

Aflatoxines i ocratoxines: agents tòxics que cal controlar

RESUM: *El present article se centra en l'estudi de toxines produïdes per fongs dels gèneres Aspergillus i Penicillium, més concretament en les aflatoxines B1, G1, B2, G2 i ocratoxina A. Es dona una visió general del tema quant a origen, legislació, toxicitat i control de micotoxines. A més, es presenten tres mètodes per a l'anàlisi d'aquestes toxines en productes vegetals, ja que són els substrats en els quals es presenten més habitualment. Primerament, es desenvolupa un mètode d'anàlisi per a la determinació d'aflatoxines B1, G1, B2 i G2 en una planta medicinal. Posteriorment, s'optimitza l'anàlisi d'ocratoxina A en cafè i finalment es presenta un mètode per a la determinació simultània d'aflatoxines B1, G1, B2, G2 i ocratoxina A en cervesa. En tots els mètodes s'empren extracció en fase sòlida de reblert polimèric i cromatografia líquida de fase inversa. La detecció es realitza per espectrometria de masses de quadrupol simple amb ionització a pressió atmosfèrica.*

SUMMARY: *This paper is focused on the study of mycotoxins produced by fungi of the genera Aspergillus and Penicillium, specifically on aflatoxins B1, G1, B2, G2 and ochratoxin A. A general survey of mycotoxin origin, toxicity, legislation and control is presented. Furthermore, three analytical methods for the analysis of mycotoxins in vegetable products is presented, due to these substrates are the most liable to be contaminated. First, a method for the determination of aflatoxins B1, G1, B2 and G2 in a medicinal herb is presented. Afterwards, the analysis of ochratoxin A in coffee was optimized. Finally, a method for the simultaneous analysis of aflatoxins B1, G1, B2, G2 and ochratoxin A in beer is developed. All the methods apply solid-phase clean-up using a polymeric sorbent and liquid chromatography with a reversed phase column. A single quadruple mass spectrometer with an electrospray ionization source was used as a detector.*

INTRODUCCIÓ

Des del descobriment de les aflatoxines al voltant dels anys seixanta del segle passat, l'home reconeix la importància que tenen les micotoxines sobre la salut humana i animal.

Les micotoxines són un grup molt divers de metabòlits secundaris d'origen fúngic que es caracteritzen pel fet de presentar una heterogènia toxicitat tant per a l'home com per als animals, toxicitat que pot variar des de causar efectes carcinogènics, teratogènics o mutagènics fins a pro-

duir desordres de tipus hormonal o immunosupressor. Les àmplies condicions mediambientals que permeten el creixement de fongs comporten que les micotoxines es puguin produir en un gran nombre d'aliments usuals en la dieta de l'home i en l'alimentació animal. Els fongs poden envair els cultius durant la collita o després d'aquesta, durant el transport o emmagatzematge, i es desenvolupen quan les condicions són òptimes. Actualment existeix una preocupació creixent, tant per part de les autoritats sanitàries com de les indústries alimentàries, per garantir el consum d'aliments segurs, especialment pel que es refereix a l'absència de residus tòxics

que, d'una manera o altra, poden arribar als aliments i ser transmesos als consumidors. És per tots aquests motius que es realitzen controls per evitar que els contaminants tòxics entrin a la cadena alimentària.

La majoria de les micotoxines estan produïdes per espècies dels gèneres *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium* i *Penicillium*. Les aflatoxines continuen sent les micotoxines més estudiades a causa de la seva elevada toxicitat i àmplia distribució. Però, en els darrers anys, estant adquirint una importància cada vegada més gran altres micotoxines com ara l'ocratoxina A, fumonisines, tricotecens (desoxinivanelol, T2 i diacetoxiscirpenol) i zearalenona.

Les aflatoxines van ser descobertes l'any 1960 amb l'anomenada *Turkey X*, en la qual més de cent mil galls d'indi van morir a Anglaterra com a conseqüència de la ingestió de farina de cacauet contaminada amb fongs, en la qual es va detectar *Aspergillus flavus*.¹

D'altra banda, les ocratoxines van ser aïllades per primera vegada d'*Aspergillus ochraceus* el 1965, no com a resultat de toxicosi, sinó en un estudi de laboratori de fongs toxigènics aïllats de cereals i llegums de Sud-àfrica.^{2,3}

NATURALESQA QUÍMICA

Les aflatoxines formen una família de compostos derivats de la difuranocumarina. Fins ara s'han descrit setze tipus d'aflatoxines, de les quals les que es troben més freqüentment en aliments són les aflatoxines B1, G1, B2 i G2 (figura 1). Les aflatoxines B1 i B2, en ser ingerides per animals productors de llet, són metabolitzades per l'organisme, mitjançant enzims hepàtics que provoquen una hidroxilació per produir les respectives aflatoxines M1 i M2 (figura 1). Si el bestiar consumeix pinso contaminat amb aflatoxines, aquestes són eliminades a través de la llet i persisteixen en els productes làctics derivats.⁵

Les ocratoxines formen una família de compostos més reduïda que la de les aflatoxines, i està formada per les ocratoxines A, B i C. La més tòxica és l'ocratoxina A (OTA), d'aquí l'interès que ha despertat la seva determinació en els darrers anys (figura 1). Les ocratoxines B i C són l'anàleg de clorat i l'èster etílic, respectivament.

FONGS PRODUCTORS DE TOXINES

Les espècies més conegudes productores d'aflatoxines són *Aspergillus flavus*, amb la producció de les aflatoxines B1 i B2, i *A. Parasiticus*, el qual produeix les quatre aflatoxines B1, G1, B2 i G2. Altres espè-

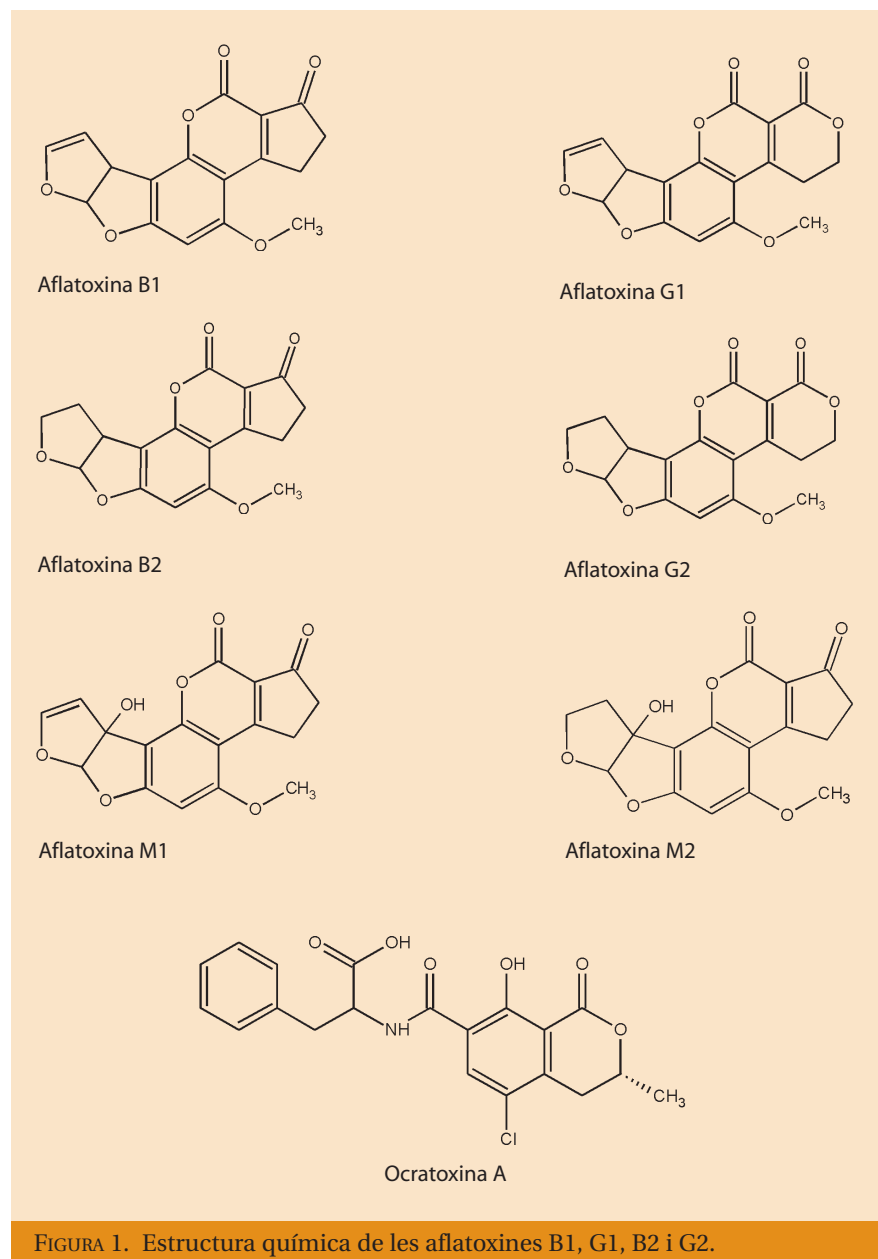


FIGURA 1. Estructura química de les aflatoxines B1, G1, B2 i G2.

TAULA 1. Contingut màxim permès d'aflatoxines en aliments a la Unió Europea

Aliment	B1 (µg/kg)	B1+B2+G1+G2 (µg/kg)	M1 (µg/kg)
Cacauets, fruits amb closca, fruits secs i productes derivats de la seva transformació, destinats al consum humà o com a ingredients de productes alimentaris	2	4	–
Cacauets destinats a ser sotmesos a processos de selecció, o a un altre tractament físic, abans de ser destinats al consum humà	8	15	–
Nous i fruits secs abans de ser classificats o processats i abans de ser destinats al consum humà	5	10	–
Cereals i productes processats destinats al consum humà o destinats a l'elaboració d'aliments	2	4	–
Espècies (bitxo, pols de bitxo, pebre blanc i negre, pebre vermell, pebre de pebrot, nou moscada, gíngebre i tumèric)	5	10	–
Llet (llet sense processar, llet destinada a l'elaboració de productes, productes làctics i llet tractada tèrmicament)	–	–	0,05

cies recentment descrites com a productores d'aflatoxines són *A. nomius*, *A. Pseudotamarii*,⁶ *A. Bombycis*,⁷ *A. Ochraceoroseus*⁸ i *E. Stellata*.⁹ D'altra banda, l'ocratoxina A pot ésser biosintetitzada per una gran varietat d'espècies fúngiques de *Penicillium* i *Aspergillus*. La font més important de la toxina a la zona temperada és el *Penicillium verrucosum* i l'*A. ochraceus* en regions tropicals i subtropicals.¹⁰ Ambdós gèneres fúngics pertanyen a la flora d'emmagatzematge, ja que és freqüent detectar-los en aliments resultat de l'esporulació i biodeterioració d'aquests a causa de fongs.

FREQÜÈNCIA

Les aflatoxines i ocratoxines es troben com a contaminants naturals en productes alimentaris bàsicament d'origen vegetal. També es detecten en begudes o productes que han estat elaborats a partir de productes contaminats, ja que aquestes micotoxines són compostos termoresistents i no es destrueixen en la majoria de les etapes de processat d'aliments, i es poden fins i tot concentrar en etapes posteriors. Les matrius alimentàries descrites en les quals

s'han detectat aflatoxines i ocratoxines són: cereals i subproductes de cereals, soja, te, cafè, cacau i derivats, fruits, fruits secs, espècies, cervesa, vi, productes làctics, etc.¹¹

És important comentar que també s'han detectat toxines, o els seus derivats, en productes carnis procedents d'animals que han estat alimentats amb menjar contaminat. Com que aquestes toxines són solubles en greixos, s'acumulen a la fracció lipídica dels animals afectats i a partir d'aquí les ingereixen els humans.^{12, 13, 14, 15}

TOXICITAT

Quant a toxicitat, cal destacar que les aflatoxines estan considerades com un dels components cancerígens més potents de la naturalesa, amb un rang ampli d'acció sobre diverses espècies animals, incloent-hi l'home.¹⁶ L'Agència Internacional per a la Recerca sobre el Càncer (IARC) va classificar les aflatoxines en el grup 1,¹⁷ considerant-les cancerígenes per a l'home. La més tòxica és l'aflatoxina B1 i, en ordre decreixent, segueixen les aflatoxines M1, G1, M2, B2 i G2.¹⁸

TAULA 2. Contingut màxim permès d'OTA en aliments a la Unió Europea

Aliment	OTA (µg/kg)
Cereals (incloent-hi arròs i fajol) i productes derivats de cereals	5
Cereals en gra (incloent-hi arròs i fajol)	5
Tots els productes derivats de cereals (incloent-hi productes derivats de cereals processats i grans de cereals destinats al consum humà)	3
Panses	10
Cafè torrat en gra i cafè torrat mòlt	5
Cafè soluble	10
Vi o raïm i/o vins usats com a base d'altres begudes	2
Most per beure o com a base per a altres begudes	2

Les aflatoxines i ocratoxines es troben com a contaminants naturals en productes alimentaris bàsicament d'origen vegetal

Posteriorment, l'OTA s'ha classificat dins del grup 2B,¹⁹ com a agent possiblement carcinogen per a l'home sobre la base dels estudis realitzats en animals d'experimentació, encara que amb evidències insuficients, de moment, en els éssers humans.

La quantitat de micotoxines presents en aliments acostuma a ser baixa, entorn de poques desenes de µg/kg: és per aquest fet que no és probable que causin intoxicacions agudes en els éssers humans. Però la presència continuada de micotoxines a baixes concentracions en els aliments representa un risc potencial per a la salut humana, de manera que cal vigilar i controlar els nivells en què aquestes es troben.²⁰

LEGISLACIÓ

Quant a legislació, cal esmentar que avui en dia hi ha una gran heterogeneïtat respecte al nombre de toxines regulades, els països que les controlen i els nivells permesos en els diferents països. Cal esperar que aquesta heterogeneïtat legislativa en breu s'homogeneïtzi en àmbit comunitari, cosa que comportarà un augment de toxines regulades en el nostre país. A les taules 1 i 2 es resumeixen els nivells actuals màxims fixats per a les aflatoxines i l'OTA en àmbit comunitari, respectivament.

La presència de micotoxines a nivells superiors als tolerables representa una amenaça per a la innocuïtat dels aliments i un risc important per a la salut humana. No obstant això, la possible toxicitat crònica de moltes micotoxines a bai-

xes dosis desperta més preocupació que la toxicitat aguda.

CONTROL DE MICOTOXINES

Al llarg del temps, s'ha desenvolupat un ampli rang de mètodes analítics sensibles i sofisticats per a la determinació de micotoxines en una gran varietat de matrius alimentàries.²¹ En l'època del descobriment de les aflatoxines, la separació i detecció d'aquestes es realitzava per cromatografia de capa fina (TLC) utilitzant una gran varietat de solvents d'elució i observant les plaques sota la llum ultraviolada (UV). Posteriorment, amb el desenvolupament de la cromatografia líquida d'alta eficàcia (HPLC), la utilització de la TLC ha quedat desplaçada a un segon terme. L'HPLC ofereix més precisió, un poder de resolució més elevat, és fàcil d'automatitzar i s'obtenen límits de detecció més baixos. En contraposició, la TLC és simple, robusta i és relativament barata d'implementar en un laboratori d'anàlisi. Actualment el mètode analític més emprat en la determinació d'aquest tipus de micotoxines és la cromatografia líquida de fase inversa amb detector de fluorescència, ja que s'aprofiten les propietats fluorescents d'aquestes. En el cas de voler detectar nivells baixos de toxines, es realitzen derivatitzacions pre o postcolumna per tal d'augmentar la fluorescència dels analits i poder tenir millors límits de detecció. Però, en el dia d'avui, és habitual treballar amb espectròmetres de masses que són més sensibles, selectius i eviten els problemes de la derivatització.

Les etapes de preparació de mostra són complicades, ja que cal concentrar els analits que es troben en matrius complexes i a baixes concentracions, poques desenes de mg/kg. Les tècniques més emprades són l'extracció en fase líquida, l'extracció en fase sòlida, les columnes multifuncionals i les columnes d'immunoafinitat. Quant a l'extracció en fase líquida, els solvents més emprats són el cloroform, metanol, acetona, acetonitril, benzè, hexà i mescles d'aquests solvents.²² Els principals problemes de l'extracció en fase líquida són la formació d'emulsions, les extraccions incompletes i la coextracció de compostos que interfereixen a la quantificació. En algunes ocasions, s'addicionen sals en el recipient d'extracció per tal de millorar la recuperació, especialment en l'anàlisi de teixits animals. Una alternativa a l'extracció líquida és la utilització de cartutxos d'extracció en fase sòlida, ja que eviten la utilització de grans quantitats de solvents. Les fases estacionàries més emprades són la sílica, C8, C18 i florissil.^{23, 24} Altres treballs publicats empen columnes multifuncionals, les quals estan constituïdes per mescles d'adsorbents (carbó vegetal, celita, resines d'intercanvi iònic i d'altres) empaquetats en tubs de plàstic.²⁵ En els darrers anys s'ha incrementat molt l'ús de les columnes d'immunoafinitat (IAC), emprades en l'etapa d'extracció i/o purificació, a causa de l'elevada selectivitat que presenten i la facilitat d'ús,^{26, 27} però són cares i matrius dependents. Les IAC es preparen adsorbint els anticossos monoclonals específics de la micotoxina en gels continguts en petits cartutxos de plàstic. D'altra banda, en aquells casos que interessa detectar presència o absència de toxina en una mostra i a un nivell de concentració determinat o en un marge de concentracions, s'usen generalment mètodes d'anàlisi immunosorbent amb enzim lligat (ELISA). El principal avantatge d'aquests mètodes és que no requereixen instrumentació, però en el cas de detectar la presència d'una determinada micotoxina,

s'han de confirmar posteriorment per tècniques analítiques convencionals.

MÈTODES D'ANÀLISI

En el present article es presenten els mètodes analítics desenvolupats pel grup de treball de l'Institut Químic de Sarrià per a la determinació d'aflatoxines B1, G1, B2, G2 i ocratoxina A en matrius alimentàries d'origen vegetal, concretament en plantes medicinals, cafè i cervesa. Els mètodes es basen en la utilització de cartutxos d'extracció en fase sòlida de reblert polimèric a l'etapa de purificació de mostra. S'empren dos tipus de reblert polimèric, l'un de fase inversa, anomenat OASIS[®] HLB, i l'altre OASIS[®] MAX, que té propietat de fase inversa i bescanvi aniònic. L'anàlisi i detecció es realitza per cromatografia líquida i espectrometria de masses amb ionització a pressió atmosfèrica. A continuació es resumeixen els diferents mètodes optimitzats, els detalls dels quals es poden consultar en els diferents treballs publicats.^{28, 29}

DETERMINACIÓ D'AFLATOXINES B1, G1, B2 I G2 A RHAMNUS PURSHIANA

R. purshiana és una planta medicinal que té una acció laxant i afavoreix el trànsit intestinal, ja que augmenta la mobilitat intestinal. És indicada per al tractament d'estrenyiment, perquè reté aigua a les femtes i en facilita l'expulsió. Actualment, l'ús de la medicina alternativa està experimentant un increment a causa que s'intenta disminuir l'ús d'antibiòtics en el camp de la veterinària.

Com que es tracta d'una mostra sòlida, cal realitzar una etapa d'extracció de les toxines anterior a l'etapa de purificació i anàlisi. Per fer-ho, es pesen 5 g de mostra i es realitza una extracció amb 50 ml d'una mescla de metanol:aigua (80:20) en un agitador magnètic durant 30

L'anàlisi i detecció es realitza per cromatografia líquida i espectrometria de masses

minuts. L'extracte obtingut es filtra per gravetat a través d'un paper de filtre i, posteriorment, una alíquota de 4 ml del filtrat es fa passar a través d'un cartutx OASIS[®] HLB (3 cc/60 mg), prèviament condicionat amb 2 ml de metanol i equilibrat amb 2 ml d'aigua. El cartutx es renta amb 2 ml d'una mescla de metanol:aigua (30:70). Les toxines s'elueixen amb metanol, es filtren a través d'un filtre de niló de 0,22 µm i s'injecten a l'HPLC-MS (Waters 2690 – Micro-mass ZMD) en mode d'ionització *electrosprai* positiu seguint els ions característics de cada una de les toxines (313.1, 329.1, 315.2, 331.2 per a l'AFB1, AFG1, AGB2 i AFG2, respectivament). En aquest cas, la separació cromatogràfica es realitza emprant una columna de fase inversa Merck Lichrospher C18 ultraràpida (4 × 30 mm, 5 mm), de manera que permet separar i detectar les toxines en tan sols 10 minuts i minimitza el consum de fase mòbil (30 metanol: 70 aigua). El límit de detecció assolit és de 3 µg/kg i el límit de quantificació de 5 µg/kg.

Amb la finalitat d'avaluar si *R. purshiana* és un bon substrat per a la producció d'aflatoxines, aquesta s'inocula amb soca fúngica aflatoxigènica (*Aspergillus parasiticus* CECT 2681) i, posteriorment al període d'incubació, es determina el contingut de toxines amb el mètode d'anàlisi anteriorment presentat. S'ha detectat la producció d'aflatoxines B1 i G1, però no la presència de les aflatoxines B2 i G2. La concentració és màxima al cap de 7 dies d'incubació amb una mitjana de 65 i 35 µg/kg d'aflatoxina B1 i G1, respectivament. S'observa una disminució del contingut d'aflatoxines al cap de 14 dies, i es detecten per a ambdues toxines un nivell aproximat de 15 µg/kg. Per tant, es pot dir

que *R. purshiana* és un bon substrat per a la producció d'aflatoxines per part d'*A. parasiticus*, de manera que és important el control d'aquestes toxines en aquest substrat.

DETERMINACIÓ D'OCRATOXINA A EN EL CAFÈ

Es pesen 10 g de cafè i es realitza una extracció amb 100 ml d'una dissolució de NaHCO₃ (1 %) a l'agitador magnètic durant 30 minuts. Una alíquota de 10 ml del filtrat s'acidula amb HCl(c) fins a pH = 6,5 i posteriorment es passa per un cartutx d'extracció OASIS[®] MAX (3 cc/60 mg), prèviament condicionat amb 2 ml de metanol i equilibrat amb 2 ml d'aigua. Després d'un primer rentat del cartutx amb 2 ml de NaAcO 50 mM (pH = 7):metanol (95:5) i un segon rentat amb 2 ml de metanol, la micotoxina s'elueix amb 2 ml de metanol (2 % HCOOH). L'extracte obtingut es porta a sequedat sota corrent de nitrogen, el residu sec es redissol amb 100 ml de fase mòbil (40 CH₃CN: 60 H₂O [0,1 % HCOOH]) i s'injecta al sistema d'HPLC-MS descrit prèviament emprant la columna XTerra C18 (2,1 × 100 mm, 3,5 mm). En aquest cas, la massa característica que es monitoritza a l'espectròmetre de masses és el 404.0. Gràcies a la utilització d'aquesta tècnica analítica, el límit de detecció del mètode és de 0,1 ng/g, el qual és inferior a l'establert per la legislació actual.

El mètode anteriorment desenvolupat s'ha validat i aplicat a l'anàlisi de 15 mostres de cafè verd i 5 mostres de cafè torrat. Les mostres de cafè analitzades procedeixen de diferents regions de producció (Zimbabwe, el Brasil, l'Índia, Uganda, Colòmbia i Indonèsia) cultivades

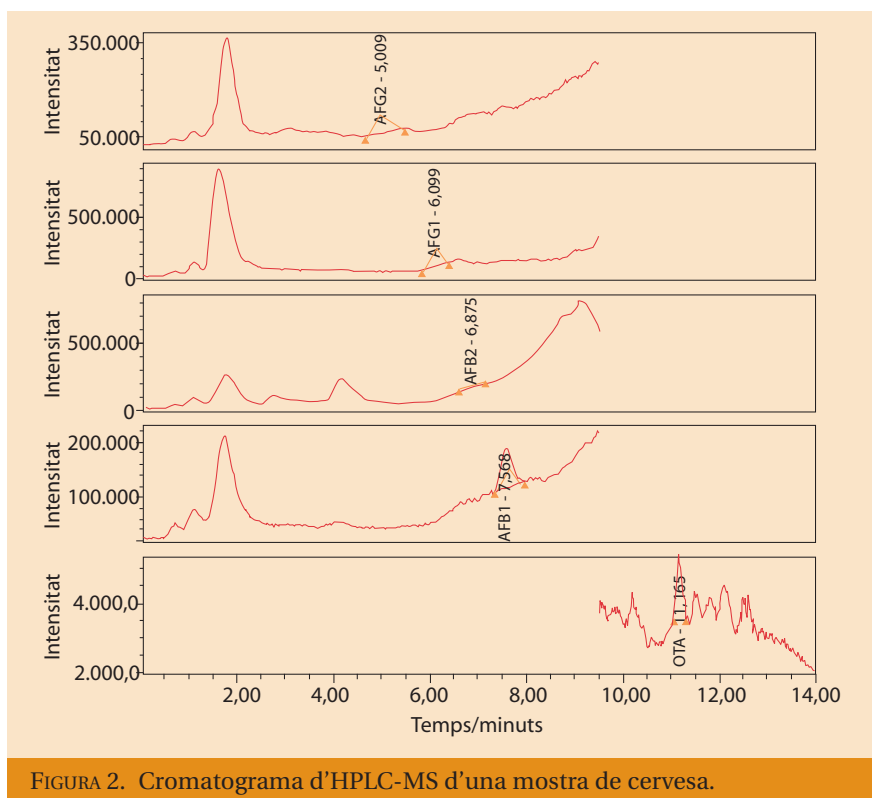


FIGURA 2. Cromatograma d'HPLC-MS d'una mostra de cervesa.

entre els anys 2001 i 2002. A cap de les mostres analitzades s'ha detectat ocratoxina A a un nivell superior del màxim legislat.

DETERMINACIÓ D' AFLATOXINES B1, G1, B2, G2 I OCRATOXINA A EN LA CERVESA

La contaminació de micotoxines a la cervesa prové bàsicament dels cereals que s'afegeixen al principi del procés d'elaboració, ja que una gran part de la toxina present en els cereals suportarà les diferents etapes de fabricació de la cervesa i es trobaran a la beguda final.

La mostra de cervesa desgasificada (5 ml) s'aplica a un cartutx d'extracció en fase sòlida OASIS[®] HLB prèviament condicionat i equilibrat amb 2 ml d'aigua i 2 ml d'acetonitril, respectivament. Després d'una etapa de rentat del cartutx amb 2 ml d'aigua (20 % acetonitril), les micotoxines s'elueixen amb 3 ml d'acetonitril. Posteriorment, l'extracte obtingut s'evapora a sequedat sota corrent de nitrogen, es redissol en 1 ml de fase mòbil (40 CH₃OH: 60 H₂O [0,1 % HCOOH]), es filtra a través

d'un filtre de niló de 0,22 mm i s'injecta al sistema HPLC-MS emprant una columna de diàmetre petit de fase inversa XTerra C18 (2,1 × 100 mm, 3,5 mm). La separació de les toxines es realitza en mode gradient amb una mescla de metanol:aigua (0,1 % HCOOH). L'espectròmetre de masses opera en mode d'ionització positiva per detectar les aflatoxines i en mode negatiu per a la detecció de l'ocratoxina A. A la figura 2 es mostra un exemple d'un cromatograma d'HPLC-MS d'una mostra de cervesa artificialment contaminada al nivell de 2 µg/l.

El mètode d'HPLC-MS s'ha validat, i s'han obtingut els resultats que es presenten a continuació:

— el mètode és lineal en el marge de 0,2 a 2 µg/l;

— l'exactitud del mètode, expressada en percentatge de recuperació, és del 84, 75, 92, 113 i 100 % per a les aflatoxines B1, G1, B2, G2 i OTA, respectivament;

— la repetibilitat, per a concentracions de prop de 2 µg/l, expressada en coeficients de variació de la concentració, és del 7, 6, 10, 8 i 5 % per a les aflatoxines B1, G1, B2, G2 i OTA, respectivament;

— el límit de detecció assolit és d'1 mg/l i el límit de quantificació de 2 mg/l.

Fins ara no s'ha fixat un nivell màxim permès de micotoxines a la cervesa, però es preveu que en breu entri en vigor.

CONCLUSIONS

La principal aportació dels mètodes presentats, respecte als altres treballs publicats, és la no-utilització de solvents orgànics clorats a l'etapa de preparació de mostra i l'ús d'una menor quantitat de solvents orgànics gràcies a l'aplicació de l'extracció en fase sòlida. La utilització de la cromatografia líquida acoblada a un espectròmetre de masses evita els problemes relacionats amb la derivatització tant pre com postcolumna. Els mètodes presentats permeten controlar les toxines al nivell establert per la legislació i assegurar així el consum d'aliments segurs.

BIBLIOGRAFIA

- LANCASTER, M. D.; JENKINS, F. P.; PHILLIP, J. M. (1961). «Toxicity associated with certain samples of groundnuts». *Nature*, 192, p. 1095-1096.
- MERWE, K. J. van der; STEYN, P. S.; FOURIE, L.; SCOTT, D. B.; THERON, J. J. (1965). «Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus*». *Nature*, 205 (4976), p. 1112-1113.
- MERWE, K. J. van der; STEYN, P. S.; FOURIE, L. (1965). «Mycotoxins. II. The constitution of ochratoxins A, B, and C, metabolites of *Aspergillus ochraceus*». *Nature*, p. 7083-7088.
- KROGH, P. (1974). *Proceedings of the 2nd International Symposium on Endemic Nephropathy*. Bulgària: Bulgarian Academy of Science.
- IONGH, H. de; VLES, R. O.; PELT, J. G. van. (1964). «Milk on mammals fed an aflatoxin containing diet». *Nature*, 202 (4931), p. 466-467.
- ITO, Y.; PETERSON, S. W.; WICKLOW, D. T.; GOTO, T. (2001). «*Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *Fluvi*». *Mycol. Res.*, 105, p. 233-239.
- PETERSON, S. W.; ITO, Y.; HORN, B. W.; GOTO, T. (2001). «*Aspergillus bombycis*,

- a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*». *Mycologia*, 93 (4), p. 689-703.
8. KLICH, M. A.; MULLANEY, E. J.; DALY, C. B.; CARY, J. W. (2000). «Molecular and physiological aspects of aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis by *Aspergillus tamaris* and *A. ochraceoroseus*». *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53 (5), p. 605-609.
 9. FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A.; SMEDSGAARD, J. (2004). «*Emericella astellata*, a new producer of aflatoxin B1, B2 and sterigmatocystin». *Lett. Appl. Microbiol.*, 38 (5), p. 440-445.
 10. PITT, J. I. (2000). «Toxicogenic fungi and mycotoxins». *Brit. Med. Bull.*, 56 (1), p. 184-192.
 11. ENRIQUEZ, B. (2000). «Mycotoxins. Contaminants of animal and human foods». *Annal. Pharm. Franc.*, 58 (6) supl., p. 464-469.
 12. ISMAIL, M. A.; ZAKY, Z. M. (1999). «Evaluation of the mycological status of luncheon meat with special reference to aflatoxigenic moulds and aflatoxin residues». *Mycopathologia*, 146 (3), p. 147-154.
 13. GAREIS, M.; SCHEUER, R. (2000). «Ochratoxin A in meat and meat products». *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 51 (4/5), p. 102-104.
 14. GATHUMBI, J. K.; USLEBER, E.; NGATIA, T. A.; KANGETHE, E. K.; MARTLBAUER, E. (2003). «Application of immunoaffinity chromatography and enzyme immunoassay in rapid detection of aflatoxin B1 in chicken liver tissues». *Poultry Science*, 82 (4), p. 585-590.
 15. LOSITO, I.; MONACI, L.; PALMISANO, F.; TANTILLO, G. (2004). «Determination of ochratoxin A in meat products by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionisation sequential mass spectrometry». *Rapid Comm. Mass Spec.*, 18 (17), p. 1965-1971.
 16. NEWBERNE, P. M.; BUTLER, W. H. (1969). «Acute and chronic effects of aflatoxin on the liver of domestic and laboratory animal». *Cancer Res.*, 29 (1), p. 236-250.
 17. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC) (1987). «Overall Evaluations of Carcinogenicity». A: *Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. França: IARC.
 18. GOURAMA, H.; BULLERMAN, L. B. (1995). «*Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds». *J. Food Protec.*, 58 (12), p. 1395-1404.
 19. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC) (1993). «Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins». A: *Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. França: IARC.
 20. FAO (2001). «Manual on the application of the HACCP system in mycotoxin prevention and control». *Food and Nutrition Paper*, 73, p. 1-5.
 21. GILBERT, J.; ANKLAM, E. (2002). «Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs». *Trends in Anal. Chem.*, 21 (6/7), p. 468-486.
 22. AOAC (2003). *Official methods of analysis of AOAC International*. Etats Units: Dr. William Horwitz.
 23. ROCH, O. G.; BLUNDEN, G.; COKER, R. D.; NAWAZ, S. (1992). «The development and validation of a solid phase extraction/HPLC method for the determination of aflatoxins in groundnut meal». *Chromatographia*, 33 (5/6), p. 208-212.
 24. SIBANDA, L.; SAEGER, S. de; PETEGHEM, C. Van. (2002). «Optimization of solid-phase clean-up prior to liquid chromatographic analysis of ochratoxin A in roasted coffee». *J. Chromatogr. A.*, 959 (1/2), p. 327-330.
 25. AKIYAMA, H.; GODA, Y.; TANAKA, T.; TOYODA, M. (2001). «Determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in spices using a multifunctional column clean-up». *J. Chromatogr. A.*, 932 (1/2), p. 153-157.
 26. SCOTT, P. M.; TRUCKSESS, M. W. (1997). «Application of immunoaffinity columns to mycotoxin analysis». *J. AOAC Int.*, 80 (5), p. 941-949.
 27. NAKAJIMA, M. (2003). «Studies on mycotoxin analysis using immunoaffinity column». *Mycotoxins*, 53 (1), p. 43-51.
 28. VENTURA, M.; GÓMEZ, A.; ANAYA, I.; DÍAZ, J.; BROTO-PUIG, F.; AGUT, M.; COMELLAS, L. (2004). «Analysis of aflatoxins B1, G1, B2, G2 in medicinal herbs by liquid chromatography tandem mass spectrometry». *J. Chromatography A.*, 1048, p. 25-29.
 29. VENTURA, M.; VALLEJOS, C.; ANAYA, I.; BROTO-PUIG, F.; M. AGUT, M.; COMELLAS, L. (2003). «Analysis of ochratoxin A in coffee by solid-phase clean-up and narrow-bore liquid chromatography-fluorescence detector- mass spectrometry». *J. Agric. Food Chem.*, 51, p. 7564-7567.

