

# COMISIÓN DEL CODEX ALIMENTARIUS



Organización de las Naciones  
Unidas para la Agricultura  
y la Alimentación



Organización  
Mundial de la Salud

# S

Viale delle Terme di Caracalla, 00153 Roma, Italia - Tel: (+39) 06 57051 - Fax: (+39) 06 5705 4593 - E-mail: codex@fao.org - www.codexalimentarius.net

Tema 9(f) del programa

CX/CF 11/5/14

Febrero de 2011

## PROGRAMA CONJUNTO FAO/OMS SOBRE NORMAS ALIMENTARIAS COMITÉ DEL CODEX SOBRE CONTAMINANTES DE LOS ALIMENTOS

5ª reunión

La Haya (Países Bajos), 21 – 25 de marzo de 2011

### DOCUMENTO DE DEBATE SOBRE LOS ALCALOIDES DE PIRROLIZIDINA (Preparado por el Grupo de trabajo por medios electrónicos dirigido por los Países Bajos)

#### INFORMACIÓN GENERAL

1. La 4ª reunión del CCCF decidió establecer un Grupo de trabajo por medios electrónicos bajo la dirección de los Países Bajos para desarrollar un Documento de debate sobre los alcaloides de pirrolizidina (AP) en los alimentos y los piensos, y las consecuencias para la salud humana, a fin de recopilar información sobre la química de los AP, su toxicidad, los métodos de análisis de que se dispone, presencia en las plantas, alimentos y piensos, y transferencia de los piensos a los alimentos.
2. El grupo de trabajo por medios electrónicos fue establecido y sus miembros son: Apimondia, Australia, Brasil, la Unión Europea, la FAO, Francia, Alemania, Hungría, Indonesia, Japón, Jordania, Nueva Zelandia, Suecia, Suiza y Togo (véase el Anexo VII). Se han recibido observaciones de Apimondia, Australia, Brasil, la FAO, Francia, Alemania, Japón, Nueva Zelandia y Suiza. Se ha preparado un documento de debate siguiendo las instrucciones del CCCF para su contenido. Al documento se le ha añadido también información sobre prácticas de gestión.

#### INTRODUCCIÓN

3. Los alcaloides de pirrolizidina (AP) son toxinas que se encuentran de forma natural en una amplia variedad de especies de plantas. Los AP son probablemente las toxinas naturales de mayor distribución, que afectan a la fauna silvestre, el ganado y el ser humano. Los brotes de toxicidad en animales de granja provocan graves pérdidas económicas para los granjeros y comunidades rurales, y existen posibles riesgos para el ser humano por la ingesta de alimentos de origen vegetal o animal contaminados con AP. Los casos de envenenamiento humano directo están bien documentados, como en el empleo directo y deliberado de especies de plantas tóxicas, como té de hierbas o medicinas tradicionales, que en algunos casos han provocado la muerte. El consumo de cereales o productos de cereales (harina o pan) contaminados con semillas que contienen AP también ha intervenido en brotes de envenenamiento, que han afectado a poblaciones rurales en Afganistán, la India y Sudáfrica, y la anterior URSS. No se conocen casos citados de envenenamiento debido a productos de origen animal que contengan AP (OMS 1988, FAO, 2010).
4. La FAO (2010) señaló que las principales familias de plantas que contienen AP son las *Asteraceae* (*Compositae*), las *Boraginaceae* y *Fabaceae* (*Leguminosae*). De las *Asteraceae*, los géneros de *Senecio* y *Eupatorium* son los más conocidos que contienen AP, mientras que la mayoría de los géneros de las *Boraginaceae* que se sabe que contienen AP son, p.ej., especies de *Heliotropium* o *Echium*. De las *Fabaceae*, el género *Crotalaria* alberga la mayoría de las especies que contienen AP. Las expectativas son que más de 6 000 especies de plantas contengan AP, si bien el envenenamiento directo del hombre y los animales parece estar asociado solamente con unas pocas especies. El envenenamiento producido por estas toxinas está asociado con daño crónico y agudo del hígado, en algunos AP con hipertensión arterial

pulmonar (en animales), y pueden provocar la muerte. En el ANEXO I del presente documento se presenta una lista de plantas con sus nombres comunes que contienen AP, basada en referencias encontradas.

## QUÍMICA DE LOS AP

5. Los AP son compuestos heterocíclicos y la mayoría de ellos se deriva de cuatro bases necina:

retronecina, heliotridina, otonecina y platinecina; los AP del tipo platinecina se consideran no tóxicos (Hartmann y Witte, 1995, véase también la figura 1). La retronecina y heliotridina son diasterómeros en la posición C7. Se conocen más de 350 estructuras diferentes de AP en aminas terciarias (Hartmann y Witte, 1995). La mayoría de los AP que se dan de forma natural en las plantas son necinas esterificadas o N-óxidos de alcaloides (excepto los alcaloides del tipo otonecina), mientras que los AP no esterificados son menos frecuentes en las plantas (como en *Crotalaria medicaginea* y *Crotalaria aridicola* australianas, cuyos nombres comunes se desconocen). Los ésteres pueden dividirse en monoésteres, diésteres no-macroscíclicos y diésteres macroscíclicos de una base necina. Los diésteres macroscíclicos se encuentran con mayor frecuencia en especies de *Senecio* (que incluye la hierba cana) y *Crotalaria* (que incluye el alacrancillo). Los AP encontrados en las especies *Eupatorium* y *Boraginaceae* son en general del tipo mono y diéster (Hartmann y Witte, 1995).

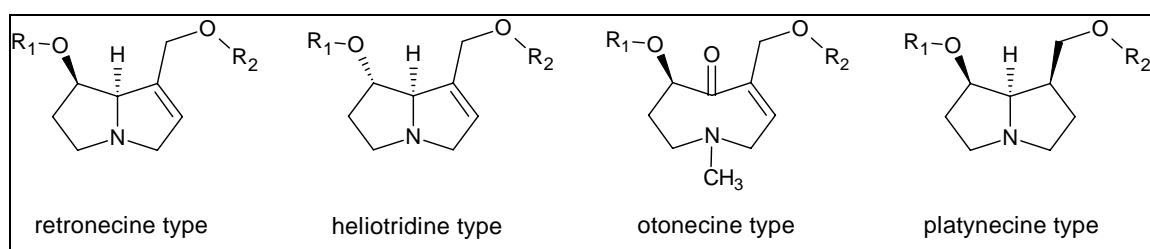


Figura 1: estructura básica de los cuatro tipos de base necina que se encuentran en la gran mayoría de los alcaloides de pirrolizidina. Los AP del tipo retronecina, heliotridina y otonecina son tóxicos, los AP del tipo platinecina se consideran no tóxicos (Hartmann y Witte, 1995).

6. Los requisitos estructurales mínimos para la toxicidad son:

1. un anillo de  $\Delta^3$ -pirrolina (3,4-didehidropirrolidina);
2. un grupo de hidroxilo o preferiblemente dos, cada uno unido al anillo de pirrolina a través de un átomo de carbono;
3. al menos uno de los hidroxilos está esterificado;
4. la mitad ácida tiene una cadena ramificada (Autoridad Alimentaria de Australia y Nueva Zelandia, 2001)<sup>1</sup>.

7. En general se puede decir que los AP macroscíclicos son más tóxicos que los AP diésteres, que a su vez son más tóxicos que los AP monoéster. Las enzimas del hígado pueden convertir el anillo otonecino de los AP del tipo otonecino en un anillo de retronecina a través de N-demetilación oxidativa.

## REGULACIÓN DE LOS AP EN LOS ALIMENTOS Y PIENSOS

8. Las normas para el control de los AP se concentran en el control de las plantas tóxicas y partes de las plantas. La situación normativa con respecto a los AP en los alimentos y piensos ha sido resumida por la FAO (2010) y Kempf *et al.* (2010). A continuación se exponen específicamente las normas vigentes y recomendaciones.

### CODEX ALIMENTARIUS

9. Para cereales y legumbres, el Codex Alimentarius señala que las semillas tóxicas en el trigo no estarán presentes en cantidades que representen un peligro para la salud y menciona específicamente la presencia de crotalaria. Esas normas son (FAO, 2010):

- Maíz CODEX STAN 153-1985

<sup>1</sup> El 1 de julio de 2002 la Autoridad Alimentaria de Australia y Nueva Zelandia (ANZFA) se convirtió en Normas Alimentarias de Australia y Nueva Zelandia (FSANZ).

- Determinadas legumbres CODEX STAN 171-1989
- Sorgo en grano CODEX STAN 172-1989
- Trigo y trigo duro CODEX STAN 199-1995
- Avena CODEX STAN 201-1995

### **Australia**

10. En Australia consuelda (*Symphytum* spp.) está en el Apéndice C (sustancias distintas a las que figuran en la Lista 9, de tal peligro para la salud que se aprueba la prohibición de venta, suministro y utilización) de la Norma de Sustancias Venenosas de 2010, para utilización terapéutica o cosmética, excepto para uso dermal, para lo cual está incluida en la Lista 5 de la Norma para Sustancias Venenosas (DOHA, 2010).

11. El *Código Conjunto sobre Normas Alimentarias (ANZJFSC)*, que es de aplicación tanto para Australia como para Nueva Zelanda, enumera las especies de plantas que contienen AP bajo la *Lista 1: "Plantas y hongos prohibidos"* de la norma 1.4.4. Las plantas más importantes son las siguientes: *Borago officinalis*; *Crotalaria* spp; *Echium plantagineum*; *Echium vulgare*; *Heliotropium* spp; *Senecio* spp; *Symphytum asperum*; *Symphytum officinale*; y *Symphytum x uplandicum*. No se añadirá intencionadamente a los alimentos ninguna planta ni hongo, ni parte ni derivado de ninguna planta ni hongo que se enumera en la Lista 1, ni ninguna sustancia de los mismos, ni se ofrecerá a la venta como alimento.

12. Hay también distintas normas estatales australianas que establecen un límite para semillas de *Heliotropium* spp; *Echium* spp; *Amsinckia* spp; y *Crotalaria* spp en los piensos.

13. En 2001 las Normas Alimentarias de Australia y Nueva Zelanda (FSANZ) establecieron una ingesta diaria tolerable provisional (IDTP) para los AP de 1 µg/kg de pc por día. En 2004 FSANZ aconsejó a los procesadores de miel de Australia/Nueva Zelanda que prosiguieran con su práctica de mezclar mieles que provienen principalmente de buglosa o flor morada (*Echium plantagineum*) con otras mieles para reducir los AP a un nivel inocuo (FSANZ, 2004).

### **Austria**

14. En Austria solamente están autorizadas unas pocas plantas que contienen AP como remedios de hierbas. Esas plantas o preparaciones de ellas solamente pueden comercializarse si son analizadas mediante un "... método avanzado de detección" que demuestre que "... el producto final no contiene alcaloides de pirrolizidina." (Bundesgesetzblatt, 1989, según citado por Kempf *et al.*, 2010).

### **Bélgica**

15. En Bélgica el uso de borraja (*Borago oSfficialis*) en los alimentos está prohibido. El aceite de borraja puede utilizarse en suplementos alimenticios si puede demostrarse que está exento de AP, utilizando un método adecuado de detección con suficiente LOD (Real Decreto, 1997). Recientemente se aprobó el nivel máximo de 1 µg/kg como está regulado en los Países Bajos, pero el método de detección y LOD deben indicarse también.

### **Canadá**

16. Sanidad de Canadá ha aconsejado a los consumidores canadienses no utilizar ni ingerir consuelda (*Symphytum officinale*) ni ningún producto sanitario que contenga consuelda. Como precaución se aconseja a los consumidores no aplicar localmente a la piel abierta productos que contengan consuelda. Estos consejos son de aplicación tanto para productos aprobados como no aprobados (Sanidad de Canadá, 2003).

### **UE**

17. La UE ha regulado los alcaloides en los piensos fijando un contenido máximo de 3 000 mg de semillas de malas hierbas y frutos no molidos ni triturados que contengan alcaloides, glucósidos u otras sustancias tóxicas y frutas/kg en el total de piensos (relativos a un producto de pienso con un contenido de humedad del 12 %). El contenido máximo relacionado con *Crotalaria* spp. es 100 mg de semillas/kg del total de pienso (UE, 2010).

### Alemania

18. Desde 1992 los productos fitofarmacéuticos que contienen AP están regulados en una Ordenanza Farmacéutica Federal. Según esa norma solamente se pueden comercializar unas pocas plantas que se ha probado que tienen AP activos y preparaciones de las mismas, que se indican por el nombre. Con respecto al contenido de AP se establecieron los límites siguientes: en la ingesta habitual oral la cantidad total de AP 1,2-insaturados (incluyendo los n-óxidos de los AP (NOAP)) no debe exceder de 1 µg al día. Si la aplicación es superior a 6 semanas, el límite se reduce a 0,1 µg al día. Además en el envase de los productos que se utilizan por vía oral se debe insertar el aviso "no utilizar durante el embarazo o la lactancia" (Bundesgesundheitsamt, 1992, citado por Kempf *et al.* 2010).

### Japón

19. En Japón la comercialización de consuelda (*Symphytum* spp.) y sus productos está prohibida conforme al Artículo 6.2 de la Ley de Sanidad Alimentaria. La decisión de prohibir la venta de toda consuelda y alimentos de consumo que contengan consuelda fue adoptada por el Ministerio de Sanidad, Trabajo y Bienestar en junio de 2004 por precaución, debido a incidentes de efectos adversos señalados en el extranjero.

### Nueva Zelanda

20. El *Código sobre Normas Alimentarias de Australia y Nueva Zelanda (ANZFSC)* regula tanto para Australia como para Nueva Zelanda los contaminantes de los alimentos descritos bajo el capítulo de Australia.

### Países Bajos

21. En los Países Bajos los AP están regulados para preparaciones de hierbas o extractos de hierbas. El contenido total de AP (incluidos NOAP) de estos productos no debe exceder de 1 µg/kg ó 1 µg/L, respectivamente (Decreto sobre productos para preparados de hierbas, 2001). En el Anexo del citado decreto se presenta una lista general de todas las plantas y hongos que se supone que contienen AP.

### Sudáfrica

22. El Ministerio de Agricultura, **Bosques y Pesca de Sudáfrica reiteró en 2008 que** la venta de consuelda (*Symphytum* spp.) como alimento había sido prohibida por las Normas relativas a la Prohibición de la Venta de Consuelda, Productos Alimenticios que contienen Consuelda y Dulces de Jalea que Contiene Konjac, publicadas en la Gaceta Gubernamental el 10 de octubre de 2003, para prohibir el uso de consuelda como alimento (DAFF, 2008). En aquel momento se estaban desarrollando normas para los productos que contienen consuelda que se afirma que tienen propiedades medicinales.

### Suiza

23. En Suiza están en vigor las mismas normas para productos fitofarmacéuticos que en Alemania. (Ordenanza sobre productos medicinales de hierbas y productos complementarios (SR 812.212.24), Anexo 6; [http://www.swissmedic.ch/produktbereiche/00445/00454/index.html?lang=en&download=NHzLpZeg7t.lnp6I0NTU042I2Z6ln1ad1IZn4Z2qZpnO2Yuq2Z26gpJCDdIR3gGym162epYbg2c\\_JjKbNoKSn6A--](http://www.swissmedic.ch/produktbereiche/00445/00454/index.html?lang=en&download=NHzLpZeg7t.lnp6I0NTU042I2Z6ln1ad1IZn4Z2qZpnO2Yuq2Z26gpJCDdIR3gGym162epYbg2c_JjKbNoKSn6A--)).

### Reino Unido

24. De forma similar a la norma alemana para remedios herbáceos, en el pasado en el Reino Unido la consuelda (*Symphytum* spp.) y preparaciones de ella estaban prohibidas (Kempf *et al.*, 2010, no se han encontrado referencias originales).

### EE.UU.

25. La Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) publicó en 2001 una carta para la industria en que comunicaba la preocupación sobre la inocuidad de productos suplemento que contienen consuelda (*Symphytum* spp.) debido a sus AP. El FDA recomendó también que las empresas detuvieran de inmediato la comercialización de suplementos que contengan consuelda y avisaran a los consumidores para que dejaran de utilizar los productos. Por último, el FDA instó a los fabricantes a identificar y comunicar todo acontecimiento adverso, incluidos trastornos de hígado que se hubieran asociado con consuelda y otros ingredientes que contengan AP (FDA, 2001).

26. En los Estados Unidos los animales llevados al matadero que muestran signos de enfermedades relacionadas con AP son desaprobados y no se permite que entren en el suministro de alimentos (USDA, 2007).

## ISO

27. Además de estas normas/recomendaciones, ISO ha puesto en práctica una condición para los AP: la Especificación ISO para el trigo permite que las semillas contengan un máximo de 0,05 % de AP y ofrece un método de ensayo para semillas tóxicas en muestras de trigo para el consumo humano (ISO, 2000, citado por la FAO, 2010). Esa tolerancia parece ser próxima al límite de determinación del método.

## TOXICIDAD

28. En este capítulo se han resumido por tema evaluaciones del IPCS y otros órganos de evaluación de riesgos. Además se resumen estudios que se han puesto a disposición recientemente para dar una visión general de la información fuera del ámbito de aplicación de este documento de debate con respecto a las evaluaciones de riesgos anteriores. La validez de dichos estudios se evaluará por separado, lo cual es una labor de evaluación de riesgos y por tanto fuera del ámbito de aplicación de este documento de debate.

### Toxicidad aguda

29. El IPCS (OMS, 1988) concluyó que "en el hombre, el envenenamiento por AP se manifiesta normalmente como una enfermedad veno-oclusiva (VOD) aguda caracterizada por un dolor continuo sordo en la parte superior abdominal derecha, ascitis con rápida acumulación de líquido dando lugar a distensión abdominal pronunciada y a veces asociada con oliguria y efusión pleural masiva. También puede manifestarse como enfermedad subaguda con síntomas imprecisos y hepatomegalía persistente. Los niños son especialmente vulnerables. Muchos casos progresan a cirrosis y en algunos casos se ha demostrado que un sólo episodio de enfermedad aguda progresa a cirrosis, pese a que se ha eliminado del paciente la fuente de exposición tóxica y se le ha administrado tratamiento sintomático. La mortalidad puede ser elevada debido a insuficiencia hepática en la fase aguda o hematemesis por varices esofágicas quebradas producidas por cirrosis.

30. El IPCS (OMS, 1988) y el COT (2008) enumeraban los valores LD50 disponibles de varios AP en las ratas tras inyección intraperitoneal (ip). Los valores LD50 orales no están disponibles. Pese a que la pertinencia de la inyección ip para la exposición oral es baja, esos valores LD50 de ip se presentan a continuación en el Cuadro 1. Los LD50 de ip indican que entre los AP hay una gran diferencia en cuanto a toxicidad aguda cuando se administran por inyección ip, si bien cabe señalar que entre distintas clases de ratas se han indicado diferencias importantes en la susceptibilidad a los AP.

*Cuadro 1: valores LD50 de varios AP en ratas tras inyección intraperitoneal (OMS, 1988, COT, 2008)*

AP	LD50 (mg/kg)
Equimidina	200
Equinatina	350
Europina	>1 000
Heleurina	140
Heliosupina	60
Heliotrina	300
Heliotridina	1 200
Intermedina	1 500
Jacobina	77 (ratones)
Jaconina	168 (ratas hembra)
Lasiocarpina	77
N-óxido de lasiocarpina	547
Licopsamina	1 500
Monocrotalina	175
Retrorsina	34
N-óxido de retrorsina	250
Riddelliina	105 (ratones)
Senecionina	50 (citado también como 85)

Senecifilina	77
Senkirkina	220
Espectabilina	220
Supinina	450
Simfitina	130 (citado también como 300)

31. A fin de determinar si una única dosis elevada o pequeñas dosis repetidas pueden producir envenenamiento y evaluar si mediante dosis reiteradas más pequeñas, con el tiempo podría producirse resistencia, Anjos *et al.* (2010) investigaron los efectos tóxicos de las semillas de cascabelillo fétido (*Crotalaria retusa*, que contiene 6,84 % de monocrotalina) en las ovejas. Comprobaron que las ovejas son muy susceptibles a la intoxicación aguda (y crónica) tras una sola dosis de aproximadamente 205 mg de monocrotalina/kg. Por otra parte, las ovejas que ingirieron dosis no tóxicas de 136,8 mg/kg al día se volvieron resistentes a las dosis tóxicas de 273 mg/kg y 342 mg/kg. En base a otros estudios los autores sugirieron como posibles explicaciones de esa resistencia que la producción del metabolito dehidromonocrotalina por enzimas microsomales podía reducirse, o que la desintoxicación de AP por microbios del rumen podía aumentar. Los autores señalaron también que las ovejas pueden adquirir resistencia mediante una rápida adaptación de los microbios ruminales a la monocrotalina que se metaboliza.

### Toxicidad crónica

#### Declaraciones sobre toxicidad crónica

32. Con respecto a toxicidad crónica, el IPCS (OMS, 1988) concluyó que la "megalocitosis, presencia de hepatocitos agrandados que contienen grandes núcleos hiperromáticos, es un rasgo característico de la hepatotoxicidad crónica inducida por alcaloides de pirrolizidina en animales experimentales". Los hepatocitos agrandados se producen por la poderosa acción antimiótica de los metabolitos de pirrol de alcaloides de pirrolizidina. Este cambio no se ha observado en el hígado humano, si bien los cultivos *in vitro* de células de hígado fetales humanas se agrandan cuando se exponen a los AP, indicando susceptibilidad al efecto antimiótico de los alcaloides.

33. El IPCS concluyó que en el ser humano una ingesta diaria de AP tan baja como el equivalente a 0,01 mg/kg de heliotrina puede producir enfermedad. A tal efecto se basó en datos de Ridker *et al.* (1985), que indicaban que 0,015 mg/kg de equimidina y alcaloides afines (equivalente a 0,009 mg/kg de pc/día de heliotrina utilizando los datos de LD50) producían envenenamiento por consueña. Además, si se expresa desde el punto de vista de dosis equivalentes de heliotrina, las dosis totales estimadas en los brotes conocidos o indicaciones de casos variaban entre 1 mg/kg y 167 mg/kg de pc. Al comparar estas cifras con la dosis letal total de varios AP en las ratas, el IPCS señaló que esto podría parecer indicar que el hombre es notablemente más sensible al envenenamiento por AP que las ratas. No obstante, señaló que "cabe observar que esas estimaciones están basadas en datos globales limitados y una serie de supuestos, y por tanto su fiabilidad es insegura". Con todo, se recomendó minimizar la exposición cuando fuera posible (OMS, 1988).

34. ANZFA (2001) concluyó que el órgano objetivo para la toxicidad de los AP, tanto en animales experimentales como en el ser humano, es el hígado. En los animales esa toxicidad se manifiesta como actividad antimiótica que da lugar a fibrosis general, regeneración nodular, parenquima y cáncer, mientras que en el ser humano los principales efectos son daño hepatocelular, cirrosis y enfermedad veno-oclusiva. Propuso una ingesta diaria tolerable de 1 µg/kg al día en base a la enfermedad veno-oclusiva de hígado como el principal efecto toxicológico de la exposición crónica. Según ANZFA, "los datos disponibles sobre casos de enfermedad veno-oclusiva en el ser humano señalan que se puede establecer un nivel sin efectos observados (NOEL) provisional de 10 µg/kg de pc/día. Si a ese NOEL se le aplica un factor de incertidumbre de 10 para explicar la variabilidad humana, la ingesta diaria tolerable provisional (IDTP) de AP para el ser humano es 1 µg/kg de pc/día". Una caracterización ulterior del potencial de riesgo para la salud humana por la exposición a los AP en los alimentos no se consideró posible debido a la insuficiente información sobre la exposición alimentaria.

35. En 2007 la EFSA concluyó que los principales síntomas de toxicidad observados en animales comprenden varios grados de daño progresivo del hígado y enfermedades veno-oclusivas asociadas con un efecto directo de los metabolitos tóxicos en las células endoteliales. Además se señaló con regularidad proliferación de vías biliares, megalocitosis hepática y fibrosis de hígado, daño renal, hipertensión pulmonar e hipertrofia cardíaca secundaria en el ventrículo derecho (solamente en un reducido número de AP), así

como pérdida de peso, anorexia y depresión. En el ser humano se señaló que el punto de valoración más sensible de la toxicidad de AP es enfermedad veno-oclusiva. Además indicó que se habían observado diferencias importantes en la sensibilidad a los AP de una especie específica. Es decir, generalmente se reconoce que los roedores, así como los cerdos, las aves, el ganado y los caballos son muy sensibles a intoxicación por AP, mientras que las ovejas, las cabras y los conejos no lo son (EFSA, 2007).

36. El Instituto Federal de Evaluación de Riesgos (Bundesinstitut für Risikobewertung, BfR, Alemania) realizó en 2007 una evaluación de riesgos del senecio común (*Senecio vulgaris*) como contaminante de mezclas para ensalada. Señaló que casos de envenenamiento habían mostrado que los AP pueden producir daño en el hígado mortal en el ser humano y los animales. En base a una evaluación de la exposición se concluyó que no podía descartarse daño agudo en el hígado a medio plazo debido a la ingesta de mezcla para ensalada contaminada con senecio común. Indicó que en base a los datos disponibles no había podido determinarse un tamaño de porción por debajo del cual los AP genotóxicos 1,2-insaturados no constituyen un riesgo para la salud y por tanto tampoco había podido derivarse una ingesta tolerable. Como medida preventiva, la ingesta de AP debería evitarse todo lo posible. Para un adulto de 60 kg de peso, la ingesta a largo plazo supondría una estimación de 220 µg a 349 µg de AP insaturados al día y por tanto excedería considerablemente la ingesta diaria tolerada de 0,1 µg de AP 1,2-insaturados para los productos medicinales sin indicaciones terapéuticas o sin restricción de ingesta a 6 semanas. La posible ingesta de AP insaturados a través de otros alimentos no se tuvo en cuenta debido a falta de datos, pero aconsejó realizar un examen del posible aumento de la exposición de los consumidores a AP insaturados que podía entrar en alimentos como la miel, la leche, la carne y los huevos a través de los piensos (BfR 2007a).

37. El Comité sobre Toxicidad del Reino Unido (COT, 2008) concluyó que se sabía que los AP producen enfermedad veno-oclusiva en el ser humano. Concluyó que no cabía esperar que 0,1 µg de riddelliina/kg de pc/día diera lugar a efectos no cancerígenos. Habida cuenta que no se disponía de estudios fidedignos en el ser humano, derivó dicho valor de NOAEL de 0,01 mg/kg de pc/día para citomegalia de los hepatocitos en las ratas, resultante de la exposición oral a riddelliina (NTP, 2003), y aplicando factores de incertidumbre de 10 para la variabilidad entre especies y 10 para variabilidad en una especie. Señaló que la proporción de valores LD50 podía utilizarse para convertir otros AP a equivalentes de riddelliina a fin de compararlos con esa dosis. Asimismo concluyó que no es probable que los AP en la leche sean una preocupación para la salud humana, y que se necesita más información sobre los niveles de AP en los cereales y la miel. Al no disponer de datos sobre concentraciones de AP en los cereales, huevos o carne en el mercado del Reino Unido no pudo llevarse a cabo una evaluación de la exposición de los consumidores del Reino Unido a estos alimentos (declaración de COT, 2008).

38. En 2005 el Instituto Nacional para la Salud Pública y Medio Ambiente de los Países Bajos (RIVM) concluyó que los efectos tóxicos de los AP se manifiestan generalmente en el hígado, pero también en los pulmones y los riñones, y son un resultado de las propiedades reactivas de los metabolitos de pirrol. Calculó una ingesta diaria tolerable (IDT) para efectos no cancerígenos para riddelliina de 0,1 µg/kg de pc al día, basada en un NOAEL para lesiones neoplásicas en las ratas de 0,01 mg/kg por día (NTP, 2003), utilizando un factor de incertidumbre de 100. La Autoridad sobre Inocuidad Alimentaria y Productos para Consumidores de los Países Bajos (VWA) concluyó en 2007 que los altos consumidores con una ingesta prolongada de tipos de miel con altos niveles de AP tenían un riesgo elevado de desarrollar cáncer y posibles efectos agudos. No obstante, indicó que se desconocía en qué medida se produce realmente esa situación, y concluyó también que cuando los consumidores de miel consumen distintos tipos de miel no hay un riesgo extra de cáncer.

39. A continuación se presenta en el Cuadro 2 una lista de los valores de referencia identificados para puntos de valoración no cancerígenos. En general no pudieron derivarse valores de orientación basados en la salud de alcaloides individuales debido a falta de buenos datos sobre toxicidad oral. Solamente se derivó un valor de orientación aparte basado en la salud para riddelliina. Asimismo, la disponibilidad de datos farmacocinéticos de AP y datos firmes comparativos de toxicidad animal es limitada.

**Cuadro 2: valores de referencia identificados de puntos de valoración no cancerígenos de órganos de evaluación de riesgos**

	Valor de referencia basado en la salud (HBGV)	Valor HBGV ( $\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{día}$ )	Referencia
Total AP	IDTP	1	FSANZ/ANZFA, 2001
Riddelliina	IDT	0,1	RIVM, 2005
Riddelliina**	IDT	0,1	COT, 2008
AP 1,2-insaturados	IDT	0,1* (>6 semanas) 1* (<6 semanas)	BfR, 1992

\* en  $\mu\text{g}/\text{persona}/\text{día}$

\*\* El COT concluyó que la proporción de valores LD50 podía utilizarse para convertir otros AP a equivalentes de riddelliina a fin de compararlos con esa dosis.

Estudios recientes sobre hepatotoxicidad

40. Copple *et al.* (2006) demostraron que en el hígado de ratas tratadas con monocrotalina (300 mg/kg) se producía hipoxia. Dado que esa hipoxia sucedía antes de producirse un daño importante de las células parenquimas hepáticas (CPH), esto podría indicar que la hipoxia contribuye al daño de esas CPH. La hipoxia y daño de las CPH se redujeron aproximadamente un 70% tras administrar warfarina, sugiriendo que la deposición de fibrina podría ser un factor causal en el desarrollo de la hipoxia. No obstante, como la warfarina no pudo evitar por completo la hipoxia influirán otros factores. Por otra parte un inhibidor no específico de sintasas de óxido nítrico potenció la hipoxia inducida por monocrotalina y también el daño de las CPH. Los autores señalaron que estos resultados sugieren que hay una relación entre la hipoxia y el daño de las CPH.

41. Mingatto *et al.* (2008) comprobaron que en ratas alimentadas, la monocrotalina incrementó la glicogenolisis y glicolisis, mientras que en el hígado de ratas sin alimentar redujo la gluconeogénesis y síntesis de urea. Estas alteraciones metabólicas solamente se observaron tras tratamiento previo con fenobarbital, un inductor del metabolismo, que indica que los efectos se deben a metabolitos de monocrotalina. Dado que la monocrotalina puede influir en el metabolismo hepático relacionado con la energía y por tanto en varios procesos más, los autores concluyeron que esto puede contribuir a hepatotoxicidad por monocrotalina.

42. Tang *et al.* (2007) compararon los efectos de isolina, clivorina y monocrotalina en el hígado de ratones con un inhibidor de esterasa o sin él, o un inhibidor P450. Incluso a la dosis más elevada sometida a prueba (164 mg/kg de pc durante 3 días consecutivos), la monocrotalina no tuvo efecto en el hígado de los ratones. Por otra parte la clivorina era letal a esa dosis, al igual que la isolina que ya era letal tras 2 días. Cuando el inhibidor de esterasa se administró al mismo tiempo, la isolina resultó ya letal a la dosis media (100 mg/kg de pc) y mostró efectos en enzimas del hígado incluso a la dosis más baja sometida a prueba (50 mg/kg de pc). También aumentó la toxicidad de la clivorina, mientras que la de la monocrotalina no fue afectada. En combinación con el inhibidor P450, los aumentos en las enzimas de hígado, inducidos por isolina fueron eliminados por completo o suprimidos parcialmente dependiendo de la dosis aplicada. Los autores concluyeron que esos resultados muestran que, en los ratones, la isolina es más hepatotóxica que la clivorina o monocrotalina, y que los efectos tóxicos de la isolina dependen de la activación metabólica por enzimas P450.

Toxicidad pulmonar

43. Se ha demostrado que los AP producen hipertensión pulmonar (HP) con cambios vasculares en la circulación pulmonar relacionados, tanto directa como indirectamente, en varias especies animales así como en primates no humanos. En el informe de 1988 de la OMS (OMS, 1988) se han resumido varios estudios y el informe de un caso humano. En determinadas circunstancias también puede producirse HP sin tener efectos importantes en el hígado. La monocrotalina es uno de los AP que se sabe que produce HP primaria en las ratas.



44. Recientemente Shimzu *et al.* (2008) examinaron el efecto del tratamiento con hemina en la HP inducida por monocrotalina (60 mg/kg de pc) y concluyeron que la hemina mejoraba significativamente la HP así como la inflamación pulmonar. Los autores señalaron que posiblemente fue transmitido por la inducción de hemo-oxigenasa-1 pulmonar que puede producir la atenuación de la inflamación pulmonar.

### **Cardiotoxicidad**

45. La toxicidad pulmonar puede dar lugar después a hipertrofia cardíaca del ventrículo derecho tal como describen, entre otros, Burns (1972, citado por la OMS, 1988), Allen y Chesney (1972, 1973, citados por la OMS, 1988) que comunicaron síntomas de HP y *cor pulmonale* en las ratas y primates no humanos.

46. Recientemente Akhavein *et al.* (2007) indicaron que la administración de monocrotalina (50 mg/kg) a ratas tenía un efecto cardiotoxico directo, independiente del grado de HP, tal como se demuestra por la disminución de la función del ventrículo izquierdo, miocarditis y espesamiento medial coronario arterial.

### **Genotoxicidad y carcinogenia**

47. Muchos AP pertenecientes a los AP tipo retronecina, heliotridina u otonecina muestran genotoxicidad. Ejemplos son riddelliina, retrorsina y monocrotalina (tipo retronecina), clivorina y senquirquina (tipo otonecina), y lasiocarpina y heliotrina (tipo heliotridina) (Fu *et al.*, 2007).

### **Declaraciones sobre la carcinogenia de los AP**

48. En 1998 el IPCS publicó su evaluación de los AP (OMS, 1988). Con respecto a la carcinogenia concluyó que, dado que se ha demostrado que varios AP son mutagénicos en varios sistemas de cultivos celulares y cancerígenos en animales experimentales, debería considerarse seriamente un posible riesgo de cáncer para el ser humano. No obstante, comprobó que no se disponía de información sobre seguimiento a largo plazo de seres humanos expuestos a AP y que sufran toxicidad de AP. Debido a esta falta de conocimientos, no había sido posible hacer una evaluación del riesgo de cáncer de los AP para el ser humano.

49. La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) ha evaluado varios AP. La lasiocarpina, monocrotalina y riddelliina se han clasificado como grupo 2B (posiblemente cancerígenos para el ser humano) mientras que la hidroxisenquirquina, isatidina, jacobina, retrorsina, senecifilina, senkirkina y simfitina se han clasificado como grupo 3 (no clasificables con respecto a su cancerosidad para el ser humano, IARC, 1976, 1983, 2002).

50. ANZFA (2001) concluyó que había pruebas convincentes de que la exposición crónica a AP es cancerígena en ratas y algunas especies de animales de laboratorio diferentes, pero señaló que había también informes no conocidos de cáncer en animales domesticados producidos por exposición a AP en su dieta. En base a un análisis de Culvenor (1983) de la ingesta alimentaria estimada de AP por seres humanos durante brotes comparados con el alcance de la dosis de efecto cancerígeno en las ratas, concluyó que de los brotes importantes de envenenamiento conocidos no se tenía evidencia de que los AP produzcan cáncer de hígado en el ser humano.

51. En 2007 la EFSA concluyó que los datos epidemiológicos no proporcionaban ninguna evidencia de un aumento del riesgo de cáncer en poblaciones humanas expuestas a AP. Datos de animales experimentales, en que se utilizaron concentraciones muy elevadas, señalaron la capacidad de algunos AP para producir aductos de ADN, enlaces cruzados de ADN y enlaces cruzados de proteínas-ADN, así como efectos mutagénicos y genotóxicos. Concluyeron que en ensayos con roedores se ha demostrado que varios AP son cancerígenos a dosis experimentales elevadas.

52. En 2007 el BfR reevaluó el principio de tolerancia cero de la UE para determinados compuestos y clases de compuestos en alimentos y piensos. Con respecto a la presencia de compuestos genotóxicos como ingredientes naturales de alimentos tradicionales en general, el BfR recomendó realizar una evaluación de riesgos caso por caso que pueda conducir a una recomendación de ingesta reducida de productos alimenticios especiales. Con respecto a la posible adición de ingredientes botánicos genotóxicos aislados al alimento o con respecto a contaminantes genotóxicos de origen vegetal, refiriéndose específicamente a la contaminación de la ensalada por partes de *Senecio vulgaris* que contienen explícitamente AP, generalmente recomienda aplicarles una tolerancia cero (BfR, 2007).

53. En base a un estudio de NTP de riddelliina administrada oralmente a ratas, el Instituto Nacional de Salud Pública y Medio Ambiente de los Países Bajos (RIVM) calculó una dosis virtualmente segura (DVS) de 0,00043 µg/kg de pc/día, que conduce a un riesgo incrementado de que como mucho una persona entre un millón desarrolle cáncer (RIVM, 2005). Esta DVS está basada en la dosis más baja que da lugar al desarrollo de un tumor en el estudio de NTP, que fue 1 mg/kg/día (Chan *et al.*, 2003).

54. El Comité sobre Carcinogenia de las Sustancias Químicas en los Alimentos, Productos para Consumidores y Medio Ambiente (COC) del Reino Unido examinó en 2008 la mutagenicidad y carcinogenia de 7 AP y 2 metabolitos propuestos. El COC concluyó que la riddelliina era genotóxica y cancerígena, y que sería prudente suponer que al menos parte del efecto cancerígeno se producía a través de un mecanismo genotóxico. Del mismo modo concluyó que la lasiocarpina era posiblemente un carcinógeno genotóxico y que se disponía de suficientes datos para concluir que la monocrotalina es cancerígena. Había evidencia limitada de la carcinogenia de la clivorina, petasitenina y simfitina mientras que la evidencia de la carcinogenia de la senquirquina era insuficiente. Se ha realizado un número limitado de estudios utilizando vías de administración no orales sobre los dos metabolitos, dehidroretronecina y dehidroheliotridina. Globalmente no indicaron actividad cancerígena de los metabolitos (COB, 2008, citado por COT, 2008). El Comité decidió además que un enfoque de "grupo de evaluación acumulativa", que se describe en el dictamen del Panel Científico de EFSA sobre metodologías para la evaluación de riesgos acumulativos y sinérgicos de los plaguicidas, podría ser apropiado para los alcaloides de pirrolizidina dada la evidencia de un modelo común de tumor para varios de estos compuestos (COC, 2008).

55. En su Declaración sobre Alcaloides de Pirrolizidina en los Alimentos en 2008 el Comité sobre Toxicidad (COT) del Reino Unido ratificó la recomendación del COC de evaluar todos los AP como un grupo de evaluación acumulativa utilizando el BMDL10 con un margen de exposición (MOE) adecuado, reconociendo la naturaleza preventiva de este enfoque. Un BMDL10 de 0,073 mg/kg de pc/día se derivó de un estudio de 2 años sobre la carcinogenicidad de la lasiocarpina y debería utilizarse para apreciar la exposición a todo AP. Permitiendo un MOE de al menos 10 000 indicó que no era probable que dosis de AP hasta 0,007 µg/kg de pc/día fueran preocupantes en cuanto a riesgo de cáncer. Tampoco cabría esperar que esas dosis dieran lugar a efectos no cancerígenos (COT, 2008).

56. A continuación se presenta en el Cuadro 3 una lista de los valores de referencia identificados para puntos de valoración cancerígenos.

*Cuadro 3: valores de referencia identificados de puntos de valoración cancerígenos de órganos de evaluación de riesgos*

	<b>Límite de referencia basado en la salud (HBGL)</b>	<b>Valor HBGL (µg/kg pc/día)</b>	<b>Referencia</b>
Riddelliina	DVS	0,00043	RIVM, 2005
Total AP	"no es probable que sea preocupante en cuanto a riesgo de cáncer"	0,007	COT, 2008

#### Mecanismo de carcinogenia

57. Hace tiempo que se sabe que los AP son cancerígenos para animales (OMS, 1988). Los alcaloides matriz son no reactivos químicamente, pero tras la ingesta los AP sufren metabolismo hepático dando lugar a metabolitos (geno)tóxicos. El paso crítico para la toxicidad es la formación de los derivados pirrólicos bifuncionales reactivos, 6,7-dihidro-7-hidroxi-1-hidroximetil-5H-pirrolizidina (DHP). La DHP reacciona con proteínas celulares y ADN para formar aductos de ADN, enlaces cruzados de ADN y enlaces cruzados proteínicos de ADN. Esto ha sido bien demostrado en las últimas décadas (OMS, 1988, ANZFA, 2001). Además Yang *et al.* (2001) confirmaron que la riddelliina produce tumores de hígado transmitidos por formación de aductos de ADN derivados de DHP. Es decir, la riddelliina se metaboliza por microsomas del hígado de ratas macho y hembra (más en las ratas macho que en las ratas hembra, metabolismo específicamente por CYP3A4 que se encuentra tanto en ratas como en el ser humano) para formar DHP, que, debido a su fuerte capacidad de unión al ADN, da lugar a un conjunto de ocho aductos de ADN derivados de DHP, produciendo el daño en el ADN. Asimismo obtuvieron una clara relación dosis-respuesta entre la dosis y el nivel total de aductos de ADN. En 2005 Wang *et al.* (2005b) subrayaron que los NOAP podían ser genotóxicos debido a la formación de aductos de ADN-DHP a través de conversión reductiva del compuesto parental.

## Estudios recientes sobre genotoxicidad o carcinogenia

### *Potencia genotóxica relativa*

58. Los mismos aductos de ADN derivados de la DHP inducidos por riddelliina se formaron por activación metabólica de lasiocarpina, heliotrina, retronecina, N-óxido de retronecina, N-óxido de retrorsina, N-óxido de riddelliina, monocrotalina y N-óxido de monocrotalina encontrados *in vitro* e *in vivo* por Xia *et al.* (2006), Xia *et al.* (2008), Yan *et al.* (2008) y Wang *et al.* (2005a, 2005b), pero en menor medida que riddelliina. De estos cuatro estudios se puede deducir el siguiente orden de potencia para la formación de aductos de ADN: riddelliina  $\approx$  lasiocarpina  $>$  retrorsina  $>$  monocrotalina  $\approx$  N-óxido de retrorsina  $\geq$  N-óxido de riddelliina  $>$  heliotrina  $\approx$  retronecina  $>$  N-óxido de retronecina. En el ANEXO II se dan detalles de estos estudios.

### *Potencia genotóxica relativa de materiales vegetales*

59. Se ha comprobado que el extracto de raíz de consuelda (común) (*Symphytum officinale*) presenta un potencial mutagénico comparable a la riddelliina en el hígado de ratas *in vivo* tal como señalaron Mei *et al.* (2005), Mei *et al.* (2006) y Guo *et al.* (2007). Ambos muestran un espectro mutacional similar con transversión G:C  $\rightarrow$  T:A como mutación predominante. Chou y Fu (2006) investigaron la formación *in vivo* de aductos de ADN derivados de la DHP de consuelda (*Symphytum officinale*), gordolobo (*Tussilago farfara* L.) y flor de tusilago (*Flos farfara*) en el hígado añadiéndolos a compuestos diferentes de AP que pudieran estar implicados.

### *Carcinogenia en el ser humano*

60. Tal como indican las declaraciones de los órganos de evaluación de riesgos, no se ha demostrado todavía de forma inequívoca que los AP sean cancerígenos en el ser humano. No obstante, en 1988 el IPCS señaló que esto debía examinarse muy a fondo. A continuación se resumen estudios recientes que proporcionan indicaciones sobre la posible carcinogenia en el ser humano.

61. En 2003 Xia *et al.* informaron que la riddelliina puede ser metabolizada por microsomas de hígado humano para formar DHP y N-óxido de riddelliina. Este estudio demostró también que cuando la enzima humana CYP3A4 es inhibida por el inhibidor CYP troleandomicina (TAO), la formación de DHP y N-óxido de riddelliina se reducía considerablemente. Además, los parámetros cinéticos  $V_{max}$  y  $K_m$  del metabolismo microsomal del hígado humano eran comparables a los del metabolismo microsomal del hígado en ratas. Los autores concluyeron que esto indica que en la formación de DHP en el ser humano interviene la misma enzima metabólica del hígado que en las ratas, lo cual podría ser una indicación de que pueden producirse procesos cancerígenos similares.

62. Acción enzimática similar se vio también en los estudios de Wang *et al.* (2005b) y Xia *et al.* (2006) con retrorsina, N-óxido de retrorsina, N-óxido de riddelliina, N-óxido de monocrotalina y lasiocarpina. En dichos estudios los inhibidores humanos CYP3A ketoconazol y TAO inhibieron significativamente la formación de DHP, mientras que Xia *et al.* mostraron también que el inductor CYP3A dexametasona produjo un incremento en la formación de DHP.

## **Inmunotoxicidad**

63. La dehidroheliotridina (DHH), un metabolito pirrólico, tiene una importante actividad inmunodepresora en la respuesta primaria de ratones jóvenes, cuando se inyecta ip poco antes del estímulo antigénico (Percy y Pierce, 1971, citado por la OMS, 1988). La respuesta secundaria a estímulos antigénicos, según medida por la reducción del número de células específicas del bazo sintetizadoras de anticuerpos 7S y 19S, fue suprimida cuando se administró DHH en el momento de estímulo secundario, pero no cuando se administró 24 ó 36 h. después del estímulo antigénico. Se sugirió que la dehidroheliotridina destruye o desactiva selectivamente las células que participan en las fases iniciales de reconocimiento y procesamiento de antígenos.

64. Recientemente Hueza *et al.* (2009) investigaron la inmunotoxicidad de la monocrotalina. A las ratas que se les administró 3,0 mg/kg de pc de monocrotalina mostraron disminución de la celularidad de la médula ósea, pero no afectó a ningún parámetro más, como índices esplénico y tímico. Además, se midió una reducción en la producción de óxido nítrico (NO) por macrófagos (tras 1,0 mg/kg, 3,0 mg/kg y 5,0 mg/kg de pc de monocrotalina) que según los autores podría ser un factor esencial subyacente al riesgo

incrementado de hipertensión pulmonar y respuestas inflamatorias anómalas. Si bien señalan que se necesitan más estudios para aclararlo.

### **Toxicidad reproductiva**

65. En 1988 el IPCS concluyó que se había demostrado la capacidad de los AP para cruzar la barrera placentaria en las ratas e inducir parto prematuro o muerte de las camadas. Concluyó que el embrión en el útero parecía más resistente a los efectos tóxicos de los alcaloides de pirrolizidina que el neonato y que se sabía que los AP habían pasado a través de la leche materna a los animales lactantes. El IPCS desconocía los datos sobre los efectos teratogénicos/fetotóxicos de los AP en el ser humano y por tanto no pudo evaluar el potencial de esos efectos en la exposición a AP (OMS, 1988).

66. El COT (2008) señaló en base a información proporcionada al Comité por dos centros pediátricos para el hígado que en el Reino Unido la enfermedad veno-oclusiva pediátrica es extraña y que los casos eran casi siempre atribuibles a otras causas, y por tanto no era probable que estuvieran relacionados con la exposición a los AP.

67. En la sección siguiente "informes de casos recientes en el ser humano" se describe un caso humano (Rasenack *et al.*, 2003) que indica efectos de los AP en el feto.

### **Informes de casos recientes**

68. En este apartado se resumen informes de casos que no se han incluido en evaluaciones anteriores de riesgos. Los informes de casos de intoxicaciones de animales señalan fuentes posibles de contaminación por AP y posibles especies de ganado que podrían ser pertinentes para el consumo humano de productos de origen animal contaminados.

#### Animales - ganado

69. En 12 granjas de avestruces del distrito agrícola de Pomona, 35 km al norte de Harare (Zimbabwe), se comunicó el envenenamiento de avestruces (Cooper, 2007). Entre otras plantas tóxicas, parte del envenenamiento fue producido por la ingestión de senecio de Rhodesia (*Senecio sceleratus*) que dio lugar a hemorragias cutáneas y sangrado en las membranas mucosas de la tráquea, el pericardio, diafragma y membrana interperitoneal. Además, el hígado estaba agrandado, blando e icterico, y los pulmones y cavidades torácicas y abdominales estaban llenas de un fluido claro.

70. En Inglaterra cuatro de trece caballos con acceso al mismo lote de heno mostraron síntomas de diarrea tras comer heno durante seis meses en 2007. Análisis de sangre mostraron que la actividad enzimática en el hígado de estos caballos había aumentado. Dado que los problemas de hígado están asociados con el envenenamiento por AP, se examinó el contenido de AP de muestras del lote de heno y se compararon con muestras de heno de una granja de control. Mientras en las muestras de control no se detectaron AP, las concentraciones aproximadas de AP medidas en las muestras de heno alcanzaron hasta 10 mg/kg (Crews y Andersen, 2009).

71. En Sierra Norte, Sevilla (España), fallecieron diez toros de un año de una manada de 700 animales (Moyano *et al.* 2006). Todos los animales habían pastado en la misma dehesa que contiene grandes cantidades de viborera (*Echium vulgare* 80%) y senecio común (*Senecio vulgaris* 15%), y fueron alimentados también con un ligero suplemento de heno de alfalfa. El agua potable procedía de riachuelos que discurrían por la granja. Los síntomas, datos bioquímicos y lesiones observados encontrados eran similares a los encontrados por otros autores en casos de envenenamiento bovino por AP, si bien en España no se dispone de mucha información sobre envenenamiento espontáneo bovino por *Echium* spp. o *Senecio* spp.

72. En junio de 2006 se presentó al Colegio de Veterinarios de Ontario un toro cruzado rojo de 5 años que sufría letargo 4 semanas (Walsh y Dingwell, 2007). Tras someterlo a reconocimiento físico, en el que, entre otras cosas, se señaló hinchazón abdominal ventral, el diagnóstico incluía peritonitis, efusión pericardial, parasitismo gastrointestinal e infección con *virus de la diarrea viral bovina*. Dos días después se encontró muerta en la misma granja una vaca cruzada de cara bicolor amarilla. La vaca no tenía historial previo de enfermedad, pero el propietario informó que parecía tener un letargo y depresión similares a los del toro. En base a examen post mortem, el diagnóstico fue envenenamiento por algas verde-azuladas y se enviaron muestras de varios órganos para examen histopatológico. Una segunda vaca falleció 4 días después y se envió para examen, pero no pudo ser diagnosticada. Entre tanto, los resultados del examen

histopatológico revelaron que la primera vaca había fallecido por hepatotoxicidad tóxica lo cual coincidía con alcaloidosis pirrolizidínica. La dehesa en la granja en que pastaba la manada resultó contener hierba de Santiago o senecio común (*Jacobaea vulgaris*, anteriormente conocida como *Senecio jacobaea*) en prefloración. La planta estaba extendida en las zonas bajas del pasto a una densidad aproximada de 3 a 5 plantas/m<sup>2</sup>. El toro fue sacrificado y el examen post mortem mostró en ambos animales y en otro animal que también falleció, hepatopatía y lesiones graves coincidentes con la toxicidad de los AP.

73. A principios de 2010 se produjo la muerte de 35 caballos en el centro-oeste de Queensland (Australia) (Williamson, 2010). En estos casos la necrosis hepática estaba acompañada de una respuesta inflamatoria predominantemente neutrofílica, megalocitosis hepática y regeneración nodular en algunas zonas del hígado. Esto junto con elevada bilirrubina y enzimas de hígado concordaba con la ingesta de alcaloides de pirrolizidina. Se halla en curso una investigación de las plantas responsables.

#### Ser humano

74. Desde 1974 se han comunicado varios brotes de enfermedad veno-oclusiva (VOD) en Afganistán, con el último en febrero de 2008 en el distrito de Gulran de la provincia de Herat en Afganistán Occidental (Kakar *et al.* 2010). El consumo de pan elaborado con trigo contaminado con semillas de una hierba local denominada *charmac* (*Heliotropium popovii*) parece estar muy asociado con los brotes. En el brote de 2008 se detectó heliotrina, lasiocarpina y N-óxido de heliotrina en todas las muestras de harina, encontrando niveles más altos de heliotrina en muestras de las casas de los casos comparados con los de casas sin ningún caso. Una probable fuente secundaria, si bien menor, fue el *qurut* (un producto del suero de la leche de cabras que al pastar ingieren plantas que contienen AP). En el *qurut* se encontró también heliotrina, lasiocarpina y N-óxido de heliotrina pero en una proporción inversa. También se encontró tricodesmina, si bien no presente en las muestras de *charmac*. También se investigaron muestras de agua pero su contenido de AP fue cero.

75. En China dos personas fueron hospitalizadas tras uso prolongado de decocciones orales de *Gynura segetum* (el nombre común se desconoce, 3 g/día) como medicina tradicional (Dai *et al.* 2006). Reconocimientos físicos revelaron en ambos casos ascitis y hepatomegalía. En base a biopsia hepática que reveló espesamiento de las paredes venulares hepáticas, dilación de sinusoides y necrosis de hepatocitos, se pudo establecer el diagnóstico de enfermedad veno-oclusiva (VOD).

76. En enero de 2006 una mujer de 62 años fue ingresada en un hospital en Hangzhou (China) (Dai *et al.* (2007). Presentaba distensión abdominal después de comer, hepatomegalía y ascitis. En base a resultados clínicos e histológicos, se diagnosticó HVOD. Resultó que antes de ser ingresada la mujer había ingerido durante 3 meses raíz de *Gynura* a dosis de aproximadamente 2 g/día. Cada día colocaba 3 rodajas de raíz de *Gynura* a remojo en vino de arroz y después lo cocía al vapor. Seguidamente se comía la raíz y se bebía el vino. La raíz se identificó como *Gynura segetum* (nombre común se desconoce), y en esa especie se identificaron senecifilina y AP afines (Qi *et al.*, 2009a y 2009b).

77. Trece casos con HVOD producidos por medicina tradicional china fueron analizados retrospectivamente y el análisis reveló que 11 de los 13 casos habían sido provocados por raíz de *Gynura*, a dosis entre 150 g y 1 800 g entre 10 días y 4 meses (Wang *et al.*, 2008, del resumen). Uno de los 13 casos fue producido por Qian li guang (*Senecio scandens*), una hierba china, y otro por *tea-thirsty* (no está claro a qué especie se refiere). Los principales síntomas eran distensión y dolor abdominales, ascitis, hepatomegalía e ictericia. La función del hígado resultó anormal y GGT y ALP habían aumentado. De todos los casos, 2 pacientes mejoraron después del tratamiento médico, 2 recibieron un trasplante de hígado y 5 fallecieron.

78. En noviembre de 2006 una mujer de 66 años con hipertensión arterial conocida, diabetes no dependiente de insulina, adiposidad moderada y débil insuficiencia renal fue ingresada en un hospital en Suiza debido a disnea progresiva (Györik y Stricker, 2009). Al ser reconocida se vio que presentaba taquidisnea y el análisis de gases en sangre mostró grave insuficiencia respiratoria parcial. Ecocardiografía reveló que sufría una hipertensión pulmonar moderada. Pese a amplias investigaciones, no pudo encontrarse ninguna explicación para la HP. Posteriormente, cuando se preguntó a la mujer específicamente sobre el uso de medicinas alternativas, comunicó que durante los meses anteriores a su hospitalización había utilizado una mezcla de varias hierbas para hacer té de la que había bebido entre un litro y litro y medio al día. Esas hierbas fueron comprobadas en cuanto a su relación con HP y consuelda (*Symphytum officinale*) y pese a que no se ha demostrado, los autores creen que la HP fue posiblemente producida por el uso prolongado de

grandes cantidades de remedios de hierbas hervidas que contienen consuelda. No obstante, la mujer se negó a dejar de utilizar las hierbas como ingrediente para el té y en marzo de 2008 fue hospitalizada de nuevo con grave insuficiencia cardíaca derecha. Tras ser sometida a tratamiento, se le pudo dar de alta.

79. Cien kilómetros al suroeste de Johannesburgo, unos gemelos de un mes fueron ingresados en el hospital con un historial de tres semanas de heces sin color, orina oscura y distensión abdominal gradual (Conradie *et al.* 2005). A ambos gemelos se les había administrado medicina tradicional. Ultrasonografía mostró ascitis grave y cambios de grasa en el hígado. Biopsia de hígado confirmó VOD. Ambos gemelos fueron tratados y dados de alta. Otro par de gemelos de un mes fue ingresado en el hospital en Johannesburgo con ictericia después de administrarles un remedio tradicional 48 horas antes. Uno de los gemelos falleció en el plazo de 24 horas debido a problemas respiratorios. Una semana después, el gemelo sobreviviente mostró distensión abdominal con esplenomegalia pero no hepatomegalia. Seguidamente este niño falleció, tras lo cual una autopsia confirmó que era un caso de VOD con necrosis secundaria.

80. En ambos casos, los padres proporcionaron muestras de las medicinas tradicionales utilizadas que fueron analizadas por GC/MS. Esto reveló que ambas suspensiones de los remedios de hierbas tenían retrorsina, con niveles mucho más bajos en la muestra del caso mortal que en el del caso superviviente. Pese a que estos resultados parecen contradictorios, indicaron que al gemelo que falleció podían haberle administrado dosis más altas o más frecuentes. No se examinó ningún fluido ni órgano por no tener consentimiento.

81. Existe un informe de un caso de una incidencia de VOD en un feto humano producido por ingesta de AP por la madre. Un neonato prematuro que presentaba síntomas de hepatomegalia y ascitis nació por cesárea debido a riesgo de asfixia fetal y falleció poco después. Examen post mortem reveló enfermedad veno-oclusiva típica de envenenamiento por alcaloides de pirrolizidina. El contenido de alcaloides de pirrolizidina en el hígado fue confirmado. Análisis de una mezcla de hierbas que la familia utilizaba para cocinar reveló elevadas cantidades de los alcaloides respectivos aclarando la fuente del veneno y la relación causal. Los autores estimaron una ingesta diaria media entre 20 µg y 30 µg de AP (Rasenack *et al.*, 2003).

82. Una mujer de 55 años padecía respiración entrecortada y tos improductiva (De *et al.*, 2005). Biopsia pulmonar reveló una reacción pulmonar granulomatosa compatible con la inhalación de materias extrañas. Aproximadamente un año antes de presentar los síntomas, había retirado hierba cana negra húmeda (*no está claro a qué especie se hace referencia*) en haces para proteger a sus caballos y fue expuesta al polen maloliente podrido de la misma. En unos días desarrolló una tos seca, que posteriormente se convirtió en respiración entrecortada al esforzarse. Según los autores, este es el primer caso señalado que se sospecha que la hierba cana (*no está claro a qué especie se hace referencia*) afecta a los pulmones humanos. Se desconoce si se han investigado otras causas posibles.

## MÉTODOS DE TOMA DE MUESTRAS Y DE ANÁLISIS

### Toma de muestras

83. La distribución de la concentración de AP en los alimentos y piensos es un factor importante a considerar al tomar muestras para analizarlas. Si bien en la UE existen límites oficiales para impurezas botánicas en el pienso (que varían entre 0,01 % y 0,3 % para semillas de malas hierbas y frutos no molidos ni triturados que contengan alcaloides, Directiva 2002/32/CE), no se mencionan específicamente procedimientos de toma de muestras efectivos ni se ofrece orientación al respecto (UE, 2010). En general, cuanto mayor sea el tamaño de la muestra, mejor será su representatividad. En la toma de muestras de fluidos (véase a continuación) la posible heterogeneidad parece menos un problema.

### Análisis

84. Roeder (1999), la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2007) y recientemente Crews *et al.* (2010) han examinado métodos de análisis de los AP en los alimentos y piensos, y fluidos biológicos (leche, plasma sanguíneo, bilis, orina). La EFSA (2007) señala que pueden utilizarse varias técnicas analíticas, en particular métodos cromatográficos junto con espectrometría de masas, para detectar AP en las plantas o productos derivados de las plantas. No obstante, ninguno de esos métodos ha sido validado para el análisis de muestras (mezcladas) de alimentos y piensos. La EFSA (2007) señala también la investigación en curso sobre el uso de las técnicas ELISA. No existen métodos oficiales para la detección o determinación de AP en los alimentos y piensos, y aparentemente no hay un análisis sistemático de AP en los

cereales que entran en el suministro de alimentos (Autoridad Alimentaria de Australia y Nueva Zelanda, 2001, citado por la FAO, 2001). En la Especificación ISO para el Trigo (ISO, 2000, citado por la FAO, 2010) se da un método para la determinación de semillas tóxicas en muestras de trigo para el consumo humano. Than *et al.* proporcionan un útil examen de métodos de cribado y desarrollo de ensayos de confirmación para toxinas asociadas a las plantas en los piensos (K.A. Than, 2005, citado por la FAO, 2010).

85. Un aspecto esencial en la evaluación cuantitativa de la contaminación por AP es la limitada disponibilidad de estándares analíticos de los AP y NOAP (Raezke *et al.* 2010, Kempf *et al.*, 2011). Los resultados de la mayoría de los métodos mencionados a continuación corresponden a la suma de los resultados de compuestos individuales. Debido a la falta de estándares, el contenido total de AP se puede subestimar. Recientemente Kempf *et al.* (2008) presentaron la determinación de AP del tipo retronecina como un parámetro suma (reducido a su estructura esencial común). Zhang *et al.* (2007) describieron un enfoque similar. No obstante, estos métodos no incluyen bases otonecinas.

#### Método para la extracción de AP

86. Para el análisis de AP en (partes de) plantas y productos de hierbas, el material de la planta se suele secar al aire o congelarse, molerse y homogeneizarse. Los AP son compuestos relativamente polares con una naturaleza básica. En el pasado se ha utilizado con frecuencia extracción Soxhlet, pero requiere tiempos de extracción relativamente largos y puede dar lugar a descomposición parcial de los NOAP (Hartmann y Toppel, 1987, Hösch *et al.*, 1996). Cuando el material se extrae con disolventes orgánicos polares, como metanol, o con soluciones acuosas ácidas o mezclas de las mismas, se obtienen buenas recuperaciones de extracción de aminos terciarios de AP y NOAP (Crews *et al.*, 2010). En el ANEXO III se presenta una relación general de los métodos de extracción utilizados para AP de distintas plantas y alimentos.

#### Métodos de limpieza del extracto

87. Antes de poder analizar el contenido de AP del extracto de muestra generalmente se necesita una fase de limpieza y/o concentración. Extracción líquido/líquido (LLE) y extracción en fase sólida (SPE) son las técnicas más comúnmente aplicadas (Crews *et al.*, 2010). SPE suele utilizarse en la preparación de muestras de miel. Las columnas de intercambio catiónico fuerte (SCX) se utilizan más a menudo para captar aminos terciarios de AP y sus N-óxidos. En el ANEXO IV se presenta una relación general de los métodos de limpieza utilizados.

#### Métodos de separación y detección

##### *Cromatografía en capa fina*

88. La cromatografía en capa fina (TLC) en adsorbentes de sílice y aluminio se utiliza para análisis cualitativo (Molyneux y Roitman, 1980; Roeder 1999, Crews *et al.* 2010). El reactivo de Erlich suele utilizarse para visualizar los AP (Mattocks, 1967). Es difícil encontrar datos específicos sobre límites de detección (LOD) pero probablemente son superiores a 1 µg/g.

##### *Cromatografía de gases*

89. La cromatografía de gases (GC) en combinación con detección de ionización de llama (FID), detección de fósforo-nitrógeno (NPD) y espectrometría de masas (MS) son métodos analíticos utilizados con frecuencia (Roeder, 1999; Crews *et al.*, 2010). Ventajas de la separación por GC son la alta resolución de las columnas de GC y la disponibilidad de índices de retención y espectros de masas por impacto de electrones para un gran conjunto de AP (Witte *et al.*, 1993). Una limitación importante es que los NOAP son compuestos demasiado polares e inestables térmicamente para ser analizados por técnicas de GC. Por tanto los NOAP solamente pueden analizarse de forma indirecta mediante reducción de las aminos terciarios correspondientes. Los límites de detección son del orden de 10 ng/g y 100 ng/g. En el ANEXO V se presenta una relación general de los métodos de GC utilizados.

##### *Cromatografía líquida*

90. La cromatografía líquida (LC) en combinación con detección UV es en cierta forma dificultada por la ausencia de cromóforos en la mayoría de los AP. Ello requiere detección a longitudes de onda bajas no específicas (Crews *et al.*, 2010). Zhang *et al.* (2007) y Xiong *et al.* (2009) han efectuado derivatización precolumna de los AP para mejorar las características UV y límites más bajos de detección. La ventaja del método de Zhang *et al.* (2007) es que proporciona análisis cuantitativo del total de AP de retronecina como

un derivado común producido a partir de todos los RET-AP diferentes. Este método se puede utilizar tanto en combinación con HPLC-UV como con LC-MS.

91. Una importante ventaja de la LC en comparación con la GC es que las bases terciarias y N-óxidos se pueden analizar de forma simultánea (Hösch *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 1994). De los numerosos mono y diéster AP, se han identificado varios enantiómeros y diastereoisómeros. Pawar *et al.* (2010) indicaron una separación de los enantiómeros licopsamina e intermedina por HPLC quiral. Se comunicaron límites de detección (LOD) en extractos superiores a 100 ng/mL.

#### *Cromatografía líquida - espectrometría de masas*

92. La LC en combinación con espectrometría de masas ofrece muchas posibilidades para la separación y detección, y en nuestros días es la técnica más utilizada. Los espectrómetros de masas más utilizados normalmente son los de triple cuadrupolo (LC-MS/MS) y el tipo trampa iónica (IT) (Crews *et al.*, 2010). Las aplicaciones de MS tiempo de vuelo (ToF) son todavía relativamente escasas (Crews *et al.* 2009, 2010). La mayoría de los investigadores utiliza ionización por electrospray (ESI) positiva para generar iones para detección espectrométrica de masas. La separación de AP y NOAP se obtiene bajo condiciones cromatográficas en fase reversa (RP). Los LOD varían con la matriz y la aplicación. Los LOD varían normalmente de niveles (sub) ng/mL para detección en la leche y la miel hasta varios 100 ng/g en material vegetal. En el ANEXO V se presenta una relación general de los métodos LC-MS y referencias.

#### Métodos de cribado rápido para AP

93. Se han publicado varios estudios que describen el desarrollo de ensayos por inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA) para la detección de uno o más AP. Roseman *et al.* (1992) desarrollaron un competitivo ensayo ELISA para retronecina (como ensayo de clase específico para AP). El ensayo se utilizó para el análisis de hidrolizados alcalinos de plantas que contienen AP. Roseman *et al.* (1996) desarrollaron también un ensayo ELISA para retrorsina, que mostraba un LOD en el nivel sub-ng/pocillo para retrorsina y N-óxido de retrorsina. Langer *et al.* (1996) desarrollaron un sensible ensayo ELISA competitivo para senecionina. El ensayo mostraba reactividad cruzada para integerrimina y senecifilina. El LOD para senecionina fue 23 pg/pocillo (equivalente a 0,45 ng/ml en el extracto de la muestra diluida). Lee *et al.* (2001) desarrollaron dos ensayos ELISA diferentes para riddelliina. El primero mostró reactividad cruzada con respecto a otros AP del tipo senecionina, como senecionina, retrorsina, senecifilina con LOD del orden de 18 pg/pocillo - 110 pg/pocillo (0,36 ng/ml - 2,2 ng/ml). El segundo ensayo mostró una buena reactividad cruzada con respecto a N-óxido de riddelliina, senecifilina y N-óxido de senecifilina, con LOD del orden de 30 pg/pocillo - 530 pg/pocillo (0,6 ng/ml - 10,6 ng/ml). El ensayo se utilizó para analizar la riddelliina en sangre de bovinos y material vegetal. El LOD obtenido en el plasma para riddelliina fue 25 ng/ml. Los anticuerpos monoclonales que aumentaron con respecto a retrorsina (Zündorf *et al.*, 1998) mostraron también buena sensibilidad con respecto a un conjunto de AP tipo senecionina relacionados estructuralmente. Cavallaro *et al.* (2004) desarrollaron un competitivo ensayo ELISA para heliotrina. El ensayo mostró buena reactividad cruzada para lasiocarpina, europina, heleurina y, en menor medida, N-óxido de heliotrina y N-óxido de lasiocarpina. Los LOD fueron del orden de 8 pg/pocillo - 300 pg/pocillo. El ensayo se utilizó para analizar la presencia de AP en heliotropo en muestras de trigo.

94. Una de las actividades actuales en el desarrollo de métodos para AP es el proyecto CONFIDENCE financiado por la UE. Este gran proyecto de colaboración en el ámbito de la alimentación, la agricultura y biotecnología del 7º programa marco de la CE, abarca el período 2008-2012, bajo la coordinación de RIKILT, Instituto de Seguridad Alimentaria, Wageningen (Países Bajos). El proyecto se concentra en el desarrollo de detección multi-clase, multi-analitos, rápida y sencilla, incluidos los AP. En el paquete de trabajo 4a del proyecto (alcaloides) se están desarrollando métodos de tira reactiva (dipstick) basados en anticuerpos. Para los AP, actualmente se concentra en la detección de jacobina y licopsamina en la miel y los piensos. Los anticuerpos también reaccionan cruzadamente con varios AP diferentes que, en principio, pueden detectarse también. Se espera que los prototipos de tiras reactivas se sometan ampliamente a prueba en 2011 y sean validados entre laboratorios en 2011 y 2012. El proyecto finalizará en el curso de 2012. Los ensayos con tiras reactivas son particularmente útiles para ensayos de campo. El límite de detección objetivo es 50 µg/kg.



## PRESENCIA EN LOS ALIMENTOS Y PIENSOS

95. Se cree que los seres humanos son expuestos a los AP a través de productos vegetales (principalmente productos de hierbas y cultivos contaminados), o productos de origen animal, como la miel, la leche, los huevos y despojos (ANZFA, 2001). A continuación se resumen niveles de AP y otra información sobre la presencia, recopilados para evaluaciones de riesgos. En el ANEXO VI se dan detalles de estudios recientes.

### Plantas en general

96. En general se ha señalado que el contenido de AP en las plantas varía entre 100 mg/kg y 40 000 mg/kg de peso seco, si bien el contenido más alto señalado es 180 000 mg/kg de peso seco en senecio de Riddell (*Senecio riddelli*). La cantidad de AP en una planta depende de la temporada y la ubicación. Además, varias partes de las plantas tienen niveles diferentes de AP, estando la mayoría de ellos presentes como NOAP (OMS, 1988, ANZFA, 2001). En el ANEXO I se presenta una lista de plantas con sus nombres comunes que contienen AP, basada en referencias encontradas para este documento.

### Alimentos

#### Cereales

97. Los productos de plantas que contienen AP, generalmente semillas, pueden contaminar los alimentos básicos y pueden consumirse durante largos períodos de tiempo (OMS, 1988). El IPCS no presentó datos cuantitativos.

98. La principal fuente de intoxicación por AP en países subdesarrollados son los cereales, debido a la contaminación con semillas de plantas que producen AP, incluyendo, por ejemplo, hierba cana de hojas estrechas (*Senecio inaequidens*), *Senecio ilicifolius* (nombre común se desconoce), *charmac* (*Heliotropium popovii*), verrucaria (*Heliotropium europaeum*) y especies de cascabel (*Crotalaria*) (EFSA, 2007).

99. En varios países se ha registrado contaminación importante de los productos de cereales debido a la contaminación por semillas de hierbas que contienen AP que se cultivan en el cultivo, y a fragmentos de polvo en las plantas de las mismas plantas. Los niveles de AP encontrados en varios productos de cereales en Australia varían entre <50 µg/kg y >6 000 µg/kg, pero no se ha realizado ningún análisis sistemático de los niveles en los cereales que entran en el suministro de alimentos. No se disponía de datos para indicar si en cultivos de semillas oleaginosas se dan AP (ANZFA, 2001).

#### *Estudios recientes*

100. Durante un brote de VOD en Afganistán Occidental (2008), muestras de harina de trigo tomadas de hogares utilizados como caso tenían niveles de AP de 0,16 mg/kg de heliotrina, 5,4 mg/kg de N-óxido de heliotrina y 0,045 mg/kg de lasiocarpina. Los niveles de AP en muestras de hogares de control eran dos veces más bajos que los hogares no afectados (Kakar *et al.* 2010).

101. En un estudio en Irán se determinaron cualitativa y cuantitativamente AP en muestras de trigo y harina de fincas de la provincia de Mazandaran. Senecio común (*Senecio vulgaris*) era abundante en esas fincas y se determinó que era la fuente de los AP detectados en las muestras de trigo y harina (Azadbakht y Talavaki, 2003).

#### Preparaciones de hierbas

102. El IPCS elaboró una relación general de algunas plantas que contienen (o se sospecha que contienen) AP, que la gente utiliza como medicinas de hierbas o alimentos, pero no dio información sobre el contenido de AP (OMS, 1988).

103. La exposición a AP puede deberse también al consumo intencionado de productos medicinales de hierbas, suplementos alimentarios, té de hierbas u hojas de plantas que contienen AP que se utilizan en ensaladas o de otra forma. Ejemplos son especies del género *Cynoglossum* (cinoglosa (*Cynoglossum officinale*)), *Heliotropium* (verrucaria (*Heliotropium europaeum*)), *Symphytum* (consuelda (*Symphytum officinale*)), *Senecio* spp. (senecio dorónico (*Senecio doronicum*)), hierba de Santiago (*Jacobaea vulgaris*), senecio común (*Senecio vulgaris*), *Adenostyles* spp. (*Adenostyles alliariae* (calabacera)), *Petasites* spp. (mosto pestilente (*Petasites hybridus*)), ruibarbo de ciénaga (*Petasites albus*) y *Crotalaria* spp. (cascabelillo (*Crotalaria retusa*)). La planta que más ampliamente se ha utilizado como agente terapéutico es consuelda.

No obstante, al examinar su hepatotoxicidad, el uso de consuelda en aplicaciones médicas se ha restringido en la mayoría de los países y solamente está permitido para preparaciones cutáneas locales. (EFSA, 2007).

#### Ensalada

104. En Alemania se encontró senecio común (*Senecio vulgaris*) como contaminante de una mezcla para ensalada. El BfR realizó su evaluación de riesgos utilizando la cantidad detectada de 1,7 % de senecio común en la mezcla para ensalada y un estudio en que se determinaron niveles de AP en los capítulos de senecio común. En base a la medición de los niveles de AP en capítulos de 630 µg de AP/g a 1 000 µg de AP/g de peso húmedo, se calculó que la ensalada contenía entre 10,7 µg de AP/g y 17 µg de AP/g. La incertidumbre estaba relacionada con el material vegetal, distinto a los capítulos, presente en la ensalada (BfR, 2007a).

#### Leche

105. Solamente se dispone de concentraciones de AP en la leche de experimentos de transferencia. La leche de vaca tenía niveles de AP que varían entre 0,47 mg/L y 0,84 mg/L cuando las vacas son expuestas a hierba de Santiago (*Jacobeae vulgaris*) con un contenido de AP de 0,16 % (peso seco) a un porcentaje de dosis de 10 g/kg de peso corporal al día durante 125 días (Dickinson *et al.*, 1976, citado por EFSA, 2007). La leche de cabras con el mismo régimen de dosificación tenía concentraciones medias de AP (total de AP no especificado) de 381 µg/L (225 µg/L - 530 µg/L, Dickinson, 1980, citado por la OMS, 1988). En otro experimento, la leche de cabra contenía una concentración media de 7,5 ng de AP/g de peso seco durante la exposición de las cabras a una dieta que contiene 25 % (aproximadamente 123 g/día por cabra) de hierba de Santiago desecada. El contenido de sustancia seca de la leche era de 12 %, dando lugar a un contenido medio de AP de 62,5 µg/kg de leche (Goeger *et al.*, 1982, citado por la OMS, 1988). No obstante, este estudio no menciona ninguna corrección del porcentaje de recuperación normalmente bajo de aproximadamente el 20 % de AP en la leche (EFSA, 2007).

#### Huevos

106. En huevos australianos se encontraron niveles de AP del orden de 5 µg/kg y 168 µg/kg debido a pienso contaminado (Edgar y Smith, 2000; ANZFA, 2001).

#### Carne

107. En la carne no se encontraron datos de presencia de AP y sólo se encontraron datos de experimentos de transferencia (véase el párrafo 8.2).

108. No es probable que en la carne (tejido muscular) sean detectables niveles importantes de AP no ligados libres, si bien es posible que haya presentes aductos de proteínas de AP. El metabolismo de los AP se produce en gran medida en el hígado, por tanto este órgano podría contener niveles importantes de aductos de AP frente a proteínas y ADN. No se sabe si esos aductos pueden plantear un riesgo toxicológico para el consumidor y si pueden ser liberados bajo condiciones fisiológicas o en el conducto intestinal. Se ha descrito un método analítico para la detección de aductos de AP en la sangre y el tejido del hígado (Mattocks y Jukes, 1990, 1992; Stegelmeier *et al.*, 1996), y se ha aplicado a estudios limitados de animales (véase la sección 8.2).

#### Miel

109. En los Estados Unidos de América, Deinzer *et al.* (1977) informaron de la presencia de todos los AP que contiene la hierba de Santiago (*Jacobeae vulgaris*) en la miel secretada por abejas que se alimentan de la planta. El contenido total de alcaloides estaba entre 0,3 mg/kg y 3,9 mg/kg. Se ha estimado que una ingesta media anual humana de miel (600 g) al nivel más alto de alcaloides citado podría contener menos de 3 mg de AP (Mattocks, 1986). Culvenor *et al.* (1981) y Culvenor (1983, 1985) prestaron atención al mismo peligro potencial en la miel de buglosa/flor morada (*Echium plantagenium*), una hierba que crece ampliamente en el Sur de Australia. El principal componente de los alcaloides de *Echium* spp. es equimidina, que está presente en concentraciones que alcanzan hasta 1 mg/kg. Culvenor (1983) estimó que las personas podían consumir hasta 80 g de miel al día con una ingesta correspondiente de alcaloides de 80 µg/día, si sólo se utilizaba miel de *Echium*. No se dispone de informes de toxicidad aguda en seres humanos a través de esta fuente (OMS, 1988). Es posible que exista un número pertinente todavía desconocido de plantas que contengan AP que sea de importancia para la contaminación de la miel con AP.

110. En la miel australiana se han registrado niveles de alcaloides que llegan hasta 1 mg/kg de colmenas donde las abejas se alimentaban exclusivamente de *Echium* spp. (Culvenor, 1983, citado por ANZFA, 2001). En 2004 FSANZ señaló que muestras de miel australiana tenían niveles que alcanzaban hasta 2 mg/kg de AP si bien se señaló que si se mezclaban se podía reducir sustancialmente este nivel. Los niveles más altos se encontraron en la miel de buglosa/flor morada (*Echium plantagenium*) (ANZFA, 2001).

111. En un estudio en 1994 en el Reino Unido se tomaron muestras de miel de colmenas colocadas cerca de hierba cana (*no está claro a qué especie se refiere*), o de productores de granjas y pequeños detallistas independientes. Ocho de 23 muestras de miel contenían polen de hierba cana y seis de ellas tenían niveles detectables de AP. Las dos muestras de miel con los niveles más altos eran muestras oscuras, cerosas, que se consideran insípidas y no se utilizarían para mezclarlas con otras mieles. Excluyendo estas dos muestras, el nivel más alto detectado de AP fue 0,06 mg/kg si bien no se comunicó el método utilizado para este análisis. Utilizando datos del consumo máximo de miel en cualquier momento de adultos (93 g), niños (60 g) y lactantes (32 g), los autores concluyeron que el consumo de AP de miel producida localmente no era motivo de preocupación (MAFF, 1995, citado por COT, 2008).

112. Un examen de 2002 de los AP en la miel señaló que el nivel más alto identificado de 3,9 mg de AP/kg en la miel era de senecio común (*Jacobaea vulgaris*) (Edgar *et al.*, 2002 citado por COT, 2008).

113. El estudio de Edgar *et al.* (2002) fue utilizado también por la EFSA (2007) para examinar las concentraciones de AP encontradas en la miel. En la miel derivada de senecio común (*Jacobaea vulgaris*) principalmente se encontró hasta 3,9 µg/g de AP (no corregido en cuanto a eficiencia de extracción, que se estima que es 50 % a 70 %). El nivel más alto registrado (no corregido) comunicado de AP en la miel derivada de buglosa/flor morada (*Echium plantagenium*) fue de 0,95 µg/g. Además se comprobó que los géneros que contienen plantas que producen AP representan una parte importante de todas las plantas utilizadas en la producción de miel. En Europa, la miel que procede de los siguientes géneros de plantas es importante: *Borago*, *Cynoglossum*, *Echium*, *Myosotis*, *Petasites*, *Senecio* y *Tussilago*. En países fuera de la Comunidad Europea, las plantas de los géneros *Ageratum*, *Chromolaena*, *Crotalaria*, *Eupatorium* y *Heliotropium* son también fuentes posibles de contaminación de la miel.

114. La Autoridad para la Seguridad Alimentaria y Productos de los Consumidores de los Países Bajos (VWA) analizó el contenido de AP en muestras de miel de las cuales 171 muestras eran de detallistas holandeses o de importación y 8 de colmenas colocadas deliberadamente en zonas con alta presencia de senecio común (*Jacobaea vulgaris*). De las muestras de detallistas, el 28% contenían AP a niveles entre 0,001 mg/kg y 0,365 mg/kg. Cuatro de las ocho muestras que no procedían de detallistas tenían niveles detectables de AP siendo el nivel más alto 0,010 mg/kg. Los recuentos de polen señalaron que las abejas se habían alimentado de muchas plantas diferentes y no sólo de hierba cana (VWA, 2007).

#### *Estudios recientes*

115. Muy recientemente Kempf *et al.* (2010a,b) examinaron los datos disponibles sobre presencia de AP en la miel y productos de la miel. Se detectaron AP en 17 de 55 productos comerciales de polen que fueron analizados por el método suma de parámetros HRGC-ESI\_MS (LOQ 10 µg/kg de equivalentes de retronecina, igual a aproximadamente 22 µg/kg de AP). Las concentraciones detectadas variaban entre 1,08 mg/kg y 16,35 mg/kg de equivalentes de retronecina (igual a aproximadamente 2,2 mg/kg y 35 mg/kg de AP) (Kempf *et al.* 2010a). Kempf *et al.* (2008) analizaron 216 tipos de miel recogidos en Europa y de tiendas en Internet mediante el método suma de parámetros. En 19 muestras se detectaron AP en el margen de 19 µg/kg a 120 µg/kg de equivalentes de retronecina (igual a aproximadamente 40 µg/kg y 250 µg/kg de AP). Un conjunto seleccionado de mieles de *Echium* y *Eupatorium* se analizó mediante el método suma de parámetros y con un método HPLC-ESI-MS/MS en que los AP individuales se cuantificaron (Kempf *et al.* 2011). Entre ambos métodos se halló una buena correlación.

116. Además, análisis comerciales en Alemania de 8 000 muestras de miel importada sin elaborar, (Raezke, 2010, véase el ANEXO VI), revelaron que la equimidina, licopsamina y N-óxido de licopsamina son los AP más encontrados en la miel. La cantidad media de AP en las muestras de miel sin elaborar fue de 36 µg/kg, mientras el máximo encontrado fue 3,3 mg/kg. En 4 estudios diferentes de mieles de minoristas alemanes la cantidad media de AP detectada variaba entre 9,1 µg/kg y 22,9 µg/kg, mientras el máximo encontrado variaba entre 31 µg/kg y 150 µg/kg.

## Piensos

117. El IPCS no presentó en su evaluación ninguna información sobre niveles de AP en los piensos (OMS, 1988).

118. En la evaluación de la EFSA, los datos disponibles de especies de animales de granja no permitían que se establecieran niveles de tolerancia para AP individuales en sustancias de piensos. El nivel de exposición exacto del ganado no pudo estimarse debido a la alta variabilidad en el contenido de alcaloides de las plantas, así como a la variabilidad en las dietas animales (EFSA, 2007).

### Estudios recientes

119. Mulder *et al.*, (2009) realizaron un estudio sobre la presencia de alcaloides de pirrolizidina en forraje animal producido en los Países Bajos, en el período 2006-2008. Las categorías de forraje sometidas a muestreo fueron ensilado de hierba, heno, hierba secada (artificialmente) y alfalfa. En total se analizó el contenido de AP de 147 muestras por LC-MS/MS. Se concentraron en AP típicos de hierba de Santiago (*Jacobaea vulgaris*), hierba cana de hojas estrechas (*Senecio inaequidens*) y senecio común (*Senecio vulgaris*). Para la alfalfa las cantidades detectadas de AP oscilaban entre inferiores al límite de detección (10 µg/kg) hasta 5 401 µg/kg. Las concentraciones medias oscilaban entre menos del límite de detección y 476 µg/kg. En la alfalfa se encontraron altas concentraciones de AP, con una media de 455 µg/kg, que es 30 veces o más la concentración media obtenida para el ensilado, hierba seca y heno.

120. Una comparación con muestras de plantas de referencia reveló que en la mayoría de los casos las muestras de forraje estaban contaminadas con senecio común (*Senecio vulgaris*). Sólo en dos ocasiones se obtuvieron pruebas de otras especies de hierba cana (*Senecio* spp.) presentes en el forraje. La muestra de heno contaminada contenía AP que no pudo relacionarse directamente con una de las tres especies de hierba cana incluidas en este estudio, pero parecía una especie de hierba cana afín. La muestra de hierba desecada contaminada contenía mayoritariamente una mezcla de senecio común junto con una cantidad más pequeña de hierba de Santiago (*Jacobaea vulgaris*).

### Análisis de los datos de presencia

121. Se hizo un primer análisis de las principales plantas y AP documentados en estudios, principalmente en trabajos recientes, sobre la contaminación por AP en los piensos y en las diferentes categorías de alimentos. Los resultados se resumen a continuación en el Cuadro 4. Cabe señalar que este análisis tiene en cuenta la disponibilidad limitada antes mencionada de estándares analíticos de referencia. Puede ser que hubiera también otros AP importantes de los cuales no hubo estándares de referencia (o no se utilizaron).

Cuadro 4: Plantas y sus AP observados en diferentes productos de alimentos y piensos.

Alimentos/ Piensos	Productos	Género especies vegetales	Principales AP	Referencias (selección)
Alimentos (o medicamentos tradicionales)	Remedios y tés herbales	<i>Symphytum</i> <i>Tussilago</i> <i>Senecio</i> <i>Crotalaria</i> <i>Heliotropium</i>	Acetil-licopsamina Acetil-intermedina Sinfitina Equimidina Adonifolina Monocrotalina Fulvina Senecionina Senkirina Heliotrina	Roeder, 1995 Roeder, 2000 Coulombe, 2003 Fu <i>et al.</i> , 2007 Wiedenfeld and Edgar, 2010
Alimentos	Trigo, cereales	<i>Heliotropium</i> <i>Crotalaria</i> <i>Senecio</i>	Heliotrina Lasiocarpina Europina Monocrotalina Tricodesmina Senecionina	Stewart and Steenkamp, 2001 Coulombe, 2003 Wiedenfeld and Edgar, 2010
Alimentos	Hortalizas para ensaladas	<i>Senecio vulgaris</i>	Senecionina Senecifilina Retrorsina	BfR, 2007

Alimentos	Leche	<i>Senecio jacobaea</i>	Jacolina	Dickinson <i>et al.</i> , 1976 Hoogenboom <i>et al.</i> , 2011
Alimentos	Huevos	<i>Senecio</i> <i>Heliotropium</i>	Senecionina Heliotrina	Edgar and Smith, 2000
Alimentos	Miel Polen de abejas	<i>Echium</i> <i>Cynoglossum</i> <i>Borago</i> <i>Eupatorium</i> <i>Symphytum</i> <i>Senecio</i>	Acetil-licopsamina Acetil-equimidina Senecionina Senecifilina Retrorsina	Edgar <i>et al.</i> , 2002 VWA, 2007 Kempf <i>et al.</i> , 2008 Raezke <i>et al.</i> , 2010a
Piensos	Paja, pastos, piensos compuestos	<i>Senecio</i> <i>Echium</i> <i>Heliotropium</i> <i>Crotalaria</i> <i>Amsinckia</i>	Senecionina Senecifilina Retrorsina Jacobina Erucifolina Licopsamina Equimidina Heliotrina Monocrotalina Retusamina	EFSA, 2007 Mulder <i>et al.</i> , 2009 Wiedefeld and Edgar, 2010 Fletcher <i>et al.</i> , 2011
Piensos	Alfalfa	<i>Senecio vulgaris</i>	Senecionina Senecifilina Retrorsina	Mulder <i>et al.</i> , 2009

122. La combinación de los datos arriba presentados permite formular una lista de los AP más detectados, que figura a continuación.<sup>2</sup> Cabe señalar que los AP importantes varían de acuerdo al país o región y al predominio de plantas que contengan AP. Gran parte de los datos del cuadro anterior son de Europa, lo que puede ser poco pertinente para otras regiones. Además, esta lista puede estar incompleta ya que otras regiones importantes productoras de cereales y de carne no aportaron datos. También cabe señalar que esta lista sólo se basa en la presencia y que no se tuvo en cuenta la toxicidad.

En alimentos:

Acetilequimidina  
Acetil-licopsamina  
Europina  
Heliotrina  
Jacolina  
Lasiocarpina  
Monocrotalina  
Retrorsina  
Senecionina  
Senecifilina  
Tricodesmina

En piensos:

Equimidina  
Erucifolina  
Heliotrina  
Jacobina  
Licopsamina  
Monocrotalina  
Retrorsina  
Retusamina  
Senecionina  
Senecifilina

## CONTAMINACIÓN DE LOS ALIMENTOS A TRAVÉS DE ANIMALES

### Leche

123. Casi todos los estudios de transmisión de AP desde los piensos a la leche son de hace más de 20 años. Las evaluaciones de los órganos de estimación de riesgos citan principalmente los estudios de

<sup>2</sup> Si bien en este documento de debate se incluyen las hierbas medicinales con fines informativos, esas plantas se consideran aplicaciones medicinales y, por lo tanto, quedan fuera del ámbito de trabajo del Codex y los AP correspondientes no figuran en la lista de los AP que se evaluarán.

Schoental, 1959, Dickinson *et al.*, 1976, Eastman *et al.*, 1982, Goeger *et al.*, 1982, Panter and James, 1990, y Molyneux and James, 1990.

124. El Programa internacional de seguridad de las sustancias químicas (IPCS) concluyó en 1988 que los AP se transmiten de los piensos a la leche, a partir de estudios en ratas, cabras y vacas, y que por esta vía pueden causar daños tóxicos a la cría lactante. Sin embargo, establecieron que "el grupo de acción no contó con información de casos de toxicidad aguda por consumo de lácteos contaminados" (WHO, 1988).

125. A partir de estudios de la transmisión de AP desde piensos a los tejidos comestibles de animales de granja (vacas lecheras y ovejas lactantes), es probable que no más de alrededor del 0,1% del alcaloide básico ingerido se excrete en la leche. Se sabe que los se excretan AP y NOAP en la leche de vaca, por lo tanto, la leche puede ser una fuente importante de AP cuando se obtiene de un único animal que haya ingerido cantidades considerables de AP. Debido al acopio de leche en abundancia, es poco probable que de esta fuente se produzcan exposiciones significativas. Respecto a la leche humana, se han encontrado AP durante epidemias de envenenamiento de AP y se han producido casos de enfermedad venooclusiva en neonatos y otros lactantes por esta vía (ANZFA, 2001, EFSA, 2007).

126. En un estudio realizado en el Reino Unido se analizaron 21 muestras unificadas de leche del mercado minorista. Las muestras de leche se tomaron de una zona donde se había documentado la frecuencia más elevada de intoxicación por hierba cana en el ganado en los dos años anteriores al estudio. No se encontraron senecionina, senecifilina ni jacobina en ninguna de las muestras y se concluyó que no era probable que hubiera presentes concentraciones detectables en ninguna otra parte del Reino Unido. El COT indicó que era una práctica comercial común en el Reino Unido reunir muestras de leche de todas las vacas de una granja y después también en la lechería, lo que da por resultado la dilución de los AP, si es que los hay presentes (MAFF, 1988, citado en COT, 2008).

127. En un estudio que no se utilizó en las evaluaciones de riesgos arriba citadas, se investigó la transferencia de AP radioetiquetados a la leche de vaca. Una vaca lechera recibió una única dosis oral de 1 mg/kg pc de senecifilina radioetiquetada. La concentración en sangre de senecifilina llegó a un valor máximo de 120 ng/ml en una hora (calculado por los niveles de radioactividad), se mantuvo en este margen unas 20 horas y disminuyó después rápidamente a 11 ng/ml después de 54 horas. Se observó una concentración en la leche de 11 g/ml después de dos horas y llegó a un máximo de 102 ng/ml 14 horas más tarde. A 64 horas de haberse suministrado, todavía se detectaron 5 ng/ml. El total calculado de senecifilina observado en la leche fue de 900 µg o 0,16% de la dosis suministrada. A las 16 horas, el 11,3% de la radioactividad se podía extraer como alcaloides libres y el 2,9% como óxidos de Nitrógeno. A las 27 horas, estos valores eran de 15,1% y 11,2%, respectivamente (Candrian *et al.*, 1991).

#### Estudio reciente

128. Hoogenboom *et al.* (2011) estudiaron la posible transferencia de AP desde piensos contaminados a la leche en vacas. A fin de investigar esta posible transferencia, se suministró a las vacas durante tres semanas una ración con cantidades cada vez mayores (de 50 a 200 g/día) de hierba cana seca. Se recogió la leche y se tomaron muestras dos veces al día; y dos veces a la semana de heces y orina. En la leche se encontró presencia de AP relacionada con la dosis. El principal componente observado en la leche fue la jacolina, no obstante que era un componente menor en el material de hierba cana. Prácticamente no se observaron óxidos de nitrógeno en la leche, a pesar de que representaban más de un 80% de los AP presentes en la hierba cana. Se estimó que la transferencia general de los AP sólo fue de un 0,1%, pero de 4% en el caso de la jacolina. Los autores informaron que el análisis de las muestras de heces y orina indicó que se estaba produciendo un metabolismo sustancial de los AP.

#### **Carne y órganos**

129. Se había evaluado anteriormente la posible presencia de AP y sus metabolitos en la carne de animales alimentados con materiales que contenían AP antes de la matanza (WHO, 1988, ANZFA, 2001, EFSA, 2007 y COT, 2008), y se consideró baja la posibilidad de toxicidad causada por este medio.

130. En hígados y riñones de animales domésticos para consumo humano, se encontraron concentraciones de AP (no se sabe si aductos de AP o sin ligar) de <0,010 a 0,073 mg/kg (ANZFA, 2001).

131. En el estudio de Candrian *et al.* (1991, presentado arriba bajo el subtítulo "Leche"), se sacrificó una vaca lechera 21 días después de haberle suministrado senecifilina y se examinó su hígado. La radioactividad medida correspondía a una concentración de senecifilina de 40 ng/g en el hígado fresco, que era el 0,06% de la dosis (1 mg/kg pc) o 340 µg de AP. No se midió la radioactividad del agua que se retiró (LOD = 0,5 ng/mL).

#### Estudio reciente

132. Fletcher *et al.* (2011) investigaron los riesgos que representan las plantas que contienen AP para el ganado y la calidad de la carne en el norte de Australia. Observaron diferentes especies de fabáceas (*Crotalaria* spp.), heliotropo azul (*Heliotropium amplexicaule*) y adelfilla (*Senecio bristolowensis*). Se suministró *C. novae-hollandiae* subesp. *novae-hollandiae* (no se sabe su nombre común) quemotipo 2 a terneras destetadas (110-120 kg) durante seis semanas, en dosis de 5,5 mg/kg pc/día. El total de AP observado en la sangre en general se estabilizó entre los días 7 y 28, con concentraciones de hasta 150 µg/kg. El total de AP en los músculos y el hígado fue paralelo a esta tendencia, con niveles máximos de hasta 250 µg/kg y 2 500 µg/kg, respectivamente. Además, todos los AP presentes en la planta se detectaron en los tejidos, pero en niveles variables que no reflejaban el contenido relativo de alcaloides del material vegetal. También se detectaron aductos de PA en todos los tejidos, en el siguiente orden: hígado > riñón ≈ corazón > músculo.

133. Se suministró heliotropo azul (*Heliotropium amplexicaule*) durante seis semanas a terneras destetadas, en dosis de 15 mg/kg pc/día. Los AP presentes en los tejidos estuvieron en el LOQ (límite de cuantificación) (1 µg/kg) o menos. Pero hubo aductos de AP detectables en el siguiente orden: hígado > riñón ≈ corazón ≈ músculo. También se tomaron muestras de sangre de ganado que pastaba entre plantas de heliotropo azul (*Heliotropium amplexicaule*) en propiedades participantes en un programa de control. Se detectaron trazas de indicina y heliospatina (1-3 µg/kg) en sangre entera de cuatro a 10 animales de una de estas seis propiedades. Se encontró N-óxido de indicina (2 µg/kg) en sangre entera de un único animal de otra propiedad distinta, y se observaron aductos de AP casi en todas estas muestras de sangre. El último estudio relacionado con el heliotropo azul fue con 50 bovinos de 10 propiedades en las que esta planta era considerada una plaga grave. Se encontraron trazas de aductos de AP en muestras de hígado de nueve de 10 animales de una propiedad y uno de uno de una segunda propiedad, pero no se encontraron en los hígados de los animales de otras propiedades. Los autores consideran muy probable que en zonas como éstas donde los animales están constantemente expuestos al heliotropo azul los animales se adaptarán en cierta medida, p. ej., con destrucción mayor de la toxina en el rumen y el hígado.

134. Se suministró adelfilla (*Senecio bristolowensis*) a terneras destetadas durante seis semanas, en dosis de 2,5 mg/kg pc/día. Los alcaloides presentes en la planta detectados fueron esceleratina (predominante presente como N-óxidos), esenkirina, otosenina, desacetildorinina, florosenina y dorinina. Se detectaron AP libres en la sangre y el hígado, que tendían a estabilizarse después de dos a tres semanas, con niveles de hasta 90 µg/kg en la sangre y de 400 µg/kg en el hígado, pero después disminuyeron al final de la prueba a 30 y 40 µg/kg, respectivamente. Las cantidades encontradas en los músculos siguieron una tendencia análoga. Los AP encontrados fueron todos del tipo otonecina, sin que se observaran en este tejido esceleratina ni su N-óxido, si bien este fue el AP principal que había en la planta. Se encontraron aductos de AP en todos los tejidos, en el siguiente orden: hígado > riñón > corazón ≈ músculo. Además, se hizo un estudio de residuos de AP en carne de ganado de zonas donde abundaba la adelfilla. Se encontraron concentraciones bajas de aductos de AP en el hígado del 80% de los animales estudiados, en concentraciones de alrededor de 1% a 10% del que se midió en el hígado de las terneras en el estudio de suministro.

#### **Huevos**

135. El IPCS no presentó información de posible transferencia de AP de los piensos a los huevos (WHO, 1988).

136. Tanto la EFSA (2007) como el COT (2008) examinaron un estudio turco de posible transferencia de AP de los piensos a los huevos. No se encontraron AP en los huevos de ponedoras alimentadas con hasta un 4% de una variedad oriental de hierba cana (*Senecio vernalis*). Los autores originales consideraron que podía deberse a que los residuos estuvieran por debajo del límite de detección, establecido en 0,4 mg del residuo disuelto/ml, o a que los AP estuvieran ligados a la proteína del huevo, pero observaron una reducción de la

ingestión de piensos y de la producción de huevos en los niveles de piensos de 2% y 4% (Eröksüz *et al.* 2003, citado en EFSA, 2007 y COT, 2008).

137. En otro estudio discrepante que encontró el COT (2008) se encontraron hasta 0,168 mg/kg de AP (heliotrina, europina and lasiocarpina) en huevos de gallinas a las que se había suministrado trigo contaminado con 26 mg/kg de AP (Edgar and Smith, 2000, citado en COT 2008). Como no se pudo obtener el estudio original, no se sabe si los AP estaban presentes como NOAP en los piensos y/o en los tejidos de los animales.

#### Estudio reciente

138. Eröksüz *et al.* (2008) hicieron un estudio de transferencia de AP en codornices. En total, se repartieron 160 codornices japonesas (80 machos y 80 hembras) en cuatro grupos (tres de análisis y uno de control). Los grupos de análisis recibieron una alimentación compuesta de las partes aéreas (hojas, tallos y flores) de hierba cana oriental (*Senecio vernalis*, grupo SV), *Heliotropium dolosum* (grupo HD, no se sabe el nombre común), o *Heliotropium circinatum* (grupo HC, no se sabe el nombre común) en concentraciones del 30% durante seis semanas, y al grupo de control se suministró el 0% para evaluar la toxicidad parental y progenial, junto a la transferencia de residuos de alcaloides a sus huevos. El contenido de AP en los piensos fue de 390 mg/kg en el grupo HD, 450 mg/kg en el grupo HC, y 420 mg/kg en el grupo SV. No se presentaron manifestaciones clínicas ni muerte en los grupos de análisis; pero hubo una disminución considerable de la producción y eclosión de huevos en todos los grupos de análisis, en comparación con el grupo de control. A pesar de la presencia de cambios bioquímicos e histopatológicos específicos en las codornices paternas, no se observaron cambios extraordinarios en la progenie en los días después de la eclosión 0, 10, 20, 30 o 40. El análisis con cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS) de los huevos indicó la presencia de 8,66 µg/g de AP europina en el grupo HD, 19,05 µg/g de europina y 1,46 µg/g de heliotrina en el grupo HC, y 3,21 µg/g de senecionina en el grupo SV al final del estudio. Los autores concluyeron que los resultados del estudio ofrecían la comprobación experimental de la transferencia de alcaloides a los huevos de codornices que habían recibido dosis altas de materiales vegetales que contenían AP.

#### **Miel**

139. Hay muchos datos que demuestran la presencia de AP en la miel (véase la Sección 7.3.7). El IPCS (WHO, 1988) concluyó de un caso de contaminación en gran escala que la fuente de AP en la miel eran el néctar y el polen de una hierba común que tiene un gran contenido de AP, de la que se alimentaban las abejas (WHO, 1988).

140. El número de fuentes vegetales es un factor considerable en el contenido de AP en la miel. En la miel obtenida de una sola especie vegetal la concentración de AP puede ser de muchos µg por gramo, y en particular las mieles de una flor corren el riesgo, mientras que en las de varias flores una cierta dilución reduce las concentraciones de AP en el producto final (Edgar *et al.*, 2002, citado en EFSA, 2007). Esto lo confirman los resultados sobre la miel australiana, en la que la concentración de alcaloides de hasta 1 mg/kg se han observado en colmenas de abejas que se alimentaban exclusivamente de *Echium* spp. (ANZFA, 2001).

141. El COT (2008) reseñó un proyecto T01037 financiado por la Agencia de Normas Alimentarias titulado "Recolección y análisis de muestras de miel potencialmente contaminadas de alcaloides de pirrolizidina de hierba cana y borraja". Este proyecto investigó el potencial de la contaminación de la miel por AP si las abejas se nutren de flores de borraja (*Borago officinalis*) y hierba de Santiago (*Jacobaea vulgaris*).<sup>3</sup> Si bien no fue posible cuantificar las concentraciones de AP presentes en la miel debido a la falta de estándares analíticos, se pudieron comparar entre muestras de mieles y con la cantidad de AP en un peso establecido de material vegetal. En la temporada de 2005 se tomaron muestras varias veces en seis lugares donde había hierba de Santiago o borraja. Respecto a la hierba de Santiago, se llegó a la conclusión de que incluso en condiciones desfavorables esta planta no era motivo de preocupación ya que el análisis del polen ni los resultados analíticos revelaron cantidades significativas de AP. Las mieles de lugares donde

---

<sup>3</sup> Cabe señalar que la miel producida de borraja (*Borago officinalis*) a veces se llama miel de borraja. No se debe confundir con la miel producida en Nueva Zelanda de viborera (también llamada borraja alpina, *Echium vulgare*), denominada miel de borraja, borraja azul o borraja alpina. Australia no se refiere a su miel de *Echium plantagenium* como de borraja azul, sino de buglosa o flor morada.



proliferaba la borraja revelaron conteos significativos de polen y podían relacionarse con la detección de AP (licopsamina o intermedina). No se logró una cuantificación fiable de los AP correspondientes, pero el COT indicó que "este es un proyecto preliminar para determinar si sería necesario un análisis cuantitativo ulterior para la evaluación de riesgos. Ya hay disponible en el comercio una norma para la licopsamina y la Agencia de Normas Alimentarias tiene previsto financiar otros trabajos para evaluar las concentraciones de AP en la miel de borraja" (LGC, 2007, citado en COT, 2008).

#### Estudio reciente

142. En experimentos de alimentación con abejas melíferas (*Apis mellifera*), se probó con una mezcla de AP terciarios y los N-óxidos correspondientes de hierba cana oriental (*Senecio vernalis*), monocrotalina pura y 1,2-dehidromonocrotalina en concentraciones de 0,02%, 0,2% y 2,0%. Se determinaron el metabolismo de los AP por las abejas, los efectos de disuasión y la transferencia horizontal de AP entre las abejas (Reinhard *et al.*, 2009). Las abejas no pudieron detoxificar los AP mediante N-oxidación. Se encontraron NOAP en concentraciones de >0,2%, y AP 1,2-insaturados terciarios tóxicos en concentraciones elevadas. La 1,2-dehidromonocrotalina no mostró efectos tóxicos. Se toleraron bien las concentraciones de menos de 50 µg AP 1,2-insaturados terciarios, pero otras concentraciones más altas resultaron mortales. Los autores establecieron que como en este estudio no se observaron efectos en la repelencia ni en la mortalidad en los experimentos con la alimentación de 0,2% AP, las abejas no tienen problemas con las concentraciones de AP que encuentran en su entorno (0,2% previsto en las corolas). Un experimento de transferencia horizontal indicó que las abejas que no tienen contacto directo con AP contenían aproximadamente un 4% (alimentación con 2% AP) y 15% (alimentación con 0,2%) del contenido de AP que se encontró en abejas con contacto directo con AP. Los autores concluyeron que, por lo tanto, es posible la transferencia horizontal de alimentos contaminados de AP

### **PRÁCTICAS DE GESTIÓN**

143. Para este documento de debate se hizo un estudio inicial de posibles prácticas de gestión para prevenir y reducir la contaminación de alimentos y piensos por AP. A continuación se resumen. En el Anexo VII se presentan en detalle. Cabe señalar que las prácticas de gestión que aparecen en esta sección y en el Anexo VII se concentran en las especies de hierba cana. Se contó con esta información, que se pudo reunir en el plazo limitado de este grupo de trabajo por medios electrónicos. Se presenta para indicar unas posibles medidas de gestión. Sin embargo, para tener un panorama general y completo de las posibles estrategias de riesgo, deberán recogerse prácticas de gestión para otras especies vegetales y de otros países o regiones.

144. En algunos países es obligatorio el control de la hierba de Santiago, que está legislado. En el Reino Unido, está la Ley sobre hierbas de 1959 y la Ley de control de la hierba cana de 2003; en Irlanda, la Ley sobre hierbas nocivas de 1936; en Nueva Zelanda la Ley de bioseguridad de 1993; y en Friesland, provincia de los Países Bajos, la Ordenanza de 2007 sobre la hierba de Santiago (Leiss, 2010). En Australia se han promulgado diversas leyes federales, estatales y de los territorios para control de las plantas que contienen alcaloides de pirrolizidina: la hierba de Santiago (*Senecio jacobaea*); la buglosa o flor morada (*Echium plantagineum*); la viborera (*Echium vulgare*); los heliotropos azul y común (*Heliotropium amplexicaule*, *H. europaeum*), el senecio de Madagascar (*Senecio madagascariensis*), la margarita africana (*Senecio pterophorus*), la crotalaria (*Crotalaria* spp.) y/o la amsinckia (*Amsinckia* spp., DSEWPC, 2010).

145. Las prácticas de gestión pueden constar de:

- medidas para prevenir la propagación de plantas que contengan AP, a nivel regional (principalmente para la hierba cana). Aquí es importante el conocimiento de ecología, ya que se sabe que las diferentes especies de plantas que contienen AP tienen ecologías diferentes, incluso en un género. Por ejemplo, en la evaluación de riesgos de las especies de hierba cana se mostró que la hierba de Santiago (*Jacobaea vulgaris*) más probablemente crece en pastizales dañados. El senecio común (*Senecio vulgaris*) es una hierba común de la agricultora encontrada en los cultivos de alfalfa (VWA, 2010), y como se indicó anteriormente en este documento de debate, también aparece en la lechuga (BfR, 2007a);
- medidas para prevenir el contacto de animales productores de alimentos con estas plantas, ya que los AP se transfieren de los piensos a los alimentos. Esto incluye el transporte de polen con AP por las abejas;
- prevención de la contaminación de productos alimentarios (como las hortalizas para ensaladas) con AP;
- prácticas para reducir los AP en piensos y alimentos contaminados.

146. Cabe señalar que la eficacia de estas medidas no se ha evaluado en este documento de debate ya que desbordaba el ámbito de acción de este grupo de trabajo por medios electrónicos. Se requiere un análisis completo de todas las prácticas disponibles de gestión (también para otras plantas, productos alimentarios y regiones), así como una evaluación de su eficacia. Su valor como componente de una posible estrategia de gestión de riesgos podría evaluarse entonces.

## **INVESTIGACIÓN EN CURSO**

### Métodos de muestreo y análisis

147. Como se describió en el capítulo sobre Métodos de muestreo y análisis, se están creando nuevos métodos de análisis rápido para la detección de los AP, a través del programa *Confidence*, financiado por la UE.

148. En Alemania, el BfR está creando métodos para la determinación cuantitativa de los AP en los alimentos y los piensos, dirigidos a producir datos de la presencia y a evaluar los distintos enfoques de cuantificación. El objetivo es que los métodos validados se utilicen para seguimiento.

### Datos de presencia

149. En los Países Bajos el seguimiento de los AP en los piensos será continuo y observará los AP de análogos de la licopsamina, la equimidina y la heliotrina.

150. En los Países Bajos se está haciendo un estudio de las concentraciones de AP en estudios de la dieta total. Se prevé que los resultados estarán listos en 2011.

### Contaminación de alimentos a través de los animales

151. Como se indicó en el capítulo de Transferencia, la Agencia de Normas Alimentarias del Reino Unido tiene previsto financiar más trabajos de evaluación del contenido de AP en la miel de borraja.

152. En los Países Bajos, se está haciendo un segundo estudio con vacas sobre la transferencia de AP de los piensos a la leche (fines de 2010). Se están estudiando la transferencia y el metabolismo de los AP presentes en la hierba de Santiago (*Jacobaea vulgaris*), el senecio común (*Senecio vulgaris*) y la viborera (*Echium vulgare*). Se producirán quesos con leche con metabolitos de AP para estudiar su transferencia a los lácteos.

## **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

### **Conclusiones**

#### Toxicidad

153. Los AP tienen un perfil de toxicidad común; el principal órgano que ataca la toxicidad es el hígado. Los principales síntomas de toxicidad en todas las especies animales son varios grados de daño progresivo al hígado (necrosis hepatocelular centrolobular) y la enfermedad venooclusiva. Además se documentan proliferación del ducto biliar, megalocitosis hepática y fibrosis hepática. También se observan efectos en otros órganos, como los pulmones (hipertensión pulmonar), el sistema cardiovascular (hipertrofia ventricular derecha) y lesiones degenerativas en los riñones. Se han registrado casos de intoxicación aguda en ganado y en personas y se han observado casos fatales en el ganado. Los AP pueden variar en potencia, las potencias relativas no se conocen actualmente por falta de datos sobre toxicidad oral de los distintos AP, lo que obstaculiza la evaluación de los AP.

154. Todavía hay cierto debate sobre la posible carcinogenicidad de los AP en seres humanos, el CIIC ha clasificado tres AP: lasiocarpina, monocrotalina y riddellina, como "posiblemente carcinogénicos para los seres humanos" (Grupo 2B).

155. El IPCS concluyó en 1988 que la exposición alimentaria a los AP debería ser lo más baja que fuera posible, y otros órganos de evaluación de riesgos llegaron en los años siguientes a la misma conclusión. Se han determinado sólo unos cuantos valores de referencia sanitarios, que figuran en el siguiente cuadro. Varios casos documentados recientemente sobre humanos y animales indican que hoy en día los AP siguen planteando un riesgo sanitario.

	Valor de orientación basado en la salud (HBGV)	Valor HBGV ( $\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{día}$ )	Referencia
AP 1,2-insaturados	IDT	0,1* (>6 semanas) 1* (<6 semanas)	BfR, 1992
Total de AP	IDTP	1	FSANZ/ANZFA, 2001
Riddelliina	IDT	0,1	RIVM, 2005
Riddelliina	IDT	0,1**	COT, 2008
Riddelliina	dosis inocua virtual	0,00043	RIVM, 2005
Total de AP	"poco probable que sea motivo de preocupación por riesgo de cáncer"	0,007	COT, 2008

\* en  $\mu\text{g}/\text{persona}/\text{día}$

\*\* El COT concluyó que la relación de los valores LD50 se podría utilizar para convertir otros AP a equivalentes de riddelliina para compararlos con esta dosis.

156. Los datos de la toxicidad de cada AP y su potencia relativa siguen siendo muy limitados, lo mismo que los datos de farmacocinética y toxicidad animal comparativa (especies).

#### Métodos analíticos

157. Hay disponibles varios métodos analíticos, pero la LC-MS es el método predominante de uso actual. Los límites de detección de la LC-MS comúnmente van de niveles (inferiores) ng/ml para la detección en la leche y la miel, hasta varios 100 ng/g en material vegetal.

158. La falta de disponibilidad de normas de referencia está limitando la creación y validación de métodos. Debido a la falta de estas normas, hay muchos documentos sobre equivalentes u otras normas de referencia, pero su fiabilidad no siempre es clara.

159. Se están creando métodos nuevos y rápidos. Se están generando datos nuevos sobre presencia en piensos, miel de borraja y estudios de la dieta total.

#### Presencia

160. Se ha prohibido el uso humano de plantas que contienen AP, principalmente la consuelda, ya sea en alimentos o productos medicinales. Se han establecido algunos límites máximos regionales o nacionales para los AP en productos alimentarios, 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en hierbas (Países Bajos y Bélgica).

161. Hay disponibles datos recientes de presencia de diferentes alimentos y piensos. Los alimentos que pueden estar directamente contaminados de AP son los cereales, las hortalizas para ensalada (y posiblemente otros cultivos) y los medicamentos herbales en los que se utilicen plantas que contengan AP.

162. Los productos alimentarios para seres humanos que pueden estar indirectamente contaminados son la miel, la leche, los huevos y posiblemente la carne y los despojos. Los animales que están en contacto con los AP ya sea por consumo de plantas que los contengan o por piensos contaminados (ganado) o polen (abejas), pasan los AP a sus productos. En los piensos hay límites máximos regionales para las semillas que contienen AP y que forman parte de los piensos, p. ej. de 3 000 mg (100 mg para la *Crotalaria* spp.) por kg (EU, 2010).

163. Datos experimentales y de un primer análisis de la presencia indican que los AP más detectados en los alimentos y los piensos son:<sup>4</sup>

#### En los alimentos:

Acetil equimidina  
Acetil licopsamina  
Europina  
Heliotrina  
Jacolina  
Lasiocarpina

#### En los piensos:

Equimidina  
Erucifolina  
Heliotrina  
Jacobina  
Licopsamina  
Monocrotalina

<sup>4</sup> Si bien en este documento se incluyen hierbas medicinales, con fines de información, se consideran aplicaciones medicinales y, por lo tanto, quedan fuera del ámbito de acción del Codex y los AP relacionados no figuran en la lista de AP que deberán evaluarse.

Monocrotalina	Retrorsina
Retrorsina	Retusamina
Senecionina	Senecionina
Senecifilina	Senecifilina
Tricodesmina	

164. Cabe destacar que esta lista sólo se refiere a la presencia, no se tuvo en cuenta la toxicidad. Además, influye en este análisis la disponibilidad limitada de normas de referencia analíticas. Puede haber otros AP importantes de los que no hubo normas de referencia (o no se utilizaron). Además, hay que señalar que la importancia de los AP varía de acuerdo al país, la región y la frecuencia de plantas que los contengan. La lista que figura arriba se basa en datos de Europa que pueden ser poco pertinentes para otras regiones, hacen falta más datos de otras regiones para obtener un panorama más preciso.

#### Prácticas de gestión

165. Se han aplicado muchas prácticas de gestión para reducir la posible exposición, como controlar la proliferación de hierba cana y prevenir que el ganado ingiera plantas que contienen AP. Las prácticas de gestión observadas se concentran mucho en las especies de hierba cana y se deberían reunir prácticas adicionales con otras especies de plantas, productos alimentarios y países o regiones para obtener un panorama más completo. Cabe destacar que la eficacia de las prácticas contempladas en este documento de debate no se evaluó ya que no incumbía a las tareas de este grupo de trabajo por medios electrónicos. Es necesario un análisis completo de todas las prácticas disponibles de gestión (también para otras plantas, productos alimentarios y regiones), así como una evaluación de su eficacia. Su valor como elemento de una posible estrategia de gestión de riesgos podría evaluarse entonces.

166. Las prácticas de gestión pueden ser

- medidas para prevenir la proliferación de plantas que contengan AP, en el ámbito regional (sobre todo en la hierba cana spp. (*Senecio* spp.)). Aquí es importante el conocimiento ecológico ya que se sabe que las especies de plantas que contienen AP tienen ecologías diferentes, incluso en un mismo género;
- medidas para prevenir el contacto de animales productores de alimentos con estas plantas, directamente o a través de piensos secos, ya que los AP se transfieren de los alimentos a los piensos. Esto incluye a las abejas;
- prevención de la contaminación de AP en productos alimentarios (como las hortalizas para ensalada);
- prácticas para reducir los AP presentes en piensos y alimentos contaminados.

#### **Recomendaciones**

##### Normas de referencia analítica

167. Para profundizar el conocimiento de los AP en los alimentos y los piensos, el grupo de trabajo recomienda que el CCCF invite a los miembros y observadores del Codex a crear más normas de referencia analítica para los AP y a generar más datos de la presencia en los alimentos y los piensos.

##### Evaluación de riesgos

168. Como se han hecho muchos estudios sobre los AP desde la evaluación del IPCS de 1988, algunos muy recientes, se recomienda que el JECFA ponga al día la evaluación de los AP.

169. Por lo tanto, el grupo de trabajo recomienda que el CCCF pida al JECFA que evalúe cuáles AP en los alimentos y los piensos (a través de transferencia a los productos animales) son de gran interés para la salud humana, teniendo en cuenta la lista de AP resumida en las recomendaciones del párrafo 163, y que se haga una evaluación completa de riesgos para los AP resultantes. Si no fuera posible hacer una evaluación completa de riesgos, se pide al JECFA que señale las lagunas de datos que es necesario subsanar.

##### Código de prácticas

170. Si bien hubo lagunas en la información disponible sobre la toxicidad y la potencia relativa de cada AP, el IPCS concluyó en 1988 que la exposición alimentaria a los AP debería ser todo lo baja que fuera

posible. Otros órganos de evaluación de riesgos llegaron a la misma conclusión en años posteriores. Si bien se reconoce que los resultados que produzca el JECFA darían mayor orientación sobre la eficacia de las prácticas de gestión, el grupo de trabajo recomienda al CCCF que ya comience a trabajar en la elaboración de un código de prácticas recomendado por el Codex para prevenir y reducir la contaminación de productos alimentarios con alcaloides de pirrolizidina. Para este trabajo será necesario un examen ulterior de las prácticas actuales de gestión de todas las regiones y de otras plantas que contienen AP además de la hierba cana. Queda por debatirse el tema exacto del trabajo en la plenaria del CCCF, que podría variar desde la gestión de maleza hasta prácticas de gestión en la producción de la miel.

#### Niveles máximos (NM)

171. El IPCS recomendó en 1988 que "En algunas situaciones podría ser necesario que se establecieran niveles reglamentarios de tolerancia para algunos productos alimentarios", pero como no hay evaluación reciente del JECFA disponible, y todavía hay poca información sobre concentraciones de AP en productos alimentarios, el grupo de trabajo recomienda que no se comience el trabajo de establecer NM para los AP en los alimentos y los piensos.

#### **REFERENCIAS**

Akhavain, F., E. Jean St-Michel, *et al.* (2007). Decreased left ventricular function, myocarditis, and coronary arteriolar medial thickening following monocrotaline administration in adult rats. *J. Appl. Physiol.* 103(1): 287-295.

Altamirano, J.C., S.R. Gratz, K.A. Wolnik. (2005). Investigation of pyrrolizidine alkaloids and their *N*-oxides in commercial Comfrey-containing products and botanical materials by liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. *J. AOAC Int.* 88: 406-412.

Anjos, B.L., V.M.T. Nobre, *et al.* (2010). Poisoning of sheep by seeds of *Crotalaria retusa*: acquired resistance by continuous administration of low doses. *Toxicol.* 55(1): 28-32.

Anonymous. (2001). Drought causes re-emergence of liver disease. *The Lancet.* 358: 1070. Cited by FAO, 2010.

ANZFA, Australia New Zealand Food Authority. (2001). Pyrrolizidine Alkaloids in Food – A Toxicological Review and Risk Assessment. Technical Report Series No.2. Canberra and Wellington : [http://www.foodstandards.gov.au/\\_srcfiles/TR2.pdf](http://www.foodstandards.gov.au/_srcfiles/TR2.pdf) , November 2001.

ANZJFSC, Australia and New Zealand Joint Food Standards Code. Prohibited and restricted plants and fungi. Standard 1.4.4: Issue 67.

[http://www.foodstandards.gov.au/\\_srcfiles/Standard\\_1\\_4\\_4\\_Prohib\\_plants\\_v113.pdf](http://www.foodstandards.gov.au/_srcfiles/Standard_1_4_4_Prohib_plants_v113.pdf)

Asres, K., F. Sporer, M. Wink. (2007). Identification and quantification of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids in the Ethiopian medicinal plant *Solanecio gigas* (Asteraceae). *Pharmazie* 69: 709-713.

Asres, K., F. Sporer, M. Wink. (2008). Occurrence of pyrrolizidine alkaloids in three Ethiopian *Solanecio* species. *Biochem. Sys. Ecol.* 36: 399-407.

Azadbakht & Talavaki (2003). Qualitative and Quantitative Determination of Pyrrolizidine Alkaloids of Wheat and Flour Contaminated with Senecio in Mazandaran Province Farms. *Iran J. Pharmaceut. Res.* 2: 179-183.

Beales, K.E., K. Betteridge, *et al.* (2004). Solid-phase extraction and LC-MS analysis of pyrrolizidine alkaloids in honey. *J. Agric. Food Chem.* 52: 6664-6672.

Beales, K., Betteridge, K., *et al.* (2007). Hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids and their *N*-oxides in honey and pollen. In: Panter, K., Wierenga, T., Pfister, J. (Eds.). *Poisonous Plants: Global Research and Solutions*. Cab Intl, Wallingford, UK, pp 94–100. Cited by Kempf *et al.*, 2010.

Betteridge, K., Y. Cao, S.M. Colegate. (2005). Improved method for extraction and LC-MS analysis of pyrrolizidine alkaloids and their *N*-oxides in honey: application to *Echium vulgare* honeys. *J. Agric. Food Chem.* 53: 1894-1902.

BfR, Bundesinstitut für Risikobewertung. Nulltoleranzen in Lebens- und Futtermitteln. Positionspaper des BfR vom 12. März 2007, Berlin, Deutschland.

[http://www.bfr.bund.de/cm/208/nulltoleranzen\\_in\\_lebens\\_und\\_futtermitteln.pdf](http://www.bfr.bund.de/cm/208/nulltoleranzen_in_lebens_und_futtermitteln.pdf)

BfR, Bundesinstitut für Risikobewertung. (2007a). BfR, Salatmischung mit Pyrrolizidinalkaloid-haltigem Greiskraut verunreinigt, Stellungnahme Nr.028/2007 des BfR vom 10. Januar 2007, Berlin, Deutschland.

[http://www.bfr.bund.de/cm/208/saladmischung\\_mit\\_pyrrolizidinalkaloid\\_haltigem\\_geiskraut\\_verunreinigt.pdf](http://www.bfr.bund.de/cm/208/saladmischung_mit_pyrrolizidinalkaloid_haltigem_geiskraut_verunreinigt.pdf)

Boppré, M., S.M. Colegate, *et al.* (2008). Hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids in pollen and drying-related implications for commercial processing of bee pollen. *J. Agric. Food Chem.* 56: 5662-5672.

Boppré, M., S.M. Colegate, J.A. Edgar. (2005). Pyrrolizidine alkaloids of *Echium vulgare* honey found in pure pollen. *J. Agric. Food Chem.* 53: 594–600. Cited by Kempf *et al.* 2010.

Briese, D.T., A. Walker. (2002). A new perspective on the selection of test plants for evaluating the host-specificity of weed biological control agents: the case of *deuterochampa quadrijuga*, a potential insect control agent of *Heliotropium amplexicaule*. *Biol. Control* 25: 273-287.

Brown, M.S., R.J. Molyneux, J.N. Roitman. (1994). A general method for high performance liquid chromatography of pyrrolizidine alkaloid free bases and *N*-oxides. *Phytochem. Anal.* 5: 251-255.

Budde, J., A. Reckert, *et al.* (2004). Contributions to the evolution of oligolecty in solitary bees of the genus *Andrena*. *Entomologie heute* 16: 191–200. Cited by Kempf *et al.* 2010.

Bundesgesetzblatt, Verordnung des Bundesministers für Gesundheit und öffentlicher Dienst vom 5. Mai 1989 betreffend Arzneimittel, die nicht in Verkehr gebracht werden dürfen, 555/1994 Wien, Österreich. Cited by Kempf *et al.*, 2010.

Bundesgesundheitsamt, Bekanntmachung über die Zulassung und Registrierung von Arzneimitteln, Bundesanzeiger 1992. 111: 4805.

Burns J. (1972). The heart and pulmonary arteries in rats fed on *Senecio jacobaea*. *J. Pathol.* 106:187–194.

Candrian, U., U. Zweifel, C. Schlatter. (1991). Transfer of orally administered [3H]-seneciophylline into cow's milk. *J. Agric. Food Chem.* 39(5): 930-933.

Cao Y., S.M. Colegate, J.A. Edgar. (2008). Safety assessment of food and herbal products containing hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids: interlaboratory consistency and the importance of *N*-oxide determination. *Phytochem. Anal.* 19: 526-533.

Cavallaro, V., K.A. Than, *et al.* (2004). An indirect competitive ELISA for pyrrolizidine alkaloids of *Heliotropium europaeum*. In: *Poisonous Plants and related Toxins*, Acamovic, T., Stewart, C.S., Pennycott, T.W. (Eds). CAB International, Wallingford, UK p. 114-119.

Chan, P.C., J.K. Haseman, *et al.* (2003). Toxicity and carcinogenicity of riddelliine in rats and mice. *Toxicol Lett* 144: 295-311.

Chizzola, R., B. Ozelsberger, T. Langer. (2000). Variability in chemical constituents in *Petasites hybridus* from Austria. *Biochem. Syst. Ecol.* 28: 421-432. Cited by EFSA, 2007.

Chou, M.W., P.P. Fu (2006). Formation of DHP-derived DNA adducts in vivo from dietary supplements and Chinese herbal plant extracts containing carcinogenic pyrrolizidine alkaloids. *Toxicol. Ind. Health* 22(8): 321-327.

Chou, M.W., J. Yan, *et al.* (2003a). Correlation of DNA adduct formation and riddelliine-induced liver tumorigenesis in F344 rats and B6C3F(1) mice. *Cancer Lett* 193: 119-125. Cited by EFSA, 2007.

Christov, V.S., B.P. Mikhova, L.N. Evstatieva. (2002). Alkaloids from *Senecio aquaticus*. *Fitoterapia* 73: 171-173. Cited by EFSA, 2007.

COC, Committee on Carcinogenicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment. COC section in the 18th joint annual report of the COT, COM and COC, 2008.

- Colegate, S.M., J.A. Edgar, *et al.* (2005). Solid-phase extraction and HPLC-MS profiling of pyrrolizidine alkaloids and their *N*-oxides: a case study of *Echium plantagineum*. *Phytochem. Anal.* 16: 108-119.
- Conradie, J., M.J. Stewart, *et al.* (2005). GC/MS identification of toxic pyrrolizidine alkaloids in traditional remedies given to two sets of twins. *Ann. Clin. Biochem.* 42(Pt 2): 141-144.
- Cooper, R.G. (2007). Poisoning in ostriches following ingestion of toxic plants--field observations. *Trop. Anim. Health Prod.* 39(6): 439-442.
- Copple, B.L., R.A. Roth, *et al.* (2006). Anticoagulation and inhibition of nitric oxide synthase influence hepatic hypoxia after monocrotaline exposure. *Toxicology* 225(2-3): 128-137.
- COT, Committee on toxicity of chemicals in food, consumer, products and the environment, Statement on Pyrrolizidine Alkaloids in Food, 2008.
- Couet, C.E., C. Crews, A.B. Hanley. (1996). Analysis, separation, and bioassay of pyrrolizidine alkaloids from Comfrey (*Symphytum officinale*). *Nat. Toxins* 4: 163-167. Cited by EFSA, 2007.
- Coulombe, R.A. (2003). Pyrrolizidine alkaloids in foods. *Adv. Food Nutr. Res.* 45: 61-98.
- Crews C., F. Berthiller, R. Krska. (2010). Update on analytical methods for toxic pyrrolizidine alkaloids. *Anal. Bioanal. Chem.* 396: 327-338.
- Crews, C., W.A.C. Anderson (2009). Detection of ragwort alkaloids in toxic hay by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Vet. Rec.* 165(19): 568-569.
- Crews, C., M. Driffield, *et al.* (2009). Loss of pyrrolizidine alkaloids on decomposition of ragwort (*Senecio jacobaea*) as measured by LC-TOF-MS. *J. Agricult. Food Chem.* 57: 3669-3673.
- Crews, C., J.R. Startin, P.A. Clarke. (1997). Determination of pyrrolizidine alkaloids in honey from selected sites by solid phase extraction and HPLC-MS. *Food Addit. Contam* 14: 419-428.
- Culvenor, C.C.J. (1980). Alkaloids and Human Disease : In: *Toxicology in the Tropics* Eds. R.L. Smith and E.A. Bababunmi. Taylor & Francis Ltd. London, pp 124 -141. Cited by ANZFA, 2001.
- DAFF. (2008). Warning against sale and use of banned Comfrey. Department of Agriculture, Forestry and Fisheries, South Africa.
- <http://www.doh.gov.za/docs/pr/2008/pr0630.html>
- DOHA (2010). Australian Government, Department of Health and Ageing, Therapeutic Goods Administration. Poisons Standard 2010. Federal Register of Legislative Instruments F2010L02386.
- DSEWPC, Department of Sustainability, Environment, Water, Population and Communities. (2010). Commonwealth of Australia. Weeds in Australia.
- <http://www.weeds.gov.au/government/legislation.html>
- Dai, H.F., Y. Gao, *et al.* (2006). Hepatic veno-occlusive disease induced by *Gymura segetum*: Report of two cases. *HBPD INT.* 5(3): 406-408.
- Dai, N., Y.-C. Yu, *et al.* (2007). Gynura root induces hepatic veno-occlusive disease: a case report and review of the literature. *World J. Gastroenterol.* 13(10): 1628-1631.
- De, P., C. Bloxham, *et al.* (2005). Ragwort weed and granulomatous lung disease. *Respiratory Medicine Extra* 1(3): 85-87.
- Deinzer, M.L., P.H. Thomson, *et al.* (1977). Pyrrolizidine alkaloids: their occurrence in honey from Tansy ragwort (*Senecio jacobaea* L). *Science* 195: 497-499. Cited by Kempf *et al.* 2010.
- Deinzer, M.L., B.L. Arbogast, *et al.* (1982). Gas Chromatographic determination of pyrrolizidine alkaloids in goat's milk. *Anal Chem.* 54: 1811-1814.
- Dickinson, J.O., M.P. Cooke, *et al.* (1976). Milk transfer of pyrrolizidine alkaloids in cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 169: 1192 - 1196. Cited by WHO, 1988.
- Dickinson, J.O. (1980). Release of pyrrolizidine alkaloids into milk. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 23: 377-379. Cited by WHO, 1988.

Eastman, D.F., G.P. Dimenna, H.J. Segall (1982). Covalent binding of two pyrrolizidine alkaloids, senecionine, and seneciophylline to hepatic macromolecules and their distribution, excretion and transfer into milk of lactating mice. *Drug Metab. Disp.* 10: 236-240.

Edgar, J.A., L.W. Smith (2000). Transfer of Pyrrolizidine Alkaloids into Eggs: Food Safety Implications. Tu, A. T. and Gaffield, W. Natural and Selected Synthetic Toxins. Biological Implications. [8], 118-128. Washington D.C., American Chemical Society. ACS Symposium series 745. Cited by COT, 2008.

Edgar, J.A., E. Röder, R.J. Molyneux (2002). Honey from plants containing pyrrolizidine alkaloids: A potential threat to health. *J. Agric. Food Chem.* 50: 2719-2730. Cited by EFSA, 2007.

EFSA, European Food Safety Authority. (2007). Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission related to Pyrrolizidine Alkaloids as undesirable substances in Animal Feeds. *The EFSA Journal* 447: 1-51. Parma, January 25, 2007.

[http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa\\_locale-1178620753812\\_1178621166892.htm](http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1178621166892.htm)

EFSA, European Food Safety Authority. (2009). EFSA Compendium of botanicals that have been reported to contain toxic, addictive, psychotropic or other substance of concern. *EFSA Journal* (2009). 7:281, 1-98.

Eröksüz, H., Y. Eröksüz, *et al.* (2003). Toxicity of *Senecio vernalis* to laying hens and evaluation of residues in eggs. *Vet. Hum. Toxicol.* 45: 76-80. Cited by EFSA, 2007.

Eröksüz, Y., A.O. Çeribaşı, *et al.* (2008). Toxicity of *Heliotropium dolosum*, *Heliotropium circinatum*, and *Senecio vernalis* in parental quail and their progeny, with residue evaluation of eggs. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 32(6): 475-482.

EU. (2010). Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council of 7 May 2002 on undesirable substances in animal feed, last revision 10.2.2010.

FAO, Food and Agriculture Organization. (2007). Recommendations for Improved Weed Management. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2007. Cited by FAO, 2010.

<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a0884e/a0884e00.pdf>

FAO, Food and Agriculture Organization. (2010). Pyrrolizidine alkaloids in foods and animal feeds. FAO Consumer Protection Fact Sheets No.2: 1-6.

[http://www.fao.org/ag/agn/agns/files/FAO\\_Fact\\_Sheet\\_Pyrrolizidine\\_Alkaloids.pdf](http://www.fao.org/ag/agn/agns/files/FAO_Fact_Sheet_Pyrrolizidine_Alkaloids.pdf)

FDA, US Food and Drug Administration. (2001). 'FDA Advises Dietary Supplement Manufacturers to Remove Comfrey Products From the Market'. FDA Office of Nutritional Products, Labeling, and Dietary Supplements, July 6, 2001.

<http://www.fda.gov/Food/DietarySupplements/Alerts/ucm111219.htm> Visited: October 2010.

Fletcher, M.T., R.A. McKenzie, *et al.* (2009). Pyrrolizidine alkaloids in *Crotalaria taxa* from northern Australia: risk to grazing livestock. *J. Agric. Food Chem.* 57(1): 311-319.

Fletcher, M.T., R.A. McKenzie, *et al.* (2011). Risks from plants containing pyrrolizidine alkaloids for livestock and meat quality in northern Australia. In: *Poisonings by plants, mycotoxins and related toxins*. CAB International. In Press.

Frischknecht, P.M., K. Schuhmacher, *et al.* (2001). Phenotypic plasticity of *Senecio vulgaris* from contrasting habitat types: growth and pyrrolizidine alkaloid formation. *J. Chem. Ecol.* 27: 343-358. Cited by EFSA, 2007.

FSANZ, Food Standards Australia New Zealand, Consumers advised to limit consumption of Paterson's Curse/Salvation Jane honey, Fact Sheet, 9. February 2004, Canberra, Australia. <http://www.foodstandards.gov.au/newsroom/factsheets/factsheets2004/consumersadvisedtoli2347.cfm>

Fu, P.P., Q. Xia, *et al.* (2002). Genotoxic pyrrolizidine alkaloids –Mechanisms leading to DNA adduct formation and tumorigenicity. *Int J Mol Sci* 3: 948-964.

Fu, P.P., Q. Xia, *et al.* (2007). Detection, hepatotoxicity, and tumorigenicity of pyrrolizidine alkaloids in Chinese herbal plants and herbal dietary supplements. *J. Food Drug Anal.* 15(4): 400-415.



- Furuya, T., Y. Asada, H. Mori. (1987). Pyrrolizidine Alkaloids. In: Naturally Occurring Carcinogens of Plant Origin, Toxicology, Pathology and Biochemistry. Ed. I. Hirono. Elsevier, Oxford, pp. 25-51. Cited by ANZFA, 2001.
- Gardner, D.R., M.S. Thorne, *et al.* (2006). Pyrrolizidine alkaloids in *Senecio madagascariensis* from Australia and Hawaii and assessment of possible livestock poisoning. *Biochem. Sys.Ecol.* 34(10): 736-744.
- Goeger, D.E., P.R. Cheeke, *et al.* (1982). Effect of feeding milk from goats fed Tansy ragwort (*Senecio jacobaea*) to rats and calves. *Am. J. Vet. Res.* 43: 1631-1633.
- Gourlay, H. (2007a). Ragwort crown-boring moth. Landcare Research, New Zealand Information Note.
- Gourlay, H. (2007b). Ragwort plume moth. Landcare Research, New Zealand Information Note.
- Green, C.R., G.S. Christie. (1961). Malformations in foetal rats induced by the pyrrolizidine alkaloid, heliotrine. *Br. J. exp. Pathol.* 42: 369-378. Cited by WHO, 1988.
- Guo, L., N. Mei, *et al.* (2007). Comparison of gene expression profiles altered by comfrey and riddelliine in rat liver. *BMC Bioinformatics* 8 (Suppl 7): S22.
- Györika S, H. Stricker. (2009). Severe pulmonary hypertension possibly due to pyrrolizidine alkaloids in polyphytotherapy. *Swiss Med. Wkly.* 139: 210–211.
- Hartmann T., G. Toppel. (1987). Senecionine *N*-oxide, the primary product of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis in root cultures of *Senecio vulgaris*. *Phytochemistry* 26: 1639-1643.
- Hartmann T., B. Dierich. (1998). Chemical diversity and variation of pyrrolizidine alkaloids of the senecionine type: biological need or coincidence? *Planta.* 206: 443-451.
- Hartmann T., L. Witte. (1995). Chemistry, biology and chemoecology of the pyrrolizidine alkaloids. In: *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*, S.W. Pelletier (ed). Vol 9. pp 155-233.
- Health Canada. (2003). 'Health Canada advises consumers not to use or ingest the herb Comfrey or health products that contain Comfrey'. Advisory 2003-101 December 12, 2003. [http://www.hc-sc.gc.ca/ahc-asc/media/advisories-avis/2003/2003\\_101-eng.php](http://www.hc-sc.gc.ca/ahc-asc/media/advisories-avis/2003/2003_101-eng.php).
- Hirono, I., M. Haga. (1979). Induction of Hepatic Tumors in Rats by Senkirkine and Symphytine. *JNCI* 63: 469- 472. Cited by COT statement, 2008.
- Hirono, I., H. Mori. (1977). Carcinogenic activity of petasitenine, a new pyrrolizidine alkaloid isolated from *Petasites japonicus* Maxim. *J. Natl. Cancer Inst.* 58: 1155-1157. Cited by COT statement, 2008.
- Hoogenboom, L.A.P., P.P.J. Mulder, *et al.* (2011). Carry-over of pyrrolizidine alkaloids from feed to milk in dairy cows. *Food Add. Contam. Part A*. In press.
- Hooper, P.T. W.A. Scanlan (1977). *Crotalaria retusa* poisoning of pigs and poultry. *Aust. Vet. J.* 53: 109-114. Cited by EFSA, 2007.
- Hösch, G., H. Wiedenfeld, *et al.* (1996). A new high performance liquid chromatography method for the simultaneous quantitative analysis of pyrrolizidine alkaloids and their *N*-oxides in plant material. *Phytochem. Anal.* 7: 284-288.
- Hough, R.L., C. Crews, *et al.* (2010). Degradation of yew, ragwort and rhododendron toxins during composting. *Sci. Total Environ.* 408: 4128-4137.
- Hovermale, J.T., A.M. Craig. (1998). A routine method for the determination of retronecine. *Fres. J. Anal. Chem.* 361: 201-206.
- Hueza, I. M., J.C. Benassi, *et al.* (2009). Low doses of monocrotaline in rats cause diminished bone marrow cellularity and compromised nitric oxide production by peritoneal macrophages. *J. Immunot.* 6(1): 11-18.
- IARC. (1976). Some Naturally Occurring Substances. IARC Monographs on Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans 10. Cited by COT statement, 2008.
- IARC. (1983). Some Food Additives, Feed Additives and Naturally Occurring Substances. IARC Monographs on Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans 31. Cited by COT statement, 2008.

- IARC. (2002). Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene. IARC Monographs on Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans 82. Cited by COT statement, 2008.
- ISO, International Organization for Standardization. (2000). Wheat (*Triticum aestivum L.*) ISO 7970:2000. Geneva. Cited by FAO, 2010.
- Ji, X., I. Khan, *et al.* (2005). Variability for the presence of pyrrolizidine alkaloids in *Crotolaria juncea L.* Pharmazie 60(8): 620-622.
- Jiang, Z., F. Liu, *et al.* (2009). Determination of senkirkine and senecionine in *Tussilago farfara* using microwave-assisted extraction and pressurized hot water extraction with liquid chromatography tandem mass spectrometry. Talanta 79: 539-546.
- Joosten, L., P.P.J. Mulder, *et al.* (2010). The analysis of pyrrolizidine alkaloids in *Jacobaea vulgaris*; a comparison of extraction and detection methods. Phytochem. Anal. 21: 197-204.
- Kakar, F., Z. Akbarian, *et al.* (2010). An outbreak of hepatic veno-occlusive disease in Western Afghanistan associated with exposure to wheat flour contaminated with pyrrolizidine alkaloids. J. Toxicol. 2010: 1-7.
- Kempf M., T. Beuerle, *et al.* (2008). Pyrrolizidine alkaloids in honey: risk analysis by gas chromatography-mass spectrometry. Mol. Nutr. Res. 52: 1193-1200.
- Kempf, M., S. Heil, *et al.* (2010a). Pyrrolizidine alkaloids in pollen and pollen products. Mol. Nutr. Food Res. 54(2): 292-300.
- Kempf, M., A. Reinhard, T. Beuerle. (2010b). Pyrrolizidine alkaloids (PAs) in honey and pollen-legal regulation of PA levels in food and animal feed required. Mol. Nutr. Food Res. 54(1): 158-168.
- Kempf, M., M. Wittig, *et al.* (2011). Pyrrolizidine alkaloids in honey: comparison of analytical methods. Food Addit. Contam.: Part A **in press**.
- Kirk, H., M. Macel. (2004). Natural hybridization between *Senecio jacobaea* and *Senecio aquaticus*: molecular and chemical evidence. Mol. Ecol. 13: 2267-2274. Cited by EFSA, 2007.
- Knight, A.P., C.V. Kimberling. (1984). *Cynoglossum officinale* (Hound's-tongue)- A cause of pyrrolizidine alkaloid poisoning in horses. JAVMA 185: 647-650. Cited by EFSA, 2007.
- Koninklijk besluit van 29 AUGUSTUS 1997 betreffende de fabricage van en de handel in voedingsmiddelen die uit planten of uit plantenbereidingen samengesteld zijn of deze bevatten (Stbl. 21.XI.1997).
- Kuhara, K., H. Takanashi, *et al.* (1980). Carcinogenic activity of clivorine, a pyrrolizidine alkaloid isolated from *Ligularia dentata*. Cancer Lett. 10: 117-122. Cited by COT statement, 2008.
- Langel, D., D. Ober, P.B. Pelsler. (2011). The evolution of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis and diversity in the Senecioneae. Phytochem. Rev. In press. DOI 10.1007/s11101-010-9184-y.
- Langer, T., E. Möstl, R. Chizzola, R. Gutleb. (1996). A competitive enzyme immunoassay for the pyrrolizidine alkaloids of the senecionine type. Planta Medica 62: 267-271.
- Lebada, R., A. Schreier, *et al.* (2000). Quantitative analysis of the pyrrolizidine alkaloids senkirkine and senecionine in *Tussilago farfara L.* by capillary electrophoresis. Phytochem. Anal. 11: 366-369.
- Lee, S.T., T.K. Schoch, *et al.* (2001). Development of enzyme-linked immunosorbent assays for the hepatotoxic alkaloids riddelliine and riddelliine N-oxide. J. Agric. Food Chem. 49: 4144-4151.
- Leiss, K. A. (2010). Management practices for control of ragwort species. Phytochem. Rev. in press.
- LGC. (2007). Collection and Analysis of Honey Samples Potentially Contaminated with Pyrrolizidine Alkaloids from Ragwort and Borage. Food Standards Agency Project T01037. Cited by COT, 2008.
- Li, S.L., G. Lin, *et al.* (2008). Identification of five hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids in a commonly used traditional Chinese medicinal herb, Herba *Senecionis scandentis* (Qianliguang). Rapid Commun. Mass Spectrom. 22: 591-602.
- Liu, F., S.Y. Wan, *et al.* (2009). Determination of pyrrolizidine alkaloids in Comfrey by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. Talanta 80: 916-923.

- Lodge-Ivey, S.L., M.S. Rappe, *et al.* (2005). Molecular analysis of a consortium of ruminal microbes that detoxify pyrrolizidine alkaloids. *Can. J. Microbiol.* 51: 455-465
- Lüthy, J., U. Zweifel, *et al.* (1981). Pyrrolizidine alkaloids of *Senecio alpinus* L. and their detection in feedingstuffs. *J. Agric. Food Chem.* 29(2):302-305.
- Macel, M., M. Bruinsma, *et al.* (2005). Differences in effects of pyrrolizidine alkaloids on five generalist insect herbivore species. *J. Chem. Ecol.* 31(7): 1493-1508.
- Macel, M., K. Vrieling, P.G.L. Klinkhamer. (2004). Variation in pyrrolizidine alkaloid patterns of *Senecio jacobaea*. *Phytochem.* 65: 865-873. Cited by EFSA, 2007.
- MAFF, U.K. (1994). Naturally occurring Toxicants in Food. MAFF Food Surveillance Paper 42, 18-29.
- MAFF, U.K. (1995). Surveillance for pyrrolizidine alkaloids in honey. Joint Food Safety and Standards Group Food Surveillance Information Sheet 52. Cited by Kempf *et al.* 2010.
- Mattocks, A.R. (1967). Detection of pyrrolizidine alkaloids on thin-layer chromatograms. *J. Chrom.* 27: 505-508.
- Mattocks, A.R. (1986). Chemistry and toxicology of pyrrolizidine alkaloids, London, New York, Academic Press. Cited by WHO, 1988 and EFSA, 2007.
- Mattocks, A.R., R. Jukes. (1990). Recovery of the pyrrolic nucleus of pyrrolizidine alkaloid metabolites from sulphur conjugates in tissues and body fluids. *Chem. Biol. Interact.* 75: 225-239.
- Mattocks, A.R., R. Jukes. (1992). Detection of sulphur-conjugated pyrrolic metabolites in blood and fresh or fixed liver tissue from rats given a variety of toxic pyrrolizidine alkaloids. *Toxicol. Lett.* 63: 47-55.
- McLaren, D.A., J.E. Ireson, R.M. Kwong. (2000). Biological control of ragwort (*Senecio jacobaea* L.) in Australia. In: Spencer NR (ed) Proceedings of the X International Symposium on Biological Control of Weeds 1999, Montana, pp 67-79.
- McLaren, D., I. Faithfull. (2004). Ragwort-Management. Landcare Note LC0382. Department of Sustainability and Environment, State of Victoria.
- Mehrabani, M., A. Ghannadi, *et al.* (2006). Toxic pyrrolizidine alkaloids of *Echium amoenum* fisch. & Mey. *DARU* 14(3): 122-127.
- Mei, N., L. Guo, *et al.* (2005). Mutagenicity of Comfrey (*Symphytum Officinale*) in rat liver. *Br. J. Canc.* 92(5): 873-875.
- Mei, N., L. Guo, *et al.* (2006). Analysis of gene expression changes in relation to toxicity and tumorigenesis in the livers of Big Blue transgenic rats fed Comfrey (*Symphytum officinale*). *BMC Bioinformatics* 7(S2): S16.
- Mei, N., L. Guo, *et al.* (2007a). Gene expression changes induced by the tumorigenic pyrrolizidine alkaloid riddelliine in liver of Big Blue rats. *BMC Bioinformatics* 8(S7): S4.
- Mei, X., T. Chen. (2007b). The mutant frequencies and types of mutations induced by Comfrey in the lungs of transgenic big blue rats. *J. Food Drug Anal.* 15(4): 458-465.
- Mingatto, F. E., M. A. Maioli, *et al.* (2008). Effects of monocrotaline on energy metabolism in the rat liver. *Toxicol. Lett.* 182(1-3): 115-120.
- Molyneux, R.J., L.F. James. (1990). Pyrrolizidine alkaloids in milk: Thresholds of intoxication. *Vet. Hum. Toxicol.* 32(S): 94-103.
- Molyneux, R.J., J.N. Roitman. (1980). Specific detection of pyrrolizidine alkaloids on thin-layer chromatograms. *J. Chromatogr.* 195: 412-415.
- Moyano, M.R., A. Garcia, *et al.* (2006). *Echium vulgare* and *Senecio vulgaris* poisoning in fighting bulls. *Journal of Veterinary Medicine - Series A* 53(1): 24-25.
- Mroczek, T., K. Glowniak, A. Wlaszczyk. (2002). Simultaneous determination of *N*-oxides and free bases of pyrrolizidine alkaloids by cation-exchange solid-phase extraction and ion-pair high-performance liquid chromatography. *J. Chrom. A.* 949: 249-262.

- Mroczek, T., K. Ndjoko, *et al.* (2004). On-line structure characterization of pyrrolizidine alkaloids in *Onosma stellulatum* and *Emilia coccinea* by liquid chromatography-ion-trap mass spectrometry. *J. Chrom. A.* 1056: 91-97.
- Mulder, P.P.J., B. Beumer, *et al.* (2009). Dutch survey pyrrolizidine alkaloids in animal forage. RIKILT report 2009.018. <http://edepot.wur.nl/135952>.
- Narberhaus, I., V. Zintgraf, *et al.* (2005). Pyrrolizidine alkaloids on three trophic levels - Evidence for toxic and deterrent effects on phytophages and predators. *Chemoecology* 15(2): 121-125.
- Neumann, H., S. Lütt, *et al.* (2009). Umgang mit dem Jakobskreuzkraut Meiden-Dulden-Bekämpfen. Landesamt für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein (LLUR) und Deutscher Verband für Landschaftspflege e.V. (DVL).
- North West Weeds. (2007). Blue Heliotrope. North West Weeds. [Online] November 25, 2007. [Cited: April 15, 2008.] Government of New South Wales. Cited by FAO, 2010.  
[http://www.northwestweeds.nsw.gov.au/blue\\_heliotrope.htm](http://www.northwestweeds.nsw.gov.au/blue_heliotrope.htm).
- NTP. (1978). Bioassay of Lasiocarpine for possible carcinogenicity. NTP Technical Report 39: 1-66. Cited by COT statement, 2008.
- NTP. (2003). Toxicology and carcinogenesis studies of riddelliine. NTP Technical Report 508. Cited by COT statement, 2008.
- Oberlies, N.H., N.C. Kim, *et al.* (2004). Analysis of herbal teas made from the leave of Comfrey (*Symphytum officinale*): reduction of *N*-oxides results in order of magnitude increases in the measurable concentration of pyrrolizidine alkaloids. *Public Health Nutr.*, 7: 919-924.
- Panter, K.E., L.F. James. (1990). Natural plant toxicants in milk: A review. *J. Anim. Sci.* 68: 892-904.
- Pawar, R.S., E. Grundel, *et al.* (2010). Chiral stationary phases for separation of intermedine and lycopsamine enantiomers from *Symphytum uplandicum*. *J. Sep. Sci.* 33: 200-205.
- Pelser, P.B., H. de Vos. (2005). Frequent gain and loss of pyrrolizidine alkaloids in the evolution of Senecio section Jacobaea (Asteraceae). *Phytochem.* 66: 1285-1295. Cited by EFSA, 2007.
- Peterson, J.E., M.V. Jago. (1980). Comparison of the toxic effects of dehydroheliotridine and heliotrine in pregnant rats and their embryos. *J. Pathol.* 131: 339-355. Cited by WHO, 1988.
- Qi, X., S. Wang, *et al.* (2009a). Determination of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids in *Gynura segetum* by MEKC. *Chromatographia* 70: 281-285.
- Qi, X., B. Wu, *et al.* (2009b). Simultaneous characterization of pyrrolizidine alkaloids and *N*-oxides in *Gynura segetum* by liquid chromatography/ion trap mass spectrometry. *Rapid Comm. Mass Spectrom.* 23: 291-302.
- Raezke, K.-P. (2010). Pyrrolizidine alkaloids in honey. FEEDM General Meeting, Brussels, 01.07.2010.
- Raezke, K.-P. (2010a). Pyrrolizidinalkaloide im Honig. *Deutsches Bienen-Journal* 18: 6-7.
- Rasenack, R., C. Müller, *et al.* (2003). Veno-Occlusive Disease in a Fetus Caused by Pyrrolizidine Alkaloids of Food Origin. *Fetal Diagnosis and Therapy* 18, 223-225.
- Reinhard, A., M. Janke, *et al.* (2009). Feeding deterrence and detrimental effects of pyrrolizidine alkaloids fed to honey bees (*Apis mellifera*). *J. Chem. Ecol.* 35(9): 1086-1095.
- Ridker, P.M., S. Ohkuma, *et al.* (1985). Hepatic veno-occlusive disease associated with consumption of pyrrolizidine alkaloid containing dietary supplements. *Gastroenterology* 88: 1050 - 1054. Cited by WHO (1988) and ANZFA (2001).
- RIVM, Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, RIKILT Institute of Food Safety (2007). Risicobeoordeling inzake de Aanwezigheid van Pyrrolizidine Alkaloiden in Honing, Wageningen, The Netherlands.
- RIVM, Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu. (2005). Advisory report on pyrrolizidine alkaloids in herb preparations.

- Roberts, P.D., A.S. Pullin (2007). The effectiveness of management interventions used to control ragwort species. *Environ. Manage.* 39(5): 691-706.
- Röder, E. (1995). Medicinal plants in Europe containing pyrrolizidine alkaloids. *Pharmazie* 50: 83-96. Cited by EFSA, 2007.
- Roeder, E. (1999). Analysis of pyrrolizidine alkaloids. *Curr. Org. Chem.* 3: 557-576.
- Roeder, E. (2000). Medicinal plants in China containing pyrrolizidine alkaloids. *Pharmazie*, 55: 711-727.
- Roeder, E., H. Wiedenfeld. (2009). Pyrrolizidine alkaloids in medicinal plants of Mongolia, Nepal and Tibet. *Pharmazie* 64: 699-716.
- Roseman, D.M., X. Wu, *et al.* (1992). Development of a class-specific competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of pyrrolizidine alkaloids in vitro. *J. Agric. Food Chem.* 40: 1008-1014.
- Roseman, D.M., X. Wu, M.J. Kurth. (1996). Enzyme-linked immunosorbent assay detection of pyrrolizidine alkaloids: immunogens based on quaternary pyrrolizidinium salts. *Bioconjugate Chem.* 7: 187-195.
- Roulet, M., R. Laurini, *et al.* (1988). Hepatic veno-occlusive disease in newborn infant of a woman drinking herbal tea. *J. Pediatrics* 112: 433-436. Cited by COT, 2008.
- Schoental, R. (1959). Liver lesions in young rats suckled by mothers treated with the pyrrolizidine (Senecio) alkaloids, lasiocarpine, and retrorsine. *J. Pathol. Bacteriol.* 77: 485-504.
- Schoental, R., M.E. Fowler, A. Coady. (1970). Islet Cell Tumours of the Pancreas found in Rats given Pyrrolizidine Alkaloids from *Amsinckia intermedia* Fisch and Mey and from *Heliotropium supinum* L. *Cancer Res.* 30: 2127-2131. Cited by COT statement, 2008.
- Shimzu, K., T. Takahashi, *et al.* (2008). Hemin treatment abrogates monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Medicinal Chemistry* 4(6): 572-576.
- Skaanild, M.T., C. Friis, L. Brimer. (2001). Interplant alkaloid variation and *Senecio vernalis* toxicity in cattle. *Vet. Hum. Toxicol.* 43: 147-151. Cited by EFSA, 2007.
- Smith, L.W., C.C.J. Culvenor. (1981). Plant sources of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids. *J. Nat. Prods.* 44: 129-152.
- Stegelmeier, B.L., D.R. Gardner, *et al.* (1996). Pyrrole detection and the pathologic progression of *Cynoglossum officinale* (Houndstongue) poisoning in horses. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8: 81-90.
- Stuart, K.L., G. Bras. (1957). Veno-occlusive disease of the liver. *Q. J. Med.* 26: 291-315. Cited by ANZFA, 2001.
- Suter, M., S. Siegrist-Maag, *et al.* (2007). Can the occurrence of *Senecio jacobaea* be influenced by management practice? *Weed Res.* 47(3): 262-269.
- Tang, J., T. Akao, *et al.* (2007). In vitro metabolism of isoline, a pyrrolizidine alkaloid from *Ligularia duciformis*, by rodent liver microsomal esterase and enhanced hepatotoxicity by esterase inhibitors. *Drug Metab. Dispos.* 35(10): 1832-1839.
- Than, K.A., V. Stevens, *et al.* (2005). Plant-associated toxins in animal feed: Screening and confirmation assay development. *Anim. Feed Sci. Technol.* 121: 5-21.
- USDA, United States Department of Agriculture, Food Safety Inspection Service. (2007). Multi-species Disposition Basics with a Public Health Focus.
- s.l.: [http://www.fsis.usda.gov/PDF/PHVt-Multi\\_Species\\_Disposition.pdf](http://www.fsis.usda.gov/PDF/PHVt-Multi_Species_Disposition.pdf)
- Vrieling, K., S. Derridj. (2003). Pyrrolizidine alkaloids in and on the leaf surface of *Senecio jacobaea* L. *Phytochem.* 64: 1223-1228. Cited by EFSA, 2007.
- VWA (2007). Advice on Pyrrolizidine Alkaloids in Honey. 5 November 2007 VWA: Dutch Food and Consumer Product Safety Authority.
- VWA. (2010). Advies van de directeur bureau Risicobeoordeling aan de minister van LNV en de minister van VWS over Jacobskruiskruid in diervoeder (Advice of the director of the Bureau of Risk Assessment to the

minister of LNV and the minister of VWS on tansy ragwort in animal feed). 31 March 2010. VWA: Dutch Food and Consumer Product Safety Authority.

Walsh, R.B., R.T. Dingwell. (2007). Beef herd poisoning due to ingestion of Tansy ragwort in southwestern Ontario. *Can. Vet. J.* 48(7): 737-740.

Wang, Y.-P., P.P. Fu, *et al.* (2005a). Metabolic activation of the tumorigenic pyrrolizidine alkaloid, retrorsine, leading to DNA adduct formation in vivo. *Int. J. Environ. Res. Public Health* [Electronic Resource] 2(1): 74-79.

Wang, Y.-P., J. Yan, *et al.* (2005b). Human liver microsomal reduction of pyrrolizidine alkaloid *N*-oxides to form the corresponding carcinogenic parent alkaloid. *Toxicol. Lett.* 155(3): 411-420.

Wang, Q., C.-M. Lu, *et al.* (2008). Traditional Chinese medicine containing pyrrolizidine alkaloids and hepatic veno-occlusive disease. *Linchuang Xiaohuabing Zazhi* 20(1): 22-25

Warenwetbesluit Kruidenpreparaten Besluit van 19 januari 2001 (WKB 2001), houdende vaststelling van het Warenwetbesluit Kruidenpreparaten. Staatsblad van het Koninkrijk der Nederlanden 2001, 56, 1–12. <http://wetten.overheid.nl/BWBR0012174>

WHO. (1988). Pyrrolizidine Alkaloids, IPCS, International Programme on Chemical Safety. 1988. Environmental Health Criteria No. 80 (EHC 80). WHO Geneva. pp 1-345. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc080.htm>, 1988.

WHO. (2001). Health Talks Afghanistan. Geneva: World Health Organization, September 2001.

Wiedenfeld, H., J. Edgar. (2010). Toxicity of pyrrolizidine alkaloids to humans and ruminants. *Phytochem. Rev.* DOI 10.1007/s11101-010-9174-0.

Williamson, G. (2010). Plant Poisonings. *Animal Health Surveillance Quarterly* (Newsletter of Australian National Animal Health Information System). 15(2):16.

Witte, L., L. Ernst, *et al.* (1992). Chemotypes of two pyrrolizidine alkaloid containing *Senecio* species. *Phytochem.* 31: 559-565. Cited by EFSA, 2007.

Witte, L., P. Rubiolo, *et al.* (1993). Comparative analysis of pyrrolizidine alkaloids from natural sources by gas chromatography-mass spectrometry. *Phytochem.* 32: 187-196.

Wretensjö, I., B. Karlberg. (2003). Pyrrolizidine alkaloid content in crude and processed borage oil from different processing stages. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 80: 963-970.

Wuilloud, J.C.A., S.R. Gratz, *et al.* (2004). Simultaneous analysis of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids and *N*-oxides in comfrey root by LC-ion trap mass spectrometry. *Analyst.* 129: 150-156.

Xia, Q., M.W. Chou, *et al.* (2003). Human liver microsomal metabolism and DNA adduct formation of the tumorigenic pyrrolizidine alkaloid, riddelliine. *Chem. Res. Toxicol.* 16: 66-73.

Xia, Q., M.W. Chou, *et al.* (2006). Formation of DHP-derived DNA adducts from metabolic activation of the prototype heliotridine-type pyrrolizidine alkaloid, lasiocarpine. *Cancer Lett.* 231(1): 138-145.

Xia, Q., J. Yan, *et al.* (2008). Formation of DHP-derived DNA adducts from metabolic activation of the prototype heliotridine-type pyrrolizidine alkaloid, heliotrine. *Toxicol. Lett.* 178(2): 77-82.

Xiong, A.Z., L. Yang, *et al.* (2009). Determination of total retronecine esters-type hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids in plant materials by pre-column derivatization high-performance liquid chromatography. *Biomed. Chromatogr.* 23: 665-671.

Xiong, A., Y. Li, *et al.* (2009a). Simultaneous determination of senecionine, adonifoline and their metabolites in rat serum by UPLC-ESIMS and its application in pharmacokinetic studies. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 50: 1070-1074.

Xiong, A., L. Yang, *et al.* (2009b). Identification of metabolites of adonifoline, a hepatotoxic pyrrolizidine alkaloid, by liquid chromatography/tandem and high-resolution mass spectrometry. *Rapid comm. Mass Spectrom.* 23: 3907-3916.

Yan, J., Q. Xia, *et al.* (2008). Metabolic activation of retronecine and retronecine *N*-oxide - formation of DHP-derived DNA adducts. *Toxicol. Ind. Health* 24(3): 181-188.

Yang, Y.-C., J. Yan, *et al.* (2001). Metabolic activation of the tumorigenic pyrrolizidine alkaloid, riddelliine, leading to DNA adduct formation in vivo. *Chem. Res. Toxicol.* 14: 101-109.

Yu, L., Y. Xu, *et al.* (2005). Separation and determination of toxic pyrrolizidine alkaloids in traditional Chinese herbal medicines by micellar electrokinetic chromatography with organic modifier. *Electrophoresis* 26: 3397-3404.

Zhang, F., C.H. Wang, *et al.* (2007). Quantitative analysis of total retronecine esters-type pyrrolizidine alkaloids in plant by high performance liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta.* 605: 94-101.

Zhang, F., C.H. Wang, *et al.* (2008). Quantitative analysis by HPLC-MS<sup>2</sup> of the pyrrolizidine alkaloid adonifoline in *Senecio scandens*. *Phytochem. Anal.* 19: 24-31.

Zündorf, I., H. Wiedenfeld, *et al.* (1998). Generation and characterization of monoclonal antibodies against the pyrrolizidine alkaloid retrorsine. *Planta Medica* 64: 259-263.

## ANEXO I: Panorama general de plantas que contienen AP

Familia	Género	Especie	Nombre común	Alcaloides de pirroizilidina	Productos	Reference:
<i>Asteraceae</i> ( <i>Compositae</i> )	Adenostyles	<i>Adenostyles alliariae</i>	Calabacera	senecionina integerrimina acetilsenecifilina espartioidina	productos o tés de hierbas (medicinales) complementos alimentarios	Langel <i>et al.</i> , 2011 Röder, 1995 <i>cited by EFSA</i> , 2007
	Ageratum				miel	Edgar <i>et al.</i> , 2002 EFSA, 2009
	Brachyglottis	<i>Brachyglottis repanda</i>	Rangiora <i>Bushman's friend</i>	senecionina senkirina	productos de hierbas medicinales	WKB, 2001 Langel <i>et al.</i> , 2011
	Chromolaena			acetilrinderina	miel	Edgar <i>et al.</i> , 2002
	Erechtites	<i>Erechtites hieracifolia</i>	Tabaquillo	senecionina senecifilina		WKB, 2001 Langel <i>et al.</i> , 2011
	Eupatorium	<i>Eupatorium aromaticum</i>	Ageratina aromática			WKB, 2001
		<i>Eupatorium cannabinum</i>	Cáñamo silvestre	intermedina licopsamina amabilina supinina rinderina equinatina	miel polen	Boppré <i>et al.</i> , 2008 Kempf <i>et al.</i> , 2010a, 2010b Röder, 1995 <i>cited by EFSA</i> , 2007 WKB, 2001 EFSA, 2009
		<i>Eupatorium purpureum</i> ( <i>Eutrochium purpureum</i> )	Eupatoria púrpura			WKB, 2001 EFSA, 2009
	Gynura	<i>Gynura segetum</i> <i>Sin. Gynura japonica</i>		senecionina acetilsenecifilina senecicannabina	alimentos productos de hierbas	Dai <i>et al.</i> , 2006, 2007 Qi <i>et al.</i> , 2009 WHO, 1988 Langel <i>et al.</i> , 2011
	Petasites	<i>Petasites albus</i>	Ruibarbo de ciénaga	senecionina senkirkine	productos o tés de hierbas complementos alimentarios	Langel <i>et al.</i> , 2011
		<i>Petasites hybridus</i>	Mosto pestilente	senecionina	productos o tés de hierbas	Chizzola <i>et al.</i> , 2000 <i>cited by</i>



		<i>sin. Petasites vulgaris</i> <i>sin. Petasites officinalis</i> <i>sin. Tussilago petasites</i>		integerrimina senkirkina	complementos alimentarios	EFSA, 2007 Röder, 1995 <i>cited by EFSA, 2007</i> WKB, 2001 EFSA, 2009 Langel <i>et al.</i> , 2011
		<i>Petasites spurius</i>	Mosto pestilente espurio	senkirkina (y AP no tóxicos)		Langel <i>et al.</i> , 2011 Röder, 1995 <i>cited by EFSA, 2007</i>
	Senecio	<i>Senecio adonidifolius</i> <i>sin. Jacobaea adonidifolia</i>	Senecio con hojas de Adonis	senecionina senecifilina adonifoline		WKB, 2001 Langel <i>et al.</i> , 2011
		<i>Senecio alpinus</i> <i>sin. Jacobaea alpina</i>	Senecio alpino	senecionina integerrimina acetilsenecifilina jacobine jacozine jaconina jacolina	piensos	Langel <i>et al.</i> , 2011
		<i>Senecio aquaticus</i> <i>sin. Jacobaea aquatica</i>	Senecio de pantano	senecionina senecionina integerrimina senecifilina acetilerucifolina otosenina florosena	piensos	Christov <i>et al.</i> , 2002 <i>cited by EFSA, 2007</i> Kirk <i>et al.</i> , 2004 <i>cited by EFSA, 2007</i> WKB, 2001 Langel <i>et al.</i> , 2011
		<i>Senecio aureus</i> <i>sin. Packera aurea</i>	Senecio áureo	senecionina otosenina floridanina		WKB, 2001 Langel <i>et al.</i> , 2011
		<i>Senecio bicolor</i> <i>sin. Senecio cineraria</i> <i>sin. Jacobaea maritima</i> <i>sin. Cineraria maritima</i>	Senecio cineraria	senecionina integerrimina senecifilina retrorsina jacobina jacozina		Röder, 1995 <i>cited by EFSA, 2007</i> WKB, 2001 EFSA, 2009 Langel <i>et al.</i> , 2011

				jaconina jacolina otosenina		
		<i>Senecio brigalowensis</i>	Adelfilla	esceleratina senkirkina otosenina deacetildoronina florosenina	piensos alimentos (carne y órganos)	Fletcher <i>et al.</i> , 2011
		<i>Senecio doronicum</i>	Senecio dorónico	doronina bulgarsenina	productos herbales o téis alimentos	Röder, 1995 <i>cited by EFSA</i> , 2007 WKB, 2001 Langel <i>et al.</i> , 2011
		<i>Senecio erucifolius</i> <i>sin. Jacobaea erucifolia</i>	Senecio grisáceo	senecionina integerrimina acetilsenecifilina espartioidina retrorsina acetierucifolina senecivernina jacobina jaconina		Langel <i>et al.</i> , 2011 Witte <i>et al.</i> , 1992 <i>cited by</i> <i>EFSA</i> , 2007
		<i>Senecio ilicifolius</i>		senecionina integerrimina senecifilina retrorsina	alimentos (cereales)	EFSA, 2007 Langel <i>et al.</i> , 2011 WHO, 1988
		<i>Senecio inaequidens</i> <i>sin. Senecio burchellii</i>	Hierba cana de hojas estrechas	senecionina integerrimina senecifilina espartioidina retrorsina senkirkina otosenina florosenine floridanina	piensos	EFSA, 2007 Mulder <i>et al.</i> , 2009 WHO, 1988 Langel <i>et al.</i> , 2011

				doronina		
		<i>Senecio incanus</i> <i>sin. Jacobaea incana</i>	Senecio alpino gris	senecionina integerrimina senecifilina jacobina jacozina jaconina jacolina		Langel <i>et al.</i> , 2011 WKB, 2001
		<i>Senecio jacobaea</i> <i>sin. Jacobaea vulgaris</i>	Hierba de Santiago Senecio común	senecionina integerrimina senecivernina acetilsenecifilina espartioidina retrorsina usaramina riddellina jacobina jacozina jacolina jaconina acetilerucifolina	productos herbales o tés piensos (orina, heces de bovino) alimentos (leche de bovino, de cabra) miel polen	COT, 2008 Crews <i>et al.</i> , 2009 Deinzer <i>et al.</i> , 1977 Dickinson <i>et al.</i> , 1976, 1980 (milk) Edgar <i>et al.</i> , 2002 Kempf <i>et al.</i> , 2010a, 2010b Kirk <i>et al.</i> , 2004 <i>cited by</i> <i>EFSA</i> , 2007 Macel <i>et al.</i> , 2004 <i>cited by</i> <i>EFSA</i> , 2007 Mulder <i>et al.</i> , 2009 Pelser <i>et al.</i> , 2005 <i>cited by</i> <i>EFSA</i> , 2007 Röder, 1995 <i>cited by EFSA</i> , 2007 Vrieling and Derridj, 2003 <i>cited by EFSA</i> , 2007 Walsh and Dingwell, 2007 WKB, 2001 WHO, 1988 Witte <i>et al.</i> , 1992 <i>cited by</i> <i>EFSA</i> , 2007 EFSA, 2009 Langel <i>et al.</i> , 2011
		<i>Senecio longilobus</i> <i>sin. Senecio flaccidus</i>	Senecio flácido	senecionina integerrimina senecifilina espartioidina	alimentos	Anonymous, 1988 <i>cited by</i> <i>ANZFA</i> , 2001 Langel <i>et al.</i> , 2011

				retrorsina usaramina riddellina		
		<i>Senecio madagascariensis</i>	Hierba cana de Madagascar Senecio de Madagascar Adelfilla	senecionina integerrimina senecivernina retrorsina usaramina acetilsenkirkina otosenina florosenina doronina	piensos	Gardner <i>et al.</i> , 2006 Langel <i>et al.</i> , 2011
		<i>Senecio nemorensis</i> <i>sin. Senecio ovatus</i>	Senecio de Nemi	senecionina fuchsisenecionina triangularina retroisosenina dororenina nemorensina	polen de miel	Boppré <i>et al.</i> , 2008 Kempf <i>et al.</i> 2010b EFSA, 2009 Langel <i>et al.</i> , 2011
		<i>Senecio riddellii</i>	Senecio de Riddell	retrorsina riddellina	piensos	ANZFA, 2001 COT, 2008 Langel <i>et al.</i> , 2011
		<i>Senecio scandens</i>	<i>Qian li guang</i>	senecionina senecifilina usaramina senkirkina jacobina jacozina erucifolina adonifolina	productos o tés de hierbas miel	Li <i>et al.</i> , 2008 Wang <i>et al.</i> , 2008 Zhang <i>et al.</i> , 2008 Langel <i>et al.</i> , 2011
		<i>Senecio sceleratus</i> <i>sin. Senecio latifolius</i>	Senecio de Rhodesia	senecifilina retrorsina esceleratina	piensos	Cooper, 2007 Langel <i>et al.</i> , 2011
		<i>Senecio vernalis</i>	Hierba cana oriental	senecionina integerrimina senecivernine	alimentos (huevos) polen de miel	Eröksüz <i>et al.</i> , 2003 <i>cited by</i> <i>EFSA</i> , 2007 Eröksüz <i>et al.</i> , 2008

				senecifilina riddellina retrorsina hidroxisenkirquina		Kempf <i>et al.</i> , 2010a Reinhard <i>et al.</i> , 2009 Skaanild <i>et al.</i> , 2001 <i>cited by EFSA</i> , 2007 Langel <i>et al.</i> , 2011
		<i>Senecio vulgaris</i>	Senecio común	senecionina integerrimina senecifilina espartioidina retrorsina usamarina riddellina	productos o tes de hierbas piensos alimentos (hortalizas para ensaladas)	BfR, 2007 Frischknecht <i>et al.</i> , 2001 <i>cited by EFSA</i> , 2007 Moyano <i>et al.</i> , 2006 Mulder <i>et al.</i> , 2009 Röder, 1995 <i>cited by EFSA</i> , 2007 WKB, 2001 EFSA, 2009 Langel <i>et al.</i> , 2011
	Solanecio	<i>Solanecio gigas</i>		senecionina integerrimina senecifilina espartioidina usaramine neosenkirquina bulgarsenina	producto herbal (medicinal) miel	Asres <i>et al.</i> , 2007
		<i>Solanecio angulatus</i> <i>Senecio subscandens</i>		senecionina integerrimina retrorsina	miel (polen)	Asres <i>et al.</i> , 2008 Langel <i>et al.</i> , 2011
		<i>Solanecio mannii</i> <i>sin. Senecio mannii</i>		no se encontraron AP tóxicos	producto herbal	Asres <i>et al.</i> , 2008
		<i>Solanecio tuberosus</i>		senecionina integerrimina eruciflorina senecifilina retrosina jacobina jaconina bulgarsenina	producto herbal	Asres <i>et al.</i> , 2008 Langel <i>et al.</i> , 2011

				retroisosenina		
	Tussilago	<i>Tussilago farfara</i>	Gordolobo	senkirkina senecionina		Jiang <i>et al.</i> , 2009 Röder, 1995 <i>cited by EFSA</i> , 2007 WKB, 2001 EFSA, 2009 Langel <i>et al.</i> , 2011
<i>Boraginaceae</i>	Alkanna	<i>Alkanna tinctoria</i> <i>sin. Anchusa tinctoria</i>	Palomilla de tintes	triangularina		WKB, 2001 EFSA, 2009
	Anchusa	<i>Anchusa arvensis</i>	Buglosa	echinatina?		WKB, 2001
		<i>Anchusa italica</i>	Buglosa italiana			WKB, 2001
		<i>Anchusa officinalis</i>	Buglosa oficial	7-acetil-licopsamina intermedina		Röder, 1995 <i>cited by EFSA</i> , 2007 WKB, 2001 EFSA, 2009
	Borago	<i>Borago officinalis</i>	Borraja	7-acetil-licopsamina 7-acetilintermedina supinina	alimentos miel (polen)	ANZFSC Edgar <i>et al.</i> , 2002 COT, 2008 Koninklijk besluit, 1997 Röder, 1995 <i>cited by EFSA</i> , 2007 WKB, 2001 Wretensjö and Karlberg, 2003 EFSA, 2009
	Cynoglossum	<i>Cynoglossum officinale</i>	Cinoglosa	12-acetilheliosupina 7-angeloilheliotridina equinatina viridiflorina	productos o tes de hierbas miel	Edgar <i>et al.</i> , 2002 Knight <i>et al.</i> , 1984 <i>cited by EFSA</i> , 2007 Röder, 1995, 2000 <i>cited by EFSA</i> , 2007 WHO, 1988 WKB, 2001 EFSA, 2009

	Echium	<i>Echium amoenum</i>		equimidina (isomero) 7-angeloil retronecina 7-tigloilretronecina	productos herbales	Mehrabani <i>et al.</i> , 2006
		<i>Echium plantagineum</i>	Buglosa Flor morada	equimidina equiumine equiuplatina	miel polen alimentos (cereales)	ANZFA, 2001 ANZFSC, FSANZ 2004 Beales <i>et al.</i> , 2004 Betteridge <i>et al.</i> , 2005 Boppré <i>et al.</i> , 2008 Culvenor <i>et al.</i> , 1981 Culvenor 1983, 1985 Edgar <i>et al.</i> , 2002 Kempf <i>et al.</i> , 2010b EFSA, 2009
		<i>Echium vulgare</i>	Viborera	equivulgarina acetilvulgarina acetilequimidina leptantina equimiplatina uplandicina equiuplatina	miel polen alimentos	ANZFSC Beales <i>et al.</i> , 2004, 2007 Betteridge <i>et al.</i> , 2005 Boppré <i>et al.</i> , 2008 Edgar <i>et al.</i> , 2002 Edgar and Smith, 2005 Kempf <i>et al.</i> , 2010a, 2010b Moyano <i>et al.</i> , 2006 EFSA, 2009
	Heliotropium	<i>Heliotropium amplexicaule</i>	Heliotropo azul	indicina heliospatina	miel piensos alimentos (carne y órganos)	Beales <i>et al.</i> , 2004 Fletcher <i>et al.</i> , 2011 Kempf <i>et al.</i> , 2010b
		<i>Heliotropium arborescens</i> <i>Heliotropium peruvianum</i>	Heliotropo común	(12-acetil)indicina		Röder, 1995 <i>cited by EFSA</i> , 2007 WKB, 2001
		<i>Heliotropium circinatum</i>		europina heliotrina heulerina lasiocarpina	alimentos (huevos)	Eröksüz <i>et al.</i> , 2008
		<i>Heliotropium dolosum</i>		europina	alimentos (huevos)	Eröksüz <i>et al.</i> , 2008

		<i>Heliotropium europaeum</i>	Verrucaria	lasiocarpina europina heliotrina supinina heleurina	alimentos (cereales) productos o tés herbales miel	Beales <i>et al.</i> , 2004 Edgar and Smith, 2000 EFSA, 2007 Kempf <i>et al.</i> , 2010b WHO, 1988 WKB, 2001 EFSA, 2009
		<i>Heliotropium indicum</i>	Alacrancillo	indicina echinatine supinina heleurina lasiocarpina		WKB, 2001 EFSA, 2009 Hartmann and Witte, 1995
		<i>Heliotropium popovii</i>	<i>Charmac</i>	heliotrina lasiocarpina	alimentos (cereales, trigo) piensos (leche de cabra)	Kakar <i>et al.</i> , 2010 WHO, 1988
	Lithospermum	<i>Lithospermum officinale</i>	Mijo de sol Granos de amor	12-acetil-litosenina		Röder, 1995 <i>cited by EFSA</i> , 2007 WKB, 2001 EFSA, 2009
	Myosotis	<i>Myosotis palustris</i> <i>sin. Myosotis scorpioides</i>	Nomeolvides de pantano	mioscorpina 7-acetilescorpioidina simfitina	miel	Edgar <i>et al.</i> , 2002 Röder, 1995 <i>cited by EFSA</i> , 2007
		<i>Myosotis sylvatica</i>	Nomeolvides	3-acetilheliosupina		Hartmann and Witte, 1995
	Pulmonaria	<i>Pulmonaria officinalis</i>	Pulmonaria			EFSA, 2009
	Symphytum	<i>Symphytum asperum</i>	Consuelda del Cáucaso	asperumina eliumina simlandina simfitina mioscorpina echinatine equimidina	productos o tés de hierbas alimentos	Hartmann and Witte, 1995
		<i>Symphytum officinale</i>	Consuelda	7-acetilintermedina 7-acetil-licopsamina equimidina	productos o tés de hierbas alimentos	ANZFS Couet <i>et al.</i> , 1996 <i>cited by</i> <i>EFSA</i> , 2007



				simlandina simviridina mioscorpina simfitina		Mei <i>et al.</i> , 2005 Röder, 1995 <i>cited by EFSA</i> , 2007 Oberlies <i>et al.</i> , 2004 <i>cited by EFSA</i> , 2007 WKB, 2001 EFSA, 2009
		<i>Symphytum tuberosum</i>	Consuelda menor	amadolina 7-acetil-licopsamina simfitina equimidina		EFSA, 2009 Hartmann and Witte, 1995
		<i>Symphytum x uplandicum</i> <i>sin. Symphytum peregrinum</i>	Consuelda rusa	equimidina 7-acetilintermedina 7-acetil-licopsamina uplandicina simlandina simviridina mioscorpina simfitina	productos o tés de hierbas alimentos	Röder, 1995 <i>cited by EFSA</i> , 2007
<i>Fabaceae</i> ( <i>Leguminosae</i> )	Crotalaria	<i>Crotalaria alata</i>		monocrotalina fulvina	especies de pastizal	Fletcher <i>et al.</i> , 2009
		<i>Crotalaria aridicola</i>		no se encontraron AP tóxicos	especies de pastizal	Fletcher <i>et al.</i> , 2009
		<i>Crotalaria brevis</i>		monocrotalina fulvina	especies de pastizal	Fletcher <i>et al.</i> , 2009
		<i>Crotalaria crispata</i>		monocrotalina fulvina crispatina	especies de pastizal	Fletcher <i>et al.</i> , 2009
		<i>Crotalaria cunninghamii</i>		retusamina	especies de pastizal	Fletcher <i>et al.</i> , 2009
		<i>Crotalaria dissitiflora</i>			especies de pastizal	Fletcher <i>et al.</i> , 2009
		<i>Crotalaria goreensis</i>		no se encontraron AP tóxicos	especies de pastizal	Fletcher <i>et al.</i> , 2009

		<i>Crotalaria grahamiana</i>		monocrotalina grahamina	especies de pastizal	Fletcher <i>et al.</i> , 2009
		<i>Crotalaria incana</i>		integerrimina usaramina	especies de pastizal	Fletcher <i>et al.</i> , 2009
		<i>Crotalaria juncea.</i>		senecionina integerrimina junceina tricodesmina	especies de pastizal	Ji <i>et al.</i> , 2005
		<i>Crotalaria lanceolata</i>			especies de pastizal	Fletcher <i>et al.</i> , 2009
		<i>Crotalaria medicaginea</i>		no se encontraron AP tóxicos	especies de pastizal	Fletcher <i>et al.</i> , 2009
		<i>Crotalaria mitchellii</i>		retusamina crosemperina de-etilretusamina	especies de pastizal	Fletcher <i>et al.</i> , 2009
		<i>Crotalaria montana</i>		fulvina	especies de pastizal	Fletcher <i>et al.</i> , 2009
		<i>Crotalaria nana</i>		crotnanina cronaburmina	alimentos	Anonymous, 1988 <i>cited by ANZFA, 2001</i>
		<i>Crotalaria novae-hollandiae</i>		retusamina crosemperina croaeiptina monocrotalina crispatina tricodesmina	especies de pastizal food (meat and organs)	Fletcher <i>et al.</i> , 2009
		<i>Crotalaria pallida</i>		usaramina integerrimina	especies de pastizal	Fletcher <i>et al.</i> , 2009
		<i>Crotalaria ramosissima</i>		fulvina	especies de pastizal	Fletcher <i>et al.</i> , 2009

				monocrotalina crispatina		
		<i>Crotalaria retusa</i>	Cascabelillo	monocrotalina espectabilina retusina	productos o tés de hierbas alimentos (cereales) especies de pastizal	Anjos <i>et al.</i> , 2010 Fletcher <i>et al.</i> , 2009 Hooper and Scanlann, 1977 <i>cited by EFSA, 2007</i>
		<i>Crotalaria spectabilis</i>		monocrotalina espectabilina retusina	especies de pastizal	Fletcher <i>et al.</i> , 2009 Hooper and Scanlann, 1977 <i>cited by EFSA, 2007</i> Ji <i>et al.</i> , 2005 EFSA, 2009
		<i>Crotalaria verrucosa</i>		acetilcrotaverrina fulvina pumilina A	especies de pastizal	Fletcher <i>et al.</i> , 2009
		<i>Crotalaria zanzibarica</i>		usaramina integerrimina	especies de pastizal	Fletcher <i>et al.</i> , 2009
	Trichodesma	<i>Trichodesma incanum</i>		tricodesmina		EFSA, 2009

**ANEXO II:** Datos de estudios de genotoxicidad

<b>Substancia (pureza)</b>	<b>Análisis</b>	<b>Concentración</b>	<b>Resultados</b>	<b>Referenci</b>
Riddellina (pureza confirmada)	análisis de <sup>32</sup> P-postetiquetado/HPLC de aductos de ADN derivados de DHP en hígados de ratas hembras  (Para confirmar los resultados se hizo el metabolismo microsomal de hígado de rata <i>in vitro</i> pero no se describe)	Riddellina: 1 nmol	Riddellina (pos contr): 1350±127 ad./10 <sup>8</sup> nucl.	Chou and Fu, 2006
Consuelda (extracto de raíz, aceite compuesto, hojas, consuelda)		Extracto de raíz de consuelda: equivalente a 2.28 nmol riddellina	Extracto de raíz de consuelda: 22.0±3.8 ad./10 <sup>8</sup> nucl.	
		Aceite compuesto de consuelda: eq. to 13.1 nmol riddellina	Aceite compuesto de consuelda: 31.9±5.1 ad./10 <sup>8</sup> nucl.	
		Hoja de consuelda, tableta: no AP Hoja de consuelda, pepsina: no AP		
Tusilago (extracto de raíz, tusilago)		Extracto de raíz de tusilago: eq. a 1,86 nmol riddellina	Extracto de raíz de tusilago: 12.9±7.3 ad./10 <sup>8</sup> nucl.	
		Tusilago: eq. a 2,66 nmol riddellina		
Flos farfara		Flos farfara: eq. a 6,66 nmol	Flos farfara: 7.4±3.2 ad./10 <sup>8</sup> nucl.	

		riddellina (no se menciona la consuelda)	No se detectaron aductos de ADN derivados del DHP en las hojas de consuelda, la consuelda o el tusílago  (El metabolismo <i>in vitro</i> mostró resultados análogos)	
Riddellina  Consuelda  (no se conocen la pureza ni la composición exacta)	Se compararon la expresión en los genes y procesos de funciones biológicas en el hígado de las ratas con chips de ADN y análisis computarizado de datos, respectivamente	1 mg/kg riddellina (5x/semana) durante 12 semanas  alimentación con 8% de raíz de consuelda durante 12 semanas	Espectro comparable de mutación entre la consuelda y la riddellina  Fuerte correlación entre la expresión genética de modificaciones causadas por la riddellina y la consuelda, especialmente en los genes metabolizantes y los genes relacionados con el cáncer	Guo <i>et al.</i> 2007
Consuelda (simfitina, 7-acetil-licopsamina, 7-acetilintermedina)  (no se conoce la composición exacta)	Determinación de frecuencias mutantes (MF) en el hígado de ratas machos  Comparación del tipo de mutaciones inducidas por la consuelda con la riddellina (Mei <i>et al.</i> , 2004)	alimentación con 2% de raíz de consuelda durante 12 semanas	$MF_{\text{consuelda}} = 146 \pm 15 \times 10^{-6}$ $MF_{\text{control}} = 30 \pm 16 \times 10^{-6}$  No se observaron diferencias significativas entre los espectros de mutaciones (principalmente G:C→T:A transversión) inducidos por la consuelda y la riddellina  Strong indicó que las mutaciones inducidas por la consuelda se deben a la presencia en la misma de AP	Mei <i>et al.</i> 2005
Consuelda (no se conoce la	Determinación de frecuencias	alimentación con 8% de raíz	$MF = 139 \pm 35 \times 10^{-6}$	Mei <i>et al.</i> 2006

composición exacta)	mutantes (MF) y análisis de secuencias en el hígado de ratas machos (comparación con Mei <i>et al.</i> , 2005)  Análisis con chip para estudiar la expresión de las modificaciones genéticas	de consuelda durante 12 semanas	(comparable con una alimentación con 2% de consuelda)  El espectro de mutación de la alimentación de 8% fue considerablemente diferente del de control, pero no del espectro de mutación de la alimentación con 2%  La exposición a la consuelda modificó la expresión de los genes que participan en el metabolismo, lesión de las células endoteliales y lesión hepática y anomalías hepáticas, incluida fibrosis del hígado y cáncer	
Riddellina (>97%)	Análisis genético con chips para estudiar los perfiles de expresión genética del hígado de ratas hembras	1 mg/kg pc (5 días/semana) durante 12 semanas	Los genes modificados por la riddellina participaron principalmente en cáncer, muerte celular, desarrollo tisular, movimiento celular, morfología tisular, señalación e interacción de célula a célula, y crecimiento y proliferación celular	Mei <i>et al.</i> 2007a
Consuelda (simfitina, 7-acetil-licopsamina, 7-acetilintermedina)  (no se conoce la composición exacta)	Determinación de frecuencias mutantes (MF) y análisis de secuencias en pulmón de ratas machos	alimentación con 8% de raíz de consuelda durante 12 semanas	MF <sub>consuelda</sub> = $47,7 \pm 8,9 \times 10^{-6}$ MF <sub>control</sub> = $33,8 \pm 9,6 \times 10^{-6}$  El espectro de mutación de la consuelda (principalmente	Mei and Chen 2007b

			<p>transversión G:C→T:A) fue muy diferente del de control, pero comparable al espectro de mutación de la riddellina y al de la consuelda observados en el hígado de las ratas</p> <p>Sin embargo, se observaron otras mutaciones también lo que indica que otros compuestos que hay en la consuelda pueden intervenir en la mutagenicidad pulmonar</p>	
Retrorsina (pureza desconocida)	<p>Metabolismo <i>in vitro</i> de retrorsina en microsomas de hígado, pulmón, riñón y bazo de rata hembra en presencia o ausencia de triacetilolandomicina (TAO, liver enzyme CYP3A inhibitor) and dexamethasone (liver enzyme inducer)</p> <p>Análisis de <sup>32</sup>P-postetiquetado/HPLC de aductos de ADN derivados de DHP en hígado de rata hembra (<i>in vivo</i>) y en microsomas de hígado de rata (<i>in vitro</i>)</p>	<p><i>In vitro</i></p> <p>Retrorsina: 2 μmol</p>	<p><i>Microsomas hepáticos</i></p> <p>Tasa de formación de DHP del metabolismo de la retrorsina en presencia de 1,7 veces más elevado que en ausencia de dexametasona</p> <p>Formación de DHP de 67% (con dexametasona) reducida en presencia de TAO</p> <p>Formación de 29% de N-óxido de retrorsina (con dexametasona) y reducción del 30% (sin dexametasona) en presencia de TAO</p> <p>Se encontraron los mismos aductos de ADN derivados de DHP con metabolismo microsomal de</p>	Wang <i>et al.</i> 2005a

			<p>retrorsina que con la riddellina (control positivo)</p> <p><i>Microsomas extrahepáticos</i></p> <p>Las actividades de enzimas metabolizadoras de la retrorsina tanto inducidas por dexametasona como en microsomas de ratas de control, muy inferiores en comparación con microsomas hepáticos</p> <p><i>In vivo</i></p> <p>Se encontraron los mismos aductos de ADN derivados de DHP con metabolismos de retrorsina <i>in vivo</i> que con la riddellina (control positivo)</p>	
		<p><i>In vivo</i></p> <p>1.0 mg/kg/día durante 3 días seguidos</p>		
<p>Riddellina (N-óxido)</p> <p>Retrorsina (N-óxido)</p> <p>Monocrotalina (N-óxido)</p> <p>(purezas confirmadas)</p>	<p>Metabolismo <i>in vitro</i> en microsomas de rata hembra y humanos en condiciones oxidativas e hipóxicas y con o sin troleandomicina (TAO, inhibidor de enzima hepática CYP3A)</p> <p>análisis <sup>32</sup>P-postetiquetado/HPLC de</p>	<p><i>In vitro</i></p> <p>N-óxido de monocrotalina: 1.5 µmol</p> <p>N-óxido de riddellina y N-óxido de retrorsina: 1.4 µmol</p>	<p><i>In vitro</i></p> <p>Tanto el DHP como los AP parentales correspondientes son metabolitos mayores del metabolismo microsomal de N-óxidos de AP de la rata y los seres humanos</p> <p>En condiciones de oxidación, se</p>	<p>Wang <i>et al.</i>, 2005b</p>



	<p>aductos de ADN derivados de DHP en hígados de ratas hembras (<i>in vivo</i>)</p>	<p><i>In vivo</i></p> <p>Riddellina, retrorsina y N-óxido de monocrotalina: 2,9 µmol/kg/día durante 3 días seguidos</p> <p>Monocrotalina: 3,0 µmol/kg/día</p>	<p>inhibe la reducción de N-óxido-AP al compuesto parental, mientras que en condiciones hipóxicas disminuye la formación de DHP</p> <p>La TAO inhibió la formación de DHP un &gt;70%, mientras que no intervino en la reducción del N-óxido</p> <p>El nivel de actividad las enzimas microsomales de las ratas y los seres humanos es comparable</p> <p>La tasa del metabolismo <i>in vitro</i> presenta el siguiente orden: riddellina ≥ retrorsina &gt; monocrotalina</p> <p><i>In vivo</i></p> <p>Niveles de aductos de ADN (<i>in vivo</i>) derivados de DHP:</p> <p>Riddellina: 118±17ad./10<sup>7</sup>nucl.</p> <p>Retrorsina: 110±18ad./10<sup>7</sup>nucl.</p> <p>Monocrotalina: 55,2±1ad./10<sup>7</sup>nucl.</p>	
--	---	---	---	--

		N-óxido de riddellina y N-óxido de retrorsina: 2,7 μmol/kg/día	N-óxido de riddellina: 39,9±0.6ad./10 <sup>7</sup> nucl.  N-óxido de retrorsina: 11,5±0.1ad./10 <sup>7</sup> nucl.  N-óxido de monocrotalina: 9,2±0,1ad./10 <sup>7</sup> nucl.	
Riddellina (pureza desconocida)	Metabolismo de la riddellina por microsomas del hígado de ratas y de seres humanos en presencia o ausencia de triacetiloleandomicina (TAO, inhibidor de la enzima hepática CYP3A)  análisis <sup>32</sup> P-postetiquetado/HPLC de aductos de ADN derivados de DHP formados del metabolismo microsomal hepático de ratas y humanos	0,1 mM	Los principales metabolitos de la riddellina fueron N-óxido de riddellina y DHP a consecuencia del metabolismo microsomal hepático tanto de ratas como de seres humanos  Los parámetros cinéticos V <sub>max</sub> en K <sub>m</sub> del metabolismo microsomal hepático humano fueron comparables a los del metabolismo microsomal hepático de la rata  Se detectó el mismo conjunto de ocho aductos de ADN derivados de DHP después del metabolismo microsomal hepático de ratas y seres humanos  En presencia de TAO, se redujo la formación de DHP y N-óxido de riddellina un 48% y 92%,	Xia <i>et al.</i> 2003

			respectivamente	
Lasiocarpina (>99%)  Riddellina (pureza desconocida)	Metabolismo <i>in vitro</i> de lasiocarpina en microsomas hepáticos de ratas hembras en presencia o ausencia de ketoconazol o troleandomicina (TAO) (inhibidores ambos de la enzima hepática CYP3A) y dexametasona (inductor de enzima hepática)  análisis <sup>32</sup> P-postetiquetado/HPLC de aductos de ADN derivados de DHP formados por metabolismo microsomal hepático de rata	0,2 mM	Se formaron los mismos aductos de ADN derivados de DHP por metabolismo de lasiocarpina que con riddellina (pos. control)  Nivel de aductos de ADN derivados de DHP: Riddellina: 10,2±3,3ad./10 <sup>6</sup> nucl. Lasiocarpina: 10,1±3,3d./10 <sup>6</sup> nucl.  La formación de DHP por microsomas hepáticos después de tratamiento con dexametasona 1,6 veces más y 3,47 veces más para rata macho y hembra  Tanto el ketoconazol como la TAO redujeron la formación de DHP de un 85% a un 92%	Xia <i>et al.</i> 2006
Heliotrina  Riddellina (N-óxido)  Retrorsina (N-óxido)  Monocrotalina	análisis <sup>32</sup> P-postetiquetado/HPLC de aductos de ADN derivados de DHP formados por metabolismo microsomal hepático de rata	0,2 mM	Se formó el mismo conjunto de aductos de ADN derivados de DHP por metabolismo de heliotrina en comparación con el de riddellina  Niveles relativos de formación de aductos ADN-DHP: Riddellina: 38.5±23.2add/10 <sup>8</sup> nucl ≈	Xia <i>et al.</i> 2008

(pureza desconocida)			Lasiocarpina > Retrorsina: 196±22,8ad./10 <sup>8</sup> nucl. > Monocrotalina: 88.7±2,7ad./10 <sup>8</sup> nucl. ≈ Retrorsina N-oxide: 76±8,5ad./10 <sup>8</sup> nucl. ≥ Riddellina N-óxido: 66±10,8ad./10 <sup>8</sup> nucl. > Heliotrina 23,1±8,3ad./10 <sup>8</sup> nucl	
Retronecina (N-óxido)  Riddellina (N-óxido)  Dehidroretronecina (DHR/ (DHP))  (pureza desconocida)	análisis <sup>32</sup> P-postetiquetado/HPLC de aductos de ADN derivados de DHP formados por metabolismo microsomal hepático de rata ( <i>in vitro</i> ) y de metabolismo ( <i>in vivo</i> )	<i>In vitro</i>  Riddellina, N-óxido de riddellina, retronecina, N-óxido de retronecina: 0.31 mg en 50 µL DMSO  <i>In vivo</i>  Riddellina y N-óxido de riddellina: 3 µmol/kg/día durante 3 días seguidos  Retronecina y N-óxido de retronecina: 6 µmol/kg/día durante 3 días seguidos	El metabolismo de la retronecina, el N-óxido de retronecina, la riddellina y el N-óxido de riddellina, <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> produjeron perfiles comparables de aductos ADN-DHP  Niveles relativos de formación de aductos ADN-DHP: DHR > riddellina > N-óxido de riddellina >> retronecina > N-óxido de retronecina	Yan <i>et al.</i> 2008
Riddellina (pureza desconocida)	Metabolismo <i>in vitro</i> de microsomias hepáticas de rata hembra en presencia o ausencia de fenobarbital (activación metabólica)  análisis <sup>32</sup> P-postetiquetado/HPLC de aductos de ADN derivados de	<i>In vitro</i>  2 µmol en 50 µL DMSO	<i>In vitro</i>  El metabolismo de la riddellina mejoró después del tratamiento con fenobarbital  Se formaron los mismo ocho aductos de ADN después del	Yang <i>et al.</i> 2001

	DHP formados por metabolismo microsomal hepático de rata ( <i>in vitro</i> ) y de metabolismo ( <i>in vivo</i> )	<i>In vivo</i> 0,01, 0,033, 0,1, 0,33, 1,0 mg/kg/día (5 días/semana) durante 3 o 6 meses	metabolismo de riddellina como reacción DHR posterior con ADN  <i>In vivo</i> Se encontró un perfil del aducto de ADN similar <i>in vivo</i> que <i>in vitro</i>  Se obtuvo una relación dosis-respuesta entre la dosis y la cantidad del total de aductos de ADN	
--	--	---	--	--

**ANEXO III: Métodos de extracción de los AP en plantas, alimentos y piensos**

Producto	Método de extracción	Observaciones	Referencias
<b>Plantas</b>			
Hierba de Santiago	A temperatura ambiente con una solución de 2% de ácido fórmico en una relación de peso/volumen de 1,2:1,0 durante 1 h y con 0,25 M de ácido sulfúrico en una relación peso/volumen de 1,5:100 por 1 h. Se obtuvieron extracciones comparables con ambos solventes.	Usado en combinación con dos métodos de detección (GC-NPD y LC-MS/MS). El ácido fórmico presenta la ventaja de ser compatible con el análisis de LC-MS/MS.	Joosten <i>et al.</i> , 2010
Senecio común	0,05M de ácido sulfúrico en 30 min a temperatura ambiente		Hartmann and Toppel, 1987
Hojas de consuelda	Remojar en agua caliente (a 90°C) durante 5 min en una relación peso/solvente de 1:100.	Se extrajeron con eficacia los N-óxidos de AP con este método.	Oberlies <i>et al.</i> , 2004
Consuelda	Metano/agua 1:1 en una relación peso/volumen de 1:60 a 65°C durante una hora.	La extracción también se hizo con un sistema de extracción a presión con agua caliente, pero la obtención fue menor.	Liu <i>et al.</i> , (2009)
Raíz de consuelda en polvo	Metanol/agua 30/70 v/v con 5% ácido acético con baño ultrasónico a 45°C por 45 min. Se uso una relación peso/solvente de 1:50.		Altamirano <i>et al.</i> , 2005
Especies de sínfito, tusílagos, petasitas, emilias y dorónicas	Solución de 1% de ácido tartárico con metanol por 2 h a temperatura de reflujo, o decocción de las hojas en agua hirviendo durante 15 min en una relación peso/solvente de 1:40.		Mroczek <i>et al.</i> , 2002
Tusílagos	Las extracciones más elevadas se obtuvieron con una mezcla de metanol/agua 50/50 acidificada con ácido cítrico a un pH 2-3. Se extrajo material vegetal durante 15 min a una temperatura de reflujo en una relación peso/volumen de 1:60.	Se probaron diferentes solventes de extracción (agua, metanol y en combinación con modificadores ácidos y alcalinos) para optimizar la extracción de AP.	Lebada <i>et al.</i> , 2000
Tusílagos	Se obtuvieron mejores resultados con una mezcla de metanol/agua 1:1, acidificada con ácido clorhídrico a un pH 2-3.	Comparación de extracción con microondas (15 min), extracción con agua caliente a presión (50 min) y extracción bajo reflujo (60	Jiang <i>et al.</i> , 2009

		min). Con todos los métodos se obtuvieron recuperaciones análogas.	
Qianliguang (medicamento herbal chino)*	Extracción ultrasónica con 0,2% HCl por 40 min en una relación peso/solvente de 1,2:100.		Zhang <i>et al.</i> , 2008
Medicamentos herbales chinos*	Metano/agua 1:1, acidificada con ácido cítrico a un pH de 2-3 por 30 min a temperatura de reflujo a una relación peso/volumen de 1:60.		Yu <i>et al.</i> , 2005
<i>Gynura segetum</i> (medicamento herbal chino)*	Metano/agua 1:1, acidificada con ácido cítrico (pH 2-3) a temperatura ambiente por 30 min a una relación peso/solvente de 1:50.		Qi <i>et al.</i> , 2009a
<b>Miel y polen</b>			
Miel	Mezclas de 0,05 M ácido sulfúrico/metanol en una relación peso/volumen de 1:1,5.	La adición de un alto porcentaje de metanol produjo un precipitado.	Betteridge <i>et al.</i> , 2005
Miel	Dilución con agua a una relación peso/volumen de 1:2.		Beales <i>et al.</i> , 2004
Miel	0,05 M de ácido sulfúrico a una relación peso/volumen de 1:1,5.		Kempf <i>et al.</i> , 2008
Miel	Dilución con 0,05 M ácido sulfúrico en una relación de 2:1 peso/volumen por 1 h a temperatura ambiente.		Crews <i>et al.</i> , 1997
Polen de miel de <i>Echium</i>	0,05 M de ácido sulfúrico a una relación peso/volumen de 1:100 por 4 h a temperatura ambiente.		Boppré <i>et al.</i> , 2005
Polen de miel	0,05 M de ácido sulfúrico a una relación peso/volumen aprox. de 1:30 por 16 h. El polen con contenido bajo de AP se extrajeron en una relación peso/volumen de 1:10 durante 30 h.		Boppré <i>et al.</i> , 2008
Miel	Dilución con agua en una relación peso/volumen de 1:4 y extracción líquido-líquido con acetonitrilo después de añadir sales de QuEChERS.		Kempf <i>et al.</i> , 2011
Polen molido	0,05 M de ácido sulfúrico para extraer en una relación peso/volumen de 1:15 en 24 h.		Kempf <i>et al.</i> , 2010
* Las compilaciones de las hierbas medicinales chinas que contienen APs están disponibles (Roeder, 2000; Fu et al, 2007; Roeder and Wiedenfeld, 2009)			

<b>Piensos</b>			
Forrajes	Extracción con 2% de ácido fórmico por 30 m a temperatura ambiente a una relación peso/solvente de 1:20.		Mulder <i>et al.</i> , 2009
<b>Otros</b>			
Heces de bovino	Extracción con 2% de ácido fórmico por 30 m a temperatura ambiente a una relación peso/solvente de 1:20.		Hoogenboom <i>et al.</i> 2011

#### ANEXO IV: Métodos de limpieza de extractos que contengan AP

<b>Método de limpieza</b>	<b>Tipos de extractos</b>	<b>Observaciones</b>	<b>Referencias</b>
<b><i>Extracción líquido líquido (LLE)</i></b>			
Los agentes reductores utilizados fueron polvo de zinc y metabisulfito de sodio. LLE con diclorometano en columnas Extrelut.	Hierba de Santiago	La LLE con solventes clorinados como el diclorometano requiere reducción de los N-óxidos de AP polares a las aminas terciarias antes de la LLE. Se obtuvieron resultados relativamente más altos con polvo de zinc en comparación al metabisulfito de sodio.	Joosten <i>et al.</i> , 2010
Reducción del extracto de la planta en polvo de zinc en 0,05M de ácido sulfúrico, seguido de LLE en columna Extrelut con diclorometano	Varias especies de hierba cana		Hartmann and Toppel., 1987, Hartmann and Witte, 1992, Hartmann and Dierich, 1998
Reducción con polvo de zinc, seguida de LLE en columna Extrelut con diclorometano/metanol (95:5)	Miel		Crews <i>et al.</i> , 1997.



<i>Extracción en fase sólida</i>			
EFS con intercambio catiónico (SCE) para los AP y NOAP	Especies de <i>Symphytum</i> , <i>Tussilago</i> , <i>Petasites</i> , <i>Emilia</i> y <i>Doronicum</i>		Mroczek <i>et al.</i> , 2002
Cartuchos de SCE para extraer los AP y NOAP de extractos ácidos acuosos	Buglosa o flor morada		Colegate <i>et al.</i> , 2005
Cartuchos de SCE para extraer los AP y NOAP de extractos ácidos acuosos	Miel		Beales <i>et al.</i> , 2004, Betteridge, 2005
EFS con cartuchos de SCE	Polen de viborera y otras especies		Boppré <i>et al.</i> , 2005, Boppré <i>et al.</i> , 2008
Cartuchos de SCE	Miel y polen		Kempf <i>et al.</i> , 2008, 2010
Columnas de SPE en línea con C18	Miel		Kempf <i>et al.</i> , 2011
Cartuchos para SPE poliméricos neutrales	Forrajes		Mulder <i>et al.</i> 2009
Cartuchos para SPE poliméricos neutrales	Orina y heces de bovino		Hoogenboom <i>et al.</i> 2011

## ANEXO V: Métodos de separación y detección de AP

	Método	Producto original	AP	LOD	Observaciones	Referencias
<b>GC</b>						
Producto herbal	GC-EI-MS de AP derivados	Aceite de borraja y partes de la planta de la borraja	AP de <i>Borago officinalis</i>	20 ng/g		Wretensjö and Karlberg, 2003
Miel y polen	Método de GC-MS. Los diversos AP primero se reducen a su estructura esencial de necina y después se derivan y analizan	Miel y polen	Retronecina, base de necina principal de muchos AP: determinación de la suma de AP.	3 ng/g (LOD) 10 ng/g (LOQ)	Este método no se aplicable a los AP del tipo de otonecina.	Kempf <i>et al.</i> (2008, 2010)
Tejido animal	Método de GC. Es necesario hacer la derivación antes del análisis para volatilizar la base de necina	Fluido del rumen de oveja	Retronecina, base central de necina de muchos AP	90 ng/ml		Hovermale and Graig, 1998
<b>LC-MS</b>						
Producto herbal	LC-MS/MS con puente de C18 RP HPLC a pH 11	Hierba de Santiago	AP y N-óxidos de AP de <i>Senecio jacobaea</i>	200-500 ng/g	Prácticamente no se requiere tratamiento previo de las muestras.	Joosten <i>et al.</i> (2010)

LC-IT-MS con columna de C18 RP HPLC	Hierba de Santiago	AP y N-óxidos de AP de <i>Senecio jacobaea</i>	Aprox 1000 ng/g	Método semicuantitativo para supervisar la degradación de los AP con la elaboración de compostas.	Crews and Anderson, 2009, Crews <i>et al.</i> 2009, Hough <i>et al.</i> , 2010
LC-IT-MS con columna de C18 RP HPLC	Coltsfoot	AP de <i>Tussilago farfara</i>	Aprox. 500 ng/g		Jiang <i>et al.</i> , 2009
LC-IT-MS con columna de C18 RP HPLC	Consuelda	AP y N-óxidos de AP de <i>Symphytum</i>	LOQ 100 ng/g		Liu <i>et al.</i> (2009)
LC-IT-MS con columna de C18 RP HPLC	Raíz de consuelda rusa	AP y N-óxidos de AP de <i>Symphytum</i>	??	Método para identificar nuevos AP	Wuilloud <i>et al.</i> (2004)
LC-IT-MS con columna de C18 RP HPLC	Productos comerciales de consuelda	AP y N-óxidos de AP de <i>Symphytum</i>	??	Análisi cualitativo	Altamirano <i>et al.</i> (2005)
LC-IT-MS con columna de C18 RP HPLC a pH elevado	Dos especies de <i>Onosma</i> y <i>Emilia</i>	AP y N-óxidos de AP de <i>Emilia</i> y <i>Onosma</i>	??	Método para identificar nuevos AP	Mroczek <i>et al.</i> , 2004

	LC-IT-MS con columna de Aqua C8 RP HPLC	Buglosa o flor morada	AP y N-óxidos de AP de <i>Echium</i>	??	Método para identificar nuevos AP	Colegate et al (2005)
<b>Producto herbal</b>	LC-IT-MS con columna de C18 RP HPLC	<i>Gynura segetum</i> (Hierba medicinal china)	AP y N-óxidos de AP de <i>Gynura segetum</i>	??	Método para identificar nuevos AP	Qi et al (2009)
	LC-MS/MS con columna de C18 RP HPLC a pH elevado	Qianliguang (Hierba medicinal china)	AP y N-óxidos de AP de <i>Senecio scandens</i>	690 ng/g		Li et al., 2008;
	LC-IT-MS con columna de C18 RP HPLC	Qianliguang	AP y N-óxidos de AP de <i>Senecio scandens</i>	50-100 ng/g		Zhang et al., 2008
	LC-IT-MS con columna de Aqua C18 RP HPLC	Productos herbales	AP y N-óxidos de AP de <i>Symphytum</i> y <i>Senecio scandens</i>	1 ng/ml en extracto		Cao et al (2008)
<b>Miel y polen</b>	LC-MS con columna polimérica de HPLC	Miel	AP de <i>Senecio jacobaea</i>	2 ng/g	Reducción de N-óxidos de AP antes del análisis	Crews et al., 1997
	LC-IT-MS con columna de C8 RP HPLC	Miel	AP de <i>Echium</i> y <i>Heliotropium</i>	Aprox. 1,5 ng/g	Reducción de N-óxidos de AP antes del análisis	Beales et al., 2004;

	LC-IT-MS con columna de Aqua C18 RP HPLC	Miel	AP y N-óxidos de AP de <i>Echium</i>	Aprox. 1.5 ng/g		Betteridge <i>et al.</i> , 2005
	LC-IT-MS con columna de Aqua C18 RP HPLC	Polen	AP y N-óxidos de AP de polen de <i>Echium</i> , <i>Eupatorium</i> , <i>Senecio jacobaea</i> y <i>S. ovatus</i>	??	Método de identificación de nuevos AP	Boppré <i>et al.</i> , 2005; Boppré <i>et al.</i> 2008
Pienso	LC-MS/MS con puente de C18 RP UPLC a pH 11	Forrajes	AP y N-óxidos de AP de <i>Senecio jacobaea</i> , <i>S. vulgaris</i> y <i>S. inaequidens</i>	5-10 ng/g		Mulder <i>et al.</i> , 2009
Productos animales	LC-MS/MS con puente de C18 RP UPLC	Leche de bovino	AP y N-óxidos de AP de <i>Senecio jacobaea</i>	LOQ 0,05-0,2 ng/ml		Hoogenboom <i>et al.</i> , 2011

Otros	LC-ToF-MS y LC-IT-MS con columna de C18 RP HPLC	Suero, orina y bilis de rata	Metabolitos de AP de <i>Senecio scandens</i>	LOQ 0,6-1,2 ng/ml	Método para identificar nuevos AP y metabolitos de AP.	Xiong <i>et al.</i> , 2009a, 2009b
	LC-MS/MS con puente de C18 RP UPLC a pH 11	Orina, heces de bovino	AP y N-óxidos de AP de <i>Senecio jacobaea</i>	LOQ 0.2-0.5 ng/ml		Hoogenboom <i>et al.</i> , 2011

## ANEXO VI: Datos sobre la presencia de AP en grupos de alimentos

	Plantas con AP (AP analizados)	Producto	Origen	Concentración media	Concentración mínima	Concentración máxima	Método analítico utilizado (LD/LC)	Referencia	
Piensos y especies de pastizales	Total de AP	Ensilado de pastos	Países Bajos	<10 µg/kg	-	28 µg/kg	Basado en LC-MS/MS (LOD= 10 µg/kg)	Mulder <i>et al.</i> , 2009	
		Ensilados premarchitados		<10 µg/kg	-	<10 µg/kg			
		Paja		<10 µg/kg	-	<10 µg/kg			
		Reserva natural de paja		22 µg/kg	-	549 µg/kg			
		Pastos secos		<10 µg/kg	-	<10 µg/kg			
		Pasto granulado		21 µg/kg	-	288 µg/kg			
		Paja, alfalfa seca		411 µg/kg	-	3 524 µg/kg			
		Alfalfa granulada		476 µg/kg	-	5 401 µg/kg			
	Senecio de Madagascar ( <i>Senecio madagascariensis</i> ) (Total de AP)	Tallos, hojas, flores	Hawai, Maui, islas de Hawai	874 µg/g	217 µg/g	1 990 µg/g	GC-MS (no se conocen el LC ni el LC)	Gardner <i>et al.</i> , 2006	
	Cáñamo de la India ( <i>Crotalaria juncea</i> ) (Total de AP de los que sólo se encontraron junceina y tricodesmina)	Semillas	Asia sudoriental, América del Sur, África, Europa	1,87 µmol/g	0,8 µmol/g	3,8 µmol/g	HPLC-UV-ELSD (LD= 40 µg), HPLC-UV-MS (LD= 1 µg), espectroscopía de NRM	Ji <i>et al.</i> , 2005	
Crotalaria ( <i>Crotalaria spectabilis</i> Roth.)				Nigeria	96 µmol/g	-			-
EE UU				60 µmol/g					

Taxas de <i>Crotalaria</i> (Total de AP) <i>C. alata</i> Buch.-Ham. ex D.Don	Material vegetal	Queensland, Territorio del Norte, Western Australia	(contenido de AP en equivalentes de retrorsina) 0,03 mg/g	0 mg/g	0,06 mg/g	GC-MS (no se conocen el LOD ni el LOQ)	Fletcher <i>et</i> <i>al.</i> , 2009
<i>C. aridicola</i> subesp. <i>densifolia</i> A.E.Holland			13,6 mg/g	7 mg/g	22 mg/g		
<i>C. brevis</i> Domin			0,03 mg/g	0 mg/g	0,15 mg/g		
<i>C. crispata</i> F.Muell. ex Benth.			7,7 mg/g	3 mg/g	21 mg/g		
<i>Crotalaria</i> <i>cunninghamii</i> R.Br. subesp. <i>cunninghamii</i>			0,06 mg/g	0,04 mg/g	0,08 mg/g		
<i>C. dissitiflora</i> Benth. subesp. <i>dissitiflora</i>			<LOD	<LOD	<LOD		
<i>C. goreensis</i> Guill. & Perr.			4,5 mg/g	0,3 mg/g	14 mg/g		
<i>C. grahamiana</i> Wight & Arn.			1,3 mg/g	1,3 mg/g	1,3 mg/g		
<i>C. incana</i> L. subesp. <i>incana</i>			0,04 mg/g	0,04 mg/g	0,04 mg/g		
<i>C. incana</i> subesp. <i>purpurascens</i> (Lam.) Milne-Redh.			0,03 mg/g	0,03 mg/g	0,03 mg/g		
<i>C. lanceolata</i> E.Mey. subesp. <i>Lanceolata</i>			<LOD	<LOD	<LOD		
<i>C. medicaginea</i> var. <i>neglecta</i> (Wight & Arn.) Baker (quemotipo)			2,2 mg/g	0,7 mg/g	4 mg/g		



1)							
<i>C. medicaginea</i> var. <i>neglecta</i> (Wight & Arn.) Baker (quemotipo 2)				4,6 mg/g	0 mg/g	11 mg/g	
<i>C. medicaginea</i> var. <i>neglecta</i> (Wight & Arn.) Baker (quemotipo 3)				6,8 mg/g	6,8 mg/g	6,8 mg/g	
<i>C. mitchellii</i> Benth. subesp. <i>mitchellii</i>				0,5 mg/g	0,3 mg/g	0,7 mg/g	
<i>C. montana</i> var. <i>angustifolia</i> (Gagnep.) Niyomdham				0,1 mg/g	0 mg/g	0,3 mg/g	
<i>C. montana</i> var. <i>exserta</i> (Domin) A.E.Holland				<LOD	<LOD	<LOD	
<i>C. novae-hollandiae</i> subesp. <i>crassipes</i> (Hook.) A.E.Holland				2,3 mg/g	2,3 mg/g	2,3 mg/g	
<i>C. novae-hollandiae</i> subesp. <i>lasiophylla</i> (Benth.) A.T.Lee				0,2 mg/g	0 mg/g	0,6 mg/g	
<i>C. novae-hollandiae</i> DC. subesp. <i>novae-hollandiae</i> (chemotype 1)				0,6 mg/g	0,1 mg/g	1,4 mg/g	

	<i>C. novae-hollandiae</i> DC. subesp. <i>novae-hollandiae</i> (chemotype 2)			6,0 mg/g	0,3 mg/g	23 mg/g		
	<i>C. novae-hollandiae</i> DC. subesp. <i>novae-hollandiae</i> (chemotype 3)			0,4 mg/g	0,2 mg/g	0,7 mg/g		
	<i>Crotalaria pallida</i> var. <i>obovata</i> (G.Don) Polhill			0,1 mg/g	0 mg/g	0,2 mg/g		
	<i>C. ramosissima</i> Roxb.			22,3 mg/g	11 mg/g	71 mg/g		
	<i>C. retusa</i> L. var. <i>retusa</i>			12,2 mg/g	0,5 mg/g	31 mg/g		
	<i>Crotalaria spectabilis</i> Roth.			0,6 mg/g	0,6 mg/g	0,6 mg/g		
	<i>Crotalaria verrucosa</i> L.			0,01 mg/g	0 mg/g	0,05 mg/g		
	<i>Crotalaria zanzibarica</i> Benth.			0,3 mg/g	0,3 mg/g	0,3 mg/g		
<b>Medicamentos herbales</b>	<i>Senecio scandens</i> (Adonifolina)	Hierba, flor, tallo delgado, tallo grueso, raíz, hoja	Diferentes lugares de China	32,56 µg/g (herb)		109,9 µg/g (hierba)	HPLC-MS (LOD= 0.5 ng/mL; LOQ= 1,0 ng/mL)	Zhang <i>et al.</i> , 2008
				261,6 µg/g (flower, n=1)	4,000 µg/g (hierba)			
				85,90 µg/g (slim stem, n=1)				
				43,81 µg/g (tallo grueso, n=1)				
				31,48 µg/g (root, n=1)				
				15,61 µg/g (leaf, n=1)				

<b>Cereales</b>	Charmac ( <i>Heliotropium popovii</i> ) (Heliotrina (N-óxido), lasiocarpina)	Harina (contaminada)	Afganistán occidental	Heliotrina 0,16 mg/kg N-óxido de heliotrina 5,4 mg/kg Lasiocarpina 0,045 mg/kg			LC/MS/MS	Kakar <i>et al.</i> , 2010
		Harina (control)	Afganistán occidental	Heliotrina 0,07 mg/kg N-óxido de heliotrina 2,6 mg/kg Lasiocarpina 0,025 mg/kg				Kakar <i>et al.</i> , 2010
<b>Miel</b>	Hierba cana oriental ( <i>Senecio vernalis</i> ) (Total de AP)	Polen, flores o cálices de flor	Alemania, de mercados y venta minorista en Europa, por internet de los EE UU, México, Nueva Zelandia, Asia	4,1 mg/g (polen) 2,3 mg/g (flores o cálices de flores)		5,2 mg/g (polen, flores)	GS-MS (polen floral)  GC-MS de alta resolución (productos de polen; LOD= 0,003 µg/g; LOQ= 0,01 µg/g)	Kempf <i>et al.</i> , 2010a
	Hierba de Santiago ( <i>Jacobaea vulgaris</i> ) (Total de AP)			3,3 mg/g (polen) 3,4 mg/g (flores)		-		
	Cáñamo silvestre ( <i>Eupatorium cannabinum</i> ) (Total de AP)			0,6 mg/g (polen) 4,2 mg/g (flores)	2,9 mg/g (polen) 1,0 mg/g (flores)	-		
	Viborera ( <i>Echium vulgare</i> ) (Total de AP)			0,9 mg/g (polen) 2,0 mg/g (flores)	-	-		
	Orquídeas ( <i>Phalaenopsis hybrids</i> ) (Total de AP)			0,6 mg/g (polen) 4,4 mg/g (flores)	-	-		
	Productos de polen (Total de AP)			5,17 µg/g	-	16,35 µg/g		
	Hierba de Santiago ( <i>Jacobaea vulgaris</i> )			Miel	-	3,4 µg/g		

(Total de AP)			0,02 µg/g	1,08 µg/g	0,06 µg/g	LC-MS (MAFF, 1995; Crews <i>et al.</i> , 1997)
			<0,002 µg/g	0,3 µg/g	-	
			0,95 µg/g	-	1,5 µg/g	
Buglosa/flor morada ( <i>Echium plantagineum</i> ) (Total de AP)			0,58 µg/g	-	0,95 µg/g	GC-MS (Culvenor <i>et al.</i> , 1981)
			0,91 µg/g	-	2,63 µg/g	LC-MS (Beales <i>et al.</i> , 2004; Beales <i>et al.</i> , 2007)
			0,27 µg/g	-	1,03 µg/g	
Heliotropo azul ( <i>Heliotropium amplexicule</i> ) (Total de AP)			0,81 µg/g	-	1,65 µg/g	LC-MS (Beales <i>et al.</i> , 2004; Beales <i>et al.</i> , 2007)
Heliotropo europeo ( <i>Heliotropium europaeum</i> ) (Total de AP)			0,19 µg/g	-	0,25 µg/g	LC-MS (Beales <i>et al.</i> , 2004; Beales <i>et al.</i> , 2007)
Viborera ( <i>Echium vulgare</i> ) (Total de AP)			0,39 µg/g	-	1,3 µg/g	LC-MS (Beales <i>et al.</i> , 2004; Beales <i>et al.</i> , 2007)
Viborera ( <i>Echium vulgare</i> ) (Total de AP)			0,79 µg/g	-	2,85 µg/g	LC-MS (Betteridge <i>et al.</i> , 2005)
Hierba de Santiago ( <i>Jacobaea vulgaris</i> ) (Total de AP)	Polen floral, cargas de polen	-	0,175 mg/g (polen floral, equiv. de senecionina )	-	-	GC-MS (Budde <i>et al.</i> , 2004)

				0,8 mg/g (polen floral, equiv. de lasiocarpina)	-	-	LC-MS (Boppré <i>et al.</i> , 2008)	
				0,1 mg/g (cargas de polen, equiv. de lasiocarpina)	-	-		
	Buglosa/flor morada ( <i>Echium plantagineum</i> ) (Total de AP)			0,028 mg/g (cargas de polen, equiv. de lasiocarpina)	-	-	LC-MS (Boppré <i>et al.</i> , 2008)	
				0,006 mg/g (cargas de polen, equiv. de lasiocarpina)	-	-		
	Viborera ( <i>Echium vulgare</i> ) (Total de AP)			8,2 mg/g (polen floral, equiv. de lasiocarpina)	-	-	LC-MS (Boppré <i>et al.</i> , 2005)	
				14 mg/g (polen floral, equiv. de lasiocarpina)	-	-		
				0,35 mg/g (cargas de polen, equiv. de lasiocarpina)	-	-	LC-MS (Boppré <i>et al.</i> , 2008)	
	Cáñamo silvestre ( <i>Eupatorium cannabinum</i> ) (Total de AP)			0,120 mg/g (cargas de polen, equiv. de lasiocarpina)	-	-	LC-MS (Boppré <i>et al.</i> 2008)	
	Senecio alpino ( <i>Senecio alpinus</i> ) (Total de AP)			0,155 mg/g (polen floral, equiv. de lasiocarpina)	-	-	LC-MS (Boppré <i>et al.</i> 2008)	
				0,07 mg/g (cargas de polen, equiv. de lasiocarpina)	-	-		
	Total de AP ( $\geq 2$ $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Honey	Países Bajos	6,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$	-	365 $\mu\text{g}/\text{kg}$	LC-MS/MS based (LOD= 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) (van	RIVM, 2007 (VWA)

							Rhijn, 2007)	
	Total 16 PAs and N- óxidos ( $\geq 1$ $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Miel (cruda)	Importación	36 $\mu\text{g}/\text{kg}$	-	3,3 $\text{mg}/\text{kg}$	LC-MS/MS (LOD = 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; LOQ = 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Raezke, unpublished data 2010; Kempf <i>et al.</i> , 2011
	Total 16 AP y N-óxidos ( $\geq 1$ $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Miel (menudeo)	Alemania	9,1 - 22,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (4 estudios)	-	31 – 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$	LC-MS/MS (LOD = 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; LOQ = 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Raezke 2010a, unpublished data Intertek Food Services GmbH, 2010
<b>Leche</b>	Hierba de Santiago ( <i>Jacobaea vulgaris</i> ) (0.16% PA, 10 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ )	Leche (vacas)	-	0,840 $\text{mg}/\text{l}$ (medio más alta)	-	-	-	Dickinson <i>et al.</i> , 1976, cited by WHO 1988
	Hierba de Santiago ( <i>Jacobaea vulgaris</i> ) (0.16% PA, 10 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ )	Leche (cabras)	-	0,381 $\text{mg}/\text{l}$	<2 $\mu\text{g}/\text{kg}$	0,530 $\text{mg}/\text{l}$	-	Dickinson <i>et al.</i> , 1980, cited by WHO 1988
<b>Carne</b>	<i>Crotalaria novae- hollandiae</i> subesp. <i>novae-hollandiae</i> Chemotype 2 (Total de AP and adducts)	Hígado, riñón, corazón, músculo (terneras)	Norte de Australia	-	-	250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (músculo) 2500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (hígado) (entre el riñón y el corazón)	LCMSMS	Fletcher <i>et al.</i> , 2010
	Heliotropo azul ( <i>Heliotropium amplexicaule</i> ) (Total de AP y aductos)	Hígado, riñón, corazón, músculo (terneras)	Norte de Australia	-	-	<LOQ (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	LCMSMS	

	Adelfilla ( <i>Senecio brigalowensis</i> ) (Total de AP y aductos)	Hígado, riñón, corazón, músculo (terneras)	Norte de Australia	-	-	400 µg/kg después de 3 semanas, 40 µg/kg después de 6 semanas (hígado) (riñón, corazón, músculo por debajo de ese valor)	LCMSMS	
	Total de AP	Hígado y riñón (animales domésticos)	-	-		73 µg/kg	-	Edgar, unpublished data, cited by ANZFA 2001
<b>Huevos</b>	Total de AP en el trigo	Huevos (pollo)	-	-	-	0,168 mg/kg	-	Edgar and Smith, 2000, cited by COT 2008

## ANEXO VII Prácticas de gestión

Las prácticas de gestión se pueden dirigir a:

- medidas para prevenir la propagación de plantas que contengan AP, a nivel regional (principalmente para la hierba cana);
- medidas para prevenir el contacto de animales productores de alimentos con estas plantas, ya que los AP se transfieren de los piensos a los alimentos;
- prácticas para reducir los AP en piensos y alimentos contaminados.

A continuación se presenta un resumen de los detalles de las prácticas de gestión. Las medidas para controlar la maleza tienen como principal objetivo la hierba de Santiago.

### Prevención de la propagación de plantas que contienen AP

La principal medida de control de maleza, de conformidad con las buenas prácticas agrícolas. Según la FAO (FAO, 2007, citado en FAO, 2010), los métodos más utilizados para combatir la maleza son:

- métodos de prevención (procedimientos legislativos y de cuarentena, y otros en el ámbito de la granja);
- métodos agrícolas (rotación de cultivos, preparación de las tierras, uso de cultivos de cubierta, policultivos) recubrimiento con paja u hojarasca, gestión del agua);
- eliminación mecánica de la maleza (manual o con maquinaria);
- métodos químicos (uso de herbicidas);
- métodos biológicos (métodos clásicos mediante introducción de enemigos naturales exóticos y aumentando la población de los enemigos naturales ya presentes);
- otros métodos no convencionales (solarización del suelo, uso de agua caliente y otros que están en elaboración).

### Control preventivo de maleza

La prevención de la hierba de Santiago (*Jacobaea vulgaris*) necesita menos recursos que el combate de infestaciones y, por lo tanto, es una buena inversión (McLaren & Faithfull, 2004<sup>5</sup>). Según los autores, la prevención debe comprender las siguientes medidas:

- destrucción de plantas aisladas con herbicidas o manualmente, antes de que produzcan semillas;
- asegurar que la paja y otros forrajes y semillas para siembra no estén contaminados. Si se tiene que usar forraje contaminado, sólo debe suministrarse en zonas ya infestadas o en una zona definida que se pueda tratar enseguida en caso de producirse un brote;
- aplicar las mismas normas al suelo, la arena y la grava que se apliquen a los forrajes;
- poner en cuarentena el ganado que haya pastado en zonas infestadas porque pueden transportar semillas en las pezuñas y en el pelo, y en el tubo digestivo. Revisar la zona en cuarentena con regularidad en busca de hierba cana;
- limpieza de vehículos, maquinaria y equipo después de utilizarse en zonas infestadas;
- tomar medidas internas de cuarentena en las propiedades infestadas. Los productos de zonas infestadas deberán separarse de los obtenidos en zonas limpias. Mantener zonas de protección libres de maleza entre las tierras infestadas y las que no estén infestadas. Cercar permanente o temporalmente las zonas húmedas para impedir el pastoreo hasta los meses más secos;

---

<sup>5</sup> Este artículo se redactó respecto a la situación del estado de Victoria, Australia. Como las prácticas se pueden aplicar a otras regiones, la información se tomó en este Anexo.



- designar zonas, como barrancos y franjas de cobijo, en las que se impida el ingreso del ganado para permitir un tratamiento eficaz de desyerbe;
- capacitar a contratistas, personal de mantenimiento de los bordes de las carreteras, etc., para que reconozcan e informen sobre infestaciones, para combatir las a tiempo y tratarlas en forma que se impida su propagación;
- meter en costales todos los materiales al retirar los en flor o semilla, ya que las semillas se desprenden fácilmente de la corola. Las corolas con semillas y el material contaminado de semillas deberán destruirse con fuego o enterramiento profundo.

Las prioridades de las medidas de control podrían establecerse con el sistema propuesto por Neumann *et al.* (2009). Sobre la base de la distancia de la hierba de Santiago (*Jacobaea vulgaris*) de un campo o pastizal, se determinan tres zonas de riesgo. Cuando el riesgo se clasifica como elevado (0 a 50 m), se recomienda intervenir de inmediato para combatir las especies de hierba cana (*Senecio*). Cuando el riesgo es medio (de 50 a 100 m), una política de control evitaría que se pase de riesgo medio a riesgo elevado con eficacia. En caso de riesgo bajo (> 100 m) no se requiere intervención inmediata.

En 2004 el Departamento para el Medio Ambiente, Alimentos y ASuntos Rurales (Defra) del Reino Unido publicó un Código de prácticas para prevenir la propagación de hierba cana. El objetivo de este código es combatir la propagación de la hierba de Santiago donde representa un riesgo reconocible para animales vulnerables, así como para la producción de forrajes (Defra, 2004, citado en COT, 2008).

#### Control agrícola de malezas

##### Pastizales

La infestación o presencia de especies de hierba cana en los pastos se puede combatir de la siguiente manera:

- Promoviendo la formación de un prado continuo y competitivo (Leiss, 2010). Los prados que tienen un porcentaje elevado de suelo sin cubrir (>25%) presentaron un riesgo 40 veces más elevado respecto a la presencia de especies de hierba cana que los prados con menos del 25% de suelo sin cubrir (Suter *et al.*, 2007).
- Densidades de población pecuaria y regímenes de pastoreo apropiados y/o de irrigación y fertilización de pastizales. Es mejor el pastoreo en rotación que continuo, porque éste da lugar a un riesgo significativamente más elevado de que se produzcan infestaciones de especies de hierba cana (Suter *et al.*, 2007). El ganado rumiante, como las ovejas, se pueden "adaptar" a las plantas que contienen AP y se ha recomendado que se utilicen las ovejas "adaptadas" para combatir especies de plagas como la *Crotalaria retusa* (Anjos, 2010).
- Fertilización de pastizales con superfosfatos o urea (Thompson & Saunders, 1986 citado en Leiss, 2010). La aplicación de un elevado contenido de nitrógeno, duplicando el nitrógeno de 50 a 100 kg h/año reduce la presencia de hierba de Santiago (*Jacobaea vulgaris*) cinco veces y la de senecio de pantano (*Senecio aquaticus*) tres veces (Suter *et al.*, 2007; Suter & Lüscher, 2008 citado en Leiss, 2010).
- Combinar una alta frecuencia de poda con el uso de nitrógeno adicional. Esto fomenta las especies de pastos de crecimiento rápido, que resisten la defoliación frecuente y son competidores fuertes. Esto dificulta mucho la germinación y establecimiento de la hierba de Santiago (*Jacobaea vulgaris*) (Crawley & Nachapong, 1985 citado en Leiss, 2010).
- Cortar la hierba de Santiago (*Jacobaea vulgaris*) al inicio o final de la floración, así se reduce el número de corolas un 87% (Siegrist-Maag *et al.*, 2008 citado en Leiss, 2010). Se recomienda la primera poda cuando el 50% comiencen a florecer y la segunda cuando la mitad de las plantas restablecidas comiencen de nuevo a florecer.

##### Cultivos

Los terrenos de trigo, de mijo, etc., se deben desyerbar antes de la siembra y periódicamente en las primeras seis semanas del ciclo de crecimiento. Una eliminación final de la maleza unas dos semanas antes de la cosecha reduce significativamente la posibilidad de contaminación de la cosecha con semillas tóxicas. En los cultivos de legumbres, la única opción puede ser eliminar la yerba mecánica o manualmente (FAO, 2010).

Al desyerbar se deberá prestar atención a las zonas colindantes con el cultivo o pastizal ya que pueden constituir un depósito de malezas y crear problemas año tras año. Las medidas de largo plazo pueden incluir control biológico de plagas, pero esto requiere una amplia investigación y evaluación de los efectos ambientales de las especies introducidas (North West Weeds, 2007, citado en FAO, 2010).

Otro método eficaz para combatir la hierba de Santiago (*Jacobaea vulgaris*) es arar a profundidad las tierras no agrícolas y cultivarlas en verano y otoño (McLaren & Faithfull, 2004). Pero esto sólo se recomienda cuando se hace sistemáticamente y para eliminar la hierba de Santiago que germine de los depósitos de semillas del suelo.

#### Control mecánico de malezas

El control manual eficaz requiere la eliminación de la corola y de todas las raíces más largas, por lo tanto, sólo puede ser eficaz con plántulas y rosetas, a diferencia de otras plantas más grandes que por lo general tienen raíces más profundas. Por otra parte, la perturbación del suelo puede dar lugar a más germinación al entrar en contacto con la luz (solar) las semillas enterradas.

Otra forma de eliminación mecánica es el corte o la poda. Sin embargo, la hierba de Santiago (*Jacobaea vulgaris*) puede volver a crecer en pocas semanas y puede cambiar a reproducción vegetativa formando múltiples cálices que extienden su duración (van der Meijden & van der Waals-Kooi, 1979; Wardle, 1987 citado en Leiss, 2010). Por lo tanto, después de cortar o podar se deben aplicar sustancias químicas o cultivar la tierra.

La aplicación de fuego eliminó un 93% de hierba de Santiago en la etapa de producción de semillas, por lo cual las plantas quemadas ya no fueron viables (Wardle, 1987 citado en Leiss, 2010).

#### Control químico de malezas

Se analizó la eficacia de numerosas intervenciones de gestión para controlar las especies de hierba cana (*Senecio*) (Roberts & Pullin, 2007). La aplicación de los herbicidas 2,4-D, Asulam, Clopyralid y MCPA reduce con eficacia la densidad de senecios. Pero respecto a las especies individuales, el 2,4-D y el MCPA sólo son eficaces contra la hierba de Santiago (*Jacobaea vulgaris*), mientras que el Asulam sólo dio buenos resultados contra el senecio de pantano (*Senecio aquaticus*).

Como la hierba de Santiago (*Jacobaea vulgaris*) tiene una parte grande de biomasa en el caliz y en el sistema de raíces enterradas, es difícil hacer llegar una parte eficaz a los cálices y las raíces. Para obtener mejores resultados, los herbicidas deberán aplicarse cuando las plantas no sufran presiones (p. ej., por sequía o temperaturas extremas) (McLaren & Faithfull, 2004). Además, la concentración efectiva se redujera cuando llueva cico horas después de la aplicación, según se ha observado con el 2,4-D y el MCPA (Coles, 1967; Forbes *et al.*, 1980 citado en Roberts & Pullin, 2007).

#### Control biológico de malezas

Los enemigos naturales, el *Longitarsus jacobaeae* (pulgilla de la hierba cana) y una combinación de *Longitarsus jacobaeae* y *Tyria jacobaeae* (palomilla cinabrio) parecen tener el potencial de reducir la densidad de la hierba de Santiago (*Jacobaea vulgaris*). Es decir, la combinación de pulgillas y palomillas reduce la hierba cana en un promedio del 99,5%. La aplicación de *Tyria jacobaeae* solamente no parece reducir significativamente la densidad de hierba cana, pero sí reduce el número de racimos por planta, de semillas por racimo, la viabilidad de las semillas y el peso en seco de las plantas (Roberts & Pullin, 2007).

En Australia y Nueva Zelandia se liberaron palomillas europeas *Cochylis atricapitana*, que atacan el tallo y la flor de la hierba cana, como agentes de control biológico. El resultado fue una reducción del 40% de la altura de las plantas en flor y una reducción considerable del tamaño y la supervivencia de los racimos (McLaren *et al.*, 2000; Gourlay, 2007a).

El agente de control biológico más usado recientemente es el pteroforoideo del senecio (*Platyptillia isodactyla*), que tiene un huésped común en el senecio del pantano (*Senecio aquaticus*). Este pteroforoideo se liberó en Australia en 1999 y en Nueva Zelandia en 2006. Se redujeron las densidades de senecios del pantano en un 60% a 80% (Gourlay, 2007b).

En Australia se experimentó el control biológico del heliotropo azul (*Heliotropium amplexicaule*). Esta planta se introdujo en Australia desde América del Sur y los agentes de control biológico se seleccionaron del mismo origen, con base en la especificidad del anfitrión (Briese & Walker, 2002).

#### Otras formas de control de la maleza

La hierba de Santiago (*Jacobaea vulgaris*) se puede combatir mejor en zonas de difícil acceso cercando la zona o dejando que se cubra de vegetación silvestre. La sombra, la competencia de otras plantas y la reducción de la dispersión de las semillas por interrupción del paso del viento son los principales parámetros de control. Para competir, el pino de Monterrey es la especie de plantación más eficaz, pero las plantaciones de eucaliptos también pueden eliminar con éxito la hierba de Santiago (McLaren & Faithfull, 2004).

Otra medida que se propone para zonas de difícil acceso es el pastoreo de ovejas, que reduce el número de plantas en flor y de producción de semillas y puede conducir al cabo de un tiempo a la reducción del banco de semillas. Sin embargo, es necesario tener cuidado si las ovejas se utilizan, debido a los daños al hígado (McLaren & Faithfull, 2004).

Prevención de la ingestión pecuaria de AP

#### Prevención del pastoreo

Las plantas que contienen AP por lo general son desagradables para el ganado. Casi todos los casos de intoxicación con materiales vegetales frescos se producen en pastizales explotados en exceso o si hay un suministro limitado de forrajes (EFSA, 2007). En el caso de que se agoten los pastos durante una sequía, las autoridades nacionales y locales deberán aplicar otras medidas de alimentación del ganado en la medida de sus posibilidades (FAO, 2010).

Donde se conservan piensos, los animales no reconocen fácilmente la contaminación con materiales vegetales que contengan AP. Experimentos con paja indican que la concentración de AP no disminuye con el almacenamiento cuando están secos los cultivos (WHO, 1988).

La crotalaria y otras plantas que tienen AP a veces se utilizan como cubierta del suelo, para mejorar los suelos (las especies de alacranillo son leguminosas) y como piensos. El uso inocuo de estas plantas para piensos depende de que las hojas y los tallos contienen menos AP que las flores y las semillas. Esto se tiene que tener en cuenta al permitir a los animales pastar con estas plantas. También se debe tener presente la susceptibilidad relativa de los animales a la intoxicación por AP (los bovinos son menos sensibles que las ovejas, por ejemplo) (FAO, 2010).

La investigación de microbios del rumen con potencial de detoxificar los AP permite pensar en el uso de una mezcla de esos microbios como terapia de probióticos para el ganado (Lodge-Ivey *et al.*, 2005), y en que la resistencia en los animales se puede inducir antes de la exposición, por ejemplo suministrando dosis diarias reducidas de semillas de cascabelillo (*Crotalaria Retusa*) antes de introducir las ovejas en las tierras invadidas por esta especie de crotalaria (Anjos, 2010).

#### **Eliminación de materiales de AP de los piensos**

##### Cribado

Las disposiciones que figuran en las normas del Codex para los cereales y las legumbres (CODEX STAN 153-1985, CODEX STAN 171-1989, CODEX STAN 172-1989, CODEX STAN 199-1995, CODEX STAN 201-1995) respecto a la presencia de semillas tóxicas deberán aplicarse antes de la molturación del cultivo o de su distribución para consumo humano. El método de análisis de la norma ISO se aplica fácilmente y no requiere un equipo complicado de laboratorio ni una gran capacitación de los operadores. También se puede aplicar a la Norma del Codex, teniendo en mente la índole de la información. En algunos casos se puede usar el cribado para separar las semillas de las hierbas que contienen AP por su tamaño (FAO, 2010).

##### Elaboración de compostas/ensilado

Para los piensos contaminados, el ensilado puede ser una opción para reducir los AP. Se demostró que la elaboración de composta con hierba de Santiago (*Jacobaea vulgaris*) en sacos negros para la basura

directamente a la luz del sol sobre el terreno produce una descomposición de los AP en cuatro semanas, y a la pérdida total en 10 semanas (Crews *et al.*, 2009). También es posible utilizar las plantas de hierba de Santiago en un digestor.

#### Conciencia

Una de las medidas de control más significativas es la conciencia y la difusión del conocimiento sobre los AP y las consecuencias de las plantas y semillas que tienen AP en los productos destinados al consumo humano o a los piensos. Programas de radio rural, servicios de extensión y asociaciones de agricultores deberán ser los medios para informar a los productores de alimentos sobre la presencia de AP en los alimentos y los piensos (FAO, 2010).

## ANEXO VII

## Lista de participantes

**CHAIR**

Astrid Bulder  
National Institute for Public Health and the Environment (RIVM)  
Centre for Substances and Integrated Risk Assessment (SIR)  
P.O. Box 1, 3720 BA, Bilthoven, The Netherlands  
Tel: +31 30 274 7048  
Fax: +31 30 274 4475  
E-mail: [Astrid.Bulder@rivm.nl](mailto:Astrid.Bulder@rivm.nl)

**MEMBER****COUNTRIES/ORGANIZATION****Australia**

Christopher Schyvens  
Food Standards Australia New Zealand  
E-mail: [christopher.schyvens@foodstandards.gov.au](mailto:christopher.schyvens@foodstandards.gov.au)  
Cc to [codex.contact@daff.gov.au](mailto:codex.contact@daff.gov.au)

**Brazil**

Mrs. Maria Aparecida Martinelli  
Coordinator of Brazilian Codex Committee  
National Institute for Metrology, Standardization and Industrial Quality – INMETRO  
Ministry of Development, Industry and Trade  
Phone: +55 61 3340 2211  
E-mail: [codexbrasil@inmetro.gov.br](mailto:codexbrasil@inmetro.gov.br)

Ms. Lígia Lindner Schreiner  
Expert on Regulation  
Brazilian Health Surveillance Agency  
General Office of Foods  
Tel.: +55 61 3462 5399  
E-mail: [ligia.schreiner@anvisa.gov.br](mailto:ligia.schreiner@anvisa.gov.br) and [gacta@anvisa.gov.br](mailto:gacta@anvisa.gov.br)

**European Union**

Ms Almut Bitterhof  
European Commission  
Health and Consumers Directorate-General  
Telephone: ++32 - 2 - 298 67 58  
E-mail: [almut.bitterhof@ec.europa.eu](mailto:almut.bitterhof@ec.europa.eu)

Mr Frans Verstraete  
European Commission  
Health and Consumers Directorate-General  
Tel.: ++32 - 2 - 295 63 59  
E-mail: [frans.verstraete@ec.europa.eu](mailto:frans.verstraete@ec.europa.eu)  
CC to [codex@ec.europa.eu](mailto:codex@ec.europa.eu)

**France**

M. Jérémy PINTE  
Ministère de l'alimentation, de l'agriculture et de la pêche  
DGAL- bureau de la réglementation alimentaire et des biotechnologies  
251, rue de Vaugirard  
75732 PARIS CEDEX 15  
Tél: +33 1 49 55 81 46  
Fax: +33 1 49 55 59 48  
E-mail: [jeremy.pinte@agriculture.gouv.fr](mailto:jeremy.pinte@agriculture.gouv.fr)  
Cc to [sgae-codex-fr@sgae.gouv.fr](mailto:sgae-codex-fr@sgae.gouv.fr)

**Germany**

Dr. Ute GALLE-HOFFMANN  
Head of Unit 322  
Federal Ministry of Food, Agriculture and Consumer Protection  
Rochusstr. 1  
53123 Bonn, Germany  
Phone: + 49 - (0) - 228 - 99 529.3677  
FAX: + 49 - (0) - 228 - 99 529.4943  
E-mail: [322@bmelv.bund.de](mailto:322@bmelv.bund.de)

**Hungary**

Ms Agnes Gyöngyösi Palotas  
Chief Counsellor  
Ministry of Rural Development  
Department of Food Chain Development  
1055 Budapest, Kossuth tér 11, Hungary  
Telephone: (36-1)301-4040; FAX: (36-1)301-4808  
E-mail: [agnes.gyongyosi@vm.gov.hu](mailto:agnes.gyongyosi@vm.gov.hu)

**Indonesia**

Tetty Helfery Sihombing  
Ir. Tetty Helfery Sihombing  
Director of Food Product Standardization,  
National Agency for Food and Drug Control of Indonesia  
Phone : +6221 42875584  
Fax : +6221 42815180  
E-mail : [subdit\\_spo@yahoo.com](mailto:subdit_spo@yahoo.com)  
[tetyhelfery@yahoo.com](mailto:tetyhelfery@yahoo.com)

**Japan**

Dr Fumi IRIE  
 Deputy Director  
 Standards and Evaluation Division  
 Department of Food Safety  
 Ministry of Health, Labour and Welfare  
 1-2-2 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo  
 100-8916, Japan  
 Phone: +81-3-3595-2341  
 Fax: +81-3-3501-4868  
 E-mail: [codexj@mhlw.go.jp](mailto:codexj@mhlw.go.jp)

**Jordan**

Wail Omari  
 Jordan institution for standards and  
 metrology (JISM)  
 Email: [womari@jism.gov.jo](mailto:womari@jism.gov.jo)

**The Netherlands**

Hans van Egmond  
 RIKILT Institute of Food Safety  
 PO Box 230, 6700 AE Wageningen, The  
 Netherlands  
 Tel.: +31 317 48 03 79  
 Fax: +31 317 48 77 17  
 E-mail: [Hans.vanEgmond@wur.nl](mailto:Hans.vanEgmond@wur.nl)

Patrick Mulder  
 RIKILT Institute of Food Safety  
 PO Box 230, 6700 AE Wageningen,  
 The Netherlands  
 Tel.: +31 317 48 04 33  
 Fax: +31 317 48 77 17  
 E-mail: [Patrick.Mulder@wur.nl](mailto:Patrick.Mulder@wur.nl)

Lianne de Wit  
 National Institute for Public Health and the  
 Environment (RIVM)  
 Centre for Substances and Integrated Risk  
 Assessment (SIR)  
 P.O. Box 1, 3720 BA, Bilthoven, The  
 Netherlands  
 Tel: +31 30 274 7048  
 Fax: +31 30 274 4475  
 E-mail: [Lianne.de.Wit@rivm.nl](mailto:Lianne.de.Wit@rivm.nl)

**New Zealand**

John Reeve  
 Principal Adviser (Toxicology)  
 New Zealand Food Safety Authority  
 Level 7, North Tower Telecom Network  
 House  
 68-86 Jervois Quay, PO Box 2835  
 Wellington New Zealand  
 Ph: 04 894 2533  
 Fax: 04 894 2530  
 Cell: 029 894 2533  
[john.reeve@nzfsa.govt.nz](mailto:john.reeve@nzfsa.govt.nz)

**Sweden**

Alexey Solyakov, Techn D, PhD  
 National Veterinary Institute  
 Department of Chemistry, Environment and  
 Feed Hygiene  
 SE-75189 Uppsala, SWEDEN  
 Tel: +46 18 674023  
 Fax: +46 18 674099  
 E-mail: [Alexey.Solyakov@sva.se](mailto:Alexey.Solyakov@sva.se)

**Switzerland**

Dr. Otmar Zoller  
 Swiss Federal Office of Public Health  
 Consumer Protection Directorate  
 Food Safety Division; Section Chemical  
 Risks  
 CH-3003 Berne  
 Office: Schwarzenburgstrasse 165, 3097  
 Liebefeld, Switzerland  
 Telephone: +41 (0)31 322 95 51; FAX +41  
 (0)31 322 95 74  
 E-Mail: [otmar.zoller@bag.admin.ch](mailto:otmar.zoller@bag.admin.ch)

**Togo**

Kodzo Edem Tayi  
 Institut National d'Hygiène BP 1396 Lomé  
 Tel +228 939 24 68  
 +228 221 06 33  
 Email: [edemtak@yahoo.fr](mailto:edemtak@yahoo.fr)

**INTERNATIONAL NON-  
GOVERNMENTAL/GOVERNMENTAL  
ORGANISATIONS**

**Apimondia**

Dr. Kurt-Peter Raezke  
Director Testing & Analytics  
Intertek Food Services GmbH  
Olof-Palme-Str. 8  
28719 Bremen, Germany  
Tel: +49 (0) 421 65 727 200  
Fax: +49 (0) 421 65 727 202  
Email: [kurt-peter.raezke@intertek.com](mailto:kurt-peter.raezke@intertek.com)

**FAO**

Dr Annika Wennberg  
FAO JECFA Secretary  
Nutrition and Consumer Protection  
Division  
Food and Agriculture Organization of the  
United Nations  
Telephone: + 39 06 5705 3283; FAX: + 39  
06 5705 4593  
E-mail: [Annika.Wennberg@fao.org](mailto:Annika.Wennberg@fao.org)