

DEPARTAMENT DE MEDICINA PREVENTIVA I SALUT  
PÚBLICA, CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ, TOXICOLOGIA  
I MEDICINA LEGAL

ANÁLISIS DE AFLATOXINAS Y OCRATOXINA A EN  
ALIMENTOS Y EVALUACIÓN DE LA INGESTA  
POBLACIONAL

CRISTINA JUAN GARCÍA

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
Servei de Publicacions  
2008

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 11 de març de 2008 davant un tribunal format per:

- D<sup>a</sup>. Guillermina Font Pérez
- D. Prieto Damiani
- D. Vincenzo Brandolini
- D. Pablo Elpidio Hernández Cruza
- D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> José Ruiz Leal

Va ser dirigida per:

D. Jordi Mañes Vinuesa

D. Juan Carlos Moltó Cortes

©Copyright: Servei de Publicacions  
Cristina Juan García

---

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-7114-5

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Artes Gráficas, 13 bajo

46010 València

Spain

Telèfon: 963864115



VNIVERSITAT<sup>Q</sup> VALÈNCIA

 **Facultat de Farmàcia**

DEPARTAMENT DE MEDICINA PREVENTIVA I SALUT PÚBLICA,  
CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ, TOXICOLOGIA I MEDICINA LEGAL

**ANÁLISIS DE AFLATOXINAS Y OCRATOXINA A  
EN ALIMENTOS Y EVALUACIÓN DE LA INGESTA  
POBLACIONAL**

**Tesis Doctoral**

Presentada per:

**Cristina Juan García**

Dirigida per:

Dr. Jordi Mañes Vinuesa

Dr. Juan Carlos Moltó Cortés

---

---

---



UNIVERSITAT  
ID VALÈNCIA (Q\*) Facultat de Farmàcia

El Dr. *Jordi Mañes Vinuesa*, Catedràtic de Nutrició i Bromatologia, i el Dr. *Juan Carlos Moltó Cortés*, Professor Titular de Nutrició i Bromatologia, del Departament de Medicina Preventiva i Salut Pública, Ciències de l'Alimentació, Toxicologia i Medicina Legal de la Univesitat de València.

INFORMEN QUE:

La Llicenciada en Farmàcia per la Universitat de València *D<sup>a</sup> Cristina Juan García*, ha realitzat sota la nostra direcció i tutela el treball d'investigació: **“ANÀLISI D' AFLATOXINES I OCRATOXINA A EN ALIMENTS I AVALUACIÓ DE LA INGESTA POBLACIONAL”** durant els anys acadèmics de 2004 a 2007 amb dedicació i aprofitament. Per realitzar aquest treball la doctoranda ha gaudit de la beca predoctoral d'investigació BI04-40 i ha contat amb el suport econòmic dels projectes del Ministeri d'Educació i Ciència AGL-2003-01407 i AGL-2006-04438/ALI.

I autoritzem la seua presentació per a optar al Títol de Doctora:

Burjassot, 18 de gener de 2008

*Dr. Jordi Mañes*

*Dr. Juan Carlos Moltó*

---

---

---

---

This thesis is presented as European PhD and it is included in the  
International Doctorate Degree (IDD):

**CHEMISTRY AND FOOD TOXICOLOGY**

directed by Prof. Pietro Damiani from University of Perugia (Italy)  
and taking part Cork Institute of Technology (CIT) (Ireland),  
University of Coimbra (Portugal) and  
University of Valencia (Spain)

---

---

---



---

El treball realitzat ha contat amb:

**COOPERACIÓ INTERNACIONAL:**

Spanish Agency for International Cooperation "AECI"  
Programme Mixte Inter-Universitaire Maroco-Espagnol 2005-2006,  
Project No. A/3990/05

**ACCIÓ INTEGRADA:**

Integrated actions programmers between Portugal and Spain  
NºE 1/05 and HP04-69

---

---

---

❖ **ÍNDICE** ❖



**ÍNDICE**

<b>1.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>1.1.</b>	<b>PREÁMBULO</b>	3
<b>1.2.</b>	<b>MICOTOXINAS</b>	4
<b>1.2.1.</b>	Tipos y estructura química	4
<b>1.2.2.</b>	Agentes productores de micotoxinas	5
<b>1.2.3.</b>	Producción de las micotoxinas	7
<b>1.2.4.</b>	Control y prevención de micotoxinas	8
<b>1.2.5.</b>	Toxicidad	12
<b>1.2.6.</b>	Legislación	14
<b>1.3.</b>	<b>OCRATOXINA A</b>	17
<b>1.3.1.</b>	Estructura química	17
<b>1.3.2.</b>	Agentes productores	18
<b>1.3.3.</b>	Presencia en alimentos	19
<b>1.3.4.</b>	Mecanismos de acción	25
<b>1.3.5.</b>	Toxicidad	26
<b>1.3.5.1.</b>	Toxicocinética	26
<b>1.3.5.2.</b>	Toxicidad aguda	27
<b>1.3.5.3.</b>	Toxicidad crónica	27
<b>1.3.6.</b>	Ingestas diarias	28
<b>1.3.7.</b>	Niveles máximos admitidos	30
<b>1.4.</b>	<b>AFLATOXINAS</b>	33
<b>1.4.1.</b>	Estructura química	33

1.4.2.	Agentes productores	34
1.4.3.	Presencia en alimentos	35
1.4.4.	Mecanismos de acción	37
1.4.5.	Toxicidad	38
1.4.5.1.	Toxicidad aguda	39
1.4.5.2.	Toxicidad crónica	40
1.4.6.	Ingestas diarias	41
1.4.7.	Niveles máximos admitidos	42
<b>1.5.</b>	<b>ANÁLISIS DE MICOTOXINAS</b>	<b>45</b>
1.5.1.	Análisis de micotoxinas en alimentos	46
1.5.1.1.	Muestreo	47
1.5.1.2.	Preparación de la muestra	50
1.5.1.3.	Extracción y purificación	51
1.5.1.4.	Separación, detección y cuantificación	64
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>75</b>
<b>3.</b>	<b>EXPERIMENTAL SECTION</b>	<b>83</b>
<b>3.1.</b>	<b>SAMPLING</b>	<b>85</b>
3.1.1.	Cereal samples	86
3.1.2.	Bread samples	89
3.1.3.	Dried fruits samples	90
3.1.4.	Poultry feed samples	90
<b>3.2.</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>90</b>

---

<b>3.2.1. CHEMICALS</b>	90
3.2.1.2. Standard solutions preparation	91
<b>3.2.2. EQUIPMENTS</b>	92
3.2.2.1. Apparatus	92
3.2.2.2. Analytical columns	93
3.2.2.3. Liquid chromatography equipment	93
3.2.2.4. Fluorescence detectors equipment	93
3.2.2.5. Liquid chromatography mass spectrometry equipment	93
<b>3.3. DECONTAMINATION</b>	93
<b>3.4. DEVELOPED METHODS</b>	94
<b>3.4.1. OCHRATOXIN A ANALYSIS</b>	94
3.4.1.1. Extraction procedures	94
3.4.1.2. Determination procedures	97
3.4.1.3. Confirmation procedures	97
3.4.1.3.1. Confirmation through methylation process	97
3.4.1.3.2. Mass spectrometry confirmation	98
<b>3.4.2. AFLATOXINS ANALYSIS</b>	99
3.4.2.1. Extraction procedure	99
3.4.2.2. Determination procedure	100
3.4.2.3. Confirmation procedures	101
<b>4. RESULTS AND DISCUSSION</b>	103
<b>4.1. OPTIMIZATION OF METHODS</b>	105

<b>4.1.1. METHODS USED FOR OCHRATOXIN A ANALYSIS</b>	105
<b>4.1.1.1.</b> Optimization of Accelerated Solvent Extraction (ASE) for OTA in rice	105
<b>4.1.1.2.</b> Optimization of used method for OTA analysis in wheat, maize, barley, rye, oat, and spelt	112
<b>4.1.1.3.</b> Optimization of used method to analyze OTA in bread	114
<b>4.1.1.4.</b> Optimization of used method for OTA in dried fruits analysis	122
<b>4.1.2. METHODS USED FOR AFLATOXINS ANALYSIS</b>	123
<b>4.1.2.1.</b> Optimization of used method to analyze AF in dried fruits analysis	123
<b>4.1.2.2.</b> Optimization of used method to analyze AF in cereals and poultry feed analysis	125
<b>4.2. OCCURRENCE OF MYCOTOXINS</b>	133
<b>4.2.1. OCCURRENCE OF OCHRATOXIN A IN ANALYSED SAMPLES</b>	133
<b>4.2.1.1.</b> Occurrence of OTA in rice	139
<b>4.2.1.2.</b> Occurrence of OTA in cereals excluding rice	143
<b>4.2.1.3.</b> Occurrence of OTA in bread	148
<b>4.2.1.4.</b> Occurrence of OTA in dried fruits	151
<b>4.2.2. OCCURRENCE OF AFLATOXINS IN ANALYSED SAMPLES</b>	154
<b>4.2.2.1.</b> Occurrence of AF in dried fruits	154
<b>4.2.2.2.</b> Occurrence of AF in cereals and poultry feed	159



<b>4.3.</b>	<b>ESTIMATED DAILY INTAKE OF MYCOTOXINS</b>	161
<b>4.3.1.</b>	<b>ESTIMATED DAILY INTAKE OF OCHRATOXIN A</b>	163
<b>4.3.1.1.</b>	Estimated daily intake of OTA in cereals	163
<b>4.3.1.2.</b>	Estimated daily intake of OTA in bread	166
<b>4.3.1.3.</b>	Estimated daily intake of OTA in dried fruits	168
<b>4.3.2.</b>	<b>ESTIMATED DAILY INTAKE OF AFLATOXINS</b>	168
<b>4.3.2.1.</b>	Estimated daily intake of AF in dried fruits and cereals from Morocco	168
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	171
<b>6.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	177
<b>7.</b>	<b>ANEXO</b>	199
<b>7.1.</b>	<b>DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS</b>	201



❖ **INTRODUCCIÓN** ❖



## 1.1. PREÁMBULO

Las micotoxinas son metabolitos secundarios con diferentes propiedades químicas, biológicas y toxicológicas, producidas por hongos que se desarrollan en productos vegetales (Carrillo, 2003; Cabañes, 2000; Carlile et al., 2001). La ingesta de alimentos contaminados por micotoxinas provoca intoxicaciones conocidas como micotoxicosis. Los primeros casos de micotoxicosis conocidos datan de la Edad Media, en que se registraron epidemias por ergotismo, cuya enfermedad está provocada por el consumo de centeno contaminado por *Claviceps purpurea*, también conocida como cornezuelo de centeno.

Más recientemente se han descrito otros casos de micotoxicosis, destacar la aleukia alimentaria tóxica de 1947 producida por la ingestión de granos infectados con *Fusarium poae* y *Fusarium sporotrichioides* (Sarkisov, 1954). Pero el interés por las micotoxinas se acrecentó en 1960 cuando miles de pavos, patos y otros animales domésticos murieron en Inglaterra a causa de la "enfermedad X de los pavos", que se atribuyó a la presencia de toxinas producidas por *Aspergillus flavus* en harina de cacahuete importada de Sudamérica. Posteriormente, en 1977, se produjeron diferentes casos de stachybotryotoxicosis en trabajadores de un almacén de heno contaminado con *Stachybotrys chartarum*.

En 1965 se detectaron cepas de *Aspergillus ochraceus* en alimentos elaborados a base de maíz contaminado que causaron la muerte de pavos, ratas y ratones, y consiguieron aislar un nuevo tipo de micotoxina, denominada ocratoxina A (Van der Merwe et al., 1996). Cuatro años más tarde aislaron el mismo compuesto en *Penicillium* spp., relacionándose con *P. viridicatum* erróneamente, ya que la única especie ocratoxigénica de este género es *P. verrucosum* (Van Walbeek et al., 1969).

Durante la década de los 50, se describió una enfermedad renal crónica que afectaba a zonas rurales de lo que hoy es Bulgaria, Rumanía, Croacia, Bosnia y Serbia, denominándose nefropatía endémica de los Balcanes (NEB) (Creppy, 1999). Esta enfermedad se observó con más frecuencia en mujeres que en hombres, de 30 a 50 años. Posteriormente se sugirió que la ocratoxina A podría ser la causante de esta neuropatía (Austwick, 1975).

Hoy día se conocen más de 400 micotoxinas diferentes, siendo las aflatoxinas, la ocratoxina A, la zearalenona, las fumonisinas y los tricotecenos las principalmente asociadas a problemas de toxicidad alimentaria (Díaz, 2005).

## **1.2. MICOTOXINAS**

Las estructuras de las micotoxinas varían desde compuestos simples de bajo peso molecular como la patulina (PM= 154), a sustancias muy complejas como la fomopsina A (PM= 778) (Culvenor et al., 1989), pero por lo general son compuestos de peso molecular medio.

### **1.2.1. TIPOS Y ESTRUCTURA QUÍMICA**

Desde el punto de vista estructural, las micotoxinas se pueden clasificar en cuatro grupos (Tabla 1.1.):

1. Micotoxinas cumarínicas producidas por *Aspergillus spp.* como aflatoxinas y esterigmatocistina.
2. Micotoxinas lactónicas entre las que se distinguen las producidas por *Penicillium spp.* y *Aspergillus spp.* como son las ocratoxinas y la patulina, y un segundo grupo producidas por *Fusarium spp.* como la zearalenona.

3. Sesquiterpenos derivados de tricotecenos producidos por *Fusarium spp.* como nivalenol, deoxinivalenol, tricótesenos (T-2 y HT-2) y diacetoxycirpanol.

4. Micotoxinas aminopolihidroxiladas producidas por *Fusarium spp.* como fumonisinas o por *Alternaria spp.* como fitotoxinas AAL o alpersinas.

**Tabla 1.1:** Relación de micotoxinas, hongos productores y estructuras químicas (Antón y Lizaso, 2001).

MICOTOXINA	HONGO PRODUCTOR	ESTRUCTURA QUÍMICA
Aflatoxinas	<i>Aspergillus flavus</i> <i>A. parasiticus</i>	Anillo cumárico
Esterigmatocistina	<i>Aspergillus versicolor</i> , <i>A. nidulans</i>	
Ocratoxinas	<i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Penicillium verrucosum</i>	Anillo lactónico
Zearalenona	<i>Fusarium tricinctum</i> , <i>F. moniliforme</i> , <i>F. roseum</i> , <i>F. gramineatum</i>	
Patulina	<i>Penicillium expansum</i> <i>P. patulum</i>	
Fumonisinás	<i>Fusarium moniliforme</i>	Aminopolihidroxilada
Tricotecenos	<i>Fusarium spp.</i> <i>Trichothecium spp.</i>	Sesquiterpenos

### 1.2.2. AGENTES PRODUCTORES DE MICOTOXINAS

Los principales géneros que producen micotoxinas son *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*, siendo las especies *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus*, *F. moniliforme*, *F. roseum*, *P. verrucosum* y *P. expansum* las más reconocidas por generar dichas sustancias que son hepatotóxicas, nefrotóxicas, inmunodepresoras y cancerígenas para los

---

## 1.2. Micotoxinas

animales domésticos, aves y seres humanos, con una gran implicación sanitaria y económica a nivel mundial (Kuiper-Goodman, 1998).

**Tabla 1.2:** Principales hongos y micotoxinas encontradas en diversos alimentos (Miller, 1991)

<b>MOHOS</b>	<b>MICOTOXINAS</b>	<b>ALIMENTOS</b>
<i>Aspergillus spp.</i>	Aflatoxinas Esterigmatocistina Ocratoxina A	Cereales, maíz, arroz, frutos secos, semillas, legumbres, pasas, vino, Tejidos de animales y derivados lácteos.
<i>Fusarium spp.</i>	Tricotecenos Zearalenona Fumonisinias	Cereales.
<i>Penicillium spp.</i>	Patulina Citrinina Ocratoxina A Ácido ciclopiazónico	Frutas y zumos, arroz, queso y cereales.
<i>Alternaria spp.</i>	Alternariol Ácido tenuazónico	Frutas, legumbres y productos derivados de manzanas y tomates.
<i>Claviceps spp.</i>	Alcaloides del Ergot	Cereales.

La contaminación de alimentos por micotoxinas puede variar con las condiciones geográficas y climáticas, los métodos de producción y almacenamiento y el tipo de alimento. Así en el campo, los cultivos, pueden infectarse por diferentes hongos *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Claviceps* y otros hongos endofíticos y, en el momento de la cosecha estos pueden resultar contaminados por los hongos micotoxigénicos y/o micotoxinas tales como tricotecenos, zearolenona,



fumonisinias, ácido tenuazónico, alternariol, alcaloides ergotamínicos, etc. Además, si en los silos donde se almacenan se dan condiciones de aerobiosis, se favorece la contaminación del material por crecimiento de hongos, especialmente de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, que son potencialmente productores de toxinas tales como aflatoxinas, esterigmatocistina, ocratoxinas, citrinina y patulina entre otras (Mannon y Johnson, 1985).

Según la distribución geográfica las micotoxinas más frecuentes en el hemisferio Norte son ocratoxina, vomitoxina y zearalenona, mientras que en Sudamérica, Centroamérica, Asia, África y Australia son aflatoxinas y fumonisinias (Lacey, 1991).

Dada la compleja ecología de la proliferación de los mohos y la producción de micotoxinas, pueden producirse mezclas de micotoxinas en alimentos y piensos, especialmente en cereales. La presencia simultánea de diversas micotoxinas puede influir (Miller, 1991) tanto en el nivel de producción de micotoxinas como en la toxicidad del material contaminado. Por ejemplo, la presencia de tricotecenos puede favorecer la producción de las aflatoxinas en cereales almacenados.

### 1.2.3. PRODUCCIÓN DE MICOTOXINAS

Las micotoxinas son metabolitos secundarios fúngicos formados por reacciones enzimáticas a partir de intermediarios bioquímicamente simples del metabolismo primario, como: acetato, malonato y ciertos aminoácidos. El desarrollo de los hongos y la producción de micotoxinas se relacionan con ciertos condicionantes ambientales, entre ellos (Brera et al., 2002):

- *Factores físicos*: humedad y agua disponible, temperatura, zonas de microbiota (pequeñas zonas del alimento con alto contenido en humedad) e integridad física del grano o alimento.

- *Factores químicos*: composición del sustrato, pH, y disponibilidad de oxígeno.
- *Factores biológicos*: presencia de invertebrados (genera humedad y distribuyen esporas del hongo en el producto) y estirpe específica (en una misma especie fúngica existen estirpes productoras de micotoxinas y otras que son incapaces de producirlas).

#### **1.2.4. CONTROL Y PREVENCIÓN DE MICOTOXINAS**

Las micotoxinas afectan a un amplio rango de productos agrícolas, incluyendo cereales, frutos secos, nueces, granos de café y semillas oleaginosas, los cuales son la base de la economía de muchos países en desarrollo. Estos cultivos son susceptibles a la contaminación por hongos y por tanto, a la producción de micotoxinas. La contaminación con micotoxinas se produce como resultado de las condiciones medioambientales en el campo, así como también por las inadecuadas condiciones en que son realizadas las operaciones de cosecha, almacenamiento y procesamiento del producto.

Actualmente las autoridades oficiales de control de los alimentos están estableciendo programas preventivos y procedimientos de control, para advertir y dominar los riesgos asociados con la contaminación de los alimentos con microorganismos patógenos y productos químicos tóxicos. Estos programas son conocidos como sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC) y se están aplicando de forma creciente en la industria alimentaria, tal y como muestra el manual presentado por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y el Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA), a través de su Centro de Capacitación y Referencia FAO/OIEA para el Control de los Alimentos y los Plaguicidas. El documento incluye orientaciones a los países e instituciones interesados en la aplicación de la

aproximación sistemática del APPCC, para la prevención y control de las micotoxinas y casos de estudio reales que ilustran la aplicación de APPCC específicamente para el control de las micotoxinas.

El sistema de APPCC identifica, evalúa y controla los peligros importantes para la inocuidad de los alimentos. Se trata de un enfoque estructurado y sistemático para controlar la inocuidad de los alimentos en la totalidad del sistema del producto, desde el campo hasta la mesa. Requiere un buen conocimiento de la relación entre causa y efecto, con objeto de actuar de forma más dinámica, y es un elemento clave de la Gestión de la Calidad Total (GCT). Antes de aplicar el sistema de APPCC en un sistema de producción, es necesario que haya programas como las buenas prácticas de fabricación (BPF), las buenas prácticas de higiene (BPH), las buenas prácticas agrícolas (BPA) y las buenas prácticas de almacenamiento (BPAL) que funcionen satisfactoriamente.

Establecido el sistema de APPCC se realiza la hoja de trabajo que garantiza la inocuidad del alimento. Esta hoja de trabajo comprende tres controles:

*1. Control antes de la cosecha.*

La prevención mediante la realización de unas buenas prácticas agrícolas durante la cosecha asegura un producto final inocuo y está orientada a afrontar factores críticos que favorecen la producción de micotoxinas (Bilgrami, y Choudhary, 1998). Algunas de las principales estrategias utilizadas son las siguientes:

1.1. Gestión del riego.

1.2. Empleo de variedades de plantas resistentes.

1.3. Manejo adecuado de los rastrojos o residuos agrícolas, destrucción de malezas y rotación de cultivos.

1.4. Control de la infestación por insectos de los granos y prevención de daños mecánicos de los productos.

*2. Control durante la cosecha.*

Durante la cosecha es importante controlar, entre otras cosas, si el producto agrícola se ha desarrollado en el plazo previsto, evitando que el cultivo permanezca en el campo más tiempo del necesario, y si está limpio y seco. Este control es esencial para evitar el crecimiento de hongos y prevenir la formación de micotoxinas posteriormente durante el almacenamiento (FAO, 2003).

*3. Control después de la cosecha y descontaminación*

Los procedimientos de control después de la cosecha y de descontaminación representan un medio importante para evitar la exposición de los consumidores. La eficacia de cada método deberá evaluarse para cada producto en cuestión y para la toxina presente en el sistema (Magan et al., 2003). Algunas estrategias más habituales para después de la cosecha son:

*3.1. Descontaminación física.*

Segregación: Tras la recolección, en las instalaciones de elaboración, se realiza la limpieza y segregación, donde se retira el material dañado o afectado. En algunos casos, son los mejores métodos para reducir la presencia de micotoxinas en los productos finales.

Degradación térmica: La degradación térmica permite reducir en cierto grado determinadas micotoxinas, sin embargo, otras son termoestables y no se destruyen por completo a las temperaturas aplicadas durante la elaboración.

Irradiación: La irradiación puede ser tomada en consideración como método eficaz para controlar los mohos productores de micotoxinas.

Adsorbentes: La inclusión en los piensos de arcillas de reacción selectiva, que aglutinan firmemente estas sustancias en el aparato digestivo de los animales, reduciendo de modo apreciable su biodisponibilidad y la toxicidad asociada. Los resultados de estos estudios variaron considerablemente en función del tipo de adsorbente utilizado (arcillas, aluminosilicatos, zeolitas, glucomanos, carbón activo, polivinilpirrolidona,...), de la micotoxina estudiada y de la especie animal ensayada (Corred, and Riley, 1999).

### 3.2. Descontaminación biológica

Son por lo general resultado de compuestos específicos producidos por determinados microorganismos (bacterial strain-BBSH 797- ), ya sean enzimas o adsorbentes activos frente a micotoxinas (Fuchs et al., 2002).

### 3.3. Inactivación química

La amoniación es el método químico al que las investigaciones han prestado más atención. Los resultados de una amplia evaluación de este procedimiento demuestran la eficacia e inocuidad de la amoniación como solución práctica para descontaminar piensos contaminados por aflatoxinas. Los dos procedimientos de amoniación utilizados principalmente para la contaminación por aflatoxinas en el maíz, el maní, las semillas de algodón y las harinas son el tratamiento a alta presión y alta temperatura, y el tratamiento a presión atmosférica y temperatura ambiente. Otros procedimientos químicos utilizan por ejemplo, monometilamina y cal, urea y

ureasa, cloruro sódico, bisulfito sódico, ozono y ácido propiónico o sus sales (Mazzani, 1988).

### 1.2.5. TOXICIDAD

Elevados niveles de micotoxinas en la dieta pueden causar efectos adversos agudos y crónicos sobre la salud del hombre y una gran variedad de especies animales. Los efectos adversos pueden afectar especialmente al hígado, riñón, sistema nervioso, endocrino e inmunitario. En términos generales, el riesgo de intoxicación aguda por micotoxinas en el hombre es bajo o moderado en comparación a intoxicaciones de origen microbiológico o por contaminantes químicos. No obstante, debido a su toxicidad crónica, ya que tienen propiedades cancerígenas, se las ha considerado con mayor riesgo que los contaminantes de origen antropogénicos, aditivos alimentarios y plaguicidas.

En la Tabla 1.3 se muestra las más importante micotoxinas frente a sus principales efectos tóxicos (Jiménez et al., 1999; Pestka y Casale, 1990; Antón y Lizaso, 2001).

**Tabla 1.3.** Principales efectos tóxicos de las micotoxinas más importantes.

Micotoxina	Efecto Tóxico
Aflatoxinas	Hepatotóxica, hepatocarcinogénica, teratogénica
Ocratoxinas	Nefrotóxica, teratogénicas, carcinogénicas, inmunotóxicas
Citrinina	Nefrotóxica
Patulina	Lesiones estomacales
Tricotecenos	Aleucia tóxica alimentaria, necrosis del tracto gastrointestinal, inmunotoxicidad
Zearalenona	Hiperestrogenismo, infertilidad, abortos, carcinogénica
Fumonisinias	Leucoencefalomalacia equina

Las micotoxinas tienen efectos tóxicos sobre el sistema inmunitario, ya que disminuyen las defensas en animales y en el hombre y aumenta la susceptibilidad a infecciones. El mecanismo de acción de las micotoxinas sobre el sistema inmunitario es diferente, dependiendo del tipo de micotoxina que se trate. La inmunosupresión se manifiesta como una disminución de los linfocitos T o B, supresión de los anticuerpos, retraso en la actividad de los macrófagos y neutrófilos o disminución de la actividad del complemento.

Las micotoxinas también pueden actuar sobre el metabolismo de glúcidos y lípidos. Sobre el metabolismo de los glúcidos actúan la ocratoxina A, citrinina, aflatoxina B<sub>1</sub> y rubratoxina, mientras que sobre el de los lípidos actúan las aflatoxinas, ocratoxinas, citrinina y tricotecenos. Además, presentan efectos tóxicos específicos sobre el sistema nervioso central, tracto gastrointestinal, hígado, riñón y piel.

Por último, hay que tener en cuenta la posible interrelación entre las distintas micotoxinas consumidas conjuntamente pueden presentar efecto sinérgico, aditivo, antagonico o de potenciación sobre la salud humana (Ruiz et al., 2007).

En cuanto a la toxicidad crónica, la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (*IARC; Internacional Agency for Research on Cancer*) clasifica varias micotoxinas como carcinógenas o potencialmente carcinógenas para el hombre, de acuerdo a los siguientes grupos:

- Grupo 1. El agente es carcinógeno en humanos.
- Grupo 2A: Agente probablemente carcinógeno en humanos; existe limitada evidencia sobre humanos pero suficiente con animales.
- Grupo 2B: Agente posiblemente carcinógeno; la evidencia en humanos es limitada y tampoco hay suficiente evidencia con animales de experimentación.

- Grupo 3: El agente no es clasificable como carcinógeno para humanos y no puede incluirse en otro grupo.
- Grupo 4: El agente probablemente no es carcinógeno en humanos; la evidencia disponible, tanto de humanos como de experimentación animal así lo sugiere.

En la Tabla 1.4. se resume la evaluación realizada por la IARC en relación al poder carcinógeno de las micotoxinas.

**Tabla 1.4.** Clasificación de las micotoxinas según la IARC (2006).

MICOTOXINAS	IARC
Aflatoxina B <sub>1</sub>	1
Aflatoxina M <sub>1</sub>	2B
Citrinina	3
Esterigmatocistina	2B
Fumonisina B <sub>1</sub>	2B
Ocratoxina A	2B
Patulina	3
Toxinas derivadas de <i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. crookwellense</i> (zearalenona, deoxinivalenol, nivalenol y fusarenona X)	3
Toxinas derivadas de <i>Fusarium sporotrichioides</i> (toxina T-2)	3

### 1.2.6. LEGISLACIÓN

En los últimos años la creciente preocupación que, desde el punto de vista de seguridad alimentaria, ha supuesto la presencia de micotoxinas en los alimentos, se ha traducido a nivel legislativo en un incremento del número de normativas que regulan no sólo los niveles máximos para cada micotoxina en diferentes alimentos,



sino también los protocolos de toma de muestras y las especificaciones requeridas a los métodos de análisis a utilizar para las determinaciones analíticas.

Las autoridades para fijar los límites y establecer reglamentaciones sobre las micotoxinas han tenido en cuenta varios factores como son el riesgo, la distribución de la micotoxina en el producto y los procedimientos de muestreo, la disponibilidad de métodos de análisis y la disponibilidad de alimentos evaluando la política económica.

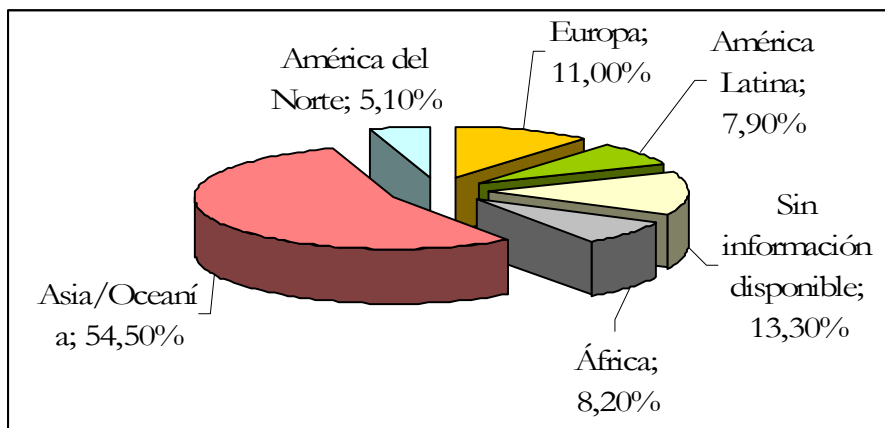
La evaluación del peligro ocasionado por las micotoxinas conduce a la estimación de las dosis consideradas como seguras, tales como la ingesta provisional tolerable semanal (PTWI, del inglés *provisional tolerable weekly intake*) y la ingesta provisional tolerable diaria (PTDI, del inglés *provisional tolerable daily intake*). La escasez de datos fiables sobre las consecuencias de la exposición humana a niveles próximos a los que establece el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA), hace necesario hablar de valores provisionales.

Se han realizado encuestas internacionales sobre las legislaciones existentes para micotoxinas en alimentos y piensos durante 2002-2003, y han sido publicadas por la FAO (FAO, 2004; Figura 1.1).

De ella se conoce que mundialmente, al menos 99 países tenían reglamentos para las micotoxinas en los alimentos y/o piensos en el año 2003, estos países representan el 87 % de los habitantes del mundo. Por orden creciente de frecuencia de micotoxinas legisladas tenemos a las fumonisinas, la zearalenona, el deoxinivalenol, la ocratoxina A, la patulina y por último las más legisladas y de las que se han encontrado reglamentos más detallados y específicos han sido las aflatoxinas.

Hasta el año 2003 en la Unión Europea tan sólo se habían legislado las micotoxinas más peligrosas y las de mayor exposición, y tan solo 39 países contaban con reglamentos específicos. Se promulgaron Directivas comunitarias en las que se

fijaban los métodos de toma de muestra y análisis para el control oficial del contenido en micotoxinas en diversos productos alimenticios. Gran parte de esas normativas han sido transpuestas a la legislación nacional española a través de los correspondientes Reales Decretos (Ramos et al., 2007).



**Figura 1.1.** Porcentaje de la población mundial con reglamentos para las micotoxinas. Fuente: FAO, 2004.

Actualmente las disposiciones comunitarias vigentes por las que se fijan el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios (incluidas las micotoxinas) son el Reglamento 466/2001, al que se le han hecho sucesivas modificaciones como el realizado por el Reglamento 472/2002 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios, y otras modificaciones posteriores con los Reglamentos: 1425/2003; 2174/2003; 455/2004; 683/2004; 123/2005; y 856/2005.

En cuanto a la normativa europea destinada a establecer los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en productos alimenticios, se disponen de cuatro directivas de ellas la Directiva

1998/53/CE está referida a las aflatoxinas y la Directiva 2005/5/CE a la ocratoxina A.

En España existen disposiciones nacionales para establecer los niveles máximos de aflatoxinas (Real Decreto 475/1988 y 465/2003), y los métodos de toma de muestra y de análisis para el control oficial del contenido máximo de aflatoxinas (Real Decreto 90/2001) y ocratoxina A (Real Decreto 294/2003). También por medio de la Directiva Europea 98/53/CE y sucesivas modificaciones por la Orden SCO/388/2003 (transposición de la Directiva 2002/27/CE), la Orden SCO/2797/2004 (transposición de la Directiva 2003/121/CE) y la Orden SCO/4226/2004 (transposición de la Directiva 2004/43/CE), se fijan métodos de toma de muestras y de análisis para el control oficial del contenido máximo de algunos contaminantes en los productos alimenticios.

### **1.3. OCRATOXINA A**

#### **1.3.1. ESTRUCTURA QUÍMICA**

La ocratoxina A (OTA) pertenece a la familia de las ocratoxinas, cuya estructura química se compone por una dihidroisocumarina unida por el grupo 7-carboxilo a una molécula de L-β-fenilalanina mediante un enlace amida (Figura 1.2), cuya estructura es la 7-(L-β-fenilalanil-carbonil)-carboxil-5-cloro-8-hidroxi-3,4-dihidro-3R-metilisocumarina.

En la Tabla 1.5 se muestran los análogos de las ocratoxinas las tres primeras corresponden a las que podemos encontrar de forma natural en alimentos, en R1 se unen moléculas de L-fenilalanina mediante un enlace amida. Las cuatro siguientes son productos de síntesis de las anteriores con utilidad analítica, estas estructuras siguen manteniendo la L-fenilalanina con unión amida. Y las dos últimas son

### 1.3. Ocratoxina A

producto de hidrólisis ácidas, que cuando se dan como reacciones metabólicas aparecen en fluidos biológicos (orina, sangre y leche), estas estructuras pierden la molécula de L-fenilalanina y con ello pierden su actividad tóxica (López et al., 2007).

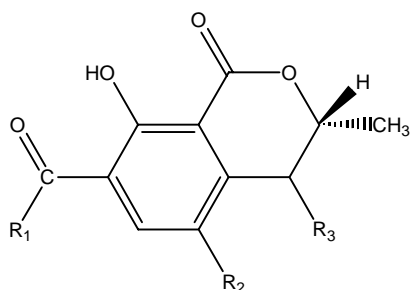


Figura 1.2. Estructura general de las ocratoxinas.

Tabla 1.5. Ocratoxinas y análogos (Hoehler et al., 1997; Xiao et al., 1996).

OCRATOXINAS	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Ocratoxina A	a	Cl	H
Ocratoxina B	a	H	H
Ocratoxina C	b	Cl	H
Ocratoxina A éster metílico	c	Cl	H
Ocratoxina B éster metílico	c	H	H
Ocratoxina B éster etílico	b	H	H
Ocratoxina 4-hidroxi ocratoxina A	a	Cl	OH
Ocratoxina $\alpha$	OH	Cl	H
Ocratoxina $\beta$	OH	H	H

a: C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>2</sub>CH(COOH)NH-; b: C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>2</sub>CH(COOEt)NH-;  
c: C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>2</sub>CH(COOMe)NH-

#### 1.3.2. AGENTES PRODUCTORES

Las ocratoxinas son micotoxinas producidas por algunas especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*.

La OTA es la más tóxica de ellas y la producen principalmente dos especies de *Penicillium* (*P. verrucosum* y *P. nordicum*) y la especie *Aspergillus ochraceus*, así como algunas variedades aisladas de *A. niger*, *A. carbonarius* y *A. terreus*. El *P. verrucosum* está especialmente asociado con cereales almacenados y es muy común en países del norte de Europa y Canadá, por el contrario el *A. ochraceus* es un hongo de clima cálido y tropical. Es conocido que para la producción de OTA por *A. ochraceus* y *P. verrucosum* los valores de  $a_w$  son bajos y están comprendidos en el intervalo de 0.83 a 0.90. Y que a 24 °C el valor óptimo es de 0.95 a 0.99. Y para un valor óptimo de  $a_w$  de 0.90, el intervalo de temperatura para la producción de OTA por *A. ochraceus* es de 12 a 37°C, mientras que para *P. verrucosum* es de 4 a 31°C (Weidenbörner, 2001).

### 1.3.3. PRESENCIA EN ALIMENTOS

Las fuentes de OTA se reflejan en la Figura 1.3 (Soriano et al., 2006).

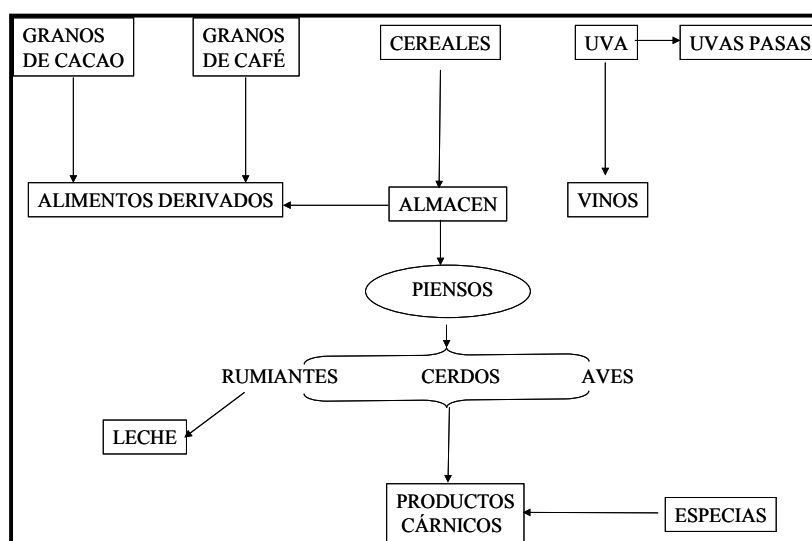
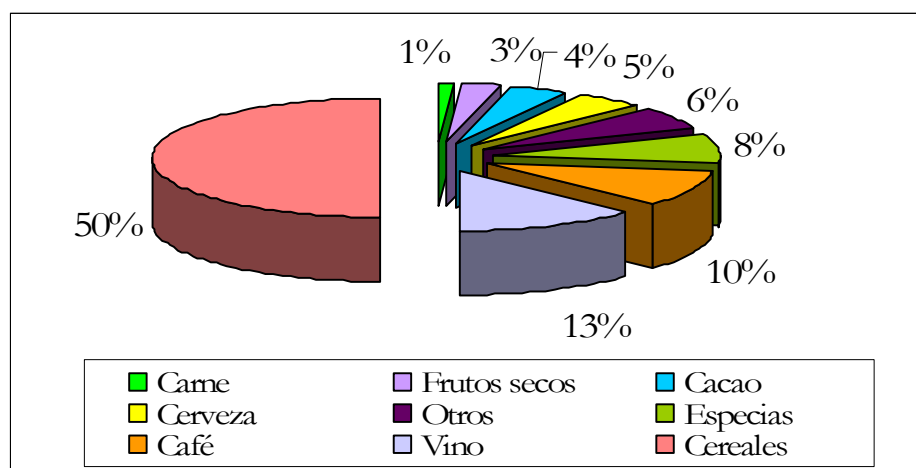


Figura 1.3. Fuentes de OTA en alimentos.

Destacar también que en la categoría de otros alimentos, el zumo de frutas es el que más cantidad de micotoxina aporta con su consumo (European Comisión, 2002).



**Figura 1.4.-** Contribución de los distintos alimentos al promedio de la ingesta alimentaria total de OTA en Europa (Datos procedentes de Francia, Noruega y Suecia) (European Commission, 2002).

Los cereales (trigo, cebada, avena, centeno, maíz y arroz) son la principal fuente de consumo alimentario de OTA por su susceptibilidad a la contaminación por hongos toxigénicos durante la cosecha, el secado y/o almacenamiento, además de ser la base de la alimentación a nivel mundial (Juan et al., 2008). La concentración de OTA más alta de cereales se estimó en el estudio de Maaroufi et al. (1995) realizado en Túnez, donde encontró una concentración  $\leq 33000$  ng/g. Entre los derivados de cereales, el pan puede presentar esta micotoxina porque el lavado y la molienda de los granos del trigo no disminuyen considerablemente la presencia de la OTA en la harina y por consiguiente en el producto final (Juan et al., 2007a; Juan et al., 2007b). En cereales de desayuno su presencia es baja, excepto en aquellas muestras ricas en muesli donde se obtuvieron valores más altos ya que las

### 1.3. Ocratoxina A

uvas pasas son una de las fuentes de OTA. Requiere especial atención las papillas de cereales para lactantes; en un estudio realizado en Italia por Beretta et al. (2002) un 3.4 % de las muestras analizadas superaban los niveles máximos establecidos.

Los piensos para animales constituyen una fuente importante de OTA en la medida en que su ingrediente básico -los cereales- estén contaminados. Por esta razón, en los productos obtenidos a partir de animales alimentados con piensos contaminados (leche, carne y derivados) puede estar presente la OTA. Además, en determinados productos de origen animal como los embutidos, se les añaden especias que también pueden estar contaminadas por OTA. Sin embargo en el ganado bovino, las enzimas bacterianas presentes en el rumen, descomponen la OTA en ocratoxina  $\alpha$  y fenilalanina (Figura 1.5) que no son tóxicas, y por lo tanto los productos derivados no suponen un peligro para la salud humana (Soriano et al., 2006).

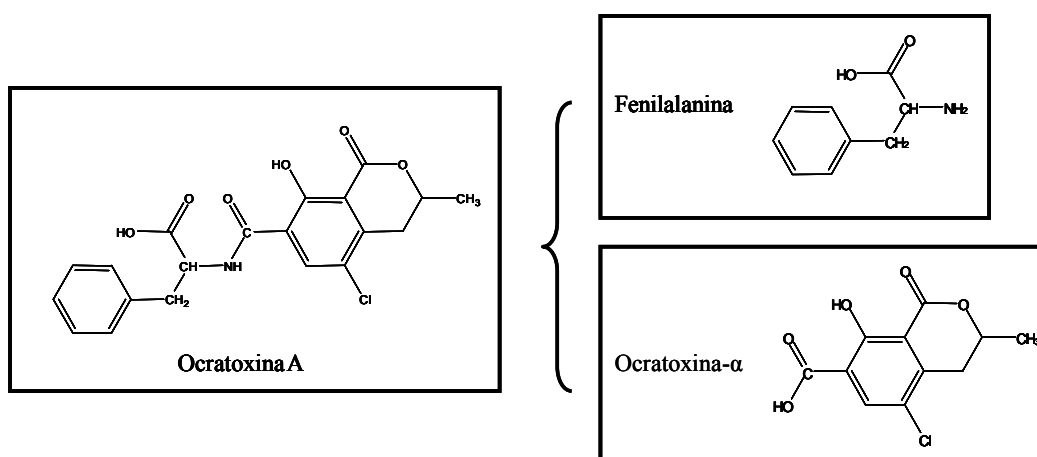


Figura 1.5 Degradación de OTA en ocratoxina- $\alpha$  y fenilalanina.

Las Tablas 1.6, 1.7 y 1.8 muestran la presencia de OTA en cereales y derivados, bebidas alcohólicas y otros alimentos procedentes de diferentes países (Soriano et al., 2006). De ellas se observa que los mayores niveles de OTA en alimentos de consumo humano se encuentran en maíz (400 ng/g) y trigo (115 ng/g) siendo también estos dos cereales los que mayor incidencia presentan (ver Tabla 1.6). Entre las bebidas alcohólicas se aprecia que los vinos tintos son los que contienen mayores concentraciones de OTA (Tabla 1.8). Si bien los piensos son los alimentos que presentan niveles más elevados de OTA (70000 ng/g).

**Tabla 1.6.** Presencia de OTA en cereales y derivados.

PAÍS	ALIMENTO	INCIDENCIA	RANGO (ng/g)
Egipto	Maíz	1/3	12
Tunez	Pan	110/125	0.01-2.09
EEUU	Cebada	18//127	10-40
	Maíz	3/293	83-166
	Trigo	87/680	0.03-115
Alemania	Alforfón	10/23	0.01-0.59
	Arroz	2/22	0.1-0.28
	Avena	24/29	0.01-0.55
	Cebada	16/22	0.01-0.5
	Centeno	13/48	0.01-1.1
	Maíz	14/31	0.01-3.35
	Mijo	24/26	0.01-0.831
	Sorgo	23/26	0.01-0.83
	Trigo	14/35	0.01-0.65
Austria	Maíz	3/27	5-100
Dinamarca	Cebada	11/41	0.05-14
	Centeno	180/247	0.01-33
	Trigo	146/247	0.01-31.6
España	Maíz	1/30	0.5-2.5
Finlandia	Avena	2/34	0.8-56.6
	Cebada	7/66	0.2-12.3



1.3. Ocratoxina A

	Centeno	9/52	0.2-17
	Trigo	7/125	0.2-3
Francia	Arroz	2/16	0.2-1.4
	Cebada	1/7	2
	Maíz	1/18	0.2-1.1
	Trigo	1/22	0.2-0.9
	Holanda	Trigo	1/31
Inglaterra	Avena	1/22	5.9
	Cebada	7/67	0.1-6.4
	Centeno	1/22	1.1
	Harina de maíz	1/4	0.6
	Pan	1/50	210
	Trigo	6/138	0.1-6.3
Italia	Cebada	6/25	0.05-3.9
	Maíz	7/49	0.05-4.9
Noruega	Avena	15/72	0.1-4.2
	Centeno	1/8	0.25-2.5
	Trigo	47/193	0.01-19.9
Polonia	Maíz	2/123	25-400
Suecia	Avena	9/33	0.1-3.6
	Centeno	33/47	0.1-27
	Trigo	55/132	0.1-5.2

Tabla 1.7. Presencia de OTA en bebidas alcohólicas.

PAÍS	ALIMENTO	INCIDENCIA	RANGO (ng/ml)
Marruecos	Vino blanco	3/3	0.04-0.54
	Vino rosado	7/7	0.028-0.18
	Vino tinto	23/23	0.04-3.24
Sudáfrica	Vino rosado	15/15	0.04-0.33
	Vino tinto	9/9	0.07-0.39
EEUU	Vino rosado	2/2	0.010-0.019
Alemania	Cerveza	39/251	0.005-0.29
Dinamarca	Cerveza	21/21	0.007-0.16
España	Vino blanco	28/50	0.003-0.760
	Vino espumoso	10/12	0.003-0.037
	Vino rosado	50/76	0.003-0.460

1.3. Ocratoxina A

	Vino tinto	103/181	<0.003-0.603
Finlandia	Cerveza	8/13	0.05-0.06
Francia	Vino blanco	4/4	<0.01-0.161
Francia	Vino rosado	8/10	0.003-0.085
Grecia	Vino blanco	7/20	0.05-1.16
	Vino dulce	3/18	0.05-2.82
	Vino rosado	55/118	0.05-1.72
	Vino tinto	8/8	0.002-2.35
Hungría	Vino tinto	1/1	0.005
Italia	Vino blanco	9/10	0.01-1.15
	Vino dulce	6/15	0.001-3.856
	Vino rosado	7/12	0.01-0.97
	Vino tinto	14/96	0.010-3.177
Portugal	Cerveza	3/7	0.005-0.006
	Vino blanco	1/2	0.003-0.010
	Vino rosado	66/68	0.003-0.020

**Tabla 1.8** Presencia de OTA en distintos alimentos.

PAÍS	ALIMENTO	INCIDENCIA	RANGO (ng/g)
Brasil	Café instantáneo	16/16	0.2-5.1
	Café tostado	23/34	0.2-6.5
Canada	Piensos	4/51	48-5900
Japón	Café verde	5/68	3.2-17
	Zumo de uvas	2/12	0.003-0.006
Alemania	Alimentos infantiles	63/97	0.01-2.13
	Avellanas	19/32	0.01-0.08
	Cacao	91/96	0.01-1.8
	Café tostado	24/34	0.3-7.54
	Carne de cerdo	8/58	0.01-0.14
	Chocolate	78/78	0.01-0.66
	Chocolate con leche	36/39	0.01-0.41
	Chocolate con nueces	31/35	0.01-0.16
	Jamón	16/57	0.01-0.17
	Ketchup	16/57	0.01-3.8
	Salami	29/68	0.01-0.19
	Salchicha	122/277	0.01-4.56

### 1.3. Ocratoxina A

	Soja	5/13	0.01-0.09
	Té verde	1/32	1.33
	Vinagre	44/87	0.01-4.35
	Zumo de uvas	75/90	0.01-5.26
España	Zumo de uvas	8/8	0.03-0.18
Francia	Uvas	22/31	0.2-7
	Zumo de frutas	1/19	3.45
Holanda	Pimienta	1/6	0.8
Inglaterra	Aceite de sésamo	1/3	0.4
	Cacao en polvo	39/40	0.2-2.4
	Café	81/100	0.1-8
	Chocolate	18/40	0.1-0.6
	Dátiles	1/20	0.2
	Especias	1/4	2.6
	Higos	2/20	0.1-0.8
	Pasas	115/120	0.2-53.6
	Salsa de chile	1/4	3.3
	Sultanas	104/120	0.2-25.1
	Uvas	110/121	0.2-29.8
	Zumo de uvas	19/20	0.01-2.10
	Italia	Aceite de oliva	1/12
Especias		5/5	0.4-23.8
Noruega	Leche	13/165	0.01-0.06
Portugal	Nuez moscada	3/3	0.2-8.5
	Pimienta dulce	3/6	0.2-4.3
Suecia	Leche	5/36	0.01-0.03
Australia	Piensos	1/25	70000

#### 1.3.4. MECANISMOS DE ACCIÓN

Debido a la analogía estructural con el aminoácido fenilalanina, la toxina inhibe de manera competitiva la tRNA fenilalanina sintetasa y como consecuencia de ello, se interrumpe la síntesis de proteínas (Dirheimer et al., 1991). A pesar de que la afinidad de la OTA por la Phe-tRNA sintetasa es mucho menor que la que presenta la propia Phe, la OTA es probablemente muy efectiva cuando se acumula

en las células, ya que la concentración intracelular de Phe es pequeña (Kuiper-Goodman et al., 1989).

Por otra parte, los efectos genotóxicos y carcinogénicos, que son los que más preocupan desde el punto de vista de la salud humana, se piensa que son consecuencia de la capacidad de la OTA para producir aductos y roturas sencillas en el ADN bien directamente, bien indirectamente por la generación de especies reactivas. El papel que la bioactivación juega en la aparición de metabolitos con efecto genotóxico y carcinogénico no está resuelto ya que, si bien algunos autores han observado efectos genotóxicos en sistemas celulares en presencia de ciertas isoformas de CYP450 (De Groene et al., 1996; El Adlouni et al., 2002; Gillman et al 1999), otros en cambio sugieren que la OTA es escasamente metabolizada por CYP450 (Gross-Steinmeyer et al., 2002; Zepnik et al., 2003).

### **1.3.5. TOXICIDAD**

#### **1.3.5.1. Toxicocinética**

En todas las especies animales estudiadas la OTA se absorbe rápidamente del tracto gastrointestinal y se elimina lentamente (Castegnaro, 1991; Zepnik et al., 2003). Su biodisponibilidad en las especies de mamíferos es superior al 50 %. La OTA presenta una alta afinidad por las proteínas plasmáticas, siendo la fracción de toxina libre en plasma <0.2 % en todas las especies estudiadas, incluido el hombre (Hagelberg et al. 1989). Se excreta en heces y orina y el principal metabolito es la ocratoxina- $\alpha$  que resulta de la hidrólisis del enlace amídico, reacción catalizada por carboxipeptidasas y otras enzimas bacterianas (Castegnaro, 1991; Zepnik et al., 2003). La presencia de ocratoxina- $\alpha$  en orina se debe a su absorción por las venas mesentéricas y su entrada en la circulación entero-hepática que explica su presencia en orina.

#### 1.3.5.2. Toxicidad aguda

La toxicidad aguda de la OTA es relativamente baja y muestra variaciones interespecíficas. La  $DL_{50}$  por vía oral se encuentra en un intervalo entre aproximadamente 20 y 50 mg/kg en ratas y ratones; hasta 0.2-1 mg/kg en perros, cerdos y pollos, que son las especies más sensibles (Kuiper-Goodman et al., 1989). Los síntomas de la intoxicación aguda consisten en hemorragias multifocales en los principales órganos y trombos de fibrina en bazo, cerebro, hígado, riñón y corazón, así como nefrosis y necrosis hepática y en el tejido linfoide (O'Brien et al., 2005). Existe descrito únicamente un caso de intoxicación aguda en el ser humano (Di Paolo et al., 1994).

#### 1.3.5.3. Toxicidad crónica

El consumo crónico de OTA produce nefropatía intersticial en los animales de granja, como pollos y cerdos, que puede causar importantes pérdidas económicas. A pesar de las diferencias en cuanto a la toxicocinética en diversas especies, las lesiones renales en cerdos, aves y roedores son muy similares (Marquardt et al., 1992).

En el ser humano se ha relacionado con la etiología de una nefropatía que es endémica en la zona de los Balcanes, debido a que presenta una gran semejanza histopatológica con la que se produce en los animales y a que la exposición a OTA parece ser muy alta en esa zona geográfica comparada con otras. Se trata de una enfermedad renal crónica y progresiva que representa actualmente el 11 % de todas las enfermedades primarias diagnosticadas en la antigua Yugoslavia. Se caracteriza por una neuropatía túbulo-intersticial progresiva, que deriva en una atrofia tubular y fibrosis periglomerular, entre otros síntomas (Tatu et al., 1998). Esta enfermedad se acompaña a veces de tumores malignos del tracto urinario superior que resultan

muy agresivos. Algunos estudios indican una incidencia ligeramente más elevada de esta enfermedad en las mujeres. Si bien la hipótesis no está comprobada, algunos estudios realizados en Francia, Túnez y Egipto indican una relación entre la ingesta de OTA a través de la dieta y el desarrollo de tumores renales y uroteliales (Godin et al., 1997; Maaroufi et al., 1995; Wafa et al., 1998).

La OTA es también teratogénica, hepatotóxica, neurotóxica e inmunotóxica (Arbillaga et al., 2004). La OTA está clasificada por la IARC como posible carcinógeno humano (grupo 2B) ya que produce tumores renales en animales de experimentación (Bendele et al., 1985; Boorman et al., 1992; Castegnaro et al. 1998). En cuanto a sus efectos genotóxicos, aunque los estudios de mutagenicidad con bacterias eran negativos, algunos autores, utilizando la técnica de post-marcaje con <sup>32</sup>P, observaron que esta micotoxina incrementaba la formación de aductos en el ADN de manera dosis-dependiente, tanto *in vitro* como *in vivo* (Obrecht-Pflumio et al., 2000; Pfohl-Leszkowicz et al., 1991). Además, la formación de aductos estaba correlacionada con la aparición de tumores (Castegnaro et al., 1998). Sin embargo, en otros trabajos recientes utilizando OTA marcada con <sup>3</sup>H, no se han encontrado evidencias experimentales de que ésta o alguno de sus metabolitos dieran lugar a aductos en el ADN (Gautier et al., 2001; Gross-Steinmeyer, 2002). No obstante, se han presentado nuevos datos que apoyan la idea de que el radical fenoxilo de la OTA daría lugar a la formación de aductos (Fauces et al., 2004). Por lo tanto, no está claro si la OTA reacciona directamente con el DNA o su actividad genotóxica se deriva de un efecto citotóxico que generaría especies reactivas capaces de lesionar el ADN (Arbillaga, 2004).

### 1.3.6. INGESTAS DIARIAS

En 1991 el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA), sobre la base de los datos de nefrotoxicidad en cerdos, que es la especie

más sensible, estableció una Ingesta Diaria Tolerable (IDT) de OTA de 16 ng/kg de peso corporal y un consumo semanal admisible provisional de 112 ng/kg pc. En 1995 este valor se redondeó a 100 ng/kg pc, lo que equivale aproximadamente a una IDA de 14 ng/kg pc (Benford et al., 2001). Por su parte, el comité científico de alimentación de la Unión Europea, sobre la base de los datos de carcinogenicidad y genotoxicidad la OTA en ese momento, recomendó reducir la exposición tanto como fuera posible y, en cualquier caso, que fuera inferior a 5 ng/kg pc/día (E.C., 2002).

En la Unión Europea se han realizado diversos estudios para evaluar la ingesta diaria de OTA a través de distintos alimentos (Task 3.2.7 "Assessment of dietary intake of Ochratoxin A by the population of EU Member States") (E.C., 2002). Partiendo fundamentalmente de esos datos, el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) estableció en 2001 la media de ingestión de OTA por grupos de alimentos que se resumen en la Tabla 1.9. Los cereales y el vino representarían las principales fuentes de exposición, 55 y 22 % respectivamente, mientras que el resto de alimentos indicados en la Tabla 1.9 contribuirían en una menor proporción. El citado informe de la Unión Europea (Task 3.2.7), sobre la base de los datos obtenidos en un total de 18.599 muestras, estableció un valor medio de ingesta diaria de OTA en la dieta europea de 5.7 ng/kg pc/día. Este valor representaría un 112 % de la IDT de 5 ng/kg pc establecida por la Unión Europea y un 40 % de la IDT establecida por JECFA (14 ng/kg pc). Con el objetivo de reducir la exposición humana a esta micotoxina, se ha aprobado una legislación europea que fija el máximo permisible de OTA en cereales, vino, café y otros alimentos (Commission Directive 1881/2006/CE); concretamente en cereales el límite es de 5 ng/g.

**Tabla 1.9.** Ingestas diarias de OTA en función de los alimentos consumidos.

<b>ALIMENTO</b>	<b>ng/kg pc/día</b>	<b>PORCENTAJE (%)</b>
<b>Cereales</b>	3.57	58.05
<b>Vino</b>	1.27	20.65
<b>Mosto</b>	0.44	7.15
<b>Café tostado</b>	0.30	4.88
<b>Cerdo</b>	0.21	3.41
<b>Cerveza</b>	0.10	1.63
<b>Alimentos desecados</b>	0.08	1.30
<b>Legumbres</b>	0.08	1.30
<b>Cacao</b>	0.06	0.98
<b>Aves de corral</b>	0.03	0.49
<b>Té</b>	0.01	0.16

Por otro lado, si tomamos como referencia el valor de IDT de 5 ng/kg pc/día, un individuo de 60 kg de peso no debería ingerir más de 300 ng OTA/día; si esta persona consumiera 60 g diarios de cereales contaminados uniformemente con 5 ng OTA/g (límite máximo permisible) ya estaría aportando esa cantidad de OTA en la dieta. Si aplicáramos estos cálculos a los niños, con menos cantidad de cereal se alcanzarían los mismos valores. Por ello la legislación impone unos niveles máximos más bajos en alimentos destinados a lactantes y niños de corta edad (0.50 ng/g).

### 1.3.7. NIVELES MÁXIMOS ADMITIDOS

La variedad de productos en los que se ha introducido niveles máximos de OTA es muy amplio, entre los de consumo humano se incluye los cereales y sus derivados, el café tostado y soluble, los derivados de la uva, las uvas pasas, el vino, y



la alimentación infantil. Y el último Reglamento comunitario sobre la OTA (Micco et al., 1989), publicado en 2005, ya advirtió de la próxima implantación de niveles máximos para otros alimentos como el café verde, los frutos secos, la cerveza, el cacao y derivados, los vinos de licor, los productos cárnicos, las especias y el regaliz; sin embargo, tras la última actualización de niveles máximos realizada en Diciembre de 2006 no se han establecido modificaciones. En la Tabla 1.10 se pueden observar los niveles máximos de OTA en la alimentación humana vigentes en la actualidad o en preparación (Commission Directive 1881/2006/EC).

En cuanto a los alimentos destinados para el consumo animal, en 2006 se han establecido niveles máximos de OTA para las materias primas de cereal y productos a base de cereal destinadas al pienso en 250 µg/kg, y para piensos complementarios y completos para cerdos en 50 µg/kg y para aves en 100 µg/kg (Commission Recommendation 576/2006/EC).

**Tabla 1.10.** Niveles máximos de OTA en alimentación humana.

<b>PRODUCTOS</b>	<b>OTA (<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>)</b>
Cereales en grano sin transformar (incluido el arroz sin transformar y el alforfón).	5.0
Productos derivados de los cereales (incluidos los productos transformados a base de cereales y los cereales en grano destinados al consumo humano directo).	3.0
Uvas pasas (uvas de Corinto, sultanas y otras variedades de pasas).	10.0
Café tostado en grano y café tostado molido, con excepción del café soluble.	5.0
Café soluble (café instantáneo).	10.0
Vino (tinto, blanco, rosado y espumoso). Otras bebidas a base de vino y/o mosto de uva (vinos aromatizados, bebidas aromatizadas a base de vinos y cócteles aromatizados de productos vitivinícolas) <sup>(1)</sup> . Excluidos los vinos de licor, los vinos de frutas y los vinos con un grado alcohólico volumétrico no inferior al 15 % vol.	2.0
Zumo de uva, ingredientes de zumo de uva en otras bebidas, incluido el néctar de fruta y el zumo de uva concentrado reconstituido.	2.0
Mosto de uva y mosto de uva concentrado reconstituido, destinados al consumo humano directo.	2.0
Alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad.	0.50
Alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales dirigidos específicamente a los lactantes.	0.50
Café verde, frutos secos distintos de las uvas pasas, cerveza, cacao y productos del cacao, vinos de licor, productos cárnicos, especias y regaliz.	En preparación

<sup>(1)</sup>El contenido máximo de OTA aplicable a estas bebidas está en función de la proporción de vino y/o mosto de uva presente en el producto acabado.

## 1.4. AFLATOXINAS

### 1.4.1. ESTRUCTURA QUÍMICA

La estructura de las aflatoxinas (AF) se dilucidó en 1962 por el grupo de Asoa (Asoa et al., 1963). Se las denomina aflatoxinas B y G (AFB y AFG) por el color de la fluorescencia que emiten bajo la luz UV; azul (*Blue*) y verde (*Green*), respectivamente (Ellis et al., 1991).

Las AF son cumarinas sustituidas, conteniendo anillos de bifurano y una configuración de tipo lactona. Todas ellas son muy fluorescentes, habiéndose aprovechado esta propiedad como base de los procedimientos analíticos. Sus pesos moleculares oscilan entre 312 y 350, y la mayoría son poco solubles en agua, pudiéndose extraer con disolventes orgánicos moderadamente polares, tales como el cloroformo o el metanol. Las AF purificadas en forma cristalina son bastante termorresistentes, estables en un rango de pH entre 3 y 10, y sus puntos de fusión son superiores a los 250 °C.

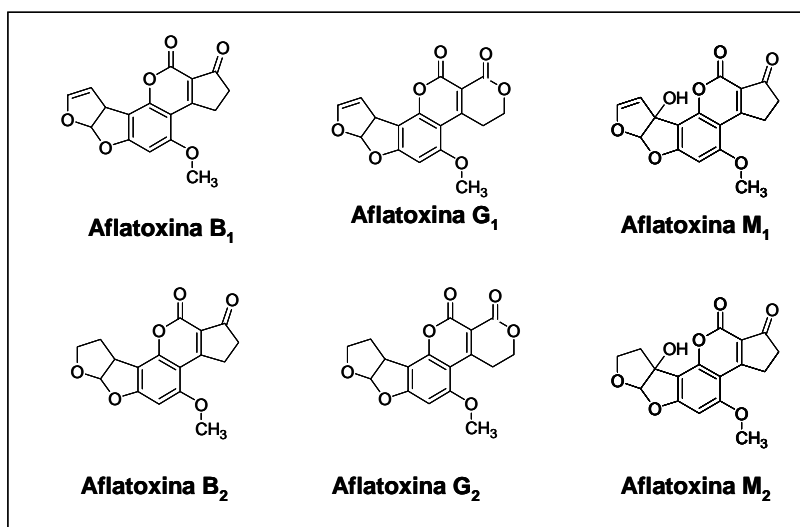


Figura 1.6. Estructuras de las AF de mayor interés.

Actualmente, se han identificado 18 tipos diferentes de AF, de las cuáles solo 6 tienen significación como contaminantes de los alimentos: las AF del grupo B (B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>), G (G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>) y M (M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub>). La numeración 1 y 2 dentro de cada grupo hace referencia a su movilidad cromatográfica relativa. Las AF del grupo M son metabolitos del grupo B. La aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), al igual que la G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>), es resultado del metabolismo de los hongos micotoxigénicos. Las aflatoxinas B<sub>2a</sub> y G<sub>2a</sub> (AFB<sub>2a</sub> y AFG<sub>2a</sub>) se forman a partir de B<sub>1</sub> y G<sub>1</sub>, respectivamente, en medios fuertemente ácidos. En la Figura 1.6 se muestran las estructuras de algunas AF (Juan et al., 2007c).

#### 1.4.2. AGENTES PRODUCTORES

Las AF del grupo B (B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>) y G (G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>) son un grupo de toxinas producidas por cepas de varias especies del género *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, y *A. tamarii*) (Goto et al., 1996; Kurtzman et al 1987). El crecimiento de estos hongos y la producción de toxinas dependen de muchos factores como puede ser el alimento, el grado de acidez, la temperatura ó humedad ambientales y la presencia de microbiota competidora. Aunque en líneas generales las condiciones óptimas de crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus* son unas temperaturas entre los 25 y los 35°C, una humedad relativa entre 88 y 95 % y una actividad del agua alta, se ha visto que *A. flavus* puede proliferar a temperaturas de 10 a 43°C, con una actividad del agua de alrededor de 0.99 y que la temperatura óptima para que produzca toxinas oscila entre los 20 y 30°C. Las pautas de comportamiento del *A. parasiticus* son similares aunque la actividad de agua óptima para su crecimiento es de 0.83 y para la producción de toxinas es de 0.87, con unas temperaturas entre 30 y 28°C. El pH óptimo para el crecimiento de estos hongos oscila entre 3.5 y 5.5. Otro factor que influye en el crecimiento de los hongos micotoxigénicos y en la síntesis de AF es la composición gaseosa ambiental en la

que crece el hongo y la luz. Al ser hongos aerobios, su crecimiento es posible a concentraciones de CO<sub>2</sub> del 20 % si bien a concentraciones superiores al 10 % detienen la producción de las AF (Sanchis y Magan, 2004).

En cuanto al tipo de alimento, se ha visto que la presencia de elevadas concentraciones de carbohidratos y de ácidos grasos favorecen la producción de AF tal y como se ha observado en el coco y cacahuete. Sustratos ricos en proteínas y bajos en carbohidratos no incrementan la producción de AF en el caso de *A. parasiticus*. Mientras que *A. flavus* puede utilizar pocos carbohidratos pero producir grandes cantidades de AF.

#### 1.4.3. PRESENCIA EN ALIMENTOS

Las AF se han detectado como contaminantes naturales en un gran número de productos agrícolas, habiéndose confirmado su presencia en prácticamente todas las zonas del mundo y en mayor o menor grado, en casi todos los alimentos de primera necesidad.

Los alimentos considerados más susceptibles a la contaminación incluyen maíz, cacahuetes, pistachos, nueces del Brasil, semillas de algodón y la copra. También se han encontrado AF en otras semillas oleaginosas como el girasol y la soja, en aceites vegetales sin refinar, en otros frutos secos como las almendras, avellanas y nueces, en las especias como el pimentón, los chiles, la pimienta, etc., en las frutas desecadas como los higos secos y las pasas, en el café y el cacao, en el resto de los cereales y sus productos derivados, y en los piensos. La presencia de AFB<sub>1</sub> en productos de origen animal tales como los huevos, carne, sangre, vísceras, etc. puede darse efectivamente, aunque la tasa de transferencia desde el pienso hasta los productos comestibles de origen animal suele ser muy baja y por tanto, su control no suele considerarse prioritario desde el punto de vista de la salud pública.

#### 1.4. Aflatoxinas

Mención aparte merece la leche y los productos lácteos en donde, aunque también se ha detectado la presencia de AFB<sub>1</sub>, la atención sanitaria debe fijarse más bien en la presencia de la AFM<sub>1</sub>, resultado de la metabolización de la AFB<sub>1</sub>.

**Tabla 1.11.** Incidencia y niveles encontrados de AF totales y AFB<sub>1</sub> en alimentos de Sudamérica.

ORIGEN	ALIMENTO	AF totales		AFB <sub>1</sub>	
		INCIDENCIA	RANGO (ng/ml)	INCIDENCIA	RANGO (ng/g)
Argentina	Maíz	0/30	nd	307/1128	30-160
	Polenta	-	-	65/135	LC-24
Chile	Cacahuete	2/466	1.3-1.7	-	-
Uruguay	Trigo	29/123	2-20	-	-
	Avena y malta	12/137	2-20	-	-
	Maíz	1/70	<20	-	-
	Frutos secos	6/157	2-20	-	-
Colombia	Maíz	-	-	38/300	LC-103
Venezuela	Cacahuetes	11/15	LC-91	-	-
	Arroz	-	-	31/47	0.375-2.5
	Maíz	No disponible	508-908	-	-
Ecuador	Pienso	25/39	21-320	-	-

Existen diferentes trabajos que estudian la incidencia y los niveles de AF encontrados en diferentes alimentos. En las Tablas 1.11 y 1.12 se muestran los resultados obtenidos en dos de ellos que permiten tener una idea a nivel mundial de la incidencia de estas micotoxinas en diferentes alimentos, así como las concentraciones en las que se encuentran (Vildes, 2005).

**Tabla 1.12.** Niveles e incidencia de AFB<sub>1</sub> en muestras de Asia, Oceanía y Europa

AFB <sub>1</sub>				
Muestra	Asia y Oceanía		Europa	
	Incidencia	Nivel máximo (ng/g)	Incidencia	Nivel máximo (ng/g)
<b>Maíz</b>	54/331	457	3/14	311
<b>Trigo</b>	0/97	nd	0/11	nd
<b>Cebada</b>	-	-	0/3	nd
<b>Avena</b>	-	-	-	-
<b>Pienso</b>	109/536	330	18/56	60
<b>Cacahuete</b>	8/9	381	-	-
<b>Arroz</b>	3/27	11	-	-

#### 1.4.4. MECANISMO DE ACCIÓN

La aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) se considera la más importante de toda la serie, normalmente aparece con mayor frecuencia y a mayor concentración que las restantes AF. La AFB<sub>1</sub> se absorbe en el intestino delgado y se transporta por los glóbulos rojos y las proteínas plasmáticas hasta el hígado, mayoritariamente por vía portal. En la Figura 1.7 se esquematiza el mecanismo de acción de la AFB<sub>1</sub> (Eaton y Gallagher, 1994; Riley y Pestka, 2005).

La toxina entra en la célula y su metabolismo en el retículo endoplasmático puede dar lugar a la formación de la AFB<sub>1</sub>-8,9-epóxido, este compuesto presenta afinidad por diversas macromoléculas tales como ácidos nucleicos y proteínas a las que se une covalentemente y por ello puede dar lugar a interrupciones en la

#### 1.4. Aflatoxinas

transcripción y en la traducción, respectivamente. El aducto de ADN formado, AFB<sub>1</sub>-guanina se elimina por orina usándose como biomarcador. La unión del epóxido a las proteínas es responsable de su toxicidad y origina la eliminación de un aducto, AFB<sub>1</sub>-lisina, que se emplea como biomarcador en suero (Galtier, 1999).

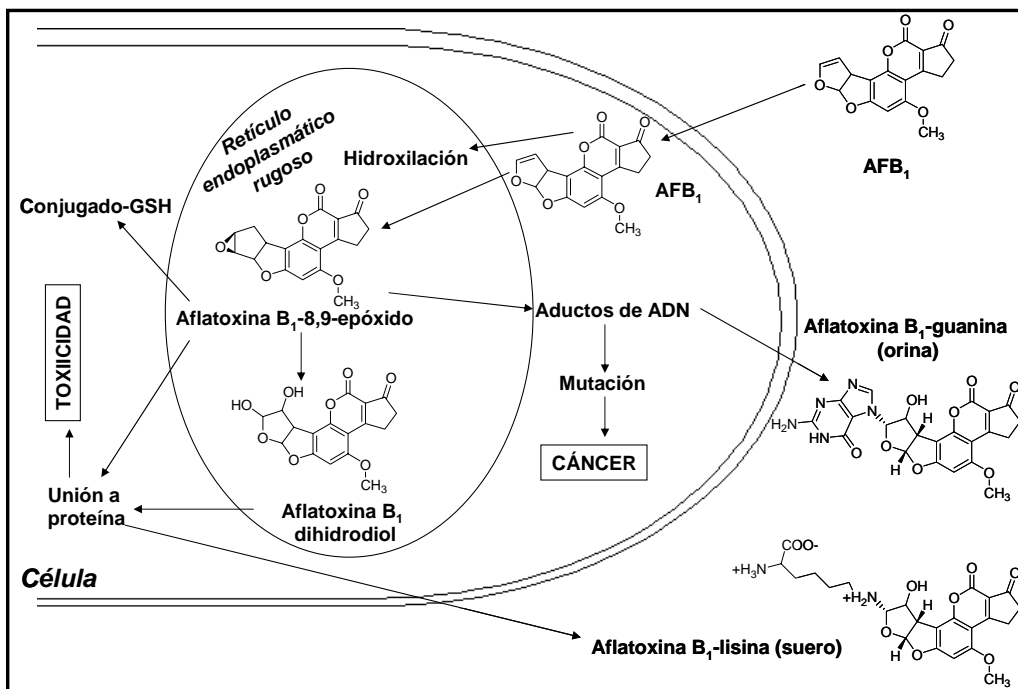


Figura 1.7. Mecanismo de acción de la AFB<sub>1</sub>

#### 1.4.5. TOXICIDAD

El Comité Científico de la alimentación humana de la UE ha señalado que la AFB<sub>1</sub> es un agente cancerígeno genotóxico que contribuye al riesgo de padecer cáncer hepático, incluso a dosis sumamente bajas (Scientific Committee on Food, 1996). La IARC también ha clasificado a la AFB<sub>1</sub> dentro de la categoría de sustancias del tipo 1 en base a la existencia de suficientes evidencias acerca de su



carácter carcinogénico para el hombre, tanto aisladamente como en mezclas naturales con las otras AF (IARC, 1993; IARC, 2002). La misma Agencia clasificó a la aflatoxina M<sub>1</sub> en la categoría 2B como corresponde a un agente posiblemente carcinogénico para el hombre en base a los estudios realizados con animales de experimentación, aunque con evidencias insuficientes por el momento para el ser humano. Las AFB<sub>2</sub> y AFG<sub>2</sub> han sido estudiadas sólo en animales, resultando que las pruebas para AFG<sub>2</sub> fueron insuficientes y las de AFB<sub>2</sub> fueron limitadas como para ser clasificadas como cancerígenas.

#### **1.4.5.1. Toxicidad aguda**

Los síntomas de la intoxicación aguda tienen lugar cuando se ingieren grandes cantidades de AF, estas una vez en el hígado, dan lugar a una infiltración de lípidos que originará necrosis y/o muerte celular hepática. En el hígado las enzimas oxidasas las biotransforman en una serie de metabolitos, que se pueden unir covalentemente con el ADN, ARN y proteínas, lo cual origina la inhibición de la síntesis de proteínas, además de la inhibición del metabolismo de carbohidratos y de lípidos. Paralelamente, se observa falta de apetito (anorexia), depresión, ictericia, diarrea y fotosensibilización llegando a la muerte, en el caso de animales, en un periodo que puede variar entre 12 y 27 días tras el consumo del alimento contaminado. También exhibe efectos citotóxicos debidos a que induce la peroxidación lipídica en el hígado produciendo un daño oxidativo en los hepatocitos. Además, la AFB<sub>1</sub> puede inhibir la actividad de la fosfodiesterasa nucleótido cíclico en el cerebro, hígado, corazón y tejidos renales (Gorelich, 1990; Moss, 2002; Neal, 1998).

Los primeros casos de aflatoxicosis se describieron en 1972, actualmente el incidente más reciente se produjo en los distritos de Makueni y Kitui en Kenia entre Enero y Julio de 2004. Donde produjeron 125 fallecimientos de un total de 317

casos registrados, y que se atribuye a la intoxicación por el consumo de maíz enmohecido, en donde se llegaron a detectar niveles de AF entre 20 y 8000 µg/kg.

El Comité Mixto FAO/WHO de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) evaluó las AF, y en términos generales consideró que el riesgo de intoxicación aguda es entre moderado y bajo. Los valores de DL<sub>50</sub> se muestran en la Tabla 1.13.

**Tabla 1.13.** Valores de DL<sub>50</sub> dependiendo de la especie animal

<b>ESPECIES</b>	<b>DL<sub>50</sub> (mg/kg)</b>
Conejo	0.30
Pato	0.43
Gato	0.55
Cerdo	0.60
Trucha	0.80
Perro	0.50-1.00
Oveja	1.00-2.00
Mandrill	2.00
Pollo	6.30
Rata	5.50-17.90
Macaco	7.80
Ratón	9.00
Hamster	10.20

#### 1.4.5.2. Toxicidad crónica

La intoxicación crónica es la más frecuente, se debe al consumo de alimentos contaminados con niveles bajos de AF durante semanas y/o meses. Los síntomas en animales no son muy específicos: reducción en la ganancia de peso, disminución de la producción de huevos y leche y mayor susceptibilidad frente a diversas enfermedades infecciosas (Moss, 2002). Este último síntoma se debe a los efectos inmunosupresores ocasionados por la reactividad de las AF con las células T

y por la disminución en la actividad fagocitaria de los macrófagos. El ganado bovino es menos susceptible ya que las enzimas bacterianas presentes en el rumen tienen la capacidad de degradar a las AF haciéndolas perder su toxicidad (Yiannikouris, y Jouany, 2002).

Los efectos tóxicos dependen de las dosis y de la duración de la ingestión, de la edad, la especie, el sexo y sobre todo del estado de nutrición de la persona o del animal (Eaton, y Gallagher, 1994). Pero el riesgo se incrementa, según la clasificación de la FAO, cuando se habla de efectos crónicos (FAO, 1997).

Las principales aflatoxicosis producidas en humanos se han dado en países como la India, China, Tailandia y países de África. África, Asia y algunas regiones de Sudamérica son los lugares con las condiciones más favorables para la contaminación por AF, por lo que la exposición humana también será alta. En la población infantil se ha relacionado epidemiológicamente la presencia de AF con determinadas signos y síntomas clínicos como son ictericia neonatal, encefalopatía y degeneración grasa visceral similar al síndrome de Reye y el *kwashiorkor* (Peraica et al., 1999).

#### 1.4.6. INGESTAS DIARIAS

La Unión Europea mantiene que para este tipo de sustancias no existe ningún umbral por debajo del cual no se hayan observado efectos nocivos, por lo tanto no considera pertinente fijar una dosis diaria tolerable y ha seguido el principio de fijar los límites legales en los niveles más bajos posibles. De este modo, y admitiendo que en el momento actual no es posible la eliminación total de la presencia de AF en los productos alimenticios, la concentración más baja permitida de AFB<sub>1</sub> en alimentos tales como los cereales y ciertos frutos secos, está establecida en 2 µg/kg. Partiendo de este valor y asumiendo que un joven de 50 kg de peso

corporal puede ingerir 9.5 ng AFB<sub>1</sub>/día, por lo tanto la ingesta máxima diaria de alimento uniformemente contaminado con 2 µg AFB<sub>1</sub>/kg no podría ser superior a 5 g. Sin embargo, debemos de trabajar con precaución porque este cálculo se ha realizado con un valor de IDT que es aproximadamente, 4000 veces inferior al valor de NOAEL. De hecho, la AFB<sub>1</sub> es una micotoxina del grupo 1, por lo tanto la dosis de umbral debería ser lo más cercana a riesgo cero. El Comité Científico para la Alimentación de la Comisión Europea emitió en 1994 una Opinión estableciendo que cantidades tan bajas como 1 ng/kg pc/día o inferiores, podían ser suficientes para contribuir al riesgo de padecer cáncer de hígado (European Commission-Scientific Committee on Food, 1996).

La FDA (Food and Drug Administration) (FDA, 1978) estimó en 1978 que la ingesta alimentaria de AFB<sub>1</sub> era en promedio de 2.73 ng/kg pc/día en EEUU, con un máximo de 9.03 ng/kg pc/día. Otras estimaciones realizadas por la misma época para Tailandia y el Este de África, fijaron una ingesta alimentaria media que oscilaba entre 3.5 y 222.4 ng/kg p.c/día.

#### **1.4.7. NIVELES MÁXIMOS ADMITIDOS**

Los niveles máximos para las diferentes AF abarcan desde los frutos secos y cereales, primeros productos en los que se legislaron estas micotoxinas a nivel mundial, hasta en especias, que presentan un menor consumo. Tal y como se muestra en la Tabla 1.14 se han establecido niveles para AF totales, AFB<sub>1</sub> y su metabolito, la AFM<sub>1</sub>, en productos lácteos y en alimentación infantil (Commission Directive 2006/1881/CE).

En cuanto a los niveles máximos en alimentos destinados para el consumo animal (Tabla 1.15), comentar que se han fijado para AFB<sub>1</sub> de forma detallada, a diferencia de las AF totales, por dos motivos. En primer lugar por su gran

#### 1.4. Aflatoxinas

toxicidad, es cancerígena para animales, y en segundo lugar porque su metabolización genera la AFM<sub>1</sub> que se elimina por leche y si es destinada para el

**Tabla 1.14.** Niveles máximos de AF en alimentación humana

PRODUCTOS	CONTENIDO MÁXIMO (µg/kg)		
	B <sub>1</sub>	B <sub>1</sub> +B <sub>2</sub> +G <sub>1</sub> +G <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>
Cacahuets, frutos de cáscara y frutos secos y productos derivados de su transformación, destinados al consumo humano directo o a ser usados como ingredientes en los productos alimenticios.	2.0	4.0	—
Cacahuets destinados a ser sometidos a un proceso de selección, u otro tratamiento físico, antes del consumo humano directo o de su uso como ingredientes en los productos alimenticios.	8.0	15.0	—
Frutos de cáscara y frutos secos destinados a ser sometidos a un proceso de selección, u otro tratamiento físico, antes del consumo humano directo o de su uso como ingredientes en los productos alimenticios.	5.0	10.0	—
Cereales (incluido el alforfón <i>Fagopyrum</i> sp.) y productos derivados de su transformación, destinados al consumo humano directo o a ser usados como ingredientes en los productos alimenticios.	2.0	4.0	—
Cereales (incluido el alforfón <i>Fagopyrum</i> sp.), salvo el maíz, destinados a ser sometidos a un proceso de selección, u otro tratamiento físico, antes del consumo humano directo o de su uso como ingredientes en los productos alimenticios.	2.0	4.0	—
Maíz destinado a ser sometido a un proceso de selección, u otro tratamiento físico, antes del consumo humano directo o de su uso como ingrediente en los productos alimenticios.	5.0	10.0	—
Leche.	—	—	0.05
Los siguientes tipos de especias: <i>Capsicum</i> spp. (frutos desecados, enteros o triturados, con inclusión de los chiles, el chile en polvo, la cayena y el pimentón). <i>Piper</i> spp. (frutos, con inclusión de la pimienta blanca y negra). <i>Myristica fragans</i> (nuez moscada). <i>Zingiber officinale</i> (jengibre). <i>Curcuma longa</i> (cúrcuma).	5.0	10.0	—
Alimentos infantiles y alimentos elaborados a base de cereales para lactantes y niños de corta edad.	0.1	—	—
Preparados para lactantes y preparados de continuación, incluidas la leche para lactantes y la leche de continuación.	—	—	0.025
Alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales dirigidos específicamente a los lactantes.	0.1	—	0.025

consumo humano supone un riesgo añadido. Por ello también los niveles de AFB<sub>1</sub> establecidos en piensos varían según al animal que vaya a consumirlo. Pero para las AF totales se ha fijado un nivel general de 20 µg/kg en pienso.

**Tabla 1.15.** Niveles máximos de AFB<sub>1</sub> en alimentación animal

<b>PRODUCTOS DESTINADOS A LA ALIMENTACIÓN ANIMAL</b>	<b>CONTENIDO MÁXIMO EN PIENSOS (µg/kg) *</b>
Todas las materias primas para la alimentación animal.	20
Piensos completos para bovinos, ovinos, caprinos, excepto:	20
- piensos completos para ganado lechero.	5
- piensos completos para terneros y corderos.	10
Piensos completos para cerdos y aves de corral (excepto animales jóvenes).	20
Otros piensos completos.	10
Pienso complementario para bovinos, ovinos y caprinos (excepto piensos complementarios para ganado lechero, terneros y corderos).	20
Piensos complementarios para cerdos y aves de corral (excepto animales jóvenes).	20
Otros piensos complementarios.	5

\* Calculado sobre la base de un contenido de humedad del 12 %

## **1.5. ANÁLISIS DE MICOTOXINAS**

Los métodos para el análisis de las micotoxinas han evolucionando en busca de una mayor precisión, exactitud y reproducibilidad para su identificación. El interés por métodos rápidos, que permitan inspeccionar en corto tiempo un gran volumen de granos, se produce desde los inicios tras el descubrimiento de las micotoxina, que condujo al empleo de la lámpara ultravioleta para detectar la fluorescencia que caracteriza a estos compuestos.

Más tarde se utilizaron los anticuerpos monoclonales para la detección rápida de aflatoxinas. También se emplean como método rápido los basados en ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Estos métodos presentan el inconveniente de dar falsos positivos ya que emplea anticuerpos monoclonales, es por ello que en esos casos es necesario confirmar las muestras positivas antes de dar un resultado (Scott, 1995). En cuanto al análisis semicuantitativo o cuantitativo se viene empleando la cromatografía en capa fina (TLC), ya que se estableció como método oficial por la Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Hoy en día es la Cromatografía Líquida de Alta Precisión (HPLC) la más empleada.

Actualmente se dispone de métodos normalizados de análisis para diferentes micotoxinas, validados por estudios interlaboratorios, que han sido recomendados por la AOAC (AOAC Internacional, 1995) y el Comité Europeo de Normalización (Comité Europeo de Normalización, 1999).

Las técnicas analíticas más empleadas para el análisis de micotoxinas se pueden dividir en tres bloques:

1. Extracción y purificación. La extracción se basa en la solubilidad de las micotoxinas en disolventes orgánicos y acuoorgánicos. Se pretende el paso

de la micotoxina desde la matriz a una fase líquida suficientemente limpia con la cual trabajar. Se basa en tres procedimientos:

- a) el uso de disolventes orgánicos mediante separación líquido-líquido
- b) el uso de extracción en fase sólida
- c) el uso de columnas de inmunoafinidad

2. Técnicas de presunción o screening.

3. Técnicas de confirmación.

### **1.5.1. ANÁLISIS DE MICOTOXINAS EN ALIMENTOS**

Se considera que alrededor del 20 % de los alimentos de origen vegetal están contaminados por micotoxinas, por lo tanto el análisis continuo de los alimentos en busca de micotoxinas es importante no solamente para protección del consumidor sino también para los productores de alimentos.

Para el análisis de micotoxinas, un comité específico de la Unión Europea estableció los requerimientos mínimos que debe cumplir el método analítico; dependiendo del grado de contaminación, los métodos de análisis deben tener una recuperación en el rango de 70-110 % (Reglamento C.E. N° 401/2006). Cualquier método que haya sido validado y adoptado por AOAC International, CEN o ISO (Organización Internacional para la Estandarización, International Organization for Standardization), es reconocido como método oficial para su aplicación en el ámbito internacional.

La metodología analítica para micotoxinas generalmente incluye etapas de muestreo y preparación de la muestra, extracción, purificación, concentración, detección y cuantificación. Estas suponen:



#### **1.5.1.1. Muestreo**

Las micotoxinas se encuentran distribuidas en el alimento de forma muy heterogénea, ya que el hongo productor puede contaminar desde la materia prima hasta el alimento ya empacado para su venta individual. Cuando se supervisa el nivel de micotoxinas en un alimento es importante que el resultado del análisis sea veraz y representativo, para evitar el rechazo o la aceptación de lotes de forma errónea. Esto tiene serias implicaciones tanto legales, como financieras y de seguridad alimentaria.

Para lograr un muestreo representativo es importante considerar los siguientes factores que se establecen en el Reglamento C.E. N° 401/2006 (E.C.D. 2006):

- Las muestras deben ser cogidas por personal cualificado y debidamente entrenado, que entienda la importancia del muestreo para los resultados del análisis.
- Los utensilios en la toma de muestra deben ser adecuados para lo que serán usados, deben estar limpios y en buen estado físico. Deben evitarse las condiciones adversas como, la contaminación cruzada y el clima.
- Las muestras elementales (es decir las muestras recogidas de un mismo lote) deben recogerse en puntos aleatorios distribuidos en todo el lote. Cualquier variación en la toma de muestra debe ser registrada.
- Las muestras deben recogerse cuando todo el lote sea espacialmente accesible, cualquier lugar del lote debe tener la misma probabilidad de ser seleccionado para el muestreo.

---

### *1.5. Análisis de micotoxinas*

- El transporte y el área de almacenamiento deben ser adecuados, los periodos de almacenamiento deben ser lo mas cortos posible.
- Un buen muestreo requiere que la identificación (etiquetado) de las muestras sea clara y proporcione información indispensable como nombre de la persona que realizó el muestreo, lugar, número de lote, condiciones de muestreo, herramientas utilizadas, fecha y hora, y cualquier observación que sea pertinente.

Durante el muestreo y la preparación de las muestras, deberán tomarse precauciones para evitar toda alteración que pueda afectar:

- Al contenido de micotoxinas, influir de manera adversa en la valoración analítica o invalidar la representatividad de las muestras globales,
- A la seguridad alimentaria de los lotes que serán objeto de muestreo.

Asimismo, se adoptarán todas las medidas necesarias para garantizar la seguridad de las personas que tomen las muestras.

- Los productos alimenticios pueden comercializarse a granel, en contenedores o en envases individuales, como sacos, bolsas o envases para la venta al por menor. El método de muestreo podrá aplicarse a todas las formas distintas en que se comercialicen los productos. La Unión Europea ha establecido protocolos de muestreo de algunos productos alimenticios para el análisis de micotoxinas (Reglamento C.E. N° 401/2006). Este reglamento también estipula que cuando no sea posible aplicar el método de muestreo descrito en esta normativa, se podrá utilizar un método alternativo de muestreo, siempre que sea lo más representativo posible.

1.5. Análisis de micotoxinas

En las Tablas 1.16, 1.17 y 1.18 se muestran un resumen general del método de muestreo para los cereales, productos a base de cereales, uvas pasas, higos secos, frutos secos, cacahuets, pistachos, nueces de Brasil, otros frutos de cáscara, café tostado en grano, café tostado molido, café soluble y especias que se han establecido en el Reglamento C.E. No 401/2006 (E.C.D. 2006).

**Tabla 1.16.** Subdivisión de los lotes en sublotes en función del producto y del peso del lote.

Productos	Peso del lote (T)	Peso o N° de sublotes	N°de muestras elementales	Peso muestra global (kg)
Cereales y productos a base de cereales	$\geq 1500$	500 T	100	10
	$> 300$ y $<1500$	3 sublotes	100	10
	$\geq 50$ y $\leq 300$	100 T	100	10
	$< 50$	-	3-100 *	1-10
Uvas pasa (pasas de Corinto, sultanas y otras variedades de pasas)	$\geq 15$	15-30 T	100	10
	$<15$	-	10-100 **	1-10
Higos pasos	$\geq 15$	15-30 T	100	30
	$<15$	-	10-100 **	$\leq 30$
Cacahuets, pistachos, nueces de Brasil y otros frutos de cáscara	$\geq 500$	100 T	100	30
	$>125$ y $<500$	5 sublotes	100	30
	$\geq 15$ y $\leq 125$	25 T	100	30
	$<15$	-	10-100 **	$\leq 30$
Frutos secos	$\geq 15$	15-30 T	100	10
	$<15$	-	10-100 **	1-10
Café tostado en grano, café tostado molido y café soluble	$\geq 15$	15-30 T	100	10
	$<15$	-	10-100 **	1-10
Especias	$\geq 15$	25 T	100	10
	$<15$	-	5-100 **	0.5-10

T: toneladas

\* Tabla 1.15

\*\* Tabla 1.16

**Tabla 1.17.** Número de muestras elementales que deben tomarse, en función del peso del lote de cereales y productos a base de cereales.

Peso del lote (T)	Número de muestras elementales	Peso de la muestra global (kg)
≤0.05	3	1
>0.05 - ≤0.5	5	1
>0.5 - ≤1	10	1
>1 - ≤3	20	2
>3 - ≤10	40	4
>10 - ≤20	60	6
>20 - ≤50	100	10

**Tabla 1.18.** Número de muestras elementales que deben tomarse, en función del peso del lote de uvas pasas, higos secos, frutos secos, cacahuets, pistachos, nueces de Brasil, otros frutos de cáscara, café tostado en grano, café tostado molido, café soluble y especias.

Peso del lote (T)	Número de muestras elementales	Peso de la muestra global (kg)
≤0.1	10	1
>0.1 - ≤0.2	15	1.5
>0.2 - ≤0.5	20	2
>0.5 - ≤1.0	30	3
>1.0 - ≤2.0	40	4
>2.0 - ≤5.0	60	6
>5.0 - ≤10.0	80	8
>10.0 - ≤15.0	100	10

### 1.5.1.2. Preparación de la muestra

Debido a que la distribución de las micotoxinas en las muestras no suele ser homogénea estas se prepararán con cuidado y se homogeneizará antes del muestreo.

El Reglamento de la C.E. N° 401/2006, aconseja que si el laboratorio realiza la homogeneización, se homogeneizará la muestra completa recibida en él. Cada una de las muestras de laboratorio deberá triturarse finamente y mezclarse cuidadosamente para garantizar una completa homogeneización. En el caso de que el contenido máximo sea aplicable a la materia seca, el contenido de materia seca del producto se determinará sobre una parte de la muestra homogeneizada, usando un procedimiento que garantice una determinación precisa del contenido de materia seca.

#### **1.5.1.3. Extracción y purificación**

La preparación de la muestra a analizar requiere procesos de extracción y purificación. Debido a que las micotoxinas se encuentran a concentraciones muy bajas en los alimentos y a la alta complejidad del alimento se hace necesario purificar el extracto (Soriano et al., 2007).

Así si la matriz es líquida se puede utilizar un disolvente inmiscible, pero el elevado volumen de muestra y disolventes que se requieren, la baja selectividad, las recuperaciones en ocasiones insuficientes y su dificultad de automatización, lo convierten en un método tedioso. Si la matriz es de naturaleza sólida, se emplean disolventes orgánicos, los más empleados son el metanol, acetona, acetato de etilo, acetonitrilo, diclorometano, hexano y mezclas de ellos (Scott, 1995). La selección del disolvente se realiza dependiendo de la polaridad de la micotoxina y de la naturaleza de la muestra. La adición de sales y los cambios de pH pueden contribuir a mejorar el rendimiento de las extracciones.

Tras la extracción con disolventes es importante llevar a cabo una etapa de purificación o limpieza (clean-up) que permita facilitar la determinación y

cuantificación. Las técnicas de extracción y purificación utilizadas para el análisis de las micotoxinas son las siguientes:

- Extracción en fase sólida:
  - Convencional (SPE, Solid Phase Extraction)
    - Con columnas Mycosep®.
    - Dispersión de matriz en fase sólida (MSPD, Matrix Solid Phase Dispersion).
    - Microextracción en fase sólida (SPME, Solid Phase MicroExtraction).
    - Con columnas de intercambio iónico (Ion Exchange Column).
    - Con columnas de inmunoafinidad (IAC, ImmunoAffinity Column).
  - Extracción por fluidos supercríticos (Supercritical Fluid Extraction).
  - Extracción asistida por microondas (Micro-Wave Assisted Extraction).
  - Extracción líquida presurizada (Pressurized Solvent Extraction).

Las principales ventajas e inconvenientes de estas técnicas se muestran en la Tabla 1.19.

- Extracción en fase sólida (SPE)

Esta técnica consiste en extraer las micotoxinas disueltas en una matriz acuosa al atravesar un soporte sólido, previamente acondicionado, donde quedan retenidas, y eluir posteriormente con una cantidad pequeña de disolvente (Figura 1.8). Esta técnica es recomendable para el análisis de muestras líquidas; en primer lugar se acondiciona la columna, la muestra líquida se pasa a través de la columna y el analito junto con interferencias de la matriz queda atrapado en la misma. Las interferencias son eluidas previamente mediante un enjuague de la columna; posteriormente se eluye el analito y concentra mediante la evaporación del exceso de disolvente empleando corriente de nitrógeno. La elección de la fase sólida

1.5. Análisis de micotoxinas

depende de la polaridad de las micotoxinas y del tipo de matriz utilizada (Berente et al., 2005; Pagliuca et al., 2005; Briones-Reyes et al., 2007; Omurtag y Beyoğlu, 2007), la SPE se han desarrollado para el análisis de tricotecenos, zearalenona, ocratoxina A y fumonisinas.

**Tabla 1.19.** Ventajas e inconvenientes de algunas técnicas de extracción y purificación

EXTRACCIÓN	VENTAJAS	INCONVENIENTES
Extracción en fase sólida	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Ideal para muestras líquidas</li> <li>▪ Menor gasto de disolvente</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ A veces extractos sucios</li> <li>▪ Requiere tiempo</li> </ul>
Extracción en columnas de inmunoafinidad	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Ideal para muestras líquidas</li> <li>▪ Menor gasto de disolvente</li> <li>▪ Extractos limpios</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Elevado coste de las columnas de inmunoafinidad</li> <li>▪ No reutilizables</li> </ul>
Extracción con fluidos supercríticos	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Rápido (30-60 minutos)</li> <li>▪ Se puede conseguir alta selectividad modificando algunos parámetros</li> <li>▪ Baja cantidad de disolventes (5-10 mL)</li> <li>▪ No es necesaria la filtración posterior del extracto</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Tamaño de muestra limitado (&lt;10 g)</li> <li>▪ Necesidad de modificadores para mejorar la eficiencia de la extracción</li> <li>▪ Coste elevado del equipo</li> </ul>
Extracción con microondas	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Rápido (15 minutos)</li> <li>▪ Bajo consumo de disolventes (15-40 mL)</li> <li>▪ Sencillo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ El extracto obtenido debe ser filtrado</li> <li>▪ Es necesaria la adición de un disolvente polar</li> <li>▪ Es necesaria la limpieza posterior del extracto</li> <li>▪ Coste moderado del equipo</li> </ul>
Extracción líquida presurizada	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Rápido</li> <li>▪ Baja cantidad de disolventes (15-40 mL)</li> <li>▪ Control absoluto de los parámetros de extracción (T, presión y tiempo)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Elevado coste del equipo</li> <li>▪ Dependiente del tipo de matriz</li> <li>▪ Es necesaria la limpieza posterior del extracto</li> </ul>

Las columnas de mayor uso están rellenas de sílice modificada con C8 o C18. En sus grupos silanoles presentan sustituyentes capaces de interactuar con el analito por intercambio catiónico, aniónico o debido a un determinado grado de hidrofobicidad, permitiendo así la separación.

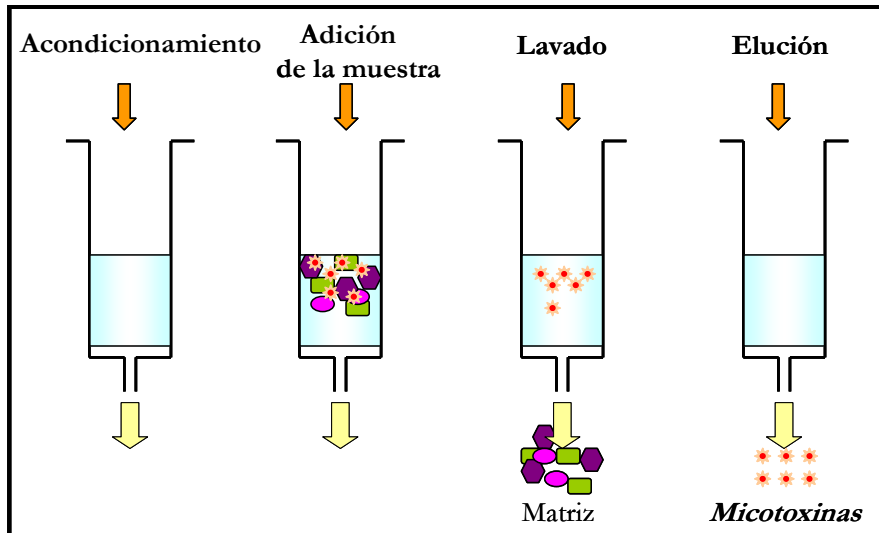


Figura 1.8. Extracción en fase sólida

▪ Extracción con columnas Mycosep®

Las columnas multifuncionales de limpieza llamadas Mycosep® se desarrollaron en EE.UU por la compañía Romer Labs Incorporated. Consisten en una columna compuesta de una mezcla de varios adsorbentes (carbón, celita, resinas de intercambio iónico entre otras) (Figura 1.9).

En el extremo inferior de la columna hay un borde de plástico, una membrana porosa y una válvula que facilita el paso del extracto por la columna; en



el extremo superior tiene un tubo de plástico donde se recolecta el extracto purificado en cuestión de segundos.

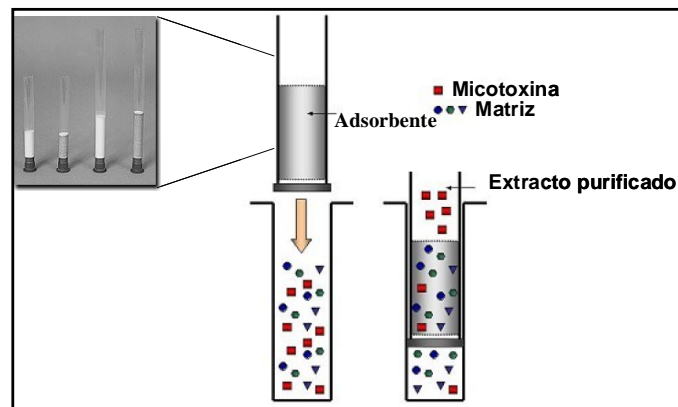


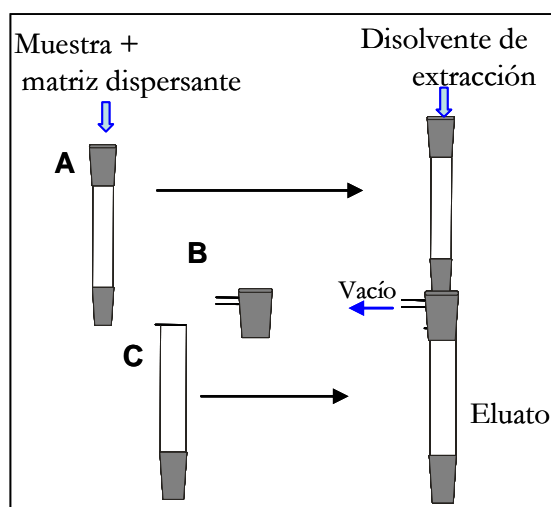
Figura 1.9. Extracción con columnas Mycosep®

La mayoría de las interferencias se retienen en la columna pero no el analito, por lo que no es necesario eluir. Este tipo de columnas se han empleado para varias micotoxinas tales como los tricotecenos del grupo B, ocratoxina A, fumonisinas y patulina (Milanez et al., 2006; Ren et al., 2007).

▪ **Dispersión de matriz en fase sólida**

Esta técnica consiste en dispersar la muestra a analizar con una fase sólida comercial como C18, octilsílice (C8), aminopropilsílice (NH<sub>2</sub>), CN, etc. Hasta conseguir una mezcla homogénea, que se introduce en una columna de vidrio, a la que se le puede añadir una fase sólida de diferente polaridad (Florisil, silicagel) para purificar simultáneamente la muestra (Figura 1.10). Las micotoxinas se eluyen de la dispersión con diferentes disolventes orgánicos como acetonitrilo, hexano, acetato de etilo o diclorometano. Esta técnica permite la extracción de micotoxinas desde pequeñas cantidades de muestras sólidas y semisólidas y se ha propuesto para la

extracción de zearalenona (Lagana et al., 2003) y de aflatoxinas (Blesa et al., 2003 y 2004).



**Figura 1.10.** **A:** columna de vidrio que se rellena de fase sólida, **B:** conexión a presión de vacío entre la columna y tubo de ensayo colector, **C:** tubo de ensayo colector.

#### ▪ Microextracción en fase sólida

Las micotoxinas son retenidas sobre una fase absorbente emplazada en el extremo de una microjeringa modificada, las cuales se desorben posteriormente en el inyector de un cromatógrafo de gases o de líquidos. La extracción se puede realizar por inmersión directa de la fibra en la muestra líquida (Figura 1.11), o por espacio de cabeza (un sistema cerrado, donde la fibra se encuentra suspendida sobre la muestra). La principal ventaja de esta técnica es que elimina la utilización de disolventes y no requiere apenas mano de obra, sus inconvenientes son que requiere un largo tiempo de extracción, es reproducible pero no necesariamente cuantitativa y para cada alimento deben estudiarse los efectos de matriz. Esta técnica se ha aplicado a la extracción de la ocratoxina A, ácido ciclopiazónico y ácido tenuazónico (Aresta et al., 2003).

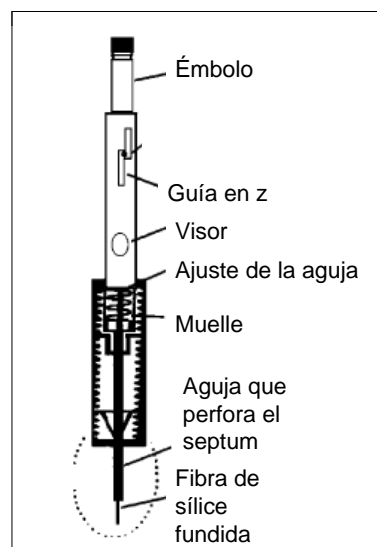


Figura 1.11. Microextracción en fase sólida.

▪ Extracción con columnas de intercambio iónico

El intercambio iónico requiere que la micotoxina a analizar se encuentre en forma iónica en un disolvente acuoso y para ello juega un papel importante la regulación del pH del medio, que dependerá de la constante de acidez ( $K_a$ ) de la micotoxina. Los compuestos en forma aniónica se aíslan mediante columnas de intercambio aniónico (SAX; strong anion exchange) que consisten en resinas con grupos funcionales débilmente básicos, como por ejemplo  $-NH_2$ ,  $-NHCH_3$  o  $-N(CH_3)_2$  o con grupos de amonio cuaternario fuertemente básicos ( $-N(CH_3)_3OH$ ) en los que el grupo hidroxilo es reemplazable por la micotoxina (Figura 1.12). Se ha utilizado para la extracción de fumonisinas y moniliformina (Labuda et al. 2005).

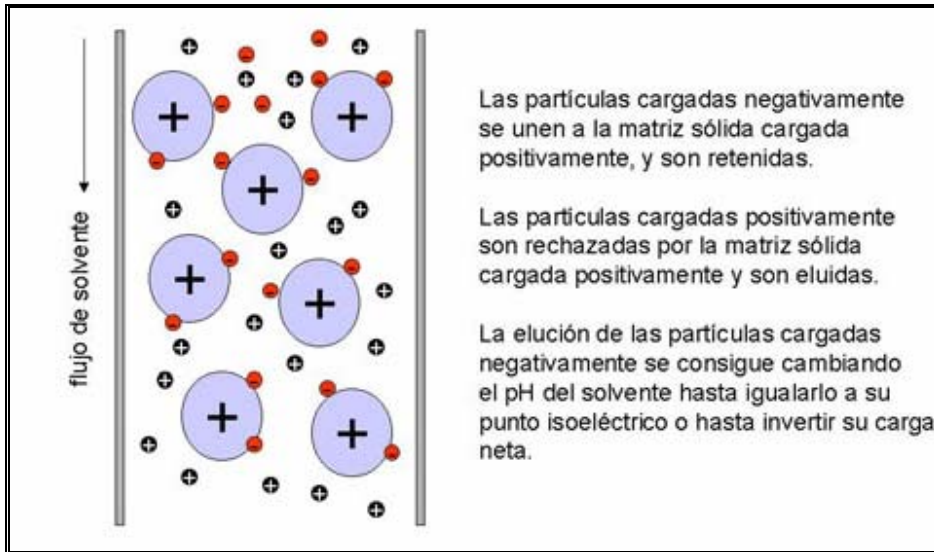


Figura 1.12. Extracción con columnas de intercambio iónico.

#### ▪ Extracción con columnas de inmunofinidad

En los últimos años, la purificación del extracto con columnas de inmunofinidad ha sido cada vez más utilizada debido a la facilidad de uso y la alta selectividad frente a otras técnicas. El procedimiento de purificación consiste en acondicionar previamente la columna, para luego añadir el extracto objeto de análisis. La micotoxina problema se unirá a los anticuerpos monoclonales fijados en la columna de inmunofinidad y mediante un líquido de lavado podrán eliminarse los restos de la matriz. Por último, la elución de la micotoxina por desnaturalización de los anticuerpos permitirá continuar el análisis (Figura 1.13). Las columnas de inmunofinidad presentan el inconveniente de tener un alto coste, fecha de caducidad y en ocasiones la variabilidad de la reproducibilidad interlotes.

Actualmente dos empresas (R-Biopharm y Vicam) comercializan columnas de inmunofinidad para aflatoxinas del grupo B, G y M, ocratoxina A,

deoxinivalenol, fumonisinas, toxina T-2 y zearalenona. También se han desarrollado columnas de inmunoafinidad que permitan la extracción y purificación simultánea de varias micotoxinas al mismo tiempo como puede ser la OchraAflaprep para aflatoxinas y ocratoxina A.

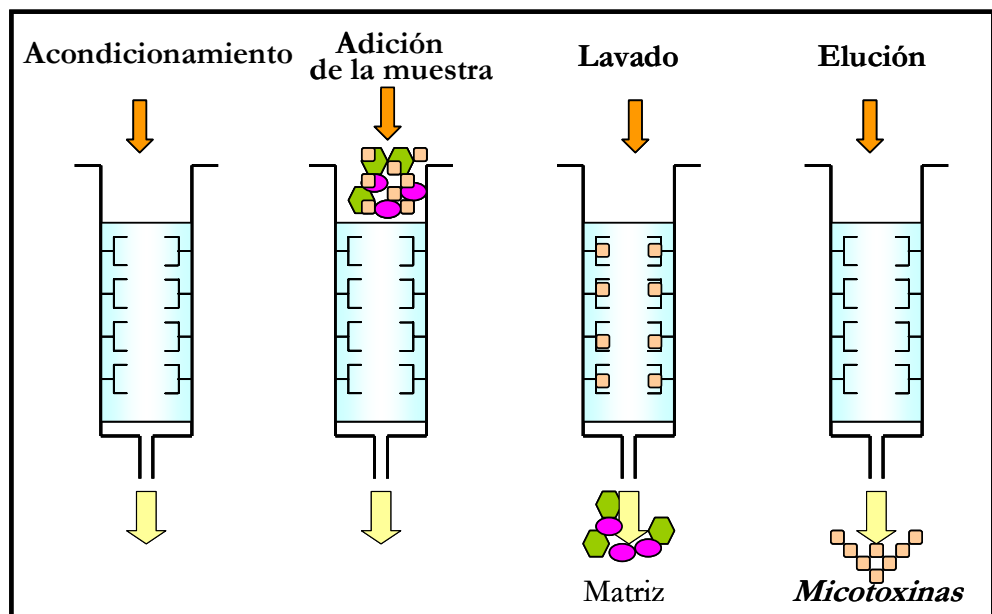


Figura 1.13. Extracción con columnas de inmunoafinidad.

#### ▪ Extracción por fluidos supercríticos

Un fluido supercrítico es aquel que se encuentra a presión y temperaturas superiores a las que definen su correspondiente punto crítico. La región supercrítica se puede alcanzar a partir de un gas por elevación de la temperatura y compresión.

El resultado es un fluido con características de gas en transición a líquido, es decir aumenta su densidad y viscosidad y disminuye su coeficiente de difusión, por lo que presentan poder de solvatación y facilidad de penetración en la matriz.

Aunque para la extracción supercrítica pueden utilizarse diversos gases, el dióxido de carbono es el más empleado por ser inerte, no tóxico y económico. También pueden utilizarse sistemas binarios de fluidos supercríticos con objeto de extraer micotoxinas más polares. Para ello se añade un modificador orgánico, generalmente metanol o isopropanol al 3-5 %. Esta técnica se puede acoplar en línea con sistemas de cromatografía gaseosa, líquida o de fluidos supercríticos aumentando así su poder de resolución. En la Figura 1.14 se muestra un esquema de esta técnica de extracción. Se ha empleado en la extracción de AFB1 (Selim y Tsuei, 1993), y en diversas micotoxinas del género *Fusarium* (Krska, 1998). Sin embargo presenta los inconvenientes de tener una baja reproducibilidad e interferencias de matriz.

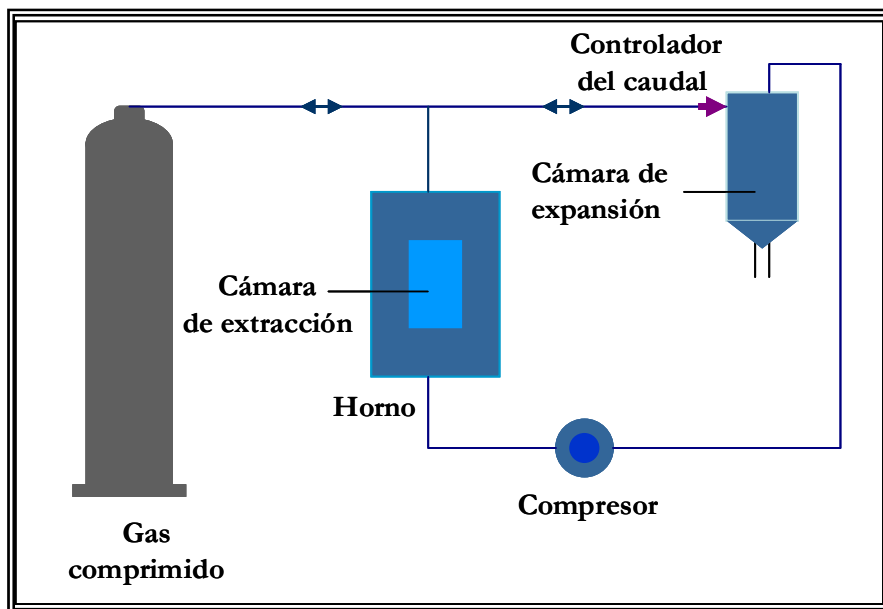


Figura 1.14. Esquema de la extracción con fluidos supercríticos.

▪ Extracción asistida por microondas

Se basa en la absorción de energía de microondas por el disolvente y la muestra, produciéndose un incremento de la temperatura que facilita la difusión de

compuestos desde la matriz al disolvente (Pallaroni y Von Holst, 2003) (Figura 1.15).

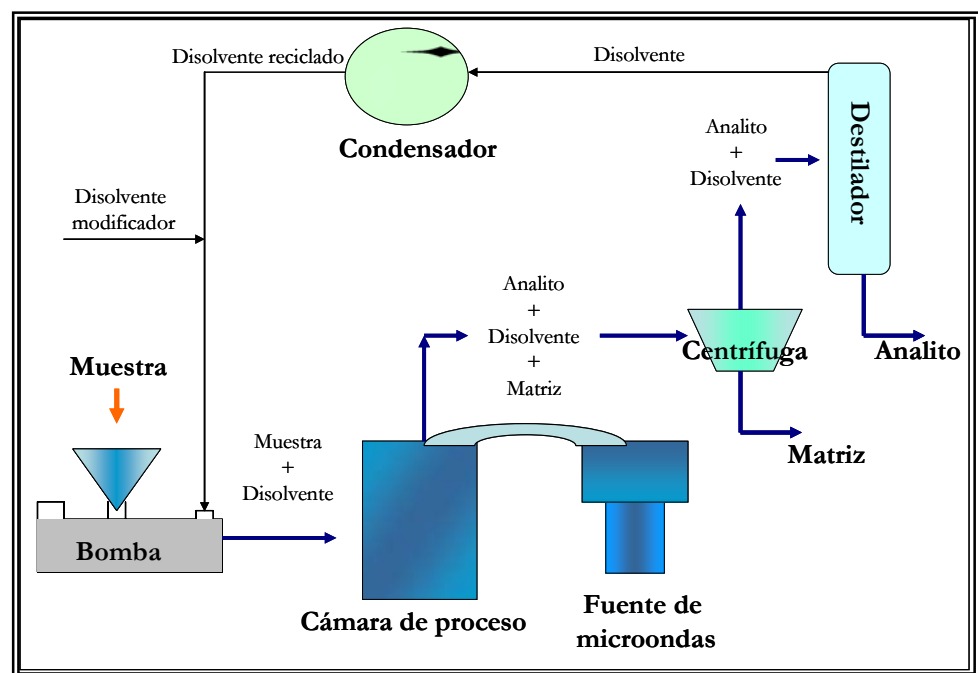


Figura 1.15. Esquema de la extracción asistida por microondas.

Esta técnica se ha aplicado en la extracción de zearalenona seguido de cromatografía líquida con detector de masas y con ionización química a presión atmosférica (APCI, Atmospheric Pressure Chemical Ionization) en maíz y trigo obteniendo límites de cuantificación de 20 y 30 ng/g, respectivamente (Pallaroni et al., 2002).

▪ Extracción líquida presurizada (PLE Pressurized Liquid Extraction)

Esta técnica de extracción se describió por primera vez en 1995 (Richter, 1995) y fue desarrollada por Dionex Co. (Sunnyvale, CA, EE.UU.) bajo la

---

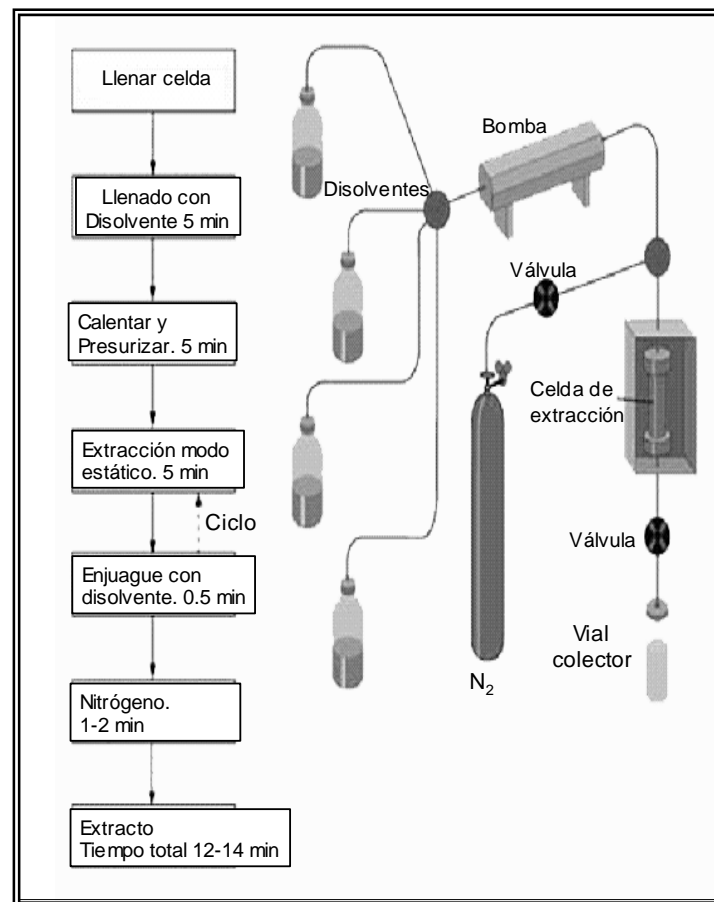
### *1.5. Análisis de micotoxinas*

denominación ASE (Accelerated Solvent Extraction). En esta técnica se utilizan disolventes a alta presión y temperatura sin alcanzar el punto crítico del disolvente; estos dos parámetros determinaran la eficiencia de la extracción (Heemken et al., 1997).

La extracción sigue tres etapas; el analito difunde del interior de la matriz a la superficie, después se transfiere al solvente de extracción y por último el analito es eluido de la celda de extracción. El coeficiente de difusión es determinado principalmente por la estructura del analito, la temperatura de extracción y el disolvente utilizado; lo anterior permite utilizar una gran variedad de disolventes, incluyendo aquellos con los que en métodos convencionales de extracción no se obtendrían buenos resultados (Lou et al., 1997).

La técnica consiste en introducir la muestra dentro de una celda de extracción de acero inoxidable y cerrarla. Una vez colocada en el carrusel de extracción, la celda se llena de disolvente. Bajo condiciones estáticas, el disolvente y la muestra están en contacto bajo temperatura y presión constantes determinadas por el analista (5-10 min generalmente), a este periodo de tiempo se le denomina ciclo o tiempo estático, el ciclo puede programarse para repetirse varias veces y mejorar la extracción. Cuando el ciclo ha terminado, se hace pasar disolvente limpio a través de la celda, para empujar el disolvente que pueda quedar atrapado en la matriz hacia el vial colector se hace pasar una corriente de nitrógeno. En la Figura 1.16 se esquematiza el proceso. La optimización del proceso de extracción generalmente comienza con la elección del disolvente adecuado, otros parámetros experimentales a evaluar son la temperatura, presión, tiempo estático y tamaño de celda de extracción (Dionex, 1997).





**Figura 1.16.** Esquema de la PLE

La PLE se ha aplicado para la determinación de ocratoxina A en arroz, productos elaborados a partir de arroz y pan (González et al., 2005, Juan et al., 2005, González-Osnaya et al., 2006), zearalenona en cereales y derivados (Pallaroni et al., 2003; Urraca et al., 2005) y fumonisina B1, zearalenona y deoxinivalenol en maíz (Royer et al., 2004).

#### **1.5.1.4. Separación, detección y cuantificación**

En los últimos años se han desarrollado técnicas muy sensibles y adecuadas para la separación y detección de micotoxinas en una gran variedad de matrices. Generalmente se utilizan técnicas cromatográficas como la cromatografía gaseosa (GC, gas chromatography) o cromatografía líquida (LC, liquid chromatography) acopladas a diferentes tipos de detectores. Sin embargo, la fidelidad de los resultados obtenidos para la determinación de micotoxinas, siempre va a estar condicionada por las etapas del análisis que le preceden.

Son muchos los factores que determinan el criterio para elegir la metodología de análisis adecuada. La combinación de cada micotoxina en cada tipo de muestra representa un problema diferente para el análisis; el criterio a seguir para elegir la técnica analítica dependerá del equipo y tiempo disponible, de la sensibilidad y la especificidad que sean requeridas y del coste final del análisis que pueda asumirse.

##### ▪ Cromatografía en capa fina

Desde 1961, fecha en la que se descubrieron las aflatoxinas (Asoa et al., 1963), la cromatografía en capa fina (TLC, Thin-layer chromatography) ha sido uno de los métodos de elección para la investigación y determinación de micotoxinas. En la TLC normal la fase estacionaria es polar y la fase móvil apolar, siendo los componentes de las muestras, con características más polares, arrastrados más despacio y permitiendo la separación de las micotoxinas a analizar. Esta técnica es extremadamente útil cuando trabajamos con extractos muy limpios y en donde el desarrollo en una sola dirección (TLC-unidimensional) es suficiente para la separación. Sin embargo, cuando existen muchas sustancias interferentes o necesitamos aislar más de una micotoxina, se utiliza la TLC-bidimensional en donde

se realiza la rotación de la placa 90° después del secado de un primer desarrollo. En la TLC reversa, la fase móvil es polar y la fase estacionaria es apolar, siendo este tipo de TLC menos utilizada. Cabe destacar el estudio de Abramson et al. (1989) donde consiguieron la separación de 18 micotoxinas usando placas de octadecilsílice.

Durante la década de los 80, se desarrolló la cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC, High-Performance Thin Layer Chromatography) con desarrollo bidimensional. Tomlins et al. (1989) desarrollaron unas placas, con una altura de 0.1 a 0.3 mm, formada por partículas de muy pequeño tamaño, en general de 2 a 10  $\mu\text{m}$ , que presentan una alta eficacia y permiten una rápida separación de las aflatoxinas. En la década de los 90, Tripathi et al. (1991) combinaron el uso de la TLC con la espectroscopía de masas para la separación de aflatoxinas y tricotecenos. Sin embargo, en los últimos 20 años el número de publicaciones ha ido decreciendo siendo desplazadas por otras técnicas cromatográficas.

#### ▪ Electroforesis capilar

La electroforesis capilar (CE, Capillary Electrophoresis) es una técnica basada en la migración de las moléculas polares en el interior de un capilar en cuyo interior fluye disolución tampón, cuando se les aplica una corriente eléctrica. La migración de un determinado ión depende de la relación carga/tamaño. A su vez el tamaño depende del peso molecular, de la estructura tridimensional y del grado de solvatación. Las dos versiones más ampliamente utilizadas de esta técnica son la electroforesis capilar en zona (CZE, Capillary Zone Electrophoresis), que utiliza un tampón simple y la cromatografía electrocinética micelar (MEKC, Micellar ElectroKinetic Chromatography), en la que se añade al tampón un tensoactivo (generalmente dodecilsulfato de sodio) que forma micelas. De las dos versiones, la cromatografía electrocinética micelar es la más empleada para el análisis de

---

### *1.5. Análisis de micotoxinas*

micotoxinas, habiendo sido propuesta para la determinación de aflatoxinas (Pena et al., 2002), fumonisinas (Maragos et al., 1996), zearalenona (Zeng et al., 2003) y patulina (Tsao y Zhou 2000). Sin embargo, el principal inconveniente es la dificultad para cuantificar las bajas concentraciones a las que se encuentran las micotoxinas en las muestras reales y la falta de selectividad cuando se utiliza un detector UV.

#### ▪ Cromatografía gaseosa

La cromatografía gaseosa es una técnica basada en la separación de compuestos en función de su volatilidad y afinidad por la fase estacionaria. Las micotoxinas son sustancias poco volátiles y se requiere una derivatización previa para analizarlas por GC. Algunas micotoxinas, entre ellas los tricotecenos, poseen grupos hidroxilo reactivos que pueden formar derivados trimetilsilil (TMS, trimethylsilyl), trifluoroacetilo (TFA, trifluoroacetyl) y heptafluorobutirilo (HFB, heptafluorobutyryl), siendo los productos de reacción, determinados por ejemplo con un detector de captura de electrones (ECD, Electron Capture Detector). En los últimos años, tanto para el análisis de tricotecenos como para otras micotoxinas, se ha generalizado el empleo de columnas capilares y el uso del detector de espectrometría de masas (MS, Mass Spectrometry). Las columnas capilares tienen una serie de ventajas como son su alta eficacia en la separación y la facilidad de acoplamiento a detectores de espectrometría de masas. Los detectores de espectrometría de masas se aplican cada vez más al análisis de micotoxinas, tanto en sus modalidades de impacto electrónico o de ionización química. El modo de adquisición de iones mediante la monitorización de iones seleccionados (SIM, Selective Ion Monitoring) suele elegirse cuando se requiere el máximo de sensibilidad. El modo de barrido de iones (full scan) proporciona el máximo de información estructural para la identificación inequívoca de los analitos.

La primera aplicación de la cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas (GC-MS Gas Chromatography-Mass Spectrometry) para el análisis de micotoxinas se realizó en 1981 para el deoxinivalenol (Scott et al., 1981). Jiao et al. (1992) realizaron el primer análisis de ocratoxina A por GC-MS mediante la formación del éster metílico O-metilocratoxina A. Sin embargo, el uso más extendido de esta técnica se realiza en el análisis de tricotecenos del grupo A (diacetoxiscirpenol, toxinas T-2 y HT-2) que no presentan propiedades fluorescentes y no absorben en la zona del espectro UV.

#### ▪ Cromatografía líquida

Desde hace treinta años se dispone de métodos de cromatografía líquida para el análisis de gran cantidad de compuestos. La primera publicación sobre la aplicación de la LC en el análisis de micotoxinas data de 1973 (Rao y Anders, 1973), desde entonces se ha aplicado cada vez más a este cometido. Entre las ventajas más importantes que presenta la LC se encuentra la posibilidad de separar sustancias termolábiles, no volátiles, polares y apolares con aceptable resolución entre sustancias químicamente similares, de manera rápida y reproducible. Tal y como se observa en la Tabla 1.20 es la técnica más habitual para el análisis de micotoxinas, acoplada a distintos detectores.

La LC en fase normal fue utilizada en un principio para el análisis aflatoxinas, pero ha sido relegada por los sistemas en fase reversa (Krska et al., 2005; Sforza et al., 2006). La LC en fase reversa usa fases estacionarias hidrocarbonadas y fases móviles acuo-orgánicas; la interacción entre las moléculas del soluto y la fase estacionaria depende en principio de las fuerzas de dispersión (interacciones hidrófobas no específicas) separándose los compuestos según su hidrofobicidad, los componentes más polares eluyen primero. Las fases estacionarias apolares se preparan uniendo grupos octilo (C8), octadecil (C18) o cadenas cortas de grupos

1.5. Análisis de micotoxinas

fenilo, cianopropilo y n-alquilo a la superficie del sílice a través de los grupos silanoles (SiOH).

**Tabla 1.20.** Porcentaje (%) de técnicas cromatográficas utilizadas en los últimos 30 años para el análisis de las micotoxinas (datos calculados basándose en las revistas citadas en el Index Citation) (González Osnaya et al. 2006).

Micotoxina	%				Método cromatográfico más usado
	TLC	CE	GC	LC	
Aflatoxinas B y G	28	2	-	70	LC-FD/LC-MS
Aflatoxina M <sub>1</sub>	25	-	-	75	LC-FD/LC-MS
Citrinina	24	-	1	75	LC-FD
Deoxinivalenol	-	-	25	75	LC-MS
Esterigmatocistina	25	-	-	75	LC-FD/LC-DAD
Fumonisinias	8	10	-	82	LC-FD/LC-MS
Ocratoxina A	30	-	4	66	LC-FD
Patulina	8	2	30	60	LC-UV/LC-MS
T-2 y HT-2	2	-	90	8	GC-MS
Zearalenona	5	5	10	80	LC-FD

TLC: Thin Layer Chromatography; CE: Capillary Electrophoresis; GC: Gas Chromatography; LC: Liquid Chromatography; DAD: Diode Array Detector; FD: Fluorescence detector; MS: Mass Spectrometry; UV: Detector de ultravioleta.

La retención de las sustancias está controlada principalmente por la fase móvil, jugando en segundo plano la fase estacionaria; el óptimo en la selectividad se alcanza combinando correctamente los componentes de la fase móvil (van Egmond y Paulsch 1986). Los solventes orgánicos más empleados son el metanol, acetonitrilo y tetrahidrofurano en diferentes combinaciones con agua destilada. La elución isocrática es útil cuando se estudian compuestos de estructura química y polaridad similar, mientras que la elución en gradientes es preferible en la separación

de muestras que contienen micotoxinas de diferente polaridad. Las muestras con compuestos ionizables se pueden analizar añadiendo aditivos a la fase móvil de forma que podamos servirnos de dos técnicas: la supresión iónica y el par iónico, empleando el contraión adecuado. Añadiendo a la fase móvil ácido acético, ácido fosfórico, ácido trifluoroacético (TFA, trifluoroacetic acid), trietilamina (TEA, triethylamine), o soluciones tampón (fosfato, acetato, borato, etc.), se puede controlar el pH de forma que se suprima la posible ionización de las moléculas de la muestra e incluso la de los grupos del relleno de la columna. O bien se puede formar un par iónico empleando el contraión adecuado de signo opuesto a la sustancia problema, el complejo resultante al no poseer carga eléctrica y ser voluminoso interaccionará más fácilmente con la fase estacionaria apolar. Se suelen utilizar alquilsulfonatos (heptanosulfonatosódico) para la separación de bases protonadas y bases de amonio cuaternario (hidróxido de tetrabutilamonio) para grupos carboxilo u otros aniones. Por ejemplo la moniliformina (Shepherd y Gilbert, 1986) y el ácido tenuazóico (Lebrun et al., 1989) han sido analizados usando la cromatografía de par iónico.

Los detectores utilizados son: UV, que es universal pero poco selectivo ya que muchas moléculas absorben a la misma longitud de onda que las micotoxinas; la fluorescencia que por el contrario es muy selectiva y por lo tanto no aplicable a cualquier micotoxina salvo las que poseen fluorescencia natural o adquirida previa derivatización y la espectrometría de masas que genera detecciones específicas. El acoplamiento cromatografía líquida-espectrometría de masas no es tan sencillo como en el caso de la cromatografía de gases-espectrometría de masas debido a que la transferencia de analitos debe realizarse desde una fase líquida en lugar de una fase gaseosa. En la práctica, las interfases más difundidas son la termonebulización (TSP, Thermospray) que nebuliza utilizando calor, la electronebulización (ES, Electrospray) aplica un campo eléctrico en el extremo de un capilar, y la APCI,

---

### *1.5. Análisis de micotoxinas*

donde la nebulización se consigue con ayuda de una corriente de nitrógeno a alta velocidad. Otra técnica menos extendida es el haz de partículas (PB, Particle Beam), en la cual se hacen llegar las moléculas neutras de la micotoxina hasta la fuente de ionización mediante una difusión selectiva. También se han aplicado al análisis de micotoxinas sistemas de espectrometría de masas en tandem (MS/MS), mediante los cuales se seleccionan un ión de interés en una primera etapa y se vuelve a fragmentar en una segunda, estos sistemas pueden proporcionar información estructural adicional y facilitan la identificación y cuantificación de los analitos en mezclas complejas (Goryacheva et al, 2007; Zollner et al., 2006).

#### ▪ Técnicas de exploración o screening

La finalidad analítica de las técnicas de exploración o screening es la de descartar, de una manera rápida, las muestras negativas y reducir al máximo el número de análisis. Se aplican cuando existe un gran número de muestras, sin embargo es recomendable usar alguna técnica de confirmación para validar los resultados positivos dado que en general los métodos de screening son relativamente sensibles pero poco selectivos. Las técnicas de exploración más empleadas para el análisis de micotoxinas son los inmunoensayos y los biosensores.

#### - Inmunoensayos

Dos técnicas se han utilizado para el análisis de micotoxinas: el radioinmunoensayo (RIA, Radio Immuno Assay) y el ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). El primero de ellos, consiste en añadir al medio de reacción un anticuerpo específico y una cantidad conocida de la micotoxina marcada radiactivamente ( $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$  o  $^{125}\text{I}$ ), la cual se incuba con la muestra problema. Tras un lavado del medio, se mide la radioactividad emitida por la muestra con un contador de centelleo, siendo la medida inversamente proporcional



a la concentración de la micotoxina en la muestra problema. La concentración de la micotoxina se determina comparando los resultados con una recta patrón. Cada vez se utiliza menos por varias razones: el laboratorio debe estar autorizado para manipular radioelementos y además los costes de los patrones y de la gestión de los residuos son elevados. Su uso ha sido desplazado por el ELISA.

La técnica de ELISA, o enzimoimmunoensayo, se basa en la reacción específica antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) y puede ser de tipo competitivo directo o indirecto. Es directo cuando se añade al medio un extracto de la muestra y una disolución de la micotoxina unida covalentemente a un enzima (normalmente peroxidasa de rábano). Cuantas más moléculas de micotoxina existan en la muestra a estudiar, menos moléculas de micotoxina conjugadas a peroxidasa se unirán al anticuerpo y el color desarrollado por la acción de la peroxidasa sobre el sustrato que posteriormente se añade será inferior. Este tipo de técnica no se suele utilizar mucho por la dificultad que entraña la conjugación del anticuerpo específico y la enzima.

El ELISA de tipo competitivo indirecto utiliza un segundo anticuerpo dirigido a la región constante del primer anticuerpo. La unión del primer anticuerpo dependerá de la cantidad del antígeno presente en la muestra a estudiar. La principal diferencia con respecto a la directa radica en que el segundo anticuerpo, que se añade en exceso, se unirá tanto más cuanto mayor sea la cantidad que se haya formado del complejo antígeno-1º anticuerpo. Es más económico que el directo porque el producto conjugado se comercializa a un precio razonable y actualmente se encuentra disponible para aflatoxinas, ocratoxina A, T-2, deoxinivalenol, zearalenona y fumonisinas (Scott, 1995).

- Biosensores

El biosensor es un dispositivo compacto de análisis que incorpora un elemento de reconocimiento biológico (un anticuerpo) asociado a un sistema de transducción, que permite procesar la señal producida por la interacción entre el elemento de reconocimiento y la micotoxina. Cuando la micotoxina reacciona con el elemento de reconocimiento se produce la variación de una o varias propiedades físico-químicas (pH, transferencia de electrones, de calor, cambio de potencial, de masa, variación de las propiedades ópticas, etc.) que detecta el transductor. Este sistema transforma la respuesta del elemento de reconocimiento en una señal eléctrica indicativa de la presencia de la micotoxina a estudiar y proporcional a su concentración en la muestra. Los sistemas de transducción más utilizados en el análisis de micotoxinas son de tipo óptico y piezoeléctrico. Los de tipo óptico, se basan en la medición de las variaciones que se producen en las propiedades de la luz como consecuencia de la interacción física o química entre la micotoxina a detectar y el elemento biológico de reconocimiento del biosensor. Los transductores que tienen propiedades ópticas y que son utilizados para el análisis de las micotoxinas son fundamentalmente los sensores de resonancia de plasmones (SPR, Surface Plasmon Resonance) y sensores de onda evanescente (Jönson et al., 1991).



*1.5. Análisis de micotoxinas*

---

❖ **OBJETIVOS** ❖

*Objetivos*

---

## **2. OBJETIVOS**

Las micotoxinas, como contaminantes naturales de alimentos, ven condicionada su presencia por factores ambientales y por el sustrato en el que crecen los hongos productores. Entre los alimentos susceptibles de contaminación por hongos micotoxigénicos se encuentran los alimentos básicos y de gran consumo como son los cereales y derivados, en ellos presentan la particularidad de poder desarrollarse, en condiciones favorables diferentes micotoxinas.

La ingesta de micotoxinas representa un grave problema de salud ya que pueden causar efectos tóxicos agudos y a largo plazo sobre el hombre y animales. Por ello para salvaguardar la salud de los consumidores se han fijado niveles máximos en algunos alimentos, valores que se encuentran en continua revisión. Destacan por su toxicidad las aflatoxinas (AF) y la ocratoxina A (OTA) por ser potencialmente carcinógenas.

La contaminación de alimentos por micotoxinas en concentraciones que superen los niveles máximos establecidos puede acarrear graves consecuencias económicas porque obligan a la paralización de las exportaciones y la destrucción de la partida del alimento contaminado. Por ello se necesitan para su control métodos de análisis rápidos, exactos y reproducibles, pero también económicos y respetuosos con el medio ambiente, debido al elevado número y variabilidad de muestras a analizar.

Por otro lado el conocimiento del grado de contaminación actual de los alimentos, tanto nacionales como de importación, consumidos en nuestro país, permitiría estimar el nivel de ingestión de dichas micotoxinas por parte de la población.

---

## 2. *Objetivos*

Ante estas premisas, el presente trabajo se propone como objetivos:

1. Estudiar distintos métodos de extracción de OTA en diferentes matrices.
2. Analizar AF y OTA por cromatografía líquida con diferentes técnicas de detección.
3. Estudiar los diferentes procesos de confirmación empleados para AF y OTA.
4. Evaluar la presencia de AF y OTA en cereales y derivados, frutas, frutos secos y alimentos para animales, procedentes del mercado español, portugués y marroquí.
5. Estimar la ingesta diaria de AF y OTA en la población española, portuguesa y marroquí por el consumo de los alimentos analizados.
6. Comparar la ingesta diaria estimada de AF y OTA frente a los valores de ingestas diarias tolerables propuestas por organismos oficiales, con objeto de estimar el riesgo que supone la exposición a ambas sustancias.

Para conseguir los objetivos propuestos se llevará a cabo el siguiente plan de trabajo:

1. Estudio de la extracción de OTA
  - Extracción clásica con disolventes orgánicos
  - Extracción líquida presurizada



- Dispersión de la matriz en fase sólida
- Extracción con columnas de inmunoafinidad

**2.** Determinación de AF y OTA por cromatografía líquida con detección de:

- Fluorescencia
- Espectrometría de masas de triple cuadrupolo

**3.** Evaluación de procesos de confirmación para AF y OTA.

- Procesos de metilación para la formación del estermético de la OTA
- Espectrometría de masas

**4.** Análisis de AF y OTA en:

- Cereales y derivados,
- Frutas y frutos secos y
- Alimentos para animales,

procedentes del mercado nacional, portugués y marroquí. Estudio comparativo de la contaminación de AF y OTA frente a los alimentos con los datos disponibles del Joint FAO/WHO Committee of Experts on Food Additives (JECFA).

**5.** Cálculo de la ingesta diaria estimada de AF y OTA en la población española, portuguesa y marroquí a partir de las concentraciones de micotoxinas encontradas en los alimentos analizados y los valores de consumo facilitados por la Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAOSTAT)

**6.** Valoración del riesgo que representa la exposición a AF y OTA comparando las ingestas diarias estimadas con los valores de ingestas diarias tolerables propuestas por organismos oficiales, tales como el Scientific Committee for Food of the European Commission (SCF) y la JECFA.



## *2. Objetivos*

---

❖ **EXPERIMENTAL SECTION** ❖

*Experimental section*

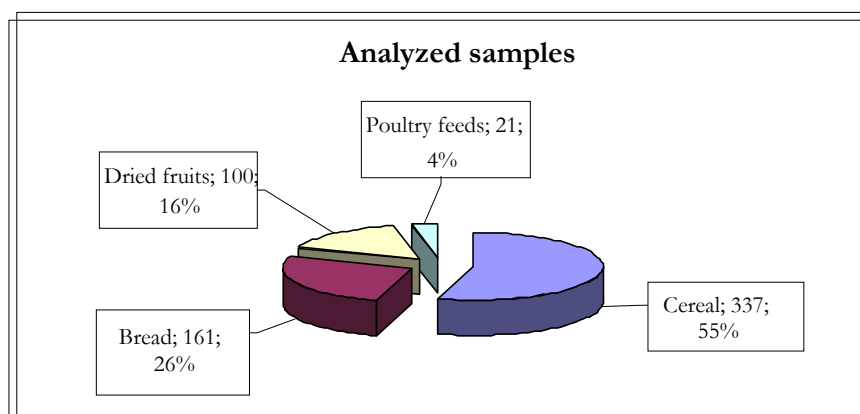
---

### 3. EXPERIMENTAL SECTION

#### 3.1. SAMPLING

A total of six hundred and nineteen samples of cereals, bread, dried fruits and poultry feed were chosen to determinate the presence of OTA or AF. A diagram portion of the analyzed samples is presented in Figure 3.1.

Sampling was done according to the Commission Regulation E.C. No 401/2006. Once samples were collected, they were stored in sealed plastic bags and kept at room temperature in a dark and dry place. The samples were divided with a subsample divider; 200 g of subsample was milled and collected in a plastic bag.



**Figure 3.1.** Number and percentage of analyzed samples.

Samples proceeding from Valencia (Spain) and Coimbra (Portugal) were stored at the same conditions as the commercial purchased samples. The rest of the samples were from Morocco and they were transported in a cooling system (coolbox, 4 °C) to the Laboratory of Food Chemistry and Toxicology of the University of Valencia (Spain) where were analyzed. Samples were milled using a

blender Moulinex. The milled samples were analysed as quickly as possible after the purchase. When it was not possible, they were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ , in a freezer.

### 3.1.1. CEREAL SAMPLES

A total of three hundred and thirty-seven cereal samples were analyzed. The distribution according to the cereal type samples is presented in Figure 3.2. They included two hundred and forty of rice, thirty-six of wheat, thirty-one of maize, twelve of oat, eight of barley, three of spelt, seven of rye. All of them were purchased from shops of Spain, Morocco and Portugal.

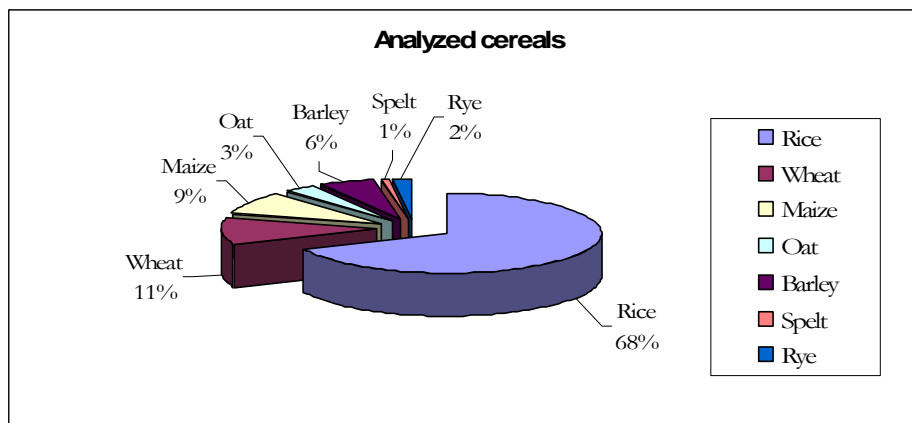


Figure 3.2. Diagram portion of analyzed cereals.

The cereal samples distribution according to the country and city of origin was:

From Portugal (Coimbra) eight wheat, five maize, six oats, three barley, three rye, fifteen rice and one spelt samples were collected from different markets and supermarkets.



---

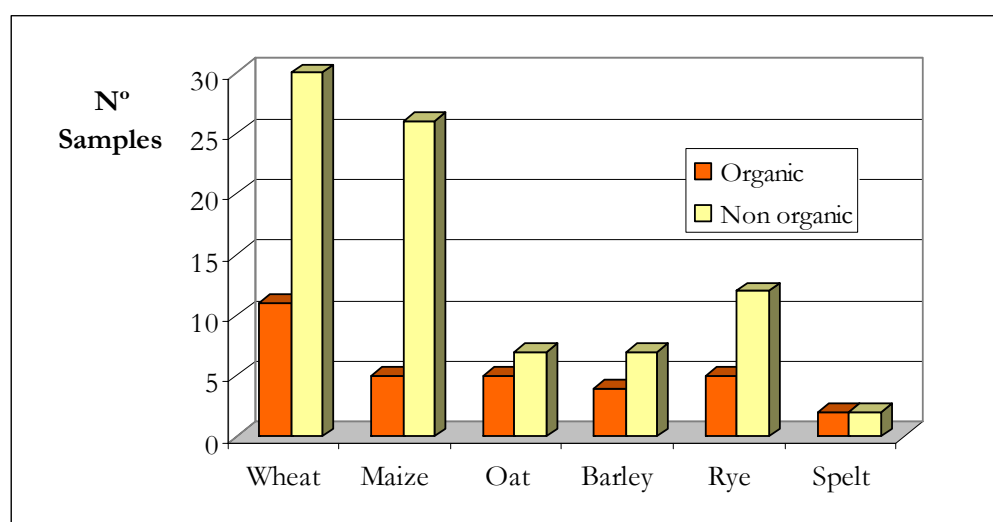
### 3. Experimental section

From Spain (Valencia) ninety-eight rice, twelve wheat, six maize, six oats, five barley, four rye and two spelt samples were collected from different markets and supermarkets.

From Morocco (Rabat and Salé) one hundred and twenty rice samples, sixteen wheat and twenty maize samples were purchased from retail shops, popular markets and local markets.

From other countries (Italy, Holland, UK, Indian and Thailand) a total of eight rice samples were purchased in Spanish supermarkets.

Distribution according to the agriculture cultivation type and grain type samples (organic or non-organic agriculture and wholecereal or not) is presented in Figures 3.3 and 3.4.



**Figure 3.3.** Cereal sample distribution according to the type of agriculture.

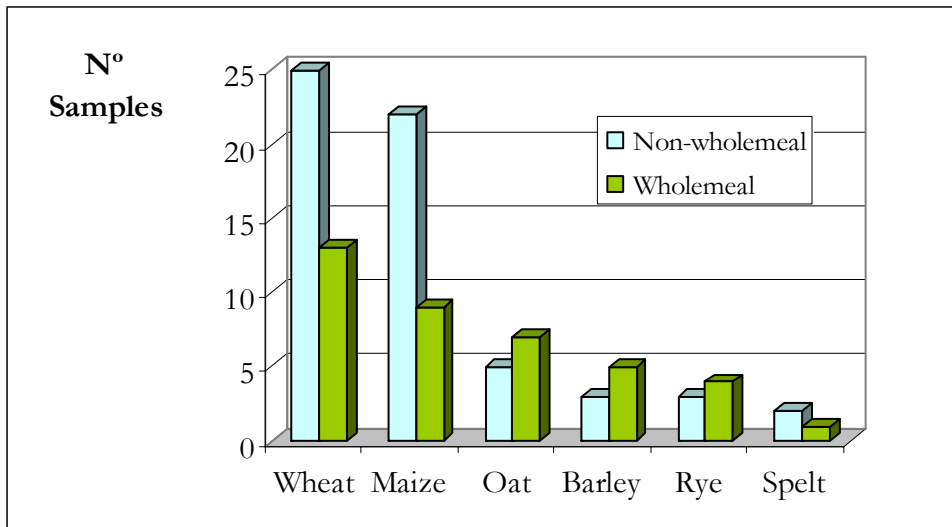


Figure 3.4. Cereal sample distribution according to the type of grain.

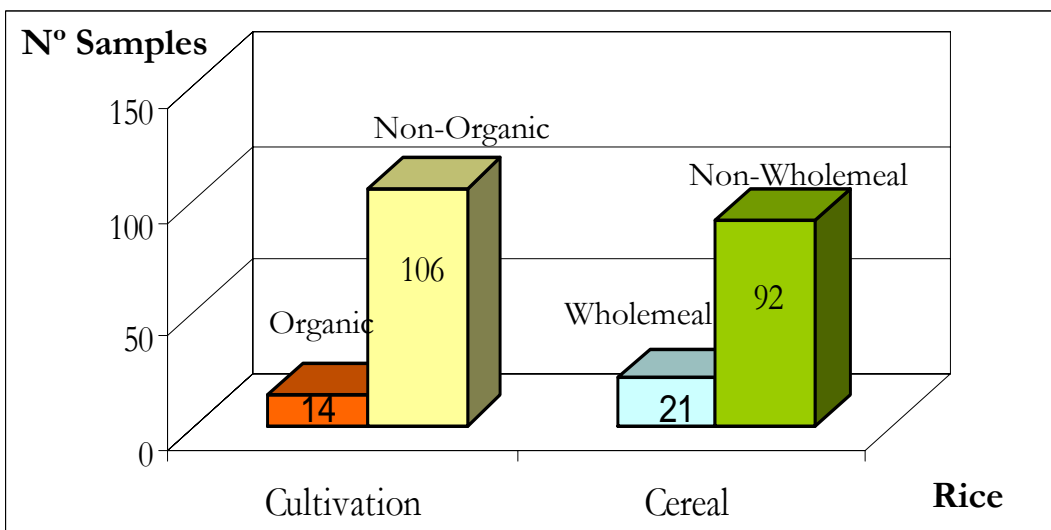


Figure 3.5. Rice sample distribution according to the type of grain and cultivation.

In this study, the major analyzed cereal was rice. This is because it is the most cultivated cereal and it is highly consumed in Valencia Community. The

distribution according to organic or non-organic agriculture and wholemeal or non-wholemeal for rice samples studied, excluding Moroccan samples, is shown in Figure 3.5. The rice samples from Morocco were not classified because this information was impossible to know.

### 3.1.2. BREAD SAMPLES

One hundred and sixty-one bread samples were analyzed. They were collected from Portugal and Morocco. The samples distribution is shown in Figure 3.6.

A total of sixty-one bread samples which include two of the most consumed bread in Portugal were analyzed. They were wheat bread and *broa* bread, the last one is elaborated with maize (*Zea mays*) and wheat (*Triticum durum*) and it is prepared with a high proportion of maize.

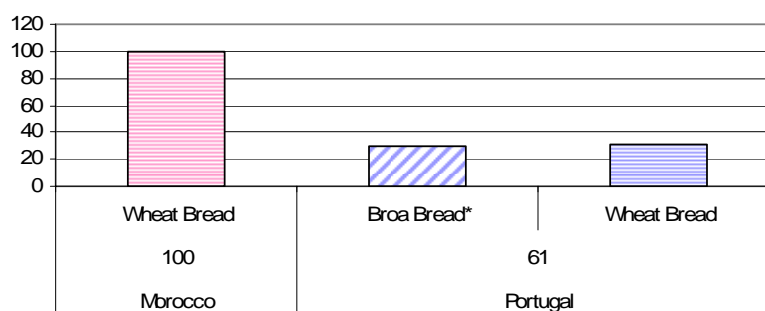


Figure 3.6. Distribution of the bread type samples according to the country of origin.

They were purchased in commercially available bakeries, confectionery's shops and supermarkets located in the city of Coimbra and its countryside, in central zone of Portugal.

The rest of the bread samples (100) were purchased from retail shops and local markets of Rabat and Salé in Morocco.

### 3.1.3. DRIED FRUITS SAMPLES

One hundred samples of dried fruits (20 raisins, 20 nuts, 20 peanuts, 20 dried figs and 20 pistachios) were purchased from retail shops and local markets of Rabat and Salé in Morocco (Figure 3.7).

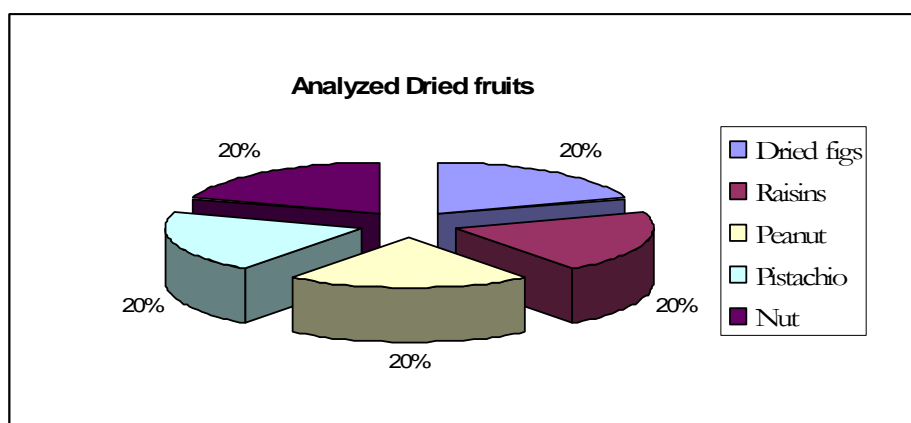


Figure 3.7. Diagram portion of the dried fruit samples.

### 3.1.4. POULTRY FEED SAMPLES

Twenty-one poultry feeds samples were purchased from popular markets in Rabat (Morocco).

## 3.2. MATERIAL

### 3.2.1. CHEMICALS

High performance liquid chromatography (HPLC) grade methanol, toluene, dichloromethane, acetonitrile, ethyl acetate, cyclohexane and acetic acid (37%) were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Formic acid (98-100%) was obtained

from Scharlau (Barcelona, Spain). Deionised water (< 8 MΩ cm resistivity) was obtained using a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA).

Chromatographic solvents and water were degassed for 20 min using a Branson 5200 (Branson Ultrasonic Corp., CT, USA) ultrasonic bath.

Hydrochloride acid, sodium hydroxide, potassium chloride, potassium dihydrogenphosphate, anhydrous disodium hydrogenphosphate, and sodium chloride analytical grade were obtained from Merck.

Boron trifluoride-methanol (14% solution), trifluoroacetic acid (TFA) and tablets of phosphate-buffered saline (PBS) were obtained from Sigma Chemicals Co (St. Louis, MO, USA).

Bulk C8 solid phase (50 μm) and nylon acrodisk (0.45 μm) were from Análisis Vínicos (Tomelloso, Spain).

Filter paper Whatman N° 4 (150 mm Ø, Whatman International Ltd. Maidstone England), cellulose and glass filter for ASE-200 were used.

OTA and AF (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> and AFG<sub>2</sub>) crystalline materials were purchased from Sigma.

Immunoaffinity OchraTest® columns and immunoaffinity AflaTest® columns were obtained from Vicam (Watertown, MA, USA).

### **3.2.1.2. Standard solutions preparation**

#### **▪ Ochratoxin A**

Stock standard solution of OTA was prepared in methanol at 500 μg/ml. Intermediate stock solutions were prepared at 50 and 5 μg/ml, by diluting stock standard solution in methanol. OTA working solutions were prepared by diluting in the same solvent. All prepared solutions were kept in amber glass vial and at -20°C, due to gradual breaking down under UV light from OTA.

▪ Aflatoxins

Stock standard solutions of AF (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> and AFG<sub>2</sub>) with concentrations of 500 µg/ml were prepared in methanol, kept in security conditions at -20 °C, wrapped in amber glass vial due to that AF gradual breaking down under UV light and held for a maximum of 3 months. Working solutions were diluted in acetonitrile and stored at -20 °C.

### 3.2.2. EQUIPMENTS

#### 3.2.2.1. Apparatus

- Moulinex blender 700 W (230-240 V, 50-60 Hz) (Barcelona, Spain)
- Braun MR 5000 M multiquick/minipimer 500 W (220-230V, 50-60Hz, Esplugues del Llobregat, Spain)
- Ultra-Turrax homogenizer Ystral Gmbh Drive X10/25 (230V; 50/60H, Dottingen, Germany)
- Magnetic stirrer (Agimatic-S, Selecta, Barcelona, Spain)
- Retch vortex mixer (Haan, Germany)
- Bath ultrasonic Branson 5200 (Branson Ultrasonic Corp., CT, USA)
- Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA)
- Büchi Rotavapor R-200 (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Suiza)
- Dionex ASE 200 system (Dionex Co., Sunnyville, CA)
- Centrifuge Eppendorf 5810R (Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
- A vacuum manifold of Macherey-Nagel (USA), a pump of Dinko (mod.D-95, 130W, 220V)
- TurboVap LV Evaporator Zymark (Hopkinton, MA, USA)

#### 3.2.2.2. Analytical columns

Liquid chromatography (LC) columns used in LC-FD were Phenomenex Luna C<sub>18</sub> column (5 µm, 150 x 4.6 mm I.D.) with guard column SecurityGuard™ C<sub>18</sub>

(ODS, 4 x 3 mm I.D.) from Scharlau (Barcelona, Spain) and Hichrom C<sub>18</sub> column (5 µm, 250 x 4.6 mm i.d.) with guard column Hichrom Ltd, HI-173, 30 mm, (England).

Two analytical columns were used in LC-MS/MS. One Discovery C<sub>18</sub>-HS (3 µm, 150 x 2.1 mm) and a guard column Discovery C<sub>18</sub>-HS Supelguard (3 µm, 20 x 2.1 mm) from Supelco (Bellforte, PA, USA) and the other was a Sunfire™ column (C<sub>18</sub>, 3.5 µm, 150 x 3.0 mm) and a guard column Sunfire™ (C<sub>18</sub>, 3.5 µm, 20 x 3.0 mm) from Waters (Zellik, Belgium).

#### **3.2.2.3. Liquid chromatography equipment**

Two LC apparatus were used, one SCL-6A equipped with two pumps LC-6A Shimadzu (Kyoto, Japan) and the other one consisted of a pump (Model 307, Gilson Medical Electronics, Villiers-le-Bel, France), both apparatus used a loop of 50 µl from Rheodyne injector model 7125 (Cotati, CA, USA).

#### **3.2.2.4. Fluorescence detector equipment**

Fluorescence detector (FD) Shimadzu RF-10A XL (Kyoto, Japan) and Perkin-Elmer spectrofluorimeter, Model LS45(Perkin-Elmer, Beaconsfield, UK) were used.

#### **3.2.2.5. Liquid chromatography mass spectrometry equipment**

Waters Alliance 2695 XE LC system coupled to a Micromass Quatro micro triple quadrupole MS (Waters, Milford, MA, USA) was used. And a Finnigan Surveyor MS pump and autosample plus system coupled to Finnigan TSQ Quantum Ultra (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA) were used.

### **3.3. DECONTAMINATION**

Decontamination of laboratory ware was done with 1-1.5% of hypochlorite solution, followed by addition of 5% acetone after 30 min according to Castegnaro et al. (1981).

### **3.4. DEVELOPED METHODS**

Detailed procedures used for analyse AF and OTA are summarized in Table 3.1. Procedures for mycotoxin analysis consisted basically on extraction, determination and confirmation procedures. These steps are described bellow.

#### **3.4.1. OCHRATOXIN A ANALYSIS**

OTA was analyzed in rice, wheat, maize, oats, barley, rye, spelt, maize bread, wheat bread, raisin, dried fig, pistachio, peanut and walnut.

##### **3.4.1.1. Extraction procedures**

Four different extraction procedures were used.

##### **▪ Extraction procedure A**

Pressurized liquid extraction (PLE; Dionex trade name ASE for accelerated solvent extraction) was used for OTA extraction in rice. Stainless steel extraction cells were sealed at one end with circular cellulose filters of 1.98 cm diameter (Dionex Co.) when organic solvents were used, and 1.98 cm diameter glass microfiber filters for water and methanol:water:ammonia (70:29:1 v/v) as extraction solvents. Different extraction solvents were tested: methanol, toluene, dichloromethane, acetonitrile, ethyl acetate, water, methanol:water (70:30 v/v), methanol:water:ammonia (32%) (70:29:1 v/v) and methanol:acetic acid (99:1 v/v). At the end of each extraction the total volume was ~ 12 mL.

Finally the optimized ASE conditions were 1000 psi, 40°C, 1 cycle, 5 min static time and 11 mL cells and methanol was chosen as the solvent for ASE of OTA. These conditions were used with five grams of milled rice. Extracts were



concentrated using a Büchi Rotavapor R-200 until a volume of ~ 3 mL was reached and then passed into an assay tube. After it was evaporated to dryness at 55°C with a gentle stream of nitrogen and reconstituted with methanol to a final volume of 0.5 mL. The final solution was degassed for 5 min using a Branson-5200 ultrasonic bath, stored during 2 hours at 4°C and then injected at room temperature on the LC-FD for analysis.

▪ **Extraction procedure B**

Briefly, cereal and cereal product samples (200 g) were prepared using a food processor and mixed thoroughly. An aliquot (2.5 g) of the sample was placed into a mortar (50 ml capacity) and was gently blended with 1.5 g of the solid phase C<sub>8</sub> (50 µm) for 5 min using a pestle, to obtain a homogeneous mixture. This mixture was introduced into a 100 mm x 9 mm i.d. glass chromatographic column with a coarse frit (no. 2) and covered with a plug of silanized glass wool at the top of the column. OTA was eluted with 20 ml methanol–formic acid (99:1, v/v) with a vacuum manifold. The eluate was evaporated to 3 ml with a gentle stream of N<sub>2</sub> at 45 °C, and then, it was filtered through a nylon acrodisk (0.45 µm) and centrifuged at 5000 rpm for 10 min. The extract was filtered through a nylon acrodisk (0.45 µm) and evaporated to dryness with N<sub>2</sub> at 55 °C and reconstituted in 500 µl of the mobile phase for LC-FD analysis. This procedure was used for analysis of OTA in wheat, maize, oats, barley, rye and spelt. It was developed in our laboratory and reported by Blesa et al. (2004a).

▪ **Extraction procedure C**

The method of Stroka et al. (2000) slightly modified was used. Briefly, 10 g of samples of pistachio, peanut and walnut added with 1g of NaCl were blended with 40 ml of methanol-water (80:20) and 20 ml of cyclohexane for 3 minutes. After separation of the two phases, cyclohexane was eliminated. For figs and raisins,

### 3. Experimental section

samples were extracted only with 40 ml of methanol-water (80:20). The extracts were filtrated through a Whatman filter paper No. 4. An aliquot of 10 ml was diluted with 60 ml of PBS buffer (pH 7.4) and the mixture was applied to the immunoaffinity column (IAC OchraTest™) previously conditioned by passing 10 ml of PBS buffer by gentle syringe pressure at a flow rate of 5 ml/min. Following it was washing with 20 ml of LC grade water and then dried with air. OTA was then slowly eluted from the IAC with 2 ml methanol into a glass vial; the eluate was evaporated to dryness with a gentle stream of N<sub>2</sub> at 55 °C and reconstituted in 500 µl of the mobile phase for LC-FD analysis.

**Table 3.1.** Extraction, determination and confirmation procedures used.

Mycotoxin	Sample	Extraction Procedure	Determination Procedure	Confirmation
OTA	Rice	Procedure A	LC-FD	▪ Methylation <sup>1</sup>
	Wheat; Maize Oat; Barley Rye; Spelt	Procedure B		▪ Methylation <sup>1</sup>
	<u>Dried fruits:</u> nut, peanut, pistachio, raisin, dried fig	Procedure C <sub>a</sub>		▪ Methylation <sup>2</sup> ▪ Mass spectrometry
	Bread	Procedure D		
AF	<u>Dried fruits:</u> nut, peanut, pistachio, raisin, dried fig	Procedure C <sub>b</sub>	LC-FD	-
	Wheat Maize Poultry feed	Procedure C <sub>c</sub>		▪ Mass spectrometry

<sup>a</sup> clean-up with IAC OchraTest; <sup>b</sup> clean-up with IAC Aflatest; <sup>c</sup> using 50 g of samples and clean-up with IAC Aflatest; <sup>1</sup> Methylation (Zimmerly & Dick, 1995); <sup>2</sup> Methylation (Pena et al. 2005)

### ▪ Extraction procedure D

An aliquot of sample bread (20 g) was extracted with 100 ml PBS/methanol (50:50, v/v) using the Braun Minipimer homogeniser for 5 min, the mixture was filtered through a Whatman filter paper No 4. After 20 mL aliquot of the filtered was diluted with 30 mL of PBS and then this solution was passed through an IAC column for cleanup using a vacuum manifold. The column was washed with 10 mL of water before eluting OTA with 3 mL of methanol. The methanol was dried at  $\pm 50^{\circ}\text{C}$  under a gentle nitrogen stream, and the residue was reconstituted in 250  $\mu\text{L}$  of mobile phase by mixing and injected in the LC-FD system.

#### 3.4.1.2. Determination procedures

After extraction of wheat, maize, oats, barley, rye, rice and spelt, poultry feed and dried fruits samples, 50  $\mu\text{l}$  were injected in LC-FD. The chromatographic system consisted of a Shimadzu SCL-6A system, an injector of 50  $\mu\text{l}$  loop and a Shimadzu RF-10A XL FD were used. Separation was carried out on a Luna-C<sub>18</sub> column (5  $\mu\text{m}$ , 150  $\times$  4.6 mm I.D) with a SecurityGuard<sup>TM</sup> C<sub>18</sub> (ODS, 4 x 3 mm I.D.). While 50  $\mu\text{l}$  of bread extract was injected in LC-FD apparatus consisted of a pump (Model 307, Gilson), one 50 $\mu\text{L}$  Rheodyne injector (model 7125), aguard column Hichrom Ltd, HI-173, 30 mm, and a column Hichrom C<sub>18</sub> (5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4.6 mm i.d.). The mobile phase in both apparatus consisted of acetonitrile/water/acetic acid (49.5/49.5/1, v/v/v) pumped at a flow rate of 0.8 ml/min. Determination of OTA was performed at 333 and 464 nm as excitation and emission wavelengths, respectively.

#### 3.4.1.3. Confirmation procedures

##### 3.4.1.3.1. Confirmation through methylation process

Two different procedures of confirmation by methylation were used. They were the following:

---

### 3. Experimental section

1.- Identity of OTA was confirmed by methyl ester formation according to Zimmerli and Dick (1995), briefly this technique consists of adding 2.5 ml of methanol and 0.1 ml of concentrated hydrochloric acid to the OTA residue, the vial was closed and kept overnight at room temperature. The reaction mixture was evaporated to dryness and the residue re-dissolved in mobile phase. Then 50  $\mu$ l were analyzed using LC-FD.

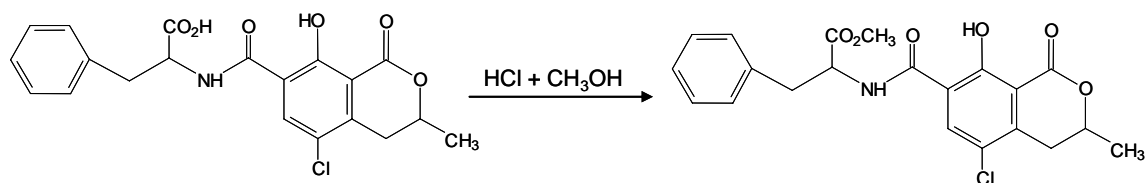


Figure 3.8. Synthesis of OTA methyl ester

2.- In this case the procedure according to Pena et al. (2005) was used, OTA was converted into its methyl ester using boron trifluoride methanolic solution 14%. Sample extracts were evaporated to dryness, 150  $\mu$ L of the BF<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>OH 14% solution was added, and the mixture was left at 60 °C for 10 min. After evaporation, the residue was dissolved in 250  $\mu$ L of mobile phase.

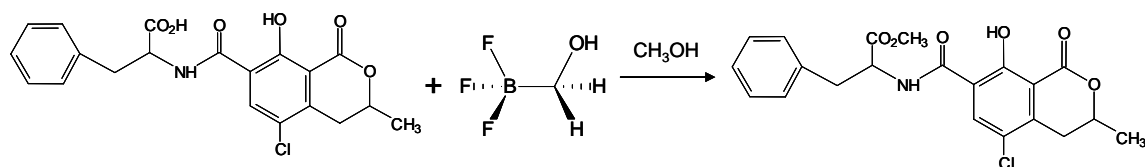


Figure 3.9. Synthesis of OTA methyl ester

#### 3.4.1.3.2. Mass spectrometry confirmation

This method was used to confirm the OTA positive samples. A LC system coupled to a Micromass Quatro micro triple quadrupole MS was used. Analytical

column Discovery C<sub>18</sub>-HS, (3µm, 150x2.1 mm) and guard column Discovery HS-C<sub>18</sub> Supelguard (3µm, 20 x 2.1 mm) were used.

The mobile phase (acetonitrile/water/acetic acid, 34.5:65.0:0.5, v/v/v) was maintained at a flow rate of 0.20 ml/min. Injection volume was 20 µl. The MS was operated in the positive electrospray ionization (ESI+) mode using multiple reactions monitoring (MRM). The OTA precursor ion was  $m/z$  404 and the product ions were at  $m/z$  358 (collision energy 13 eV) and  $m/z$  239 (collision energy 25 eV).

#### 3.4.2. AFLATOXIN ANALYSIS

AF were analyzed from dried fruits, wheat, maize and poultry feeds from Morocco.

##### 3.4.2.1. Extraction procedure

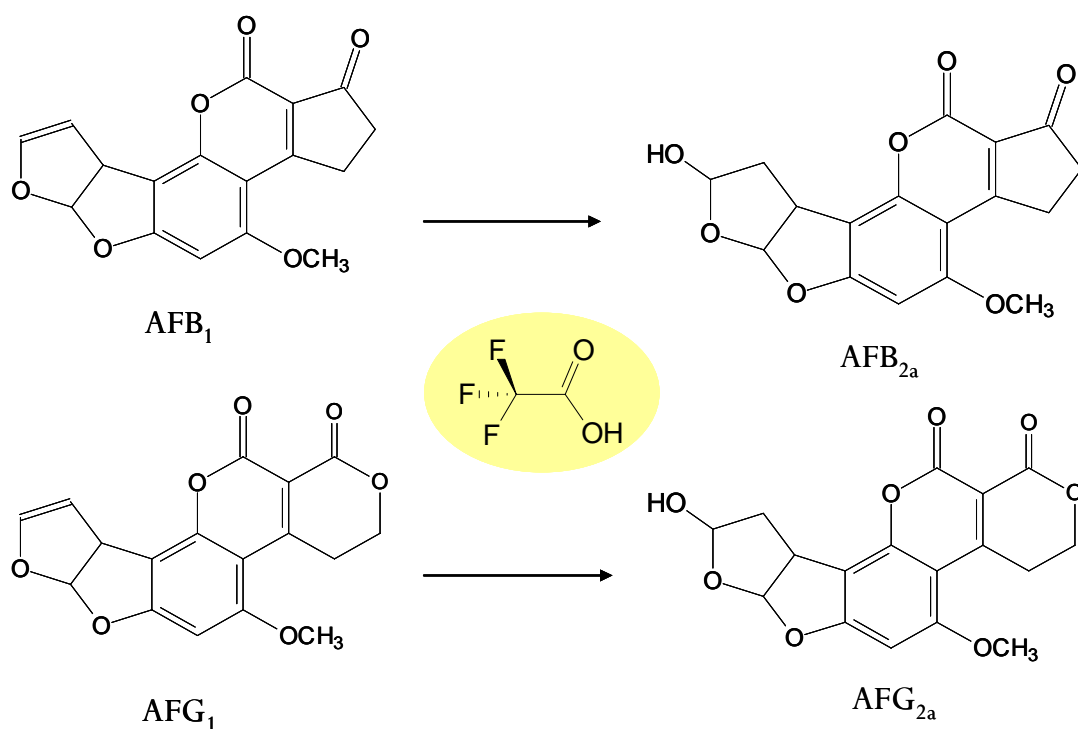
The extraction procedure C, presented before for OTA, slightly modified were used for analyze AF in dried fruits, wheat, maize and poultry feeds (see Table 3.1). Then, 10 g of samples of pistachio, peanut and walnut added to 1g of NaCl were blended with 40 ml of methanol/water (80:20) and 20 ml of cyclohexane for 3 minutes. After separation of the two phases, cyclohexane was eliminated. For figs and raisins samples, AF were extracted using only 40 ml of methanol/water (80:20). For wheat, maize and poultry feeds, the extraction procedure C were used but in these case 50 g of sample was taking and extracted with 250 ml of methanol-water (80:20, v/v) using high speed blending for 3 minutes. Extracts were filtrated on a Whatman filter paper N°4. An aliquot of 10 ml was diluted with 60 ml of PBS buffer (pH 7.4).

For clean-up the extract, an immunoaffinity column (IAC AflaTest®) for AF was conditioned with 10 ml of PBS buffer by gentle syringe pressure at a flow rate of 5 ml/min. Then, the mixture of the filtrate diluted extract (70 ml) was

### 3. Experimental section

applied to the IAC column (1-2 drops per second), followed by a washing with 20 ml of distilled water and then dried with air.

AF were eluted from the IAC slowly with 2 ml methanol into a glass vial; the eluate was evaporated to dryness with a gentle stream of N<sub>2</sub> at 52 °C, redissolved with 100 µl of TFA for 3 min to derivatize AFB<sub>1</sub> and AFG<sub>1</sub>. Re-evaporated to dryness with N<sub>2</sub> at 52 °C, and reconstituted in 500 µl of the mobile phase for LC-FD analysis. TFA was added to AF working standards in the same conditions as the extract samples.



**Figure 3.10.** Fluorescence products obtained after reaction of AFB<sub>1</sub> and AFG<sub>1</sub> with TFA.

#### 3.4.2.2. Determination procedure

Shimadzu SCL-6A system, an injector of 50 µl loop and a Shimadzu RF-10A XL FD were used. A LC column Luna-C<sub>18</sub> column (5 µm, 150 × 4.6 mm I.D) with

a SecurityGuard<sup>TM</sup> C<sub>18</sub> (ODS, 4 x 3 mm I.D.) were used with a mobile phase consisting of a mixture of methanol/water/acetonitrile (17:54:29, v/v/v) at a flow-rate of 0.8 ml/min. AF was reacted with TFA and detection of product was carried out using 365 and 435 nm as wavelengths for excitation and emission, respectively.

#### 3.4.2.3. Confirmation procedure

A Finnigan Surveyor MS pump and autosample plus system coupled to Finnigan TSQ quantum ultra (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA) was used. Analytical column Sunfire<sup>TM</sup> column (C<sub>18</sub>, 3.5 μm, 150 x 3.0 mm) with a guard column Sunfire<sup>TM</sup> (C<sub>18</sub>, 3.5 μm, 20 x 3.0 mm) from Waters (Zellik, Belgium) were used.

The mobile phase (acetonitrile/water (50:50, v/v) solution containing 2 mmol/l ammonium acetate and 0.1% formic acid) was maintained at a flow rate of 0.250 ml/min during infusion. Injection volume was 10 μl. The MS was operated in the positive electrospray ionization (ESI+) mode using multiple reactions monitoring (MRM). The [M+H]<sup>+</sup> ions for AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> and AFG<sub>2</sub> were observed at  $m/z$  313, 315, 328 and 331, respectively. For quantitative analyses, the most abundant fragments of the AF analytes were the following parent-to-fragment transitions:  $m/z$  313 → 285; 315 → 259; 328 → 243 and 331 → 245 for AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> and AFG<sub>2</sub>, respectively.

*3. Experimental section*

---



❖ **RESULTS & DISCUSSION** ❖

*Results & Discussion*

---

## 4. RESULTS AND DISCUSSION

### 4.1. OPTIMIZATION OF METHODS

#### 4.1.1. METHODS USED FOR OCHRATOXIN A ANALYSIS

##### 4.1.1.1. Optimization of Accelerated Solvent Extraction (Ase) for Ota in rice

For this analysis, the extraction procedure A (see Table 3.1), LC determination and methylation confirmation with Zimmerly and Dick's procedure were used (Zimmerly and Dick, 1995).

Achieving maximum efficiency is probably the greatest concern in ASE method development. Due to the fact that several parameters influence the extraction efficiency, a general discussion of these parameters is presented.

#### ▪ Solvent selection

ASE can be performed with almost any solvent or mixtures of solvents (except strong concentrated bases and acids). The selection of a suitable extraction solvent is the first challenge in ASE method development (Dionex 1997). Several solvents and combination of solvents (methanol, methanol:water (70:30), methanol:water:ammonia (70:29:1), methanol:acetic acid (99:1), toluene, water, dichloromethane, ethyl acetate, acetonitrile) were tried out for the extraction of OTA from rice. ASE conditions for these trials were: 1000 psi, 40°C, 1 cycle, 5 min static time and 11 mL cells. It was decided to work with these solvents for three reasons. First some of them are used for the extraction of OTA by several authors obtaining good recoveries (Lau et al. 2000; Pena et al. 2005; Zoellner et al. 2000). Secondary OTA, as an acid ( $pK_a = 4.4$ ), is moderately soluble in organic solvents in acidic medium. Finally, in ASE is possible to use solvents that are not effective in

---

#### 4.1. Optimization of methods

conventional methods because the solubilizing power is increased by high temperature and pressure (Lou et al 1997). Results of this first trial are shown in Table 4.1.

**Table 4.1.** Mean recoveries of OTA obtained after ASE extraction from a spiked rice sample at 1000 psi, 40°C, 1 cycle, 5 min static time, 11 mL cells, 60 second purge time.

Solvent conditions	Mean Recovery $\pm$ SD (%)*
Methanol	77.2 $\pm$ 5.0
Methanol:Water (70:30)	59.1 $\pm$ 6.2
Methanol:Water:Ammonia (70:29:1)	42.5 $\pm$ 5.9
Methanol:Acetic Acid (99:1)	44.2 $\pm$ 5.7
Toluene	59.2 $\pm$ 8.0
Water	16.3 $\pm$ 7.1
Dichloromethane	29.2 $\pm$ 10.3
Ethyl Acetate	16.4 $\pm$ 6.7
Acetonitrile	26.1 $\pm$ 11.2

\* Spiking at 5 ng of OTA/g of rice. Extractions were performed in triplicate.

These results show that under these conditions methanol was the solvent providing the best recoveries of OTA. However, it was decided to perform various experiments with all solvents changing temperature (40, 60 and 80°C) and pressure (500, 1000, 1500, 2000 and 2500 psi), results are included in Table 4.2. According to Gan et al (1999) along with time, these are the most important variables that can affect the extraction efficiency by ASE.

---

#### 4.1. Optimization of methods

After this was done, we selected the conditions under highest recoveries of OTA with every solvent were obtained. For each solvent it was possible to improve

**Table 4.2.** ASE operating conditions providing the best recoveries of OTA from rice for each assayed solvent.

Solvent	ASE <sup>a</sup>		Recovery <sup>b</sup> (%)
	Pressure (psi)	Temperature (°C)	
Methanol	1500	40	95.0
Methanol:Water (70:30)	500	40	70.5
Methanol:Water:Ammonia (70:29:1)	500	40	72.8
Methanol:Acetic Acid (99:1)	1000	60	64.0
Toluene	1500	60	74.8
Water	1500	60	39.3
Dichloromethane	1500	60	51.3
Ethyl Acetate	1000	40	21.1
Acetonitrile	1000	40	34.1

<sup>a</sup> ASE operating conditions: 11 mL cells, 1 cycle, 5 min static time, 60 seconds purge time; <sup>b</sup> Spiking at 5 ng of OTA/g of rice (n=3)

recoveries of OTA by using a pressure and temperature higher than the conditions initially tested (40°C and 1000 psi). Methanol is always the solvent with best recovery values. Therefore it was chosen as the solvent for ASE of OTA from rice

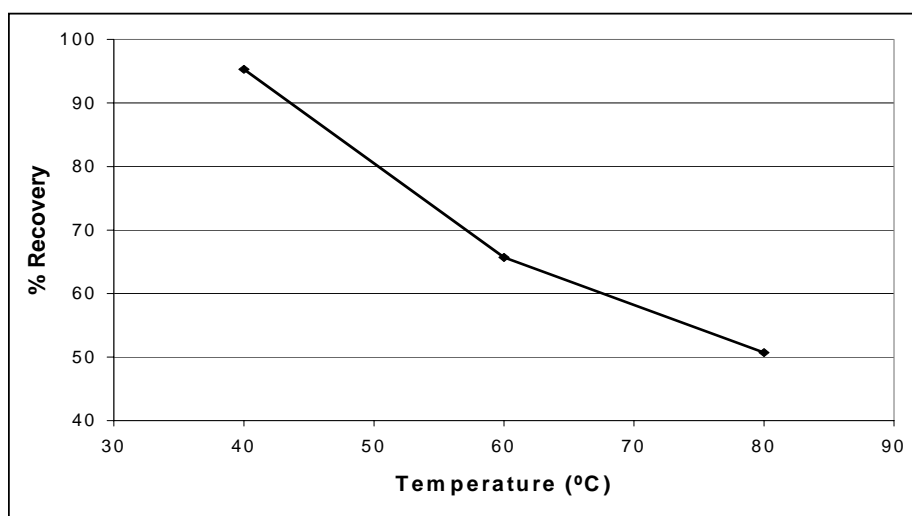
followed by its detection by LC. The use of methanol can be pointed out as a general advantage for extracting because in this way the use of halogenated solvents is avoided, the extraction is facilitated since no mixtures have to be prepared and methanol is a low cost solvent.

▪ Effect of temperature and pressure

The use of high temperatures during the extraction process affects the properties of a solvent. It increases diffusion rates and its capacity to solubilize analytes. Interactions between analytes and matrix components are weakened and there is a decrease in viscosity and surface tension. With the use of high pressure in the extraction process the solvent is kept in a liquid state when working with temperatures at or above the boiling point. It also improves the extraction efficiency by forcing the solvent into areas that would not normally be contacted using atmospheric conditions (Giergielewicz-Mozajska et al. 2001; Richter et al. 1996).

According to the results shown in Figure 4.1., a temperature of 40°C was chosen for ASE of OTA from rice because it gave recoveries over 90%. As temperature was increased above 40°C the extraction efficiency decreased. As it is mentioned before, high temperatures will increase solubility and mass transfer, but selectivity also decreases (Giergielewicz-Mozajska et al. 2001), therefore matrix components are co-extracted. Considering that rice has an elevated content of starch and other components highly soluble in alcohol at high temperatures, it is feasible that under these extracting conditions their solubility in methanol is higher than the solubility of OTA causing saturation of the solvent and a low content of OTA in solution.

ASE of OTA from rice samples with methanol were carried out using different pressures (500, 1000, 1500, 2000 and 2500 psi). The highest recovery of OTA was obtained at 1500 psi. A decrease in ASE recoveries of OTA was observed when pressures above 1500 psi were utilized (2000 and 2500 psi) at 40°C, even when several authors (Giergielewicz-Mozajska et al. 2001; Richter et al.1996; Heemken et al. 1997) have not found a relationship between pressure and recovery. In this case higher pressure along with temperature improves extraction of matrix components more than OTA.



**Figure 4.1.** Recoveries obtained in the optimization of ASE temperatures. Rice spiked at 5 ng of OTA/g. ASE operating conditions: Methanol, 1500 psi, 1 cycle, 5 min static time, 11 mL cell size, 60 seconds purge time.

▪ Effect of cell size and number of cycles

During the optimization of the method, two different cell sizes were tested (11 and 22 mL). For both sizes the same quantity of rice (5 g) and the conditions previously established were used.

---

#### *4.1. Optimization of methods*

There were no differences between recoveries of OTA by using whether 11 mL cell size or 22 mL. However when using with 11 mL cells, less quantity of solvent is used which is in general evaporation time consuming and environmental and economic advantages.

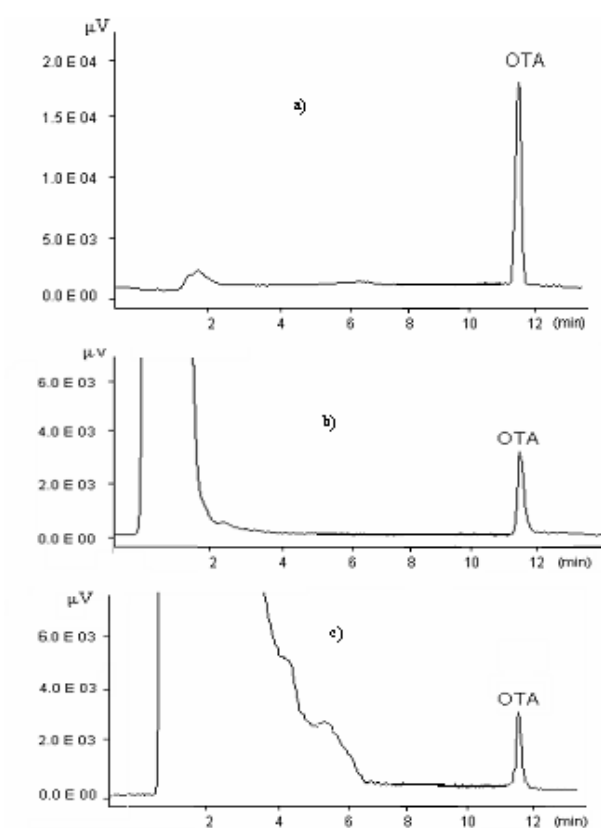
In order to investigate the effects of extraction time on extraction efficiency, time was varied by increasing the number of extraction cycles (1, 2 and 3 cycles). When multiple cycles are used, the application of static time (5 min in this case) and the solvent flush step are repeated. These would improve the penetration of solvent into the sample interstices and the contact of the solvent with the analyte. In this study, we did not observe any enhancement in recoveries of OTA by increasing the time used in extraction thus a five-minute cycle was chosen for the extraction of OTA from rice.

#### ▪ Analytical performance

Mean recovery of fortified rice samples (n=3) at a level of 5 ng/g of OTA was 94.0 % with a standard deviation (SD) of 2.5 % and at 15 ng/g the mean recovery was 90.7 % with a SD of 2.8 %. The values obtained for recovery and standard deviation of the optimized method are in agreement with the Commission Directive 2002/26/EC for methods of analysis of OTA in foodstuffs (E.C.D. 2002a). These results indicate good recovery and reproducibility of the method optimized in the present study. Methodologies like solid-phase extraction and liquid-liquid extraction yield 60-120 % (Wood et al. 1996), considering that the proposed method of ASE of OTA from rice with LC-FD offers also several advantages, e.g. it is an automated procedure that allows performing up to 24 programmed extractions, the quantity of solvents used is lessened and it does not require a large amount of sample. Therefore it is a good alternative that allows



performing analysis with good precision and accuracy. In Figure 4.2. is presented a chromatogram of a positive rice sample analyzed with us optimized method.



**Figure 4.2.** LC-FLD chromatograms. (a) Standard solution with 50 ng/mL of OTA. (b) Rice sample spiked at 5 ng/g of OTA. (c) Positive rice sample containing 4.17 ng/g of OTA.

Several parameters were taken into consideration to establish quality control of the method, such as limit of detection and limit of quantification (LOD and LOQ, respectively), which were calculated applying the  $3\sigma$  and  $10\sigma$  criterion, respectively (Wennrich et al. 2000), and inter and intra day variation. The LOD and LOQ were 0.01 and 0.03 ng/g respectively.

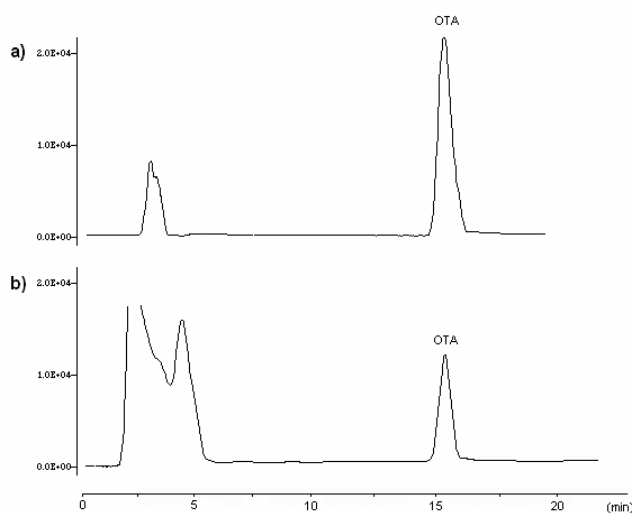
---

#### 4.1. Optimization of methods

The analytical work was conducted on three different days by triplicate to detect any day-to-day effects. Certification exercises on several mycotoxins indicate the possibility that the variation (Inter and Intra-day) values for duplicate recovery experiments do not exceed 15 % (Hald et al. 1993). At a fortification level of 5 ng/g of OTA, an inter-day variation of 5.5 % and an intra-day variation of 4.7 % were obtained. According to these results it can be said that the proposed analytical procedure fulfills both requirements.

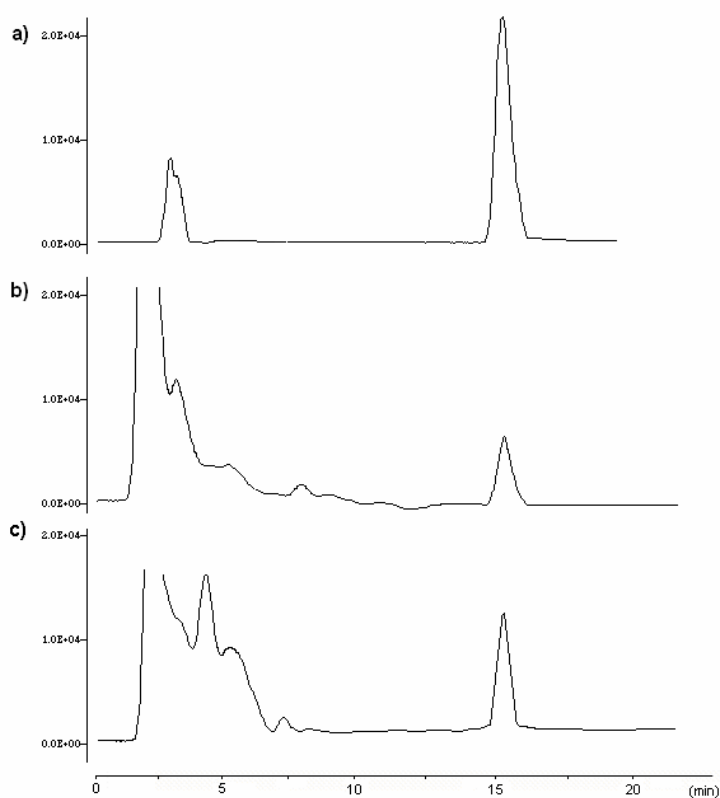
##### 4.1.1.2. Optimization of used method for OTA analysis in wheat, maize, barley, rye, oat, and spelt

For such analysis, the extraction procedure B (see Table 3.1), LC determination procedure and methylation confirmation with Zimmerly and Dick's method were used (Zimmerly and Dick, 1995).



**Figure 4.3.** a) Chromatogram of a standard solution with 50 ng/mL of OTA (Retention Time= 15.8 min); b) chromatogram of a maize sample fortified with 10 ng/g.

OTA recoveries obtained from cereals spiked at 10 ng/g ranged from 78 to 89% with SD of 4.97 to 3.66, respectively (Table 4.3). The LOQ and LOD obtained for each cereal ranged from 0.19 to 0.25 and from 0.05 to 0.03 ng/g, respectively. The results reflected the extraction of OTA using 2.5 g of sample and 1.5 g of C8 solid phase, which gave clean chromatogram profiles (Figure 4.3). The SD obtained was according to the European specification (E.C.D. 2002 A).



**Figure 4.4.** a) Chromatogram of a standard solution with 50 ng/mL of OTA (Retention Time = 15.8 min); b) chromatogram of a positive non-organic wheat containing 0.7 ng/g; c) chromatogram of an extract of organic wheat containing 1 ng/g.

**Table 4.3.** OTA recoveries obtained from cereals spiked at 10 ng/g.

Sample	Mean Recovery * $\pm$ SD (%)
Wheat	83.6 $\pm$ 4.9
Maize	81.1 $\pm$ 3.9
Oat	93.9 $\pm$ 4.5
Barley	87.5 $\pm$ 4.0
Rye	85.7 $\pm$ 3.7
Spelt	84.4 $\pm$ 4.2

The analyzed cereals were from two different agriculture systems, organic and non-organic. In Figure 4.4. is presented two chromatograms of two contaminated wheat samples from organic and non-organic agriculture.

#### 4.1.1.3. Optimization of used method to analyse OTA in bread

In such occasion, the extraction procedure D (see Table 3.1), LC determination procedure and methylation confirmation with Pena et al. (2005) method were used.

The calibration curves were obtained using the linear least squares regression procedure of the peak area versus the concentration. The linearity for OTA, in the working standard solutions at three determinations of five concentration levels, between 1-25 ng/mL, was good as shown by the fact that the determination of the correlation coefficients ( $r^2$ ) are above 0.9990 for six calibration curves, prepared in three different days.

To optimize the extraction OTA from bread, the extraction efficiencies were studied in order to achieve good analytical performance. Firstly, OTA was extracted using the method of Pena et al. [2005], previously used for rice samples. However, some modifications were needed. Three different volumes of

---

#### 4.1. Optimization of methods

PBS:methanol (50:50) were assayed as extracting solvent, using Minipimer apparatus: 50, 75 and 100 mL by using 20 g of maize bread fortified with OTA at 0.5 ng/g. The best recoveries were obtained with 100 mL of PBS:methanol (50:50) (Table 4.4). The extracting solvent was proved in different proportions and recoveries obtained with PBS:methanol (80:20) were slightly lower, 102% vs. 99.6% (Table 4.5). This phenomenon may be due to the solubility power of methanol (Pena et al, 2005; Scudamore K. et al. 1997). Higher percentage of methanol were not studied because OTA was able to could be elute from IAC columns (Pena A. et al, 2005), since methanol is one of the most potent desorbents (Zhou S. et al. 2004).

**Table 4.4.** Mean recoveries and RSDs obtained (n=3) with different volumes of PBS/methanol (50:50) as extracting solvent using Minipimer apparatus.

Volum PBS:methanol (mL)	Fortification level (ng/g)	Recovery (%)	RSD (%)
100 (50:50)	0.5	102.0	4.7
75 (50:50)	0.5	65.0	17.8
50 (50:50)	0.5	51.0	6.0

**Table 4.5.** Mean recoveries and RSDs obtained (n=3) with different proportion of PBS/methanol as extracting solvent.

Volum PBS:methanol (ml)	Fortification level (ng/g)	Recovery (%)	RSD (%)
100 (50:50)	0.5	102.0	4.7
100 (80:20)	0.5	99.6	0.7

---

#### 4.1. Optimization of methods

Due to the characteristics of the sample, a more efficient process to separate the matrix residue from the solvent extract was essential. So, firstly filter paper Whatman N°4 and secondly centrifugation at 3400 g for 15 minutes, were evaluated, and it was observed that with the second approach the recovery was 30%.

During the optimization of the method, different extraction procedures were assayed such as manual agitation, minipimer, Ultra-Turrax, centrifugation and agitation plate. With these apparatus the recovery results oscillated between 22 and 53% (Table 4.6), which were overcome by Minipimer apparatus.

**Table 4.6.** Mean recoveries and RSDs obtained between different agitation techniques using 100 mL PBS:MeOH (50:50) and OTA fortification level at 0.25 ng/g.

Agitation	Recovery (%)	RSD (%)
Manual	50	6.0
Ultra-Turrax	53	3.2
Centrifugation	30	5.8
Agitation plate	22	5.0
Minipimer	102	4.7

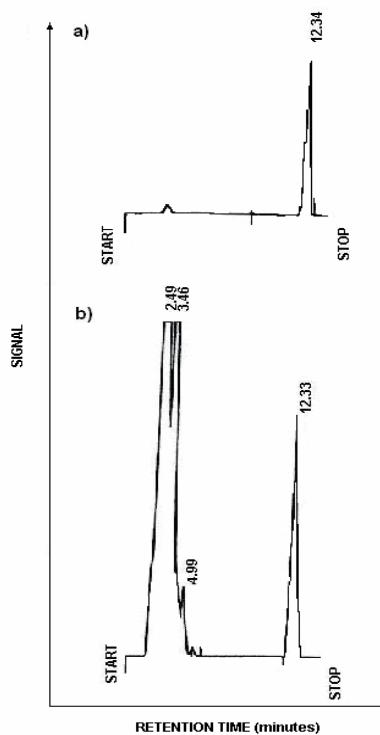
The accuracy for the optimized methodology was determined by calculating the mean recovery values used for each fortification level (Table 4.7).

The recovery values were 102.0 and 87.0% for fortification levels at 0.5 and 2.0 ng/g, respectively. The precision was calculated through intraday repeatability (n=3) and interday repeatability (3 days). The intraday repeatability was 4.7 and

1.4% for 0.5 and 2.0 ng/g fortification levels, respectively. The interday repeatability was 11.4 and 9.3% for the same fortification levels.

**Table 4.7.** Accuracy and intra-assay validation results and inter-assay obtained with the optimized method.

Fortification (ng/g)	Recovery within-day (%)	RSD within- day (%)	Recovery between-day (%)	RSD between-day(%)
0.5	102.0	4.7	98.0	11.4
2.0	87.0	1.4	79.0	9.3



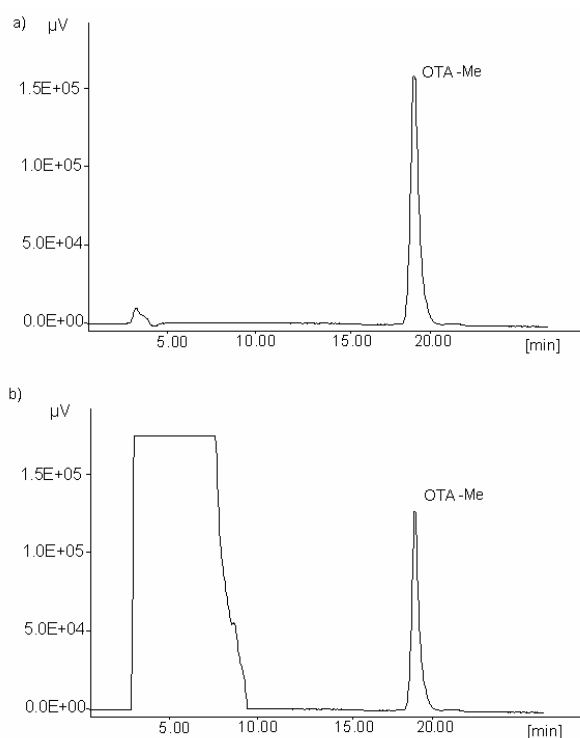
**Figure 4.5.** a) Chromatogram of standard solution with 5 ng/mL of OTA; b) chromatogram of an extract of *Broa* bread sample containing 2.65 ng/g of OTA.

---

#### 4.1. Optimization of methods

To estimate the limits of LOD and LOQ, bread samples spiked at 2 ng/g were extracted and analyzed using the optimized procedure, the LOD and LOQ values were calculated by applying the  $3\sigma$  and  $10\sigma$  criterion, respectively. LOD and LOQ for the optimized method were 0.015 and 0.03 ng/g, respectively. Our obtained LOQ value was lower than the obtained by González et al. (2006b) which was 0.06 ng/g. They used pressurised liquid extraction (PLE) with methanol but did not use OTA IAC for the analysis of OTA in bread.

The chromatograms obtained using this method were clear and none interferences in analytical peaks (see Figure 4.5)



**Figure 4.6.** Chromatograms of standard solution of methylated OTA (a) and positive sample confirmed by methylation (b).



All positive results were confirmed by two procedures, first by OTA methyl ester formation (Figure 4.6) and secondly by LC/MS-MS (Figure 4.8).

The best conditions for analysis of OTA by LC-MS-MS were assessed; each part of the analytical setup was optimized off-line first. After the whole system was set up, the mutual influence of each parameter was evaluated and reoptimized. It was used the positive ion mode, because a comparison study by Lau et al. (2000), concluded that the ESI interface showed much higher sensitivity than the APCI.

For OTA ( $m/z$  404), the cone voltage and capillary voltage were 30 V and 3.0 kV. Source and desolvation temperatures were set at 120 and 300°C, respectively.

The scan range was  $m/z$  150–480 in the MS/MS mode, at a scan rate of 1.5 s per scan. Under ESI + conditions, OTA was transformed into protonated molecules, an abundant protonated molecule  $[M+H]^+$  was observed at  $m/z$  404 accompanied by  $[M-HCOOH+H]^+$  at  $m/z$  358 and  $[M\text{-phenylalanine}+H]^+$  at  $m/z$  239.

OTA precursor ion was  $m/z$  404. The fragment ions resulting from loss of formic acid at  $m/z$  358 and loss of phenylalanine at  $m/z$  239 were observed. The cone voltage and collision energy for each transition were programmed as described in Table 4.8 through the MassLynx acquisition software. For SIM, ions monitored for OTA were  $m/z$  404, 358 and 239, each for a dwell time of 0.2 s with the cone voltage set at 30 and 35 V, respectively. For our quantitative analyses, the two most abundant fragments from the  $[M+H]^+$  ions of the analyte OTA were monitored in the MRM, which were the following parent-to-fragment transitions:  $m/z$  404  $\rightarrow$  358 and 404  $\rightarrow$  239 for OTA (Figure 4.7). The collision energy for product ions  $m/z$  239 and 358 were 25 eV and 13 eV, respectively. The LOD and LOQ were 0.03 and

#### 4.1. Optimization of methods

0.09 ng/g, respectively. These values were calculated by applying the  $3\sigma$  and  $10\sigma$  criterion, respectively.

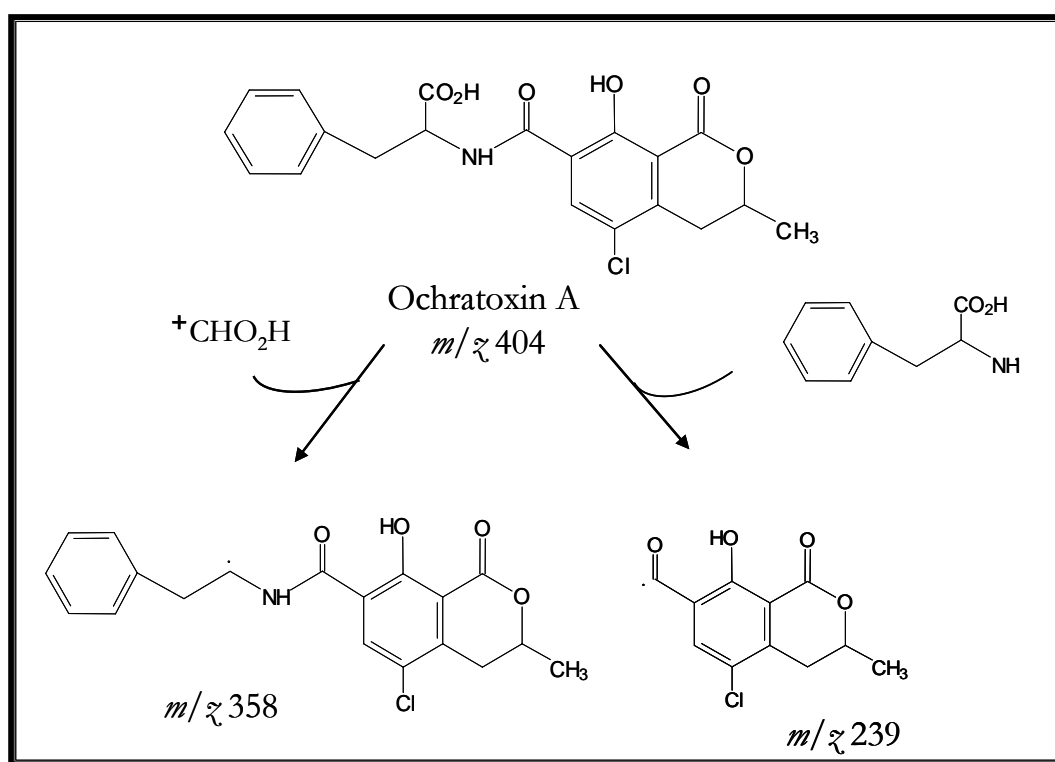
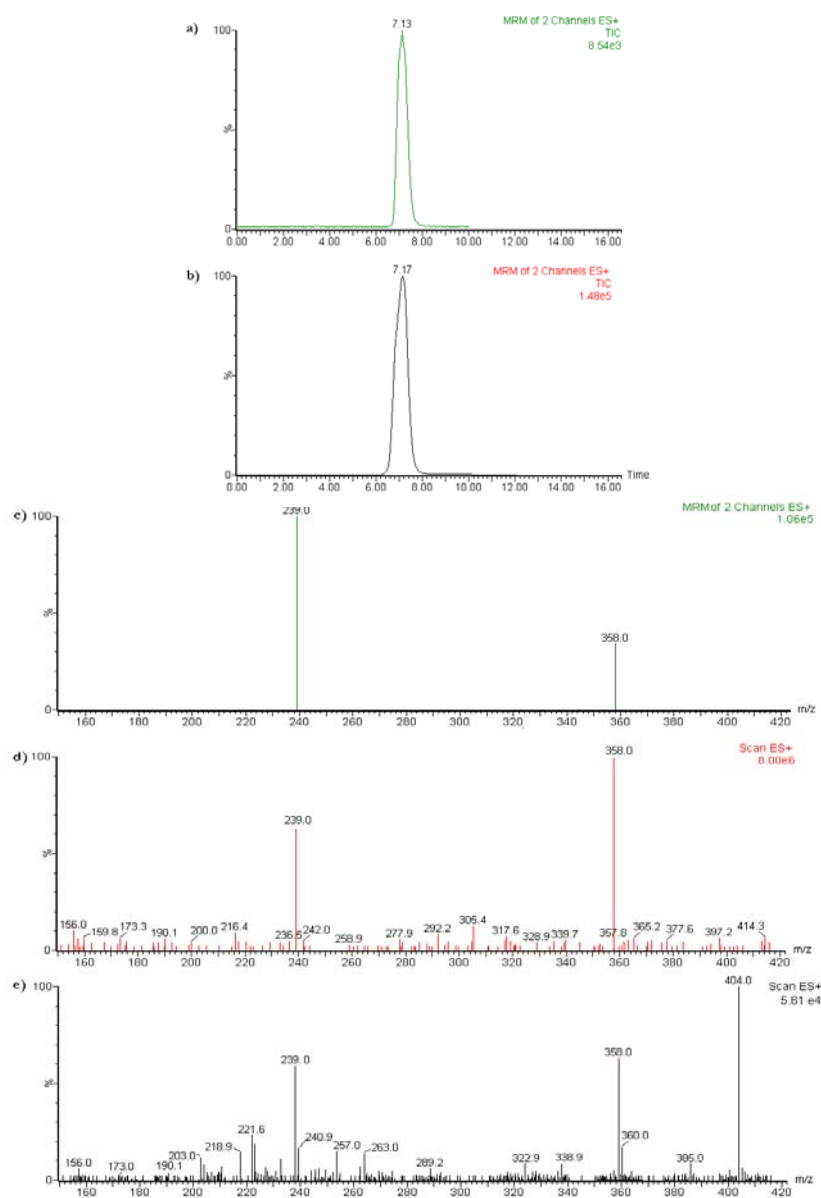


Figure 4.7. Fragmentation of Ochratoxin A.

Table 4.8. Cone voltage and collision energy used for each transition.

Transition ( $m/z$ )	Identity of fragment ion	Cone voltage (V)	Collision energy (V)
404 $\rightarrow$ 358	$[M - HCOOH + H]^+$	30	13
404 $\rightarrow$ 239	$[M - C_9H_{11}O_2N + H]^+$	35	25

Figure 4.8 shows the chromatograms and spectrum obtained by the optimized LC-MS-MS.



**Figure 4.8.** LC/ESI-MS-MS chromatograms and spectra of OTA: a) chromatogram of mixture bread sample containing 2.65 ng/g of OTA; b) chromatogram of standard solution with 50 ng/mL of OTA; c) production spectra of OTA obtained by MRM of the precursor ion  $m/z$  404; d) Products ion spectra of OTA by SCAN of the precursor ion  $m/z$  404; e) positive electrospray mass spectra of OTA by SCAN.

---

#### 4.1. Optimization of methods

Several authors reported the use of LC-MS-MS to determinate OTA, from wine and coffee (Zoellner et al. 2000; Sforza et al. 2006). This study was the first to determinate and confirmate OTA in bread by LC/ESI-MS-MS.

The confirmed LC-MS/MS results were agreed with those obtained by methylation confirmation.

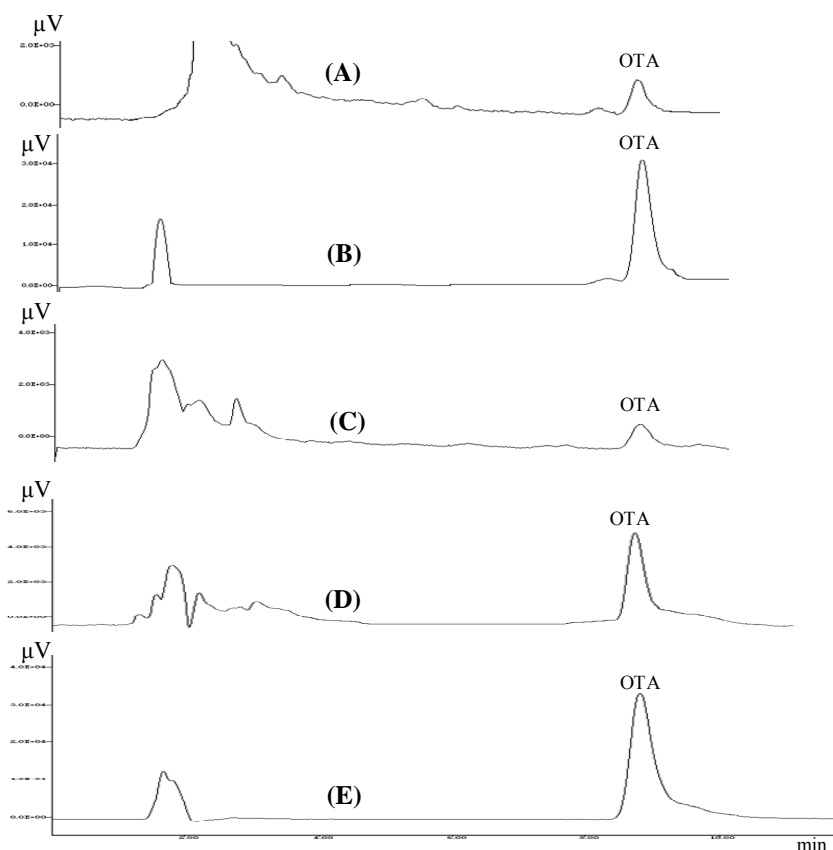
##### 4.1.1.4. Optimization of used method for OTA in dried fruits analysis

In this analysis, the extraction procedure C (see Table 3.1), LC determination procedure and methylation confirmation with Zimmerly and Dick's method were used (Zimmerly and Dick, 1995).

Recoveries for OTA from dried fruits samples spiked at a level of a 2.5 ng/g are shown in Table 4.9. The dried fruits LOQ and LOD were ranged 0.22-0.30 and 0.07-0.11 ng/g, respectively. Results of the study reflected that the analysis gave clean chromatograms (Figure 4.9) and recoveries were considered as valid for analyzing residues of OTA in dried fruits according with European specification (E.C.D., 2002 b).

**Table 4.9.** OTA mean recovery and SD obtained from samples spiked at 2.5 ng/g \* (n=3).

Sample	Mean Recovery* $\pm$ SD (%)
Peanut	93.6 $\pm$ 1.3
Pistachio	86.8 $\pm$ 2.3
Dried figs	82.4 $\pm$ 0.2
Dried raisins	75.5 $\pm$ 0.8
Walnut	72.1 $\pm$ 1.7



**Figure 4.9.** LC fluorescence chromatograms of (A): positive sample of nut; (B) positive sample of raisins; (C) positive sample of figs; (D): positive sample of peanut; and (E): Standard solution of OTA at 0.05 ng/mL.

#### 4.1.2. METHODS USED FOR AFLATOXINS ANALYSIS

##### 4.1.2.1. Optimization of used method for AF in dried fruits analysis

The extraction procedure was optimized to facilitate the complete removal of the AF. Performance of the employed analytical method was satisfactory. The IAC cleanup method results were in agreement with those obtained by Hu et al. (2006) which compare the IAC with matrix solid phase dispersion (MSPD) like cleanup method. Recovery studies were carried out by spiking uncontaminated

---

#### 4.1. Optimization of methods

samples with AF standard solution. Three replicated dried fruits samples were fortified on four concentration levels (0.5, 2.5, 5 and 25 µg/kg dried fruit) with AFB<sub>1</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub> and AFG<sub>2</sub>. The fortified samples were extracted and analyzed using the entire procedure. Analysis gave clean chromatograms (figure 4.10) and recoveries were considered as valid for analyzing residues of AF in foods according to the European legislation (E.C.D., 2002 b) being the recoveries at 2.5-5 µg/kg level for the four AF up to 80.5 % (Table 4.10).

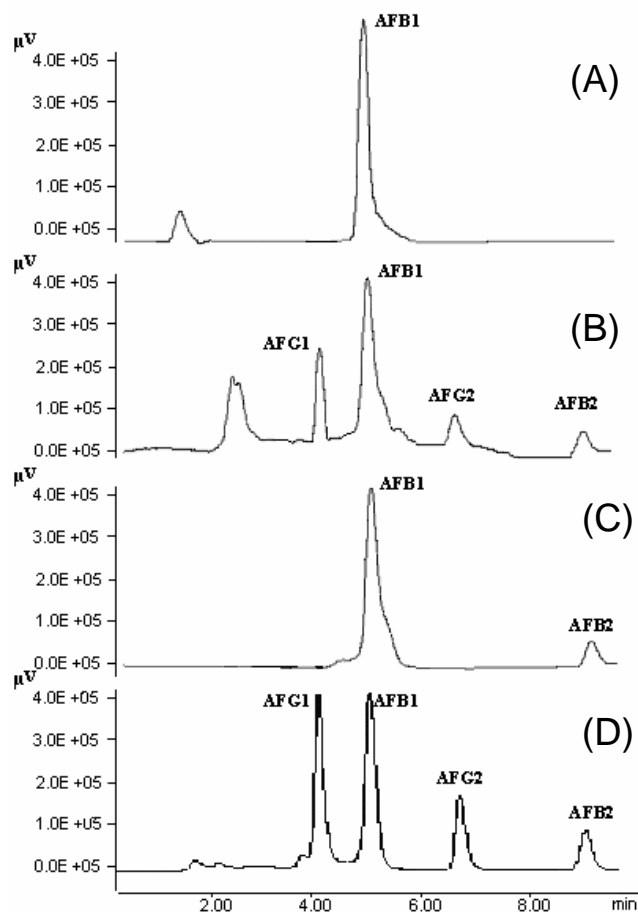
**Table 4.10.** Recoveries for AF in different analyzed matrixes

Dried fruits	Mean recovery* ± SD (%)			
	AFB <sub>1</sub>	AFG <sub>1</sub>	AFB <sub>2</sub>	AFG <sub>2</sub>
Peanut	83.6 ± 2.5	87.3 ± 2.1	88.5 ± 2.5	89.5 ± 1.8
Pistachio	87.5 ± 4.3	80.5 ± 3.2	85.7 ± 1.6	88.5 ± 5.3
Walnut	85.7 ± 2.1	88.3 ± 3.5	89.6 ± 1.9	87.5 ± 4.1
Dried figs	87.4 ± 1.8	89.2 ± 4.5	92.5 ± 3.7	90.8 ± 1.6
Dried raisins	91.5 ± 3.7	91.6 ± 5.2	90.2 ± 4.5	91.7 ± 2.7

\* n=3

The LOD and the LOQ were estimated using the signal-to-noise ratio as S/N=3 and S/N=10, respectively, for dried fruits samples containing 5 µg/kg AFB<sub>1</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub> and AFG<sub>2</sub>.

The LOQ were 0.02 µg/kg for AFB<sub>1</sub> and AFG<sub>1</sub> and 0.05 µg/kg for AFB<sub>2</sub> and AFG<sub>2</sub>. The LOD were 0.006 µg/kg for AFB<sub>1</sub> and AFG<sub>1</sub> and 0.015 µg/kg for AFB<sub>2</sub> and AFG<sub>2</sub>.



**Figure 4.10.** LC fluorescence chromatograms of: (A) positive sample of dried raisins containing 20 ng/mL; (B) positive sample of walnut containing 13.2, 1.5, 7.2 and 2.1 ng/mL of AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> and AFG<sub>2</sub>, respectively; (C) positive sample of pistachio containing 14.3 ng/mL; (D) AF standards solution of 15 ng/mL of AFB<sub>1</sub> and AFG<sub>1</sub>, and 7.5 ng/mL of AFB<sub>2</sub> and AFG<sub>2</sub>.

#### 4.1.2.2. Optimization of used methods for AF in cereal and poultry feed analysis

Performance of the analytical method used for AF analysis was considered as valid for analyzing residues of AF in foods according to the Commission

---

#### 4.1. Optimization of methods

Directive 02/27/CE (E.C.D., 2002 b) being the recoveries at 2.5 ng/g level for AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub> and AFG<sub>1</sub> and 5 ng/g level for AFG<sub>2</sub> up to 85 %. Table 4.11 shows the mean recoveries obtained at 2.5 ng/g of fortification.

**Table 4.11.** Mean recoveries of AF obtained after fortifying by triplicate to 2.5 ng/g in each type of samples.

SAMPLE	Mean recovery* $\pm$ SD (%)			
	AFB <sub>1</sub>	AFB <sub>2</sub>	AFG <sub>1</sub>	AFG <sub>2</sub>
Wheat	85.7 $\pm$ 2.1	88.6 $\pm$ 3.5	89.6 $\pm$ 1.9	87.5 $\pm$ 4.1
Maize	87.4 $\pm$ 1.8	87.3 $\pm$ 2.5	92.5 $\pm$ 3.7	93.8 $\pm$ 1.6
Poultry feed	91.5 $\pm$ 2.7	97.4 $\pm$ 5.2	90.2 $\pm$ 4.5	91.7 $\pm$ 2.7

\* n=3

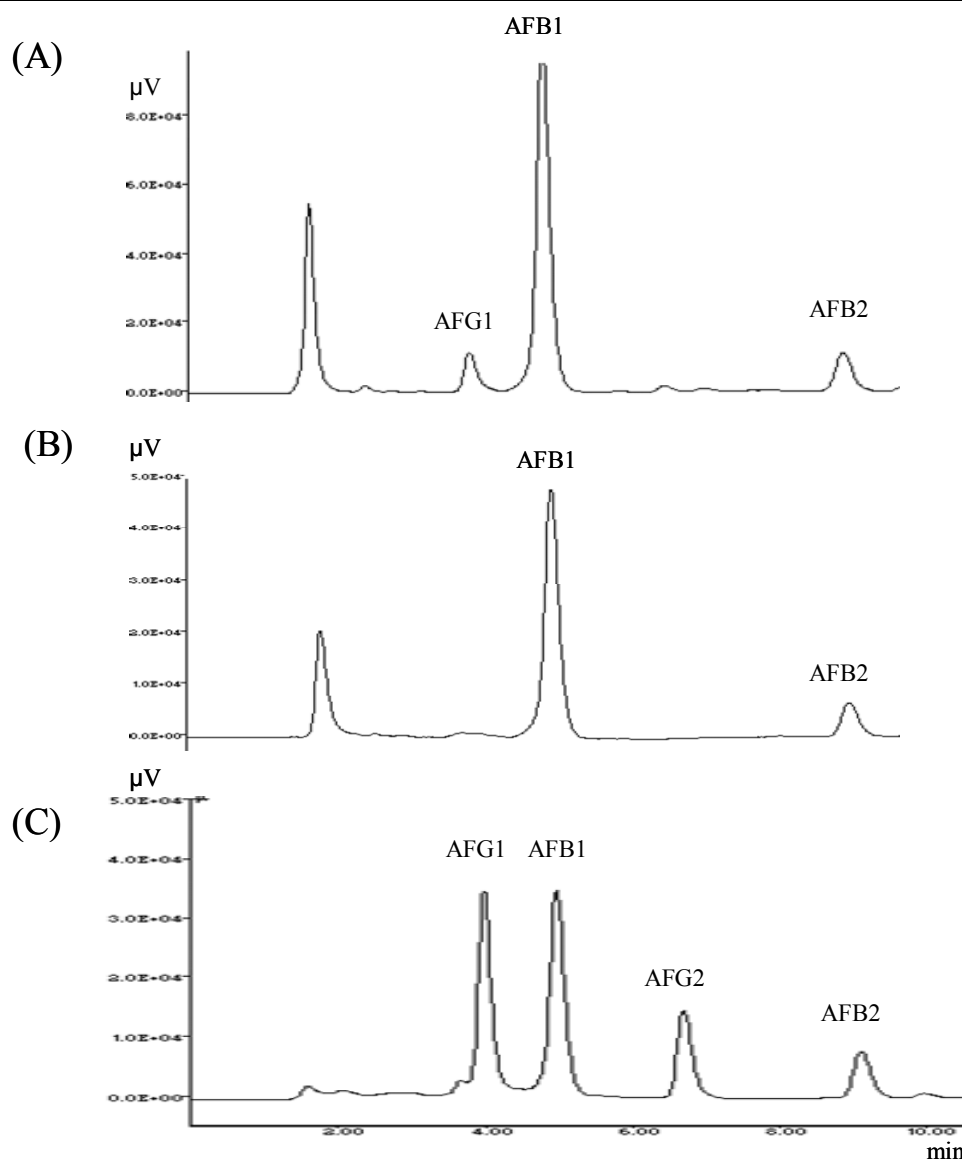
The LOD and the LOQ were estimated using the signal-to-noise ratio as S/N=3 and S/N=10, respectively, for each type of samples containing 2.5 ng/g of AFB<sub>1</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub> and AFG<sub>2</sub>.

The LODs were 0.002 ng/g, for AFB<sub>1</sub> and AFG<sub>1</sub>, and 0.004 ng/g, for AFB<sub>2</sub> and AFG<sub>2</sub>, respectively. The LOQs of AFB<sub>1</sub> and AFG<sub>1</sub> were 0.01 ng/g and the LOQs of AFB<sub>2</sub> and AFG<sub>2</sub> were 0.02 ng/g.

Figure 4.11 shows chromatographic profile of some contaminated samples of AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> and AFG<sub>2</sub>.

All positive results were confirmed by LC/MS-MS. The best conditions for analysis of AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> and AFG<sub>2</sub> by LC-MS-MS were assessed; each part of the analytical setup was optimized off-line first.





**Figure 4.11.** LC fluorescence chromatograms of (A): positive sample of maize containing 11.2 ng/g of AFB<sub>1</sub>, 1 ng/g of AFB<sub>2</sub> and 0.5 ng/g of AFG<sub>1</sub>; (B) positive sample of poultry feed containing 5.3 ng/g of AFB<sub>1</sub> and 0.6 ng/g AFB<sub>2</sub>; and (C) AF standard solution with 15 ng/mL AFB<sub>1</sub> and AFG<sub>1</sub>, and 7.5 ng/mL AFB<sub>2</sub> and 5.5 ng/mL AFG<sub>2</sub>.

#### 4.1. Optimization of methods

After the whole system was set up, in order to optimize the tuning parameters for each aflatoxin, 0.1 µg/ml standard solutions in acetonitrile/water (50:50, v/v) solution containing 2 mmol/l ammonium acetate and 0.1% formic acid were infused at 10 µl/min. It was used the positive ion mode, concluded that the ESI interface showed much higher sensitivity. The source parameters were optimized until a stable spray is obtained. Finally the spray voltage was set at 3500 V, the sheath gas flow was 45 arbitrary unit, auxiliary gas flow was set 30 arbitrary unit and capillary temperature was 300°C. The conditions used for optimized MS/MS parameters were source CID at 20, collision pressure was 1.5, and quad bias 2.7. Nitrogen was used both as turbo gas and collision gas.

**Table 4.12.** MS/MS conditions and precursor and product ions pair for aflatoxin analysis.

Mycotoxin	Transition (m/z)	Identity of fragment ion	Tube lens offset (V)	Collision energy (V)
AFB <sub>1</sub>	313 → 285	[M-CO+H] <sup>+</sup>	111	28
	313 → 241	[M-C <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup>		37
AFB <sub>2</sub>	315 → 287	[M-CO+H] <sup>+</sup>	126	27
	315 → 259	[M-C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O+H] <sup>+</sup>		30
AFG <sub>1</sub>	328 → 283	[M-CH <sub>3</sub> O <sub>2</sub> +H] <sup>+</sup>	122	20
	328 → 243	[M-C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> +H] <sup>+</sup>		25
AFG <sub>2</sub>	331 → 245	[M-C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub> +H] <sup>+</sup>	122	36
	331 → 189	[M-C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub> +H] <sup>+</sup>		44

---

#### 4.1. Optimization of methods

The scan range was  $m/z$  150–380 in the MS/MS mode, at a scan rate of 1.5s per scan. Under ESI+ conditions AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> and AFG<sub>2</sub> were transformed into protonated molecules, an abundant protonated molecule [M+H]<sup>+</sup> for AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> and AFG<sub>2</sub> were observed at  $m/z$  313, 315, 328 and 331, respectively. The [M+H]<sup>+</sup> ions were selected by the first quadrupole and fragmented in the collision cell operating. Afterwards, product ion scans (MS/MS spectra of the selected precursor ion were carried out over the range  $m/z$  50-350 in 2.0s by several collision energy and tube lens offset. From the MS/MS full scan product ion spectra, two suitable transitions were selected for acquisition in MRM mode and optimization of the corresponding collision energies and tube lens (Table 4.12).

For quantitative analyses, the most abundant fragments from the [M+H]<sup>+</sup> ions of the AF analytes were monitored in the MRM, which were the following parent-to-fragment transitions:  $m/z$  313 → 285; 315 → 259; 328 → 243 and 331 → 245 for AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> and AFG<sub>2</sub>, respectively (Figure 4.12).

A gradient elution at a flow rate of 0.25 ml/min with acetonitrile and water, both containing 2 mmol/L ammonium acetate and 0.1% formic acid, was used. Gradient elution started at 11% acetonitrile maintained for 2 min., afterwards, the acetonitrile was raised to 89% within 10 min. These conditions were maintained for 3 min. Then, within 4 min, the concentration of acetonitrile was brought back to 11%. This was maintained for 6 min. With that gradient four reasonably resolved peaks at retention times between 11 and 12 min were obtained (Figure 4.13).

4.1. Optimization of methods

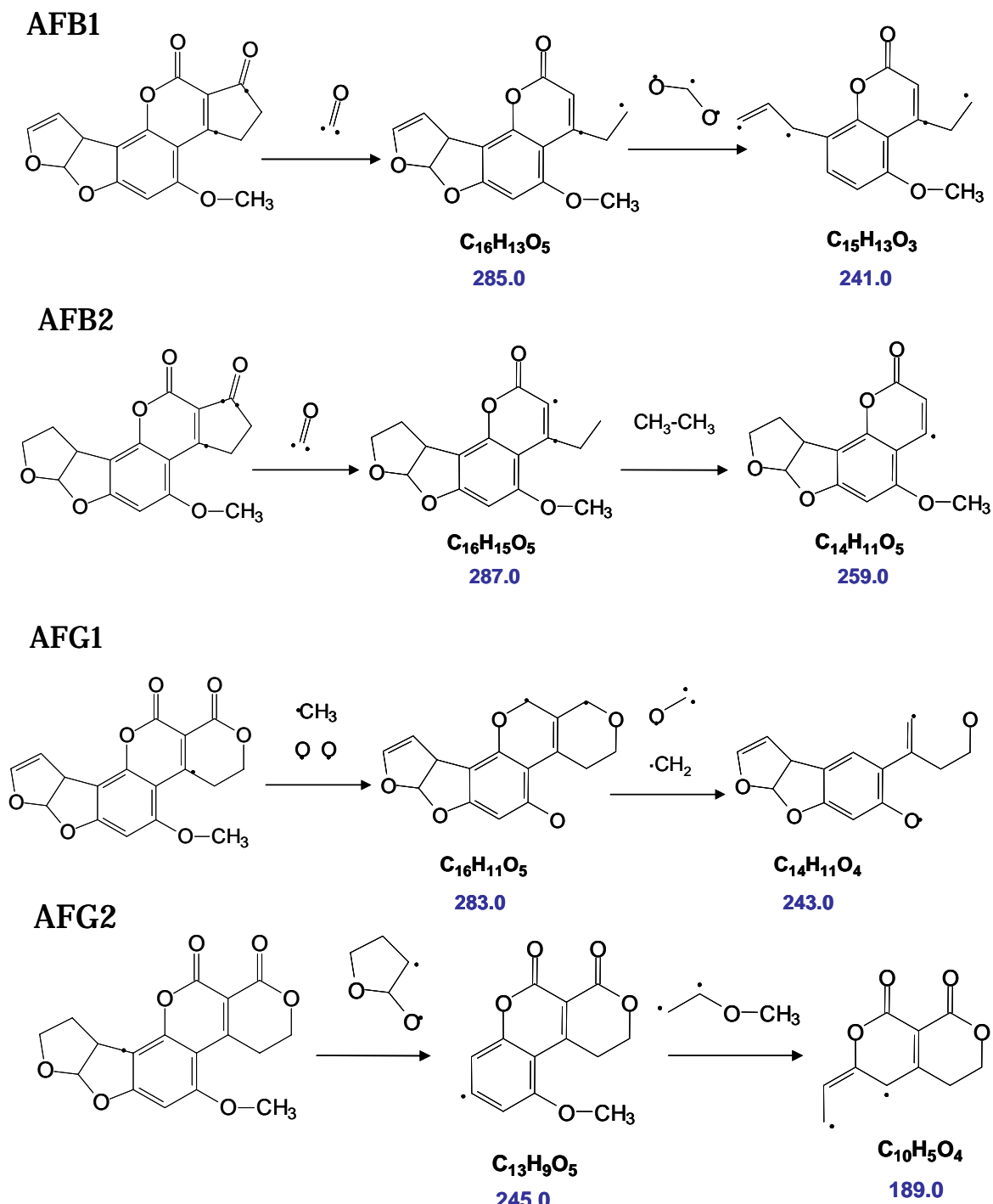
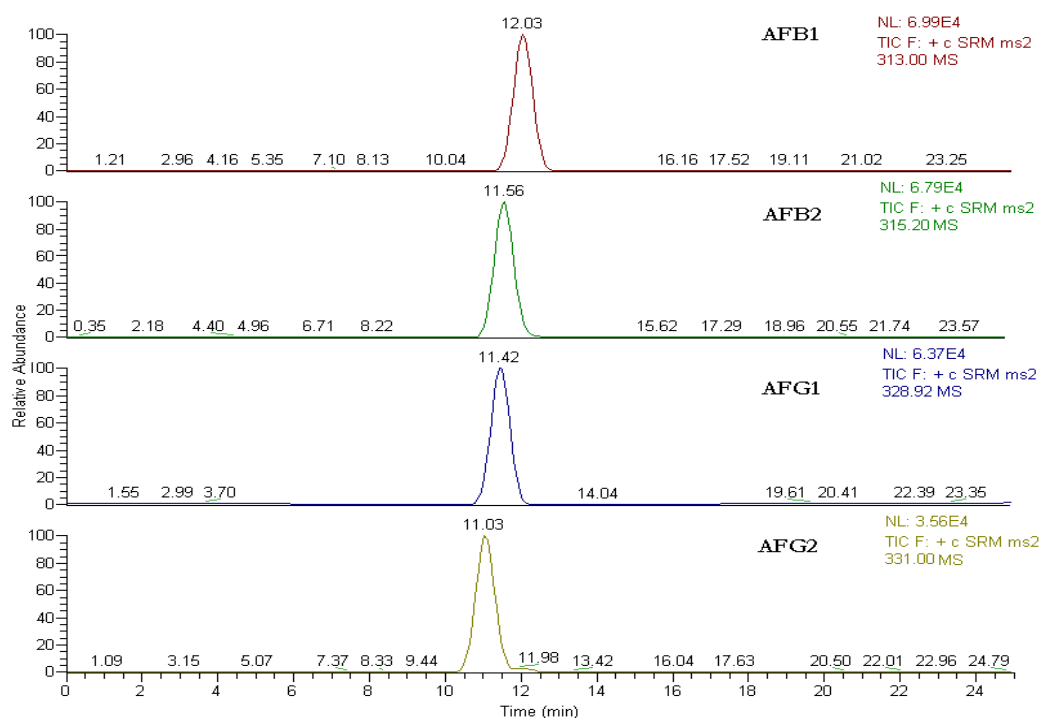


Figure 4.12. Fragmentation of aflatoxins.

#### 4.1. Optimization of methods



**Figure 4.13.** Chromatograms of standard solution with 0.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> and AFG<sub>2</sub> obtained by LC-MS/MS.

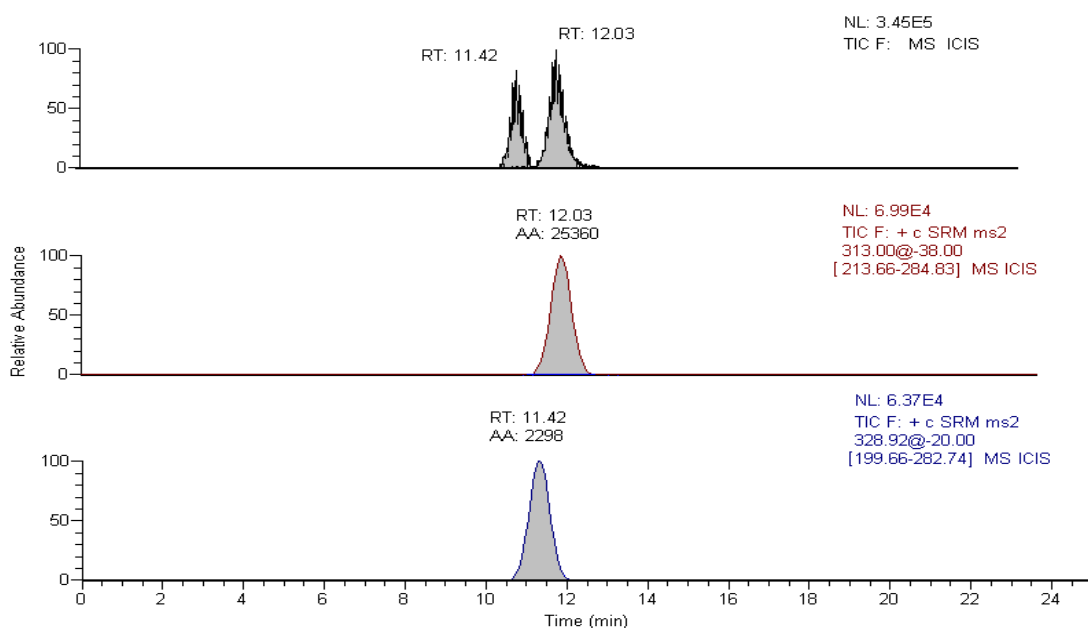
Analyte instrumental limits were estimated by the MRM LC/MS/MS chromatogram resulting from analyzing 0.5 ng injected of each AF in standard solution. Thereafter, the peak height-to-averaged background noise ratio (S/N) was measured. The background noise estimated was based on the peak-to-peak baseline near the analyte peak and a definition of LOQ and LOD as the amount giving  $S/N = 10$  and 3 of each analyte respectively were adopted. The LOQ ranged from 0.09 to 0.35 ng/g, and the LOD ranged from 0.03 to 0.1 ng/g. These data are listed in Table 4.13.

LC-MS/MS chromatogram of an AF positive maize sample is presented in Figure 4.14.

4.1. Optimization of methods

**Table 4.13.** Method performances.

Analyte	LOQ (ng/g)	LOD (ng/g)
AFB <sub>1</sub>	0.09	0.03
AFB <sub>2</sub>	0.10	0.03
AFG <sub>1</sub>	0.35	0.09
AFG <sub>2</sub>	0.30	0.10



**Figure 4.14.** A chromatogram of a positive maize sample containing 1.7 and 0.41 ng/g of AFB<sub>1</sub> and AFG<sub>1</sub>, respectively, confirmed by LC-MS/MS.

Several authors reported the use of LC-MS-MS to confirm AF from maize and nuts (Cavaliere C. et al. 2007; Chun H.S. et al. 2007).

The confirmed LC-MS/MS results were agreed with those obtained by fluorescence detection.

## 4.2. OCCURRENCE OF MYCOTOXINS

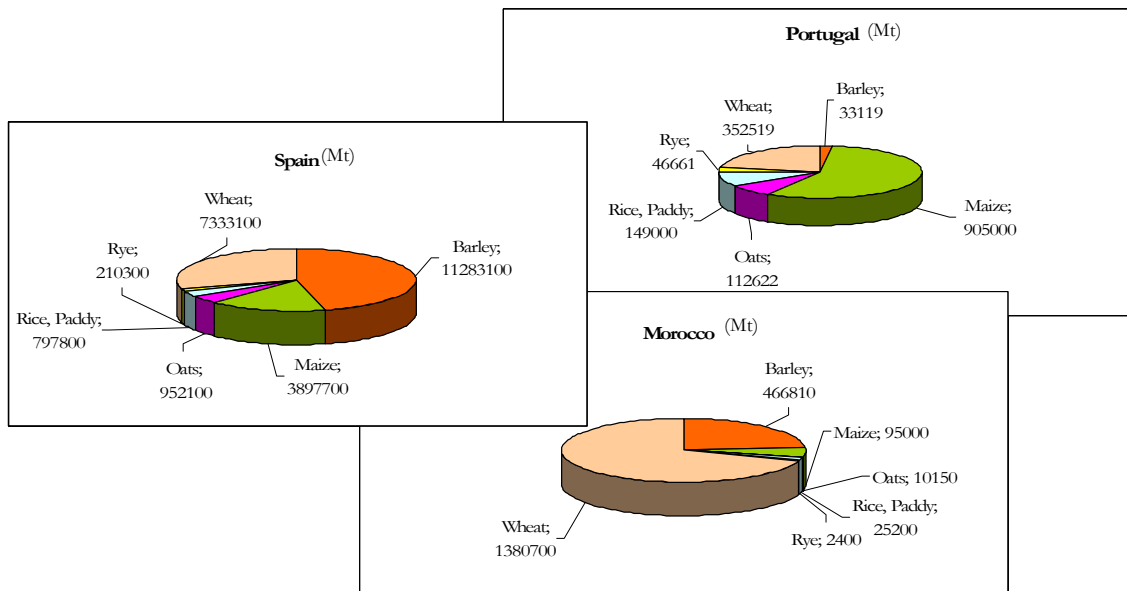
### 4.2.1. OCCURRENCE OF OCHRATOXIN A IN ANALYSED SAMPLES

Rice (*Oryza sativa* L.) is an important food crop worldwide along with wheat and maize, and has been major food in several countries. Rice cultivation has been carried out in all regions that have the necessary warmth and abundant moisture ideal to its growth, mainly subtropical rather than hot or cold weather conditions. Mheen et al. (1982) reported that the dominant genus during storage of rice is *Aspergillus*. Park et al. (2005) has been reported that the fungal species most commonly present in rice are *Aspergillus* (e.g. *A. ochraceus*), *Penicillium* (e.g. *P. verrucosum*) and *Fusarium*. Rice is an aquatic plant and is usually harvested at very high moisture levels (35-50 %). Therefore, mycotoxin-producing moulds could contaminate the grain and produce important quantities of OTA during storage. Medina et al. (2004) suggested a positive correlation between protein content of grains and OTA level. The stimulation of OTA production is probably due to the high free amino acid content in the substrate (Serra and Escola, 1997). Bacon et al (1975) stated that 25 % of glutamic acid is utilized for the synthesis of OTA. Serra and Escola (1997) hypothesized that stimulation of OTA production is probably due to the high free amino acid content in the substrate. In accordance with these evidences rice is a better substrate for the characterization of OTA-producing *A. ochraceus* strains.

Rice is a cereal with high consumption and production in Spain, Portugal and Morocco. According to the “Agricultural Bulletin Board on Data Collection, Dissemination and Quality of Statistics” (ABCDQ) Production notes by FAO in 2005 of rice during 2000 in Spain, Portugal and Morocco were 797800, 149000 and 25200 Mt, respectively, while total cereal production in Spain, Portugal and

#### 4.2. Occurrence of mycotoxins

Morocco were 24632760, 1639229 and 2005875 Mt, respectively (FAOSTAT, 2005). The production distribution of main cultivated cereals in Spain, Portugal and Morocco are shown in Figure 4.15.



**Figure 4.15.** Distribution of production cereal in 2000 (FAOSTAT, 2005).

In Morocco, rice cultivation fluctuates vastly depending especially on climatic conditions. On a potential of 25 000 ha in the Gharb plain, the harvested area varies from 500 ha to 13000 ha. In average the Moroccan population consumes 60 000 tons each year (2kg/person/year). One study done by “Agricultural Bulletin Board on Data Collection, Dissemination and Quality of Statistics” (ABCDQ) show that the yield of rice is higher than other cereals such as wheat or maize. In North African countries, the most suspected food susceptible to be contaminated by OTA are domestic and imported cereals like wheat and sorghum, olives, poultry products and spices (Grosso et al., 2003). Data published suggested the evidence association of elevated exposure to OTA with cases of human nephropathies in Tunisia (Abid et al., 2003). In Morocco, there is a lack of investigations related to OTA



---

#### 4.2. Occurrence of mycotoxins

occurrence in food and feed, even though climatic conditions, crop production and handling practices are favorable to mycotoxin contamination. In a recent report, the natural occurrence of OTA in barley, maize and wheat from Morocco were reported and the co-occurrence of OTA with *Fusarium* toxins (Zearalenone and Fumonisin B1) has been also confirmed in maize samples by Zinedine et al. (2006). If cereals (maize, wheat, barley) were preliminary studied for mycotoxin occurrence, rice has never been investigated at the moment.

For these reasons and because some studies made in rice showed that some samples were contaminated with OTA (Pena et al, 2005; Juan et al., 2005), it is important to evaluate the occurrence of OTA in rice from Spain, Portugal and also from Morocco.

Nowadays, many consumers prefer organic to non-organic foods because they are perceived healthier (Lohr, 2001). These products are denominated organic because they are cultivated without synthetic fertilizers or pesticides. The Codex Committee on Food Labelling proposed a definition “*organic agriculture is a holistic production management system which promotes and enhances agro-ecosystem health, including biodiversity, biological cycles, an soil biological activity. It emphasizes the use of management practices in preference to the use of off-farm inputs, taking into account that regional conditions require locally adapted systems. This is accomplished by using, where possible, agronomic, biological, and mechanical methods, as opposed to using synthetic materials, to fulfill any specific function within the system.*” Some scientific references report contradictory results in what respects to contaminants in organic versus non-organic foods. However, there is some evidence that the reduced use of fungicides may lead to a greater contamination by mycotoxins in organic food (Finamore et al. 2004 and Tinker, 2001) Furthermore, environmental conditions such as improper storage, including high temperature, poor drying conditions, and elevated moisture, which are often

---

#### 4.2. Occurrence of mycotoxins

associated with organic agricultural, may cause fungi survival and promote the development of their metabolites in cereal grains (Frisvald, and Samson, 1991).

Organic farming in Spain began in the end of the 1970's, with small farms, and it was basically promoted by young people coming from the cities. According to a study from 2005 of "Organic Farming in Europe" by Eurostat, in 2002 the organically farmed area reached a total of 4.9 million hectares (ha) in the European Union of 15 member states (EU-15), that is 3.8% of the total utilised agricultural area of the EU-15. In Spain, in 2003, the total cereals crop area was 6.6 million ha and the organic area percent was 1.5%, while in Portugal, with 450968 ha of cereals crop area, the organic area percentage was 6.6%, this share of organic area cultivation is the highest of the EU-15. Approximately 80% of the organic Mediterranean crops are exported mainly into central and northern European countries (Rohner-Thielen, 2005).

Jorgensen (2002), Biffi et al. (2004), Czerwiecki et al. (2002a), and Anselme et al. (2006) found highest OTA values in organic cereal samples from Denmark, Italy, Poland, and Belgium, respectively. However, results may vary greatly accordingly to the type of crop and mycotoxin in study, being some organic foods reported as less or equally contaminated compared to non-organic food. Czerwiecki et al. (2002b) in Poland, found different OTA levels in ecological and conventional different types of cereals. In this work it was studied if these evidences were confirmed.

In the other hand it was evaluated the presence of OTA in dried fruits. In fact, OTA contamination of dried fruits had been found to be due to the action of black aspergilli in Europe, including Spain (Abarca et al., 2003), France (Sage et al., 2004) and the Czech Republic (Ostry et al., 2002), and in other parts of the world such as Argentina (Romero et al., 2005) and Australia (Leong et al., 2004).

Moroccan population consumes huge amounts of dried fruits directly or as ingredient included in popular foods such as “Chebbakia”, “Sellou/Sefouf”, “Zammita” and “Mkharka” especially during the “Ramadan” fasting month and festival days. Almost all dried fruits such as pistachio, walnuts and peanuts consumed in Morocco are imported and little is known about their quality. Consequently, there are no legal parameters concerning the presence of mycotoxins, especially OTA, that control their entry to the country and, up to now, there is a lack of information in the literature about the occurrence of OTA in these products. For that, in this study it was investigated the presence of OTA in dried fruits available in the area of Rabat and Salé in Morocco.

Among cereal derivative products, bread is of significant importance due to the fact that it provides more nutrients to the world population than any other single food source, it is particularly important as a source of carbohydrates, proteins and vitamins. Wheat is utilized mainly as flour (whole grain or refined) for the production of a large variety of leavened and flat breads, and for the manufacture of a wide variety of other baking products. Bread is a product of daily consumption, highly demanded and sometimes of long-storage. The World Health Organization (WHO) recommends a 250 g/day intake which corresponds to 90 kg/person/year.

Microbial spoilage is the major problem causing deterioration of cereals and bread products. Mould spoilage accounts for between 1 and 5% of product losses depending on the season, type of product being produced and the method of processing. Spoilage of bakery products is caused mainly by moulds and yeasts. Contaminants of wheat bread are mainly *Penicillium* species (90-100%), but *Cladosporium* and *Aspergillus* species also occur, the latter especially in warmer climates. The most important mould species on bread are *P. commune*, *P. crustosum*, *P. brevicompactum*, *P. chrysogenum*, *P. roqueforti*, *A. versicolor* and *A. sydowii* (Suhr and

---

#### 4.2. Occurrence of mycotoxins

Nielsen, 2004). In addition to the economic losses caused by visible growth of spoilage moulds on bread, health hazards associated with the presence of mycotoxins are also of concern. Several authors have indicated bread as one of the main sources of daily intake of OTA (Gareis et al., 2000; Legarda and Burdaspal, 2001; Miraglia and Brera, 2002).

Some *durum* wheat is milled into flour to manufacture medium-dense breads in Mediterranean and Middle Eastern countries and some into coarse *durum* grain grits used to produce couscous (cooked grits) in Arabic countries. The presence of OTA in bread mainly comes from the wheat flour used for its manufacture because its presence in wheat grain or in flour is only partly destroyed during the breadmaking process. The formation of OTA on mouldy bread is believed to be a risk for human health either directly, as a result of people eating mouldy bread, or indirectly, as a result of consumption of products of animals fed with mouldy bread. Although the likelihood of people eating spoiled bread is very low in developed countries, the incidence in developing countries where warmer climates prevail and *A. ochraceus* is the dominant contaminant ochratoxigenic species causing problems, may be greater (Arroyo et al., 2005).

In Morocco, bread is one of the most consumed foods for the population. Wheat bread is essentially home made, however baker's yeast is now more frequently used than traditional starter. In recent years, Moroccan's life is changing because of working conditions changes. Indeed, consumption of commercial bread is an increasing habit in country. First surveys from Morocco have demonstrated the contamination of some commercialized foodstuffs with mycotoxins especially the contamination of wheat, maize, barley and rice with OTA (Zinedine et al., 2007c; Zinedine et al., in press), maize with aflatoxins (Zinedine et al., 2007b) and pasteurized milk with aflatoxin M<sub>1</sub> (Zinedine et al., 2007a).

#### 4.2.1.1. Occurrence of OTA in rice

- Rice samples purchased in Spain

The results of rice and rice products purchased in Spain are shown in Table 4.14. The distribution depending on the origin was ninety-eight, fifteen and seven from Spain, Portugal and other European countries, respectively. These have been classified according to their organic or non-organic culture. OTA was present in six out of eighty-three non-organic samples analysed; these included puffed, white, wild rice, wild rice products and rice from rice cultivars. Most non-organic positive samples exceeded the maximum levels (MLs) in the European Union, which cannot be greater than 5 and 3 µg/kg for cereals and cereal products, respectively (Reglament 472/2002).

The highest value of OTA is obtained from the rice sample obtained directly from the cultivars; rice in this stage is called “Paddy rice” and it is the whole grain taken off the plant at harvest.

White rice grain that is normally consumed makes up less than three-quarters of the weight of a paddy rice grain, which also includes the hull and bran. Taking the latter under consideration, one could explain the high OTA concentration found in this sample given that in the hulls is where the highest concentration of mycotoxins and mycotoxigenic moulds is found for most cereals. Ha et al. (1979) and Mheen et al. (1982) reported that the dominant genus during storage of milled and in paddy rice is *Aspergillus*. Once the grain is processed into rice products a decrease of OTA contamination can be expected.

#### 4.2. Occurrence of mycotoxins

In the other hand, wild rice has higher OTA concentration than the conventional rice. Wild rice is a tall aquatic plant (*Zizania aquatica*) of the family *Gramineae* (grass family), of a genus separate from common rice (*Oryza sativa*).

**Table 4.14.** Occurrence of ochratoxin A in organic and non-organic rice and rice products

NON-ORGANIC RICE AND RICE PRODUCTS				ORGANIC RICE AND RICE PRODUCTS			
Sample	Country	I <sup>1</sup>	OTA range <sup>2</sup>	Sample	Country	I <sup>1</sup>	OTA range <sup>2</sup>
Basmati rice	Holland	0/1	Nd	Basmati rice	India	0/1	Nd
Basmati rice	Spain	0/2	Nd	Brown rice	Italy	0/1	Nd
Bomba rice	Spain	0/5	Nd	Brown rice	Thailand	0/1	Nd
Brown rice	Spain	0/6	Nd	Brown rice	Spain	1/6	1.0
Parboiled rice	Spain	0/9	Nd	Puffed brown rice	Spain	1/1	2.8
Puffed rice	Spain	1/2	7.3	Red rice	Spain	0/1	Nd
Red rice	Spain	0/1	Nd	Rice cake	Italy	1/1	4.0
Rice <sup>a</sup>	Spain	1/1	27.3	Rice cake	Spain	2/3	3.6-7.1
Rice flour	Spain	0/2	Nd	Rice flour	Spain	1/1	3.3
Semolina	Spain	0/1	Nd	Rice “gofio”	Spain	0/1	Nd
White rice	Spain	1/43	4.3	Semolina	Spain	0/1	Nd
White rice	Portugal	1/7	2.1	Sweet brown rice	Italy	0/1	Nd
White rice	UK	0/1	Nd	White rice	Spain	4/10	2.1-7.6
Wild rice	Spain	1/1	21.0	White rice	Portugal	1/8	7.4
Wild rice <sup>b</sup>	Spain	1/1	7.3				
<b>Total</b>		<b>6/83</b>	<b>4.3-27.3</b>	<b>Total</b>		<b>11/37</b>	<b>1.0-7.6</b>

Nd = not detected (below the quantification limit); <sup>1</sup> I: incidence; <sup>2</sup> Range of OTA (ng/g)

<sup>a</sup> Rice samples from rice cultivars used for non-organic rice products;

<sup>b</sup> Including wild rice (20%) + white rice (70%)

---

#### *4.2. Occurrence of mycotoxins*

Wild rice is usually harvested at very high moisture levels (35-50 %) and is held for 7 to 14 days under these conditions to allow fermentation to take place, after completion of fermentation and before parching and hulling there are mould counts up to  $83 \times 10^3$  CFU/g of rice, as well as bacteria and yeast. Therefore is very likely that mycotoxin-producing moulds could be also present and produce important quantities of OTA during this period (Lindenfelser et al., 1978), even though OTA concentration may possibly diminish with rice processing, final concentration could reach important levels, as is the case of wild rice samples analysed.

According to the study of Zhai et al. (1994, 2001), in wild rice the protein and amino acid content is two times higher than that of white rice. Furthermore, essential amino acid values for white rice were lower than those of wild rice. So that, one time more the hypothesis that stimulation of OTA production is probably due to the high free amino acid content in the substrate, suggested by Serra and Escola (1997) and Medina et al. (2004), can be supported by our results.

Non-organic samples had been labeled with a Denomination of Origin (DO) from “Calasparra”, “Valencia” and “Delta de l’Ebre” regions. In general it can be said that the occurrence of OTA in this kind of products is low due to the fact that several food safety and quality standards as Good Agricultural Practices (GAPs), Good Manufacturing Practices (GMPs) and the Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) system must be followed (Council Regulation, 1991).

Rice flour and rice cake exceeded the European legislated ML, which is 3 ng/g of OTA in cereal products. Brown and puffed brown rice values of OTA were below the maximum levels for the European Union.

---

#### 4.2. Occurrence of mycotoxins

From results presented in Table 4.12, it can be observed that the incidence of OTA in organic rice and rice products is higher than in conventional rice and rice products. This may be a consequence of organic production since it involves varied cultivation practices, limited use of non-synthetic fertilizers, pesticides, fungicides, conditioners of low solubility and prohibits the use of genetically modified organisms and/or any products derived from such organisms, giving a wider margin for probable proliferation fungi and mycotoxin production.

Other studies authors show results with great dispersion Miraglia and Brera (2002) reported that 4 out of 22 rice samples contained OTA with a mean concentration of 0.11  $\mu\text{g}/\text{kg}$  and in none of the rice samples from Uruguay and United Kingdom was detected the presence of this mycotoxin. Scudamore et al. (1997) showed that OTA occurred in 3 out of 40 rice samples from UK with a mean concentration between 1-19  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Furthermore, in 25 Vietnamese rice samples were contaminated with OTA at 21.3 and 26.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Trung et al., 2001). Abdelhamid (1990) detected the occurrence of OTA in 33 % of rice germs and rice germ cake with an average value of 577 and 4  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectively. Blesa et al. (2004a) did not detect the presence of OTA in none of the rice samples studied.

##### ▪ Rice samples purchased in Morocco

For rice samples purchased in Morocco the occurrence results of OTA are shown in Table 4.15. OTA was present in 47 out of 120 analyzed samples, incidence was 39%. Levels of contamination in positive samples ranged between 0.02 and 32.4  $\text{ng}/\text{kg}$ , where the mean average of OTA in positive rice samples was 3.72  $\text{ng}/\text{g}$ .

Our findings showed high incidence of OTA in Moroccan rice comparing with rice from Spain where incidences of OTA were 14 %. Worldwide



---

#### 4.2. Occurrence of mycotoxins

contamination of rice with OTA was reported in UK by Scudamore et al. (1997) in Vietnam by Trung et al. (2001), in rice germs and rice germ cake from Egypt by Abdelhamid (1990), in Portugal by Pena et al. (2005), in France by Leblanc et al. (2005) and in polished rice from Korea by Park et al. (2005).

**Table 4.15.** Incidence (I), mean and range of OTA in rice analyzed.

<b>Rice origin</b>	<b>N° of samples</b>	<b>I (%)</b>	<b>Range of OTA (ng/g)</b>	<b>Mean of OTA (ng/g)</b>
Morocco	120	47/120 (39)	0.02 – 32.4	1.46
Spain	98	14/98 (14)	1.0-27.3	1.07
Portugal	15	2/15 (13)	2.1-7.4	0.68
Other: Italy, Holland, UK, India, Thailand	7	1/7 (33)	4.0	0.50

Up to now, no Moroccan government regulations for the maximum levels of mycotoxins in foods and feeds are still in force. However, a project prepared by the Inter-ministerial Committee for Food Control and Frauds Repression (Comité Interministériel pour le Contrôle Alimentaire et la Répression des Fraudes, CIPCARF) and the Service of Moroccan Industrial Normalization (Service de Normalisation Industrielle Marocaine, SNIMA) to protect both human and animal health is under discussion. The maximum level for OTA in cereals set by the Moroccan project is 30 µg/kg (FAO, 2004). This value is higher than maximum level (ML) fixed by European regulations for OTA in cereals and cereal products at levels that cannot be greater than 5 and 3 µg/kg, respectively (Commission Directive 2006/1881/CE). The maximum level of OTA established by the codex in cereals and cereal products is about 5 µg/kg (JECFA, 2001). Our findings showed that 15 % of analyzed samples exceeded the maximum level of OTA set by the European Union in cereals.

## 4.2. Occurrence of mycotoxins

### 4.2.1.2. Occurrence of OTA in cereals excluding rice

Sixty-two cereal samples (excluded rice) were analyzed, from which thirty and two were organic and thirty non-organic cereals. These samples were purchased from shops in Spain and Portugal. In Spain and Portugal, the consumption and production of organic rice, wheat and maize is higher than oats, barley, rye and spelt (FAO/ITC/CTA, 2001), therefore different number of samples were collected for each kind of cereal. The results obtained from the analysis of the OTA levels in the samples are presented in Table 4.16.

**Table 4.16.** Incidence (In), concentration and range of OTA (ng/g) in analyzed samples.

ORGANIC				NON ORGANIC			
Num. Sample	In	Mean (ng/g)	Range (ng/g)	Num. Sample	In	Mean (ng/g)	Range (ng/g)
Wheat (n=11)	4/11	0.87	0.27-7.97	Wheat (n=10)	5/10	0.22	0.20-0.90
Maize (n=5)	2/5	0.54	0.80-1.90	Maize (n=6)	0/6	nd	nd
Oat (n=5)	1/5	0.50	2.50	Oat (n=7)	0/7	nd	nd
Barley (n=4)	0/4	nd	nd	Barley (n=4)	0/4	nd	nd
Rye (n=5)	1/5	5.42	27.10	Rye (n=2)	0/2	nd	nd
Spelt (n=2)	1/2	1.10	2.20	Spelt (n=1)	0/1	nd	nd
TOTAL (n=32)	9/32	2.10	nd-27.10	TOTAL (n=30)	5/30	0.07	nd-0.90
<b>TOTAL (n=62)</b>	<b>I: 14/62</b>		<b>Mean: 1.11 ng/g</b>				<b>Range: nd-27.10</b>

OTA was detected in 14 out of 62 samples (23%). The range of OTA in the analyzed samples was 0.20 to 27.10 ng/g, and the mean level was 1.11 ng/g. Trucksess et al. (1999) found levels higher than 0.03 ng/g in 56 out of 383 wheat samples, and in 11 out of 103 barley samples from United States. In this study 4 wheat samples and 1 barley sample were above the ML established for OTA. MacDonald et al. (2004) found OTA in 52 out of 320 analyzed cereals samples

---

#### 4.2. Occurrence of mycotoxins

from the UK, exceeding 3% (11) the ML. Biffi et al. (2004) estimated the quantity of OTA in 211 cereal derivatives, and all contained OTA at concentrations lower than the legal limit (3 ng/g), ranging from 0.012 to 2.23 ng/g. In the SCOOP-2 report, the mean content of OTA in cereal grains in the EU was 0.27, 0.60, 0.30, 0.17 and 0.19 ng/g in wheat, rye, barley, maize and oats, respectively (Jorgensen, 2005). Park et al. (2005) observed in Korean samples that wheat flour samples contained OTA levels lower than 0.5 ng/g, and nine samples of polished rice were above the ML established for cereal grains intended to human consumption. A surveillance study from Ethiopia showed that in 110 samples of barley and wheat, the frequency was 26.2% and 23.4%, and the mean concentration 6.1 ng/g and 14.9 ng/g, respectively (Ayalew et al. 2006). In maize, wheat and barley from Morocco, OTA presented an average contamination of 1.08, 0.42 and 0.17 ng/g, respectively (Zinedine et al. 2006).

The results obtained from the analysis of organic and non organic cereals showed that 17% of non organic cereals (n=32) and 28% of organic cereals (n=30) were contaminated with OTA (Table 4.16). Moreover, the mean concentration of organic cereals was higher than that of non organic cereals, 2.10 ng/g vs 0.07 ng/g, with significant difference (P value of 0.005).

This study showed that six organic samples exceeded the ML established for cereals (5 ng/g). This may be a consequence of organic production, since it involves varied cultivation practices, limited use of non-synthetic fertilizers, pesticides, conditioners of low solubility and no use of genetically modified organisms and/or any products derived from such organisms, giving a wide margin for probable fungi proliferation and mycotoxin production. Elmholt & Rasmussen (2005) pointed that the problems in organic cereals were most likely correlated to a late harvest and high moisture content of the grain, which were not properly handled in the post-

---

#### 4.2. Occurrence of mycotoxins

harvest. Therefore, becomes easier to achieve the optimal environmental conditions needed to the growth of ochratoxigenic fungi.

Recently in a critical review of the literature about safety of organic food, Magkos et al. (2006) compared the last studies on the OTA incidence in organic and conventional cereals and cereal products, and observed that only in three out of twelve references, the OTA contamination in organic was higher than in conventional analyzed samples, while the others presented similar levels. These studies were performed by Jorgensen (2002), Biffi et al. (2004), and Czerwiecki et al. (2002a), being the highest value found in a spelt flour sample from organic agriculture (0.816 ng/g) (Biffi et al. 2004).

Among the studied samples, also the relation between the presence of OTA in wholemeal and non-wholemeal cereals was evaluated (Table 4.17). Then, the OTA frequency in whole-grain cereal was higher than in non whole-grain cereal (46% vs 18%), and the highest OTA level was found in an organic sample of whole-grain rye (27 ng/g). These results are in agreement with a study of Scudamore et al. (2003) where the scouring in whole wheat removed OTA up to 44%, once a high proportion exists in the bran fraction. On the other hand, Biffi et al. (2004), in cereals and derivatives from Italian market, detected the highest level of OTA in spelt whole flour.

In wheat the OTA incidence was higher than that of other analyzed cereals, followed by maize. ML was exceeded in 2 wheat samples with 7.6 and 7.97 ng/g, and in a rye sample with 27.10 ng/g. Biffi et al. (2004) and Lombaert et al. (2003) studied the occurrence of OTA in rice and rice products from Italy and rice-based baby cereals from Canada and Italy. The levels of OTA were quite low (< 1 ng/g) as compared to our results. Also Pena et al. (2005) studied 42 rice samples from Portugal, and the presence of OTA was found in six samples at concentrations

#### 4.2. Occurrence of mycotoxins

ranging from 0.09 to 3.52 ng/g, while Leblanc et al. (2005) estimated the mean OTA in French rice in 0.25 ng/g.

Wheat is a cereal with high consumption and production in Portugal and Spain. According to the Agricultural Bulletin Board on Data Collection, Dissemination and Quality of Statistics (ABCDQ) Production notes of FAO in 2004, the production of wheat during 2000 in Portugal was 352519 Mt, and in Spain was 7333100 Mt for wheat (FAO/ITC/CTA, 2001).

**Table 4.17.** Incidence, OTA mean concentration (ng/g), and range of OTA (ng/g) in analyzed samples

	SAMPLE	NON WHOLE CEREALS			WHOLE CEREALS		
		Incidence	Mean (ng/g)	Range (ng/g)	Incidence	Mean (ng/g)	Range (ng/g)
<b>ORGANIC</b>	Wheat (n=11)	2/7	1.18	0.27-7.97	2/4	0.32	0.30-7.60
	Maize (n=5)	1/3	0.63	1.90	1/2	0.4	0.80
	Oat (n=5)	0/2	nd	nd	1/3	0.83	2.50
	Barley (n=4)	0/2	nd	nd	0/2	nd	nd
	Rye (n=5)	0/2	nd	nd	1/3	9.03	27.10
	Spelt (n=2)	0/0	nd	nd	1/2	1.10	2.20
	TOTAL (n=32)	3/16	1.24	nd-7.97	6/16	2.95	nd-27.10
<b>NON ORGANIC</b>	Wheat (n=10)	2/6	0.12	0.20-0.50	3/4	0.37	0.20-0.90
	Maize (n=6)	0/6	nd	nd	0/0	nd	nd
	Oat (n=7)	0/5	nd	nd	0/2	nd	nd
	Barley (n=4)	0/3	nd	nd	0/1	nd	nd
	Rye (n=2)	0/2	nd	nd	0/0	nd	nd
	Spelt (n=1)	0/1	nd	nd	0/0	nd	nd
	TOTAL (n=30)	2/23	0.03	nd-0.50	3/7	0.19	nd-0.90
<b>TOTAL (n=62)</b>	5/39	0.52	nd-7.97	9/23	2.03	nd-27.10	

---

#### 4.2. Occurrence of mycotoxins

According to samples source, it was observed that 16.4% of Spanish samples and 20% of Portuguese samples were contaminated (Table 4.18). The concentration mean of OTA was higher in Spanish samples than Portuguese, 0.93 ng/g vs 0.64 ng/g respectively. Differences significant were found, P=0,005. In samples Portuguese were observed a high incidence in spelt, rye and wheat such as showed in Table 4.18, and the higher mean concentrations were obtained in rye and rice. While in Spanish samples were observed a high incidence in wheat but the higher mean concentration was obtained in rice.

**Table 4.18.** OTA incidence and mean levels of Spanish and Portuguese analyzed cereal samples.

Sample	Incidence (%)		Mean (ng/g)	
	Spain	Portugal	Spain	Portugal
Wheat	6/12 (50)	2/8 (25)	0.10	0.27
Maize	1/6 (17)	1/5 (20)	0.13	0.80
Oats	0/6 (0)	1/6 (17)	n.d.	0.41
Barley	0/5 (0)	0/3 (0)	n.d.	n.d.
Rye	0/4 (0)	1/3 (33)	n.d.	6.78
Spelt	0/2 (0)	1/1 (100)	n.d.	1.10
Rice	14/98 (14)	2/15 (14)	1.07	7.48
<b>TOTAL CEREAL</b>	21/133 (16)	8/41 (20)	0.93	0.64

##### 4.2.1.3. Occurrence of OTA in bread

The frequency and incidence obtained in Portuguese bread analysed are shown in Table 4.19. OTA frequency was 40.9%. The contaminated samples of OTA revealed levels ranging from a level inferior to the LOQ to 5.86ng/g, being

---

#### 4.2. Occurrence of mycotoxins

the OTA mean level of  $(0.23 \pm 0.86)$  ng/g (median 0.09 ng/g). The incidence distribution by kinds of bread were 70% in maize bread, and 12.9 % in wheat bread. Only one sample had OTA content (5.86 ng/g) above the maximum level (ML) for OTA in cereal products, established by European Union (3 ng/g).

Few studies about OTA levels in bread samples are available. González et al. (2006b) found two contaminated samples among twenty bread samples analyzed in Spain with OTA levels of 2.55 and 1.82 ng/g. Our incidence results are higher than the obtained by González. et al. (2006b).

**Table 4.19.** Prevalence and levels of OTA in bread analyzed from Portugal.

Sample	Incidence (%)	< LOQ	Range (ng/g)	Mean±SD (ng/g)
Maize bread	21/30 (70)	4	nd-5.86	0.44±1.19
Wheat bread	4/31 (12.9)	0	nd-0.26	0.02±0.07
<b>TOTAL</b>	25/61 (40.9)	4	nd-5.86	0.23±0.86

Legarda and Burdaspal (2001), in 255 samples of wheat bread from different countries, found 100% of incidence. The mean OTA levels ranged from 0.08 ng/g Austrian samples to 0.45 ng/g Spanish samples. The highest OTA level was found in one Spanish sample with 7.37 ng/g. Blesa J. et al (2004a) analyzed cereal products including bread from Spain, in such study the OTA level in bread were lower than 0.25 ng/g. In other study of bread from Spain and twelve different countries by Legarda M.T. and Burdaspal P.A. (2001) the mean level of OTA in samples from Spain, France, Holland, Belgium, Italy, Germany, Ireland, Austria, Switzerland, Hungary, EEUU, Tunisia and Brazil were 0.276, 0.222, 0.355, 0.142, 0.271, 0.225, 0.446, 0.081, 0.047, 0.022, 0.347, 0.259 and 0.040 ng/g, respectively. So that our result are near of the Irish value and both are higher. Wolff et al. (2000) analyzed

---

#### 4.2. Occurrence of mycotoxins

several types of bread from Germany and detected higher values in muesli bread (5.54 ng/g) and in rye meal bread (5.49 ng/g).

With respect the occurrence of OTA observed in bread samples from Morocco, the results are shown in Table 4.20. OTA was present in 48 out of 100 total analyzed samples, the incidence is 48 %. The highest frequency of positive samples (61%) and the most contaminated bread sample (149.05 ng/g) was from Casablanca. Levels of OTA in positive samples ranged between (0.14 ± 0.05) and (149.05 ± 5.10) ng/g, where the average level of OTA in positive samples is (13.06 ± 1.51) ng/g. There were 26 samples out of 100 samples that exceeded the maximum level (3 ng/g) set for OTA in cereal products by European legislation.

**Table 4.20.** Occurrence of OTA in Bread from Morocco.

<b>Bread origin</b>	<b>Incidence (%)</b>	<b>Range (ng/g)</b>
Rabat	17/32 (53)	0.53-89.50
Témara	4/11 (36)	1.14-10.10
Méknes	16/36 (44)	1.92-21.83
Salé	3/8 (37)	0.14-136.09
Casablanca	8/13 (61)	1.70-149.05
<b>Total</b>	48/100 (48)	0.14-149.05

Our findings showed a high OTA incidence in bread from Morocco comparing with data described for worldwide bread contamination with OTA by Legarda and Burdaspal (2001), González-Osnaya et al. (2006b) and Wolff et al. (2000).



#### 4.2.1.4. Occurrence of OTA in dried fruits

In Morocco, traditional techniques for the transformation and conservation of fruits are still used. These practices are very optimal conditions (especially temperature, humidity and fruits damages) for mould growth and mycotoxin production. The natural drying, which may consist in direct exposition of the fruit to the sun, is widely used especially in rural area. Fruits (raisins, figs etc.) having reached a sufficient degree of maturity are gathered and transported to drying places such as the terrace of house or a piece surrounded to prevent the access of animals. These surfaces of drying are in general exposed to a maximum sunning and are papered with herbs to avoid the contact with the ground. Fruits are spread out over these surfaces without preliminary treatment. After drying, fruits are collected and stored. During the process of fruits drying, the sugar is concentrated as the moisture content decreases resulting in an almost selective medium for xerotolerant moulds such as *A. niger* section *nigri* species. Among black aspergilli, *A. carbonarius* is the most important as OTA producing isolate observed more frequently (Abarca et al., 2003; Sage et al., 2004). They are common soil inhabitants where saprophytic colonization and survival on crop debris producing large numbers of spores which can become air-borne and contaminate ripening crops in Mediterranean, tropical and subtropical regions. In the mid-1990s it was discovered that a member of this group, *A. carbonarius*, was responsible for the production of OTA (Abarca et al. 1994). Subsequently, *A. carbonarius* and OTA were detected in grapes, wine and other grape products. The presence of OTA as a contaminant of grapes, grape products and wine is again dependent on favourable microclimate conditions which can facilitate germination, germ tube extension, establishment and mycelial colonization to occur. The most important factors governing these components of the life cycle of micro-organisms are water availability, temperature and their interaction with the nutrient status of the food matrix (Magan and Aldred, 2005).

---

#### 4.2. Occurrence of mycotoxins

Other black aspergilli including the *A. niger* aggregate and *A. aculeatus* have also been found to produce OTA on grapes (Battilani et al., 2003). Recently, OTA production in *A. tubingensis* isolates originating from grapes was observed by Medina et al. (2005). Serra et al. (2003) suggested the hypothesis that *A. carbonarius* and occasionally *A. niger*, are the main producers of OTA in grapes, authors reported also that the highest incidence of these fungi occurred in vineyards with a Mediterranean climate. Due to the ability to produce OTA at a wide range of temperatures, *A. carbonarius* and members of the *A. niger* aggregate are considered to be the main sources of the OTA contamination in grapes and raisins (Varga and Kozakiewicz, 1996). Their black spores, with a high resistance to sunlight, allowed this species to survive in hard conditions (Imanaka et al., 2005).

**Table 4.21.** Occurrence of OTA in different analyzed samples

<b>Food commodity</b>	<b>Incidence (%)</b>	<b>Range of OTA (ng/g)</b>	<b>Mean of OTA (ng/g)</b>
Peanut	5/20 (25)	0.10 - 2.36	0.68
Dried figs	13/20 (65)	0.03 - 1.42	0.33
Dried raisins	6/20 (30)	0.05 - 4.95	0.96
Walnut	7/20 (35)	0.04 - 0.23	0.11
Pistachio	0/20 (0)	ND*	ND*
<b>TOTAL</b>	<b>31/100 (31)</b>	<b>ND-4.95</b>	<b>0.42</b>

ND: not detected.

The incidence of OTA in dried raisins, dried figs, walnuts, and peanuts were 30, 65, 35, and 25 % respectively (Table 4.21). Levels of OTA ranged from 0.10 to 2.36, from 0.03 to 1.42, from 0.05 to 4.95 and from 0.04 to 0.23 µg/kg in peanuts, dried figs, dried raisins and walnuts respectively. In pistachio samples, OTA was

below the limit of quantification. All positive samples of dried fruits were below the maximum tolerable level of OTA (10 µg/kg) set by European regulations in dried vine fruits (FAO, 2004). However, no maximum level is set by the Moroccan project of mycotoxin regulations for OTA in dried fruits.

In comparison, previous UK surveys have reported incidences of OTA in raisins of 85% (MacDonald et al., 1999) and 97% (MAFF, 1999), while a German survey (Engel, 2000) reported a 95% overall incidence of OTA in raisins and currants. Data from Finland and France have indicated incidences of 71 and 46%, respectively (Miraglia and Brera, 2002). Recent data from Canada reported that OTA was present in 79% of samples of raisins (Lombaert et al., 2004).

OTA was present in 95% of dried fig samples from Brazil and 26% contained levels higher than 5 µg/kg, and samples were infected particularly with *A. niger* (Iamanaka et al., 2005). In Turkey, Ozay and Alperden (1988) reported a 3% incidence of occurrence of OTA in fig samples from the 1988 crop. Recently, Senyuva et al. (2005) reported the contamination of fig samples from the 2003 and 2004 crops in Turkey with both OTA and aflatoxins. Bayman et al. (2002) reported high levels of OTA (up to 1850 µg/kg) in figs grown in California. In the European Commission's 2002 Scientific Co-operation Project Report, analyze of 20 samples of fig imported to The Netherlands reported an incidence of 10 % with a maximum concentration of 0.8 µg/kg (Miraglia and Brera, 2002).

Bayman et al. (2002) isolated fungi in the *Aspergillus ochraceus* group (section *Circumdati*) and *Aspergillus alliaceus* from tree nut orchards, nuts, and figs in California, both *A. ochraceus* and *A. melleus* have been found in figs, tree nuts, pistachios, and pistachio tree litter in California, at frequencies comparable to those of *A. flavus*, authors reported that *A. alliaceus* is an important ochratoxin-producing fungus and

that it may be responsible for the ochratoxin contamination occasionally observed in figs.

#### 4.2.2. OCCURRENCE OF AFLATOXINS IN ANALYSED SAMPLES

##### 4.2.2.1. Occurrence of AF in dried fruits

Morocco, a North African country surrounded by Mediterranean sea and Atlantic ocean, is characterized by a climate with high humidity and high temperature. Traditional techniques for the transformation and conservation of fruits are still used. These practices are very optimal conditions (especially temperature, humidity and fruits damages) for mould growth and mycotoxin production. The natural drying, which may consist in direct exposition of the fruit to the sun, is widely used especially in rural areas. Fruits (raisins, figs etc.) having reached a sufficient degree of maturity are gathered and transported to drying places such as the terrace of house or a piece surrounded to prevent the access of animals. These surfaces of drying are in general exposed to a maximum sunning and are papered with herbs to avoid the contact with the ground. Fruits are spread out over these surfaces without preliminary treatment. After drying, fruits are collected and stored. During the process of fruits drying, the sugar is concentrated as the moisture content decreases resulting in an almost selective medium for xerotolerant moulds. It should be mentioned that at present no regulations for mycotoxins are in force in Morocco.

Results of the natural occurrence of AFB<sub>1</sub> and AFT in analyzed samples of dried fruits are summarized in Table 4.22.

▪ Occurrence in peanut samples

As shown in Table 4.22, one out of 20 peanut samples was contaminated with AF. Levels of AFB<sub>1</sub> and AFT are 0.17 and 0.32 µg/kg respectively. These results showed a weak contamination of the analyzed samples of peanut with AF.

**Table 4.22.** Occurrence of AF in dried fruits from Morocco.

Food commodity	AF	Incidence (%)	Mean (µg/kg)*	Maximum level (µg/kg)
Peanut	AFB <sub>1</sub>	1/20 (5)	0.17	0.17
	AFT	1/20 (5)	0.32	0.32
Dried raisins	AFB <sub>1</sub>	4/20 (20)	10.72	13.87
	AFT	4/20 (20)	10.72	13.87
Dried figs	AFB <sub>1</sub>	1/20 (5)	0.28	0.28
	AFT	6/20 (30)	8.70	32.91
Walnut	AFB <sub>1</sub>	6/20 (30)	359.30	2500
	AFT	6/20 (30)	728.00	4319
Pistachio	AFB <sub>1</sub>	9/20 (45)	159.00	1426
	AFT	9/20 (45)	164.00	1437
<b>TOTAL</b>	<b>AFB<sub>1</sub></b>	21/100 (21)	106.00	2500
	<b>AFT</b>	26/100 (26)	182.00	4319

- Mean of the positive samples

The occurrence of AF in peanut has been reported by several authors from different countries. High incidence of contamination of peanut with AF was reported in Argentina (Park et al, 1989) and in Philippines (Garcia 1989). Haydar et

---

#### 4.2. Occurrence of mycotoxins

al. (1990) investigated various Syrian foods for AF and found high levels of contamination in peanut. In Qatar, Abdulkadar et al. (2000) reported that one sample of peanut with shell and one sample of mixed nut; which mostly contained peanut, were found contaminated with AF and the respective levels of contamination were 2.8 and 6 µg/kg of total AF. Mphande et al. (2004) reported that 78% of raw peanut from Botswana contained AF at concentrations ranging from 12 to 329 µg/kg. In China, peanut was found contaminated with AF, being the average level was 80.27 µg/kg and the highest level was 437.09 µg/kg (Wang et al., 2006).

##### ▪ Occurrence in dried raisins samples

In dried raisins, analytical results showed that samples were contaminated only with AFB<sub>1</sub> with an incidence of 20%. AFB<sub>1</sub> concentrations ranged from 3.23 to 13.87 µg/kg. All positive samples exceeded the maximum level of 2 µg/kg set by EU regulations for AFB<sub>1</sub>. Even if several studies have reported that dried raisins do not seem to be a satisfactory substrate for *A. flavus* growth and AF production, the presence of AF in dried raisins was demonstrated in the present survey. Our data are similar to those of Iamanaca et al. (2005) that have reported an incidence (16%) of contamination of dried grapes from Brazil with AFB<sub>1</sub> and AFB<sub>2</sub>.

##### ▪ Occurrence in dried figs samples

In dried figs, the incidence of AFB<sub>1</sub> and AFT were 5 % and 30 % respectively. One sample was contaminated with AFB<sub>1</sub> (0.28 µg/kg). All other samples were contaminated with AFG<sub>1</sub> only in the range of 0.28-32.91 µg/kg. Out of samples, 15% were above the maximum level (4 µg/kg) fixed for AFT by European legislation (Commission Directive 2006/1881/CE). *A. flavus* and AF presence has been related mainly to dried figs. According to Pitt and Hocking (Pitt

et al., 1997), *A. flavus* and *A. niger* were reported as being the most common species in dried figs which was explained by their high sugar content. In England, Sharman et al. (1991) reported the contamination of 9% of figs by AF. Stenier et al. (1988) reported the contamination of dried figs from Turkey with 100-1400 µg/kg of AFB<sub>1</sub> and 0.2-1900 µg/kg of AFG<sub>1</sub>. Studies carried out also with dried figs from Turkey reported the presence of AFB<sub>1</sub> (30 µg/kg) in one of 32 samples analyzed (Özay et al., 1995). More recently, dried figs from Turkey were investigated for their contents of AF by Karaca and Nass (2006); results indicated that figs, which are sensible to the fluorescence, were contaminated with high AF levels (117.9-471.9 µg/kg). Iamanaca et al. (Iamanaka et al., 2005) have also found an incidence of contamination of Brazilian figs with AFB<sub>1</sub> of 58%, one sample showed a high contamination of AFB<sub>1</sub> of about 1500 µg/kg.

▪ Occurrence in walnut samples

In walnut samples, the incidence of AFB<sub>1</sub> and AFT was 30%. The contamination levels in walnut samples ranged from 0.56 to 2500.20 µg/kg for AFB<sub>1</sub> and from 1.24 to 4319.46 for AFT µg/kg respectively. The average contamination levels of walnut with AFB<sub>1</sub> and AFT were 359.30 and 728.00 µg/kg respectively. Out of samples, 20% exceeded the maximum level (2 µg/kg) fixed for AFB<sub>1</sub> by European legislations (Commission Directive 2006/1881/CE). In comparison, analysis of 40 in shell walnut samples in USA revealed that only 3 samples contained more than 1µg/kg of AF, several lots of walnut both in shell and shelled were unusually contaminated with AFB<sub>2</sub> (Fuller et al., 1977). AF were detected in 75% of walnut samples from Egypt with levels in the range of 15-25 µg/kg (Abdel-Hafez et al., 1993).

▪ Occurrence in pistachio samples

In pistachio samples, analytical results showed that the incidence of contamination with AFT and AFB<sub>1</sub> is 45%. Levels of AFB<sub>1</sub> and AFT ranged from 0.04 to 1426.43 µg/kg and from 0.08 to 1437.00 µg/kg respectively. Only one pistachio sample out of 20 total analyzed (5%) exceeded the maximum level set for AFB<sub>1</sub> with a concentration of 1426.43 µg/kg. Even if *Pistacia sp* (*P. vera* and *P. atlantica*) was introduced into Morocco by the National Institute of Agronomic Research since 1950 and it is now cultivated on an area of about 120 ha, few production amounts of two varieties (Achouri and Mateur) were obtained. Thus, Morocco imports huge amounts of pistachio especially from Iran. Literature available on the occurrence of AF in pistachio from this country indicates higher levels of contamination (Yazdanpanah et al., 2005) so that, pistachios imported from Iran into European Union were found to be contaminated with unacceptable levels. It was reported that a large number of pistachio from Iran were contaminated with unacceptable levels of AF, this resulted in temporary import ban of Iranian pistachio into the European Union from September 1997 (MAFF, 1997). According to a report published by Iranian Ministry of Health, 7926 pistachio samples were analyzed during March 2001 to March 2002, data indicated 761 samples contained AFB<sub>1</sub> higher than 10µg/kg (FDCL 2002). In Switzerland, Steiner et al. (1992) reported a highest AFB<sub>1</sub> concentration in a pistachio kernel of 1400 mg/kg. In Qatar, Abdulkadar et al. (Abdulkadar et al., 2000) reported an incidence of AF of 37 % with total AF level in the range of 0.53-289 µg/kg. Our results are in agreement with the above findings, thereby suggesting an urgent need to monitor levels of AF in pistachio available in Morocco.

However, a mycotoxin regulations project prepared by the Moroccan Interministerial Committee for Food Control and Frauds Repression (CIPCARF) is



under discussion (Zinedine et al., 2006). The project for mycotoxins regulations did not set limits for AF in dried fruits. This situation constitutes a very convenient problem and should spur Moroccan authorities (CIPCARF) to revise the proposed limits and also to introduce maximum levels especially for dried fruits since data reported in this work showed high AF content in some analyzed dried fruits samples that are above European limits.

#### **4.2.2.2. Occurrence of AF in cereal and poultry feed**

In Morocco, maize represents a staple food for population and animals, therefore bearing high social, economic and nutritional relevance. On average, Morocco consumes one million tons of maize each year. Morocco imports maize exclusively from United States and Argentina (ONICL, 2005). It was reported that 25% of cereals approximately consumed in the world are contaminated by mycotoxins especially AF (Devegowda et al., 1998). Maize is among the commodities with high risk of mycotoxin contamination, whilst other cereals like wheat are resistant or only moderately susceptible to mycotoxin contamination in the field. Fungal growth and toxin production in maize have been found to depend on several interacting factors that stress maize plants. Stress factors include low moisture content of the soil, high daytime maximum temperatures, high nighttime minimum temperatures, and nutrient-deficient (Abbas et al., 2002). Previous surveys from other countries have reported the occurrence of AF in maize and related products from Kenya (Ellis et al., 1991), Ghana (Kpodo et al., 2000), Iran (Yazdanpanah et al., 2001) and Benin (Hell et al., 2000).

The incidence of AF in maize and wheat flour samples from Morocco was respectively about 80 and 18 %. As shown in Table 4.23, the contamination of maize samples ranged between 0.23 and 11.2 ng/g for AFB<sub>1</sub>, while in wheat, the contamination ranged between 0.03 and 0.15 ng/g for AFB<sub>1</sub>. The highest level of

---

#### 4.2. Occurrence of mycotoxins

AFB<sub>1</sub> was detected in a sample of maize that was contaminated with 11.2 ng/g (Table 4.23). This level is over the maximum levels set by the EU regulations for AFB<sub>1</sub> in cereals (4 ng/g) and the maximum level (5 ng/g) fixed by Moroccan government regulations for AFB<sub>1</sub> in cereals (FAO, 2004).

In poultry feeds samples, as can be seen in Table 4.23, the percentage of contamination by AF is about 67 %. The contamination of poultry feeds samples ranged between 0.05 and 5.38 ng/g for AFB<sub>1</sub>. These values are below the maximum level (20 ng/g) set for AFB<sub>1</sub> by European and Moroccan regulations in poultry feeds (FAO, 2004).

The presence of moulds and mycotoxins in poultry feeds results in the raw materials used in their production (Lozada, 1995). In India, samples of poultry feeds were reported to be contaminated with aflatoxigenic *A. flavus* that only produced AFB<sub>1</sub> (Somashekar et al., 2004). In Spain, Moreno and Suarez (1986) reported the contamination of poultry feeds with *A. flavus* and *A. parasiticus* that produced AFB<sub>1</sub> and AFB<sub>2</sub>. Mixed poultry feeds from the Reunion Island presented a high total mould count reflecting the mould flora of raw materials, the most frequent and abundant fungi were *Aspergillus flavus* and *Penicillium spp.* (Bauduret, 1990). In Argentina, the identification of fungi isolated from poultry feeds showed that predominant species were *A. flavus*, *A. parasiticus*, *P. brevicompactum*, *P. purpurogenum* and *P. oxalicum*, only 10% of the strains produced all of the aflatoxins (Magnoli, 1998).

The worldwide contamination of poultry feeds with AF has been reported in Nigeria (Aletor, 1990), in Argentina (Dalcero et al., 1998) in Bangladesh (Dawlatana et al., 2002), in India (Thirumala-Devi et al., 2002) and in Turkey (Nizamlyoglu and Oguz, 2003). In a review on worldwide prevalence and preventive strategies of mycotoxins in pet food (Maxwell et al, 2006) has been concluded that

---

#### 4.3. Estimated daily intake of mycotoxins

the prevalence in pet food causes mortality and economic losses due to acute mycotoxicosis in extreme cases. Recently Binder et al. (2007) has evaluate mycotoxin incidence in poultry feed and impacts, and conclude that it is quite high in AF and other mycotoxins.

**Table 4.23.** Occurrence of aflatoxins in cereals and poultry feed from Morocco

Type of food	Incidence (%)	Range of aflatoxins (ng/g)			
		AFB <sub>1</sub>	AFB <sub>2</sub>	AFG <sub>1</sub>	AFG <sub>2</sub>
Maize	16/20 (80)	0.23 - 11.2	0.03 - 1.05	0.21-0.41	0.1-0.24
Wheat flour	3/17 (18)	0.03 - 0.15	ND	ND	ND
Poultry feed	14/21 (67)	0.05 - 5.38	0.03- 0.58	ND	ND

ND: Not detected (below the limit of quantification).

### 4.3. ESTIMATED DAILY INTAKE OF MYCOTOXINS

The danger posed by mycotoxins and their unavoidable presence in foods has led public authorities to adopt rigorous control policies. The overall scientific approach consists of combining exposure data from individuals or populations with toxicological data. In the estimation of the exposure levels the occurrence of a mycotoxin in a food and its dietary burden are taken into account.

On the basis of the available toxicological data and using the regional diets Global Environmental Monitoring System/Food Contamination Monitoring and Assessment Programme (GEMS/Food) (WHO, 1998), the Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) of the World Health Organization and of the Food and Agriculture Organization has recently evaluated the hazard for the most significant mycotoxins (OTA, fumonisins, deoxinivalenol, trichotecens, patulin and

---

#### *4.3. Estimated daily intake of mycotoxins*

zearalenone) and established the Provisional Maximum Tolerable Weekly Intake (PMTWI) and the Provisional Maximum Tolerable Daily Intake (PMTDI). A different approach was applied for AFB<sub>1</sub>, because it has carcinogenic properties, assuming that a no-effect concentration limit cannot be established for genotoxic compounds, any dose will have a proportional effect. Thus JECFA did not establish a PMTWI or PMTDI, but recommend that its level in food should be “As Low As Reasonably Achievable” (ALARA).

Data on mycotoxins exposure and/or risk assessment are available in the literature for OTA and different tolerable daily intakes (TDI) have been suggested over the last decade. In Europe, the presence of OTA in food has been regulated by the Joint Expert Committee on Food Additives since 1995, and a provisional tolerable weekly intake of 0.1 mg/kg bw (around 14 ng/kg bw/day) has been established. In 1996 the JECFA, on the basis of the nephrotoxicity of OTA, proposed a PTDI of 14 ng/kg bw (WHO, 1996). In 1998 the European Commission’s Scientific Committee on Food (SCFOO, 1998) recommended that it would be prudent to reduce exposure to OTA as much as possible, e.g. to below 5 ng/kg bw/day. These differences are also reflected in risk management measures established, resulting in variable legal limits applied to different commodities and to the same commodity in different countries (Walker, 2002). In any case, OTA risk assessments performed to date do not differentiate between risk to adults and children, which represent a particularly sensitive population that would need a specific TDI, especially in consideration of the unfavorable dose/bw ratio.

Overall, the worldwide scenario for potential mycotoxin contamination and consequent impact of human health is serious. Apart from peculiar regional circumstances, the overall situation is characterized by widespread contamination at low levels, leading to human health risks related to chronic exposure. Considering

---

### *4.3. Estimated daily intake of mycotoxins*

several factors such as: i) frequency and level of contamination; ii) relative importance of the food in a diet; and iii) available toxicological information, there are specific situation that should be noted. OTA should be monitored with the maximum attention. This is due to the fact that almost all foods and particularly many staple foods are contaminated by OTA, leading o potentially high total dietary intake. As regards, specific food categories, cereals should be first on a hypothetical “warning list” due to their worldwide dietary importance, the natural co-occurrence of almost all possible combinations of the main mycotoxins, and the frequently high levels of contamination.

The relationship between the foods levels of OTA or AFT and the dietary intake of these toxins have been thoroughly investigated. In the present work, the presence of OTA or AFT in food samples analyzed and their consumption were studied for estimated the daily intake of OTA or AFT with these foods.

To estimate the daily intake of OTA and AFT were used the levels founded of OTA or AFT (ng/g) in our analyzed food and the information about consumption available by Food and Agriculture Organization of the United Nations in its Internet site FAOSTAT <http://faostat.fao.org/site/346/DesktopDefault.aspx?PageID=346>, (consulted 12<sup>th</sup> of June of 2007).

#### **4.3.1. ESTIMATED DAILY INTAKE OF OCHRATOXIN A**

##### **4.3.1.1. Estimated daily intake of OTA in cereals**

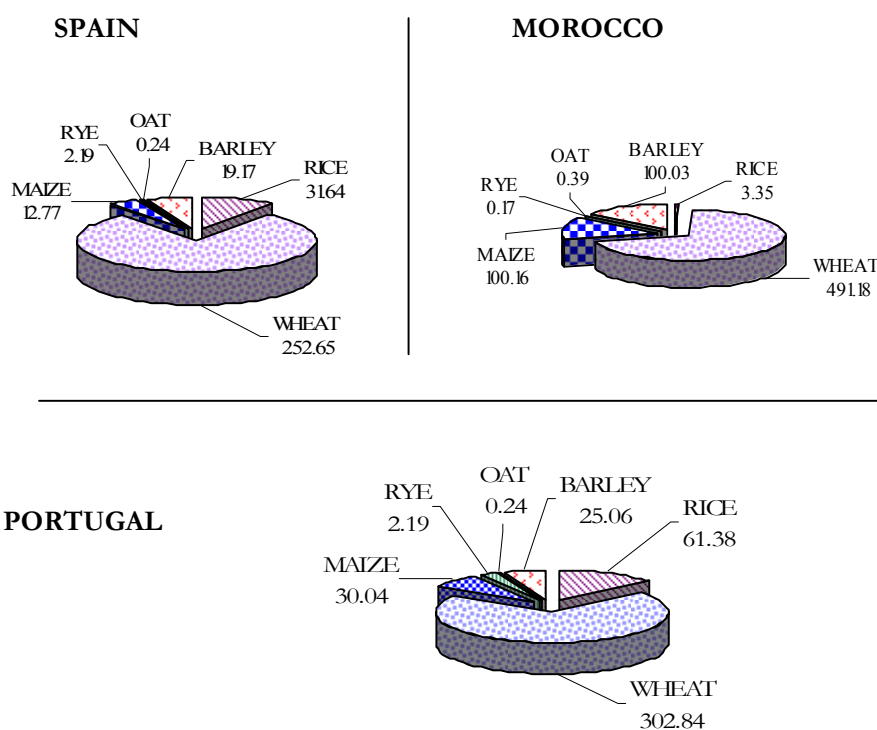
The consumption of cereals in 2005 estimated by FAOSTAT for Spain, Portugal and Morocco, is presented in Figure 4.16. Those values were used for calculated the daily intake of OTA consuming cereals.

---

### 4.3. Estimated daily intake of mycotoxins

---

#### CONSUMPTION OF CEREALS (g/capita/day) IN:



**Figure 4.16.** Consumption of cereals in Spain, Portugal and Morocco

According with the consumption, the estimated daily intake (EDI) of OTA for each cereal were ranged between 1.36 ng/kg bw/day in Portuguese wheat to 0.001 ng/kg bw/day in Portuguese oat. Whereas the daily intake of OTA in cereal was estimated in 0.34 ng/kg bw/day for Portugal and 0.73 ng/kg bw/day for Spain (Table 4.24). These values were considerably lower than the PTDI that are 14 ng OTA/kg b.w./day established by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA, 2001) and 5 ng OTA/kg b.w./day according to the

---

#### 4.3. Estimated daily intake of mycotoxins

Scientific Committee on Food of the European Commission (1996). While the evaluated levels were in the range estimated for Europe Members in TASK 3.2.7. (0.06 to 1.28 ng/kg bw/day) but inferior than the values obtained for Portugal and Spain which were 0.69 ng/kg bw/day and 0.85 ng/kg bw/day, respectively.

**Table 4.24.** EDI of OTA in analyzed cereals for Spain, Portugal and Morocco.

CEREAL	EDI of OTA (ng/kg bw/day)		
	SPAIN	PORTUGAL	MOROCCO
Wheat	0.42	1.36	-
Maize	0.028	0.40	-
Oat	n.d.	0.001	-
Barley	n.d.	n.d.	-
Rye	n.d.	1.185	-
Rice	0.56	0.69	0.024

According to Council Directive 93/5/ECC, the Member States of the European Union can co-operate with the Commission in the area of food, also indicates that an inventory of Tasks to be undertaken has to be published as a Commission Decision at least every six months. In 2002 the Task 3.2.7. (E.C., 2002) concerning the assessment of dietary intake of OTA by the population was completed and resulted in report EUR 17523 “*Assessment of dietary intake of Ochratoxin A by the population of EU Member States*”. In this report was presented results for wheat from Portugal and rice from Spain, but only the OTA level in Spanish maize was evaluated. For that the EDI of wheat and rice samples was compared with the

---

#### 4.3. Estimated daily intake of mycotoxins

estimated intake of OTA in Task 3.2.7., and was observed that all our results are higher than the presented in Task 3.2.7. (Table 4.25).

**Table 4.25.** Values of intake and mean of OTA obtained in our study and in TASK 3.2.7 (E.C., 2002).

CEREAL	ESTIMATED				TASK 3.2.7 (2002)			
	Intake of OTA (ng/kg bw/day)		Mean of OTA level in food (ng/g)		Intake of OTA (ng/kg bw/day)		Mean of OTA level in food (ng/g)	
	SP	PT	SP	PT	SP	PT	SP	PT
Wheat	0.42	1.36	0.1	0.27	-	0.69	-	0.19
Maize	0.028	0.40	0.13	0.80	-	-	0.25	-
Rice	0.56	0.69	1,07	0.68	0.08	-	0.25	-

##### 4.3.1.2. Estimated daily intake of OTA in bread

###### ▪ Bread from Portugal

According our results in bread samples collected at central zone of Portugal, OTA level mean was 0.44 ng/g. Assuming that the estimation of daily intake of bread in 1994, of Portuguese population, was 32 kg per person per year (Instituto Português do Consumidor, 2005) considering that, the estimated daily intake (EDI) of OTA with bread, for an adult whose body weighs is 60 kg reached, was 0.64 ng/kg bw/ day or 4.5 ng/ kg bw/ week. But in case of maize bread, its consumption represents a quarter of the total consumption of bread, maize bread consumption was 21.9 g/person/day. Therefore, the EDI of OTA for an adult in



---

#### *4.3. Estimated daily intake of mycotoxins*

average, 0.16 ng/kg bw/day or 1.12 ng/kg bw/ week. If the estimated is based with European values of bread intake, the levels obtained of EDI was 0.63 ng/kg bw/day or 4.4 ng/kg bw/week.

PTDI for OTA by the Scientific Committee on Food (SFC, 2003) of the European Union is 5 ng/kg bw/ day. That data was not overlapped by OTA mean levels in analyzed samples neither the most contaminated sample, representing 19.3%, respectively, of the PTDI reported by SFC. But in OTA contaminated samples was obtained 1 samples of bread with level superior of the maximum admissible levels by EC Regulation 123/2005 (E.C.R., 2005).

This value is also lower or next than values already reported in SCCOP reports for the population of EU member states, especially with wheat bread from Spain (0.77 ng/kg bw/day) (Miraglia and Brera, 2002).

#### ▪ **Bread from Morocco**

Also, daily intake of OTA from bread has never been estimated for Moroccan population. In this survey, the average contamination of analyzed bread with OTA was 13.06 ng/g. According to Chaoui et al. (2003), bread consumption in Morocco is estimated to 210.44 kg/year/person (i.e. 576.54 g/day/person). For an adult (60 kg body weights), the estimated daily intake of OTA from results of this study was 125.50 ng/kg bw/day. This value is 25 times higher than the PTDI set by the Scientific Committee for Food of the European Commission (5 ng/kg bw/day) (SFC, 1998) and 9 times higher than the value set by the FAO/WHO Committee of Experts on Food Additives (14 ng/kg bw/day) (JECFA, 2001). This value is also higher than values already reported in SCCOP reports for the population of EU member states, especially in wheat bread from Spain (0.77 ng/kg bw/day), bread and rolls in Germany and rye bread in Denmark being the estimated daily intake of,

---

#### 4.3. Estimated daily intake of mycotoxins

0.36-0.90 and 0.50 ng/kg bw/day, respectively (Miraglia and Brera, 2002). These results showed that Moroccan population is highly exposed to damage effects of OTA.

##### 4.3.1.3. Estimated daily intake of OTA in dried fruits

The consumption values provide by FAOSTAT from 2005 for dried fruits in Morocco, were used in the estimation of OTA daily intake. The results of EDI are presented in Table 4.26. These levels are lower than the PTDI proposed by JECFA or SFC.

**Table 4.26.** EDI of OTA with dried fruits in Morocco.

<b>SAMPLE</b>	<b>Consumption (g/capita/day)</b>	<b>EDI of OTA (ng/kg bw/day)</b>
Peanut	0.13	0.0015
Dried figs	4.92	0.0270
Dried raisins	n.d.	-
Walnut	0.68	0.0012
Pistachio	0.01	-

#### 4.3.2. ESTIMATED DAILY INTAKE OF AFLATOXINS

##### 4.3.2.1. Estimated daily intake of AF in dried fruits and cereals from Morocco

It was calculated for AFB<sub>1</sub> because it has carcinogenic properties and the JECFA recommend its level in food in ALARA (as low are reasonably achievable).

#### 4.3. Estimated daily intake of mycotoxins

The EDI of AFB<sub>1</sub> from analyzed samples is reported in Table 4.27. The results are calculated for all the number of each analyzed samples and with the maximum level of AFB<sub>1</sub>. The EDI of AFB<sub>1</sub> from the obtained maximum levels were alarming, especially for walnut and maize, this last is one cereal with high consumption in Morocco and is the principal poultry feed.

**Table 4.27.** EDI of AFB<sub>1</sub> calculated with the mean AFB<sub>1</sub> and the maximum levels of AFB<sub>1</sub> obtained with Moroccan samples.

Food commodity	Consumption (g/capita/day)	Mean AFB <sub>1</sub> (ng/g)	EDI of AFB <sub>1</sub> <sup>a</sup>	Maximum level of AFB <sub>1</sub> (ng/g)	EDI of AFB <sub>1</sub> <sup>b</sup>
Peanut	0.13	0.17	0.0004	0.17	0.0004
Dried figs	4.92	10.72	0.88	13.87	1.14
Dried raisins	n.d.	0.28	-	0.28	-
Walnut	0.68	359.30	4.07	2500.20	28.34
Pistachio	0.01	158.91	0.03	1426.43	0.24
Maize	100.16	5.70	9.52	11.20	18.69
Wheat flour	491.18	0.09	0.74	0.15	1.23

<sup>a</sup>: calculated with mean of AFB<sub>1</sub> obtained, (ng/kg bw/day);

<sup>b</sup>: calculated with maximum level of AFB<sub>1</sub> obtained, (ng/kg bw/day);

*4.3. Estimated daily intake of mycotoxins*

---

❖ **CONCLUSIONES** ❖

*Conclusiones*

---

## 5. CONCLUSIONES

**1.-** Del estudio comparativo entre la extracción sólido-líquido, la dispersión de matriz en fase sólida y la extracción líquida presurizada, para la extracción de ocratoxina A en diferentes cereales y derivados, la extracción líquida presurizada ha proporcionado los resultados más exactos, precisos y reproducibles, al tratarse de una técnica automática y favorecer el contacto del disolvente con la matriz.

**2.-** Todos los métodos estudiados para la determinación de ocratoxina A en muestras de cereales y frutos secos mediante cromatografía líquida acoplada a detección de fluorescencia y a espectrometría de masas previa extracción sólido-líquido, extracción líquida presurizada y dispersión de matriz en fase sólida, son adecuados para el análisis de control de micotoxinas, dado que proporcionan límites de cuantificación inferiores a los niveles máximos (LMs) establecidos en la legislación europea.

**3.-** La confirmación de la ocratoxina A por espectrometría de masas de triple cuadrupolo proporciona resultados más selectivos que los obtenidos por detección fluorimétrica previa obtención del derivado metilado de la ocratoxina A, lo que permite acortar el tiempo de análisis, al no ser necesario efectuar derivatizaciones, y economizar el coste del análisis, al no requerir purificaciones basadas en reacciones antígeno-anticuerpo. Por el contrario, la sensibilidad es ligeramente superior con la detección de fluorescencia.

**4.-** La incidencia de ocratoxina A en arroz ha sido del 13 % para las muestras procedentes de Portugal, 14 % para las de España y 39 % para las de Marruecos. En las muestras de pan analizadas esta incidencia ha sido del 40.9 %

---

## 5. Conclusiones

para las procedentes de Portugal y un 48 % para las de Marruecos. Y por último, en los frutos secos procedentes de Marruecos, se ha obtenido una incidencia del 31 %.

**5.-** La mayoría de las concentraciones de ocratoxina A encontradas en las muestras positivas procedentes de España y Portugal no superan los LMs por la Unión Europea, salvo una harina de trigo de cultivo ecológico procedente de Portugal y una harina de centeno integral de cultivo ecológico procedente de España. Sin embargo, 26 muestras de pan procedentes de Marruecos, sobre un total de 100, sobrepasan dichos límites. Mientras que, ninguna de las muestras positivas de frutos secos procedentes de Marruecos superan el LM.

**6.-** La incidencia de aflatoxinas en cereales, frutos secos y piensos comercializados en Marruecos es del 51, 26 y 67 %, respectivamente. De ellas, la aflatoxina B<sub>1</sub> es la que se presenta en mayor número de muestras y a mayores concentraciones.

**7.-** Las concentraciones de aflatoxinas en cereales, frutos secos y piensos comercializados en Marruecos oscilan entre 0.03-11.2, 0.17-4319 y 0.05-5.38 µg/kg, respectivamente. Las que han superado los LMs son 12 muestras de frutos secos de un total de 100 y 1 de maíz en grano, mientras que ningún pienso los ha sobrepasado.

**8.-** Las ingestas diarias estimadas de ocratoxina A por el consumo de los alimentos analizados son: 1 ng/kg pc/día para España, 4.27 ng/kg pc/día para Portugal y 125.5 ng/kg pc/día para Marruecos. Por lo que en el caso de Marruecos se supera la ingesta diaria tolerable de 5 ng/kg pc/día, fijada por el Comité Científico para la Alimentación de la Unión Europea.



**9.-** La ingesta diaria estimada de aflatoxinas para la población de Marruecos es de 15.22 ng/kg pc/día, por lo que excede el valor de 1 ng/kg pc/día que ha establecido el Comité Científico para la Alimentación de la Unión Europea como mínima dosis a la que existe riesgo de padecer cáncer de hígado.

❖ **BIBLIOGRAFÍA** ❖



---

*Bibliografía*

- Abarca M.L., Accensi F., Bragulat M.R. Castella G., Cabañes F.J. 2003. *J. Food Prot.* 66: 504-506.
- Abbas, H.K., Williams, W.P., Windham, G.L., Pringle, H.C., Xie, W., Shier, W.T. 2002. *J. Agric. Food Chem.* 50: 5246-5254.
- Abdel-Hafez, A.I., Saber, S.M. 1993. *Zentralblatt fur Mikrobiologie* 148: 137-147.
- Abdelhamid A.M. 1990. *Arch. Anim. Nutr.* 40: 647-664.
- Abdulkadar A.H.W., Al-Ali A., Al-Jedah J. 2000. *Food Control.* 11: 157-160.
- Abid S., Hassen W., Achour A., Skhiri H., Maaroufi K., Ellouz F., Creppy E., Bacha H. 2003. *Hum. Exp. Toxicol.* 22: 77-84.
- Abramson D., Thorsteinson T., Forest D. 1989. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 18: 327-330.
- Aletor V.A. 1990. *Food Chem.* 37: 145-153.
- Anselme M., Tangni E. K., Pussemier L., Motte J.-C., Van Hove F., Schneider Y.-J., Van Peteghem C., Larondelle Y. 2006. *Food Addit. Contam.* 23: 910-918.
- Antón A. y Lizaso J. 2001. *Hongos y Micotoxinas*. Ed. Fundación Ibérica para la Seguridad Alimentaria. Madrid.
- AOAC International. 1995. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. P. Cunniff (Ed.). Vol II. Chapter:49. Arlington, V. pp 1-49.
- Arbillaga L., Ezpeleta O., López de Cerain A. 2004. *Toxicología.* 21: 1-10.
- Aresta A., Cioffi N., Palmisano F., Zambonin C.G. 2003. *J. Agric. Food Chem.* 51: 5232-5237.
- Arroyo M., Aldred D., Magan N. 2005. *Int. J. Food Microbiol.* 98: 223-231.
- Asoa T., Büchi G., Abdel-Kader M.M., Chang S.B., Wick E.L., Wogan G.N. 1963. *J. Am. Chem. Soc.* 85: 1706-1707.
- Austwick P.K.C. 1975. *Proceedings of the Royal Society of Medicine.* 68: 219-221.
- Ayalew A., Fehrmann H., Lepschy J., Beck R., Abate D. 2006. *Mycopathology.* 162: 57-63.
- Bacon C.W, Robbins J.D., Burdick D. 1975. *Appl. Microbiol.* 29: 317-322.

- Battilani P., Giorni P., Pietri A. 2003. *Eur J. Plant Pathol.* 109: 715-722.
- Bauduret, P. 1990. *Mycopathology.* 109: 157-164.
- Bayman P., Baker J.L., Doster M.A., Michailides T.J., Mahoney N.E. 2002. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2326-2329.
- Bendele A.M., Carlton W.W., Krogh E.B., Lillehoj E.B. 1985. *J. Natl. Cancer Inst.* 75: 733-742.
- Benford D; Boyle C; Dekant W., Fuchs R., Gaylor D.W., Hard, G., McGregor D.B., Pitt D.B., Plestina J.I., Shepard R., Solfrizzo G., Verger M., Walker R. 2001. *Ochratoxin A, The Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food.* In: *Fifty-sixth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)* Food and Agriculture Organization. Rome. pp. 281-320.
- Berente B., Móricz A., H.-Otta K., Záray G., Lékó L., Rác L. 2005. *Microchem J.* 79: 103-107.
- Beretta B., De Domenico R., Gaiaschi A., Ballabio C., Galli CL., Gigliotti C., Restani P. 2002. *Food Addit. Contam.* 19: 70-75.
- Biffi R., Munari M., Dioguardi L., Ballabio C., Cattaneo A., Galli C.L., Restani P. 2004. *Food Addit. Contam.* 21: 586-591.
- Bilgrami K.S., Choudhary A.K. 1998. *Mycotoxins in preharvest contamination of agricultural crops.* In: *Agriculture and food safety mycotoxins.* Sinha K. K. and Bhatnagar D. (Ed.). New York. pp. 1-43.
- Binder E.M., Tan L.M., Chin L.J., Hanld J., Richard J. 2007. *Anim. Feed Sci. Technol.* 137: 265-282.
- Blesa J., Berrada H., Soriano J.M., Moltó J.C., Mañes J. 2004a. *J. Chromatogr. A.* 1046: 127-131.
- Blesa J., Soriano J.M., Moltó J.C., Mañes J. 2004b. *Food Addit. Contam.* 21: 165-171.
- Blesa J., Soriano J.M., Moltó J.C., Mañes J. 2004c. *Int. J. Food Microbiol.* 97: 221-225.
- Blesa J., Soriano J.M., Moltó J.C., Marin R., Mañes J. 2003. *J. Chromatogr. A.* 1011: 49-54.

---

*Bibliografía*

- Boorman G.A., McDonald M.R., Imoto S., Persing R. 1992. *Toxicol. Pathol.* 20: 236-245.
- Brera C., Caputi R., Miraglia M., Lavicoli I., Salerno A., Carelli, G. 2002. *Microchem. J.* 73: 167-173.
- Briones-Reyes D., Gómez-Martínez L., Cueva-Rolón R. 2007. *Food Chem.* 100: 693-698.
- Cabañes F.J., Accensi F., Bragulat M.R., Abarca M.L., Castella G., Mínguez S., Pons,A. 2002. *Int. J. Food Microbiol.* 79: 213-215.
- Carlile M.J., Watkinson S.C., Gooday G.W. 2001. *The fungi.* John Wiley and Sons. (Ed.). Academia Press. London.
- Carrillo L. 2003. *Micotoxinas.* Disponible en: [www.unsa.edu.ar/matbib/micragri/micagricap6.pdf](http://www.unsa.edu.ar/matbib/micragri/micagricap6.pdf) (consultado el 15 de julio de 2007).
- Castegnaro M., Mohr U., Pfohl-Leszkowicz A., Esteve J., Steinmann J., Tillmann T., Michelon J., Bartsch H. 1998. *Int. J. Cancer.* 77: 70-75.
- Castegnaro M., Plestina R., Dirheimer G., Chernozemsky I.N., Bartsch H. 1991. *Pharmacokinetics of ochratoxin A in animals.* In: *Mycotoxins, endemic nephropathy and urinary tract tumours.* Galtier P. (Ed.) IARC. Lyon. pp. 187-200.
- Cavaliere C., Foglia P., Guarino C., Nazzari M., Samperi R., Laganà A. 2007. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21: 550-556.
- Chun H.S., Kim H.J., Ok H.E., Hwang J.B., Chung D.H. 2007. *Food Chem.* 102: 385-391.
- COM(2003) 14 –C5-0021/2003 – 2003/0002(CNS). European Parliament legislative resolution: *Council Regulation amending (EC) 2092/91/ 1991. Off. J. Eur. Communities.* L 198. 1. [ww.europarl.europa.eu/sides/getDoc.do?pubRef=-//EP//NONSGML+TA+P5-TA-2003-0545+0+DOC+PDF+V0//EN](http://www.europarl.europa.eu/sides/getDoc.do?pubRef=-//EP//NONSGML+TA+P5-TA-2003-0545+0+DOC+PDF+V0//EN) - (consult on June of 2007).

- Comité Europeo de Normalización. 1999. *Food Analysis-Biotoxins-criteria of analytical methods of mycotoxins*. CEN Report CR 13505, Bruselas.
- Commission Directive 2002/26/CE of 13 March 2002. *Off. J. Eur. Communities*. L 075, 0038-0043.
- Commission Directive 2006/1881/CE of 19 December 2006. *Off. J. Eur. Communities*. L 364, 5-24.
- Council Directive 93/5/CEE, of 4 March 1993. *Off. J. Eur. Communities*. L 52, p. 18.
- Corred W.P. and Riley R.T. 1999. *Food Nutr. Agric.* 23: 25-32.
- Council Regulation (EC) N° 466/2001 of 30 November 2001. *Off. J. Eur. Communities*. L 313, 60-69.
- Commission Recommendation 2006/576/CE of 17 August 2006. *Off. J. Eur. Communities*. L 229, 7-9.
- Creppy EE. 1999. *J. Toxicol.-Toxin Rev.* 18: 277-293.
- Czerwiecki L., Czajkowska D., Witkowska-Gwiazdowska A. 2002b. *Food Addit. Contam.* 19: 470-477.
- Czerwiecki L., Czajkowska D., Witkowska-Gwiazdowska A. 2002a. *Food Addit. Contam.* 19: 1051-1057.
- Dalcero A., Magnoli C., Luna M., Ancasi G., Reynoso M.M., Chiacchiera S., Miazzo R., Palacio G., 1998. *Mycopathologia.* 141: 37-43.
- Dawlatana M., Coker R.D., Nagler M.J., Wild C.P., Hassan M.S., Blunden G., 2002. *J. Nat. Tox.* 11: 379-86.
- De Groene E.M., Hassing I.G., Blom M.J., Seinen W., Fink-Gremmels J., Horbach G.J. 1996. *Cancer Res.* 56: 299-304.
- Devegowda G., Raju M.V.L.N., Swang H.V.L.N. 1998. *Feedstuffs.* 70: 12-15.
- Di Paolo N., Guarnieri A., Garosi G., Sacchi G., Mangiarotti AM., Di Paolo M. 1994. *Nephrol. Dial. Transpl.* 9: 116-120.
- Díaz G. 2005. Micotoxinas y micotoxicosis. *IX Congreso Nacional de Avicultura. Federación Nacional de Avicultura (FENAV).*

---

## *Bibliografía*

- Dionex Corp. 1997. *ASE 200, Accelerated Solvent Extractor Operator's Manual*. Document 031149. Sunnyvale.
- Directiva 2005/5/CE de la Comisión, de 26 de enero de 2005, por la que se modifica la Directiva 2002/26/CE con respecto a los métodos de toma de muestras y de análisis para el control oficial del contenido de ocratoxina A en determinados productos alimenticios. DOUE L27 de 29.01.2005, p.38-40.
- Directiva 98/53/CE de la Comisión, de 16 de julio de 1998 por la que se fijan métodos de toma de muestras y de análisis para el control oficial del contenido máximo de algunos contaminantes en los productos alimenticios. DOUE L201 de 17.07.1998, p.93-101.
- Dirheimer G., Creppy E.E. 1991. *LARC Sci. Publ.* 115: 171-186.
- E.C. 2002. European Commission SCOOP, task 3.2.7. Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU Member States. European Commission, Directorate-General Health and Consumer Protection, Reports on tasks for scientific cooperation. January 2002. [http://europa.eu.int/comm/food/fs/scoop/3.2.7\\_en.pdf](http://europa.eu.int/comm/food/fs/scoop/3.2.7_en.pdf). (consult on April 2007).
- E.C.D. 2002 a. European Commission Directive N° 2002/26/EC of 13 March 2002 laying down the sampling methods and the methods of analysis for the official control of the levels of ochratoxin A in foodstuffs. *Off. J. Eur. Comm.* L 75: 38.
- E.C.D. 2002 b. European Commission Directive, N° 2002/27/EC of 13 March 2002 amending Directive 98/53/EC laying down the sampling methods and the method of analysis for the official control of the levels for certain contaminants in foodstuffs. *Off. J. Eur. Comm.* L75: 44-45.
- E.C.D. 2006. European Communities Regulation N° 401/2006 of 23 February 2006 the sampling methods and the method of análisis for the oficial control of the levels for mycotoxins in foodstuffs. *Off. J. Eur. Comm.* L70: 12.



- E.C.R. 2002. European Communities Regulation N° 472/2002 of March 16, 2002 amending Regulation 466/2001. *Off. J. Eur. Comm.* L75 of p.18-20.
- E.C.R. 2005. Commission European Regulation N° 123/2005 of 26 January 2005 amending regulation (EC) N° 466/2001 as regards ochratoxin A. *Off. J. Eur. Comm.* L25: 3-5.
- Eaton D.L., Gallagher E.P. 1994. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 34: 135-170.
- El Adlouni C., Pinelli E., Azemar B., Zaoui D., Beaune P., Pfohl-Leszkowicz A. 2000. *Environ. Mol. Mutag.* 35: 123-131.
- Ellis W.O., Smith J.P., Simpson B.K., Oldman J.H. 1991. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 30: 403-439.
- Elmholt S., Rasmussen P.H. 2005. *Mycopathologia* 159: 421-432.
- Engel G. 2000. *Archive für Lebensmittelhygiene* 51: 98-101.
- European Commission-Scientific Committee on Food. 1996. Opinion on aflatoxinas, ochratoxin A and Patulin-expressed on 23 September 1994. *Reports of the Scientific Committee on Food- 35° Series.*
- FAO (Food and Agriculture Organization). 1997. World wide regulations for mycotoxins. Volumen 64. Food and Nutrition Paper Rome.
- FAO. 2003. Manual sobre la aplicación del Sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC) en la prevención y control de las micotoxinas. Estudio FAO Alimentación y Nutrición, N° 73, Roma.
- FAO. 2004. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. FAO Food and Nutrition paper 81. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome. ([www.fao.org/docrep/fao/007/y5499s/y5499s00.pdf](http://www.fao.org/docrep/fao/007/y5499s/y5499s00.pdf))
- FAO/ITC/CTA. 2001 (World Markets for Organic fruits and Vegetables) Organic food and beverage: world supply and major European markets (UNCTAD/WTO International Trade Centre, 1999). Available, [www.fao.org/organicag/fap-e.htm](http://www.fao.org/organicag/fap-e.htm) (consult on March of 2007)

---

*Bibliografía*

- FAOSTAT. 2005. <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> (consulted in February of 2007)
- Faucet V., Pfohl-Leszkowicz A., Dai J., Castegnaro M., Manderville RA. 2004. *Chem. Res. Toxicol.* 17: 1289-1296.
- Finamore A., Serena M., Britti M.R., Bellovino D., Gaetani S., Mengheri E. 2004. *J. Agric. Food Chem.* 52: 7425-7431.
- Food and Drug Administration (FDA). 1978. *Assessment of estimated risk resulting from aflatoxins in consumerpeanut products and other food commodities*. Washington, DC.
- Food and Drug Control Labs (FDCL). 2002. *The situation of aflatoxin contamination in pistachio during March 2001-March 2002*. Iranian Ministry of Health and Medical Education.
- Frisvald J.C., Samson A. 1991. *Mycotoxins produced by species of Penicillium and Aspergillus occurring in cereals*. In: *Cereal Grain*. Chelkowski, J. (Ed.) Elsevier Science Publishers: Amsterdam. pp. 441-476.
- Fuchs E., Binder E.M., Heindler D., Krska R. 2002. *Food Addit. Contam.* 19: 379-86.
- Fuller G., Spooncer W.W., King A.D., Schade J., Mackey B. 1977. *JAOCS.* 54: 231-234.
- Galtier P. 1999. *J. Toxicol.-Tox. Rev.* 18: 295-312.
- Gan J., Papiernik S.K., Koskinen W.C., Yates S.D. 1999. *Environ. Sci. Technol.* 33: 3249-3253.
- Garcia V.V. 1989. *Trends in Food Product Development*. Ed. T. C. Yam & C. Tan. Singapore Institute of Food Science and Technology. Singapore. pp. 21-26.
- Garcis M., Scheuer T., Ehrhardt S. 2000. *Mitteilungsblatt derbundesanstalt fuer fleischforschung kulmbach* 39: 707-715.
- Gautier J., Richoz J., Welti D.H., Markovic J., Gremaud E., Guengerich F.P., Turesky R.J. 2001. *Chem. Res. Toxicol.* 14: 34-35.

- Giergielewicz-Mozajska H.; Da Browski L., Namiesnik J. 2001. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 31: 149-165.
- Gillman I.G., Clark T.N., Manderville R.A. 1999. *Chem. Res. Toxicol.* 12: 1066-1076.
- Godin M., Fillastre J.P., Simon P., François A., Le Roy F., Morin J.P. 1997. *Adv. Nephrol.* 26: 181-205.
- González L., Juan C., Soriano J.M., Moltó J.C., Mañes J. 2006a. *Int. J. Food Microbiol.* 107: 223-227.
- González-Osnaya L., Soriano J.M., Moltó J.C., Mañes J. 2006b. *J. Chromatogr. A.* 1113: 32-36.
- Gorelich N.J. 1990. *Risk Anal.* 10: 539-559.
- Goryacheva I.Y., De Saeger S., Delmulle B. 2007. *Anal. Chim. Acta.* 590: 118-124.
- Goto T., Wicklow D.T., Ito Y. 1996. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4036-4038.
- Grosso F., Saïd S., Mabrouk I., Fremy J.M., Castegnaro M., Jemmali M., Dragacci S. 2003. *Food Chem. Toxicol.* 41: 1133-1140.
- Gross-Steinmeyer K., Weymann J., Hege H.G., Metzler M. 2002. *J. Agric. Food Chem.* 50: 938-945.
- Ha Y.L., Kim M.C., Kim J.O., Sim K.W. 1979. *Korean J. Appl. Microbiol. Bioengineer.* 7: 15-21.
- Hagelberg S., Hule K., Fusch R. 1989. *J. Appl. Toxicol.* 9: 91-96.
- Hald B., Wood G. M., Boenke A., Schurer B., Finglas P. 1993. *Food Addit. Contam.* 2: 185-207.
- Haydar M., Benelli L., Brera C. 1990. *Food Chem.* 37: 261-268.
- Heemken O. P., Theobald N., Wenclawiak, B. W. 1997. *Anal. Chem.* 69: 2171-2180.
- Hell K., Cardwell K.F., Stamou M., Poehling H.M. 2000. *J. Stor. Prod. Research* 36: 365-382.
- Hoehler D., Marquardt R.R., McIntosh A.R., Hatch G.M. 1997. *Biochim. Biophys. Acta.* 1357: 225-233.

---

*Bibliografia*

- Hu Y.Y., Zheng P., Zhang Z.X., He Y.Z. 2006. *J. Agric. Food Chem.* 54: 4126-4130
- IACA. Associação Portuguesa dos Industriais de Alimentos Compostos para Animais. 2004. Available in <http://www.iaca.pt/index.jsp?page=noticias&id=74> (consult on November of 2006)
- Iamanaka. B.T, Menezes, C.H., Vicente. E, Leite., R.S.F, Taniwaki. M.H. 2005. *Food Addit Contam.* 22: 1258-63.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). 1993. In “IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Some Naturally Occurring Substances; Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins”. 56: 489. IARC (Ed). Geneve.
- IARC. 2002. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans: Some traditionally herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. Lyon. Vol. 82.
- IARC. 2006. Internacional Agency for Research on Cancer (Available in: <http://www.iarc.fr>- consult on July of 2006)
- Imanaka B.T., Taniwaki M.H., Menezes H.C., Vicente E., Fungaro M.H.P. 2005. *Food Addit. Contam.* 22: 1258-1263.
- Instituto Português do Consumidor. 2005. Available at [http://www.consumidor.pt/loja\\_novo/includes/content/pao\\_inf\\_comp.inc](http://www.consumidor.pt/loja_novo/includes/content/pao_inf_comp.inc). [consult on 8.11.2005].
- JECFA. 2001. Safety evaluation of certain mycotoxins in food. Prepared by the Fifty-sixth Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Food Additives Series N°. 47. Geneva.
- Jiao Y., Blas W., Rühl C., Weber R. 1992. *J. Chromatogr. A.* 595: 364-367.
- Jiménez A.M., López de Cerain A., González-Peñas E., Bello J. 1999. *Chromatographia* 58: 457-60.
- Jorgensen K. 2005. *Food Addit. Contam.* (supp 1): 26-30.

- Jorgensen K., Jacobsen J.S. 2002. *Food Addit. Contam.* 19: 1184-1189.
- Juan C., González L., Soriano J.M., Moltó J.C., Mañes J. 2005. *J Agric Food Chem.* 53: 9348-9351.
- Juan C., Lino C. M., Pena A., Moltó J. C., Mañes J., Silveira I. 2007a. *Talanta* 73: 246-250.
- Juan C., Zinedine A., Sekhra Y., Mañes J. 2007b. *Microchem. J.* 87: 154-158.
- Juan C., Burdaspal P., Soriano J.M. 2007c. *Aflatoxinas del grupo B y G*. En: *Micotoxinas en Alimentos*. Soriano del Castillo, J.M. (Ed.) Díaz de Santos. Madrid. pp. 167-181.
- Juan C., Moltó J.C., Lino C.M., Mañes J. 2008. *Food Chem.* 107: 525-530.
- Karaca H., Nas S. 2006. *Food Addit. Contam.* 23: 502-508.
- Kpodo K., Thrane U., Hald B. 2000. *Int. J. Food Microbiol.* 61: 147-157.
- Krska R. 1998. *J. Chromatogr. A* 815: 49-57.
- Krska R., Welzig E., Berthiller F., Molinelli A., Mizaikoff B. 2005. *Food Addit. Contam.* 22: 345-353.
- Kuiper-Goodman T. 1998. *Mycotoxins and phycotoxins developments in chemistry, toxicology and food safety*. Oxford: International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). pp 25-48.
- Kuiper-Goodman T., Scott P.M. 1989. *Biomed. Environ. Sci.* 2: 179-248.
- Kurtzman C. P., Horn B. W., Hesseltine C. W. 1987. *Antonie van Leeuwenhoe.* 53: 147-158.
- Labuda R., Parich A., Vekiru E., Tancinova D. 2005. *Ann. Agric. Environ. Med.* 12: 81-86.
- Lacey J. 1991. *Mycotoxins and Animal Foods*. Smith, J.E. and Henderson, R.S. (Ed.). London. pp. 363-397.
- Lagana A., Bacaloni A., Castellano M., Curini R., De Leva I., Faberi A., Materazzi S. 2003. *J. AOAC Int.* 86: 729-736.

---

*Bibliografía*

- Lau B.P.Y.; Scott P.M.; Lewis D.A., Kanhere S.R. 2000. *J. Mass Spectrom.* 35: 23-32.
- Leblanc J.C., Tard A., Volatier J.L., Verger P. 2005. *Food Addit. Contam.* 22: 652-672.
- Lebrun M.H., Gaudemer F., Boutar M., Nicolas L., Gaudemer A. 1989. *J. Chromatogr.* 464: 307-322.
- Legarda T.M., Burdaspal P.A. 2001. *Alimentaria* 321: 89-96
- Leong S.L., Hocking A.D., Pitt J.I. 2004. *AJGWR.* 10: 83-88.
- Lindenfelser L.A., Ciegler A., Hesseltine C.W. 1978. *Appl. Environ. Microbiol.* 35: 105-108.
- Lino C.M., Silva L.J.G., Pena A., Fernández M., Mañes J. 2007. *Inter. J. Food Microbiol.* 118: 79-82.
- Lohr L. 2001. *Changing Structure of Global Food Consumption and Trade.* Ed. Regmi, A. USDA/Economic Research Service: Washington, DC. pp 67-79.
- Lombaert G.A, Pellaers P., Neumann G., Kitchen D., Huzel V., Trelka R., Kotello S., Scott PM. 2004. *Food Addit. Contam.* 21: 578-585.
- Lombaert G.A., Pellaers P., Roscoe V., Mankotia M., Neil R. and Scott PM. 2003. *Food Addit. Contam.* 20: 494-504.
- López de Cerain A., Soriano J.M. 2007. *Ocratoxina A.* En: *Micotoxinas en Alimentos.* Soriano del Castillo, J.M. (Ed.) Díaz de Santos. Madrid. pp. 201-222.
- Lou X.W., Janssen H.G., Cramers C.A. 1997. *Anal. Chem.* 69: 1598-1603.
- Lozada A.F. 1995. *Food Addit. Contam.* 3: 509-514.
- Maaroufi K., Achour A., Hammami M., el May M., Betbeder AM., Ellouz F., Creppy EE., Bacha, H. 1995. *Hum. Exp. Toxicol.* 14: 609-615.
- MacDonald S., Wilson P., Barnes K., Damant A., Massey R., Mortby E., Shepherd M.J. 1999. *Food Addit. Contam.* 16: 253-260.
- MacDonald T.J., Prickett K., Wildey B., Chan D. 2004. *Food Addit. Contam.* 21: 172-181.
- MAFF, 1997. Ministry of Agriculture Fisheries and Food. Iranian pistachio nuts imports suspended. *Food Safety Inform. Bull.* 89, 1.

- Magan N., Aldred D. 2005. *Food Addit. Contam.* 22: 10-16.
- Magan N., Hope R., Cairns V., Aldred D. 2003. *Eur. J. Plant Pathol.* 109: 723-730.
- Magkos F., Arvaniti F., Zampelas A. 2006. *Critical Rev. Food Sci. Nutrition* 46: 23-56.
- Magnoli C. 1998. *Mycopathologia.* 142: 27-32.
- Mannon J., Johnson E. 1985. *New Scientist.* 105: 12-16.
- Maragos C.M., Bennett G.A., Richard J.L. 1996. *Analysis of fumonisin B<sub>1</sub> in corn by capillary electrophoresis.* In: *Fumonisin in Food.* Jackson, L. et al. (Eds.) New York. pp. 105-112.
- Marquardt R.R., Frohlich A.A. 1992. *J. Anim. Sci.* 70: 3968-3988.
- Maxwell C.C., Leung G., Trevor K.S. 2006. *J. Agric. Food Chem.* 54: 9623-9635.
- Mazzani C. 1988. *Fitopatología Venezolana.* 1: 54-58.
- Medina A., Mateo R., Lopez-Ocana L., Valle-Algarra F.M., Jiménez M. 2005. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 4696-4702.
- Medina A., González G., Sáez J.M., Mateo R., Jiménez, M. 2004. *System. Appl. Microbiol.* 27: 261-267.
- Mheen T.I., Cheigh H.S., Ragunathan A.N., Majunder K.S. 1982. *J. Appl. Microbiol. Bioengineer.* 10: 191-196.
- Micco C., Grossi M., Miraglia M., Brera C. 1989. *Food Addit. Contam.* 6: 333-339.
- Milanez T., Valente-Soares L., Baptista G. 2006. *Food Control* 17: 293-298.
- Miller J.D. 1991. Fungi and Mycotoxins in Stored Products. Ed. Champ, B.R., Highley, E., Hocking, A.D. and Pitt, J.I. ACIAR Proceedings N° 36. Canberra. pp 126-135.
- Miraglia M., Brera C. 2002. Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU member states. Reports on tasks for scientific cooperation. Reports of experts participating in SCOOP Task 3.2.7. Directorate-General Health and Consumer Protection, Rome. [http://europa.eu.int/comm/food/fs/scoop/3.2.7\\_en.pdf](http://europa.eu.int/comm/food/fs/scoop/3.2.7_en.pdf). (consult on September, 2005.)

- Moreno R.M.M., Suarez F.G.S. 1986. *Mycopathologia*. 95: 29-32.
- Moss M.O. 2002. *Int. Biodeterm. Biodegrad.* 50: 137-142.
- Mphande F.A., Siame B.A., Taylor J.E. 2004. *J. Food Prot.* 67: 96-102.
- Neal G.F. 1998. *Rev. Med. Vet.* 149: 555-560.
- Nizamlyoglu F., Oguz H. 2003. *Food Addit. Contam.* 20: 654-658.
- O'Brien E., Dietrich D.R. 2005. *Crit. Rev. Toxicol.* 35: 33-60.
- Obrecht-Pflumio S., Dirheimer G. 2000. *Chem. Biol. Interactions.* 127: 29-44.
- ONICL (Office National Interprofessionnel des Cereales et Legumineuses), 2005.  
*Importations des quatre céréales principales au Maroc.* Bulletin d'information sur le marché des céréales et des légumineuses: Situation au 31 Octobre 2005. Maroc.
- Orden SCO/2797/2004, de 28 de julio de 2004 por la que se modifican los anexos I y II del RD 90/2001. BOE 18.08.2004, p.29312-29313.
- Orden SCO/388/2003, de 25 de febrero de 2003, por la que se modifican los anexos I y II del RD 90/2001. BOE de 27.02.2003, p.7839-7840
- Orden SCO/4226/2004, de 16 de diciembre de 2004, por la que se modifican los anexos del RD 90/2001. BOE 28.12.2004, p.42047-42048.
- Ostry V., Ruprich J., Skarkova J., Prochazkova I., Kubatova A. 2002. *Mycotoxin Research.* 18: 193-197.
- Özay G., Aran N., Pala M. 1995. *Die Nahrung.* 39: 156-165.
- Pagliuca G., Zironi E., Ceccolini A., Matera R., Serrazanetti G., Piva A. 2005. *J. Chromatogr.* 819: 97-103.
- Pallaroni L., Von Holst C. 2003. *Anal. Bioanal. Chem.* 376: 908-912.
- Pallaroni L., Von Holst C., Eskilsson S., Bjorklund E. 2002. *Anal. Bioanal. Chem.* 374: 161-166.
- Park D.L, Njapau H. 1989. *JAOCS.* 66: 1402-1405.
- Park J.W., Choi S.Y., Hwang H.J., Kim Y.B. 2005. *Int. J. Food Microbiol.* 103: 305-314.



- Pena A., Cerejo F., Lino C., Silveira I. 2005. *Anal. Bioanal. Chem.* 382: 1288-1293.
- Pena R., Alcaraz M.C., Arce L., Ríos A., Valcárcel M. 2002. *J. Chromatogr. A* 967: 303-314.
- Peraica M., Radic B., Lucic A., Pavlovic M. 1999. *Bull. WHO.* 9: 754-766.
- Pestka J.J., Casale W.L., Nriagu J.O., Simmons M.S. 1990. *Adv. Environ. Sci. Tech.* 23: 613-38.
- Pfohl-Leszkowicz A., Chakor K., Creppy E.E., Dirheimer G. 1991. *IARC Science Publication.* 115: pp. 245-253.
- Pitt J.I., Hocking A.D. 1997. *Fungi and food spoilage.* Blackie Academic and Professional. London.
- Ramos A.J., Sanchis V., Marín S. 2007. *Aspectos legislativos de las micotoxinas y normativa vigente.* En: *Micotoxinas en Alimentos.* Soriano del Castillo, J.M. (Ed.) Díaz de Santos. Madrid. pp. 133-163.
- Rao G.H., Anders M.W. 1973. *J. Chromatogr.* 84: 402-406.
- Real Decreto 294/2003, de 7 de marzo de 2003, por el que se establecen los métodos de toma de muestras y de análisis para el control oficial del contenido de ocratoxina A en cereales y uvas pasas. BOE de 11.03.2003, p.9482-9485.
- Real Decreto 465/2003, de 25 de abril de 2003, sobre las sustancias indeseables en la alimentación animal. BOE de 29.04.2003, p.16485-16493.
- Real Decreto 475/1988, de 13 de mayo de 1988, por el que se establecen los límites máximos permitidos de las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 en alimentos para consumo humano. BOE de 20.05.1988, p.1532.
- Real Decreto 90/2001, de 2 de febrero de 2001, por el que se establecen los métodos de toma de muestras y de análisis para el control oficial del contenido máximo de aflatoxinas en cacahuetes, frutos de cáscara, frutos desecados, cereales, leche y los productos derivados de su transformación. BOE de 23.02.2001, p. 6996-7000.

---

*Bibliografía*

- Ren Y., Zhang Y., Shao S., Cai Z., Feng L., Pan H., Wang Z. 2007. *J. Chromatogr. A* 1143: 48-64.
- Richter B. E., Jones B. A., Ezzel J.L., Porter N. L., Avdalovic N., Pohl C. 1996. *Anal. Chem.* 68: 1033-1039.
- Riley R.T., Pestka J. 2005. . *Mycotoxins: metabolism, mechanism and biochemical markers*. In: *The mycotoxin blue book*. Duarte Díaz (Ed.). Nottingham University Press. pp. 279-294.
- Rohner-Thielen E. 2005. Statistics in focus. Agriculture. Organic farming in Europe. Eurostat, 31/2005.
- Romero S.M., Comerio R.M., Larumbe G., Ritieni A., Vaamonde G., Pinto V. 2005. *Int. J. Food Microbiol.* 104: 43-49.
- Royer D., Humpf H.U., Guy P.A. 2004. *Food Addit. Contam.* 21: 678-692.
- Ruiz M.J., Font G. 2007. *Toxicidad y evaluación de riesgos*. En: *Micotoxinas en Alimentos*. Soriano del Castillo, J.M. (Ed.) Díaz de Santos. Madrid. pp. 167-181.
- Sage L., Garon D., Seigle-Murandi F. 2004. *J. Agric. Food Chem.* 52: 5764-5768.
- Sanchis V., Magan N. 2004. *Environmental conditions affecting mycotoxins*. In: *Mycotoxins in food: detection and control*. Magan, N. and Olsen, M. (Ed.). Cambridge. pp. 174-189.
- Sarkisov A.C. 1954. *Mycoses*. State Publishing House for Agricultural Literature. (Ed.). Moscow.
- Scientific Committee on Food. 1996. Opinion on Aflatoxins, Ochratoxin A and Patulin – expressed on 23 september 1994. Reports of the Scientific Committee on Food – 36° Series (European Commission, DG Industry).
- Scott P.M. 1995. *Food Addit. Contam.* 12: 395-403.
- Scott P.M., Lau P.Y., Kanhere S.R. 1981. *J. Assoc. Anal. Chem.* 64: 1364–1371.
- Scudamore K.A., Banks J., MacDonald S.J. 2003. *Food Addit. Contam.* 20(12): 1153-1163.

- Scudamore K.A., Hetmanski M.T., Nawaz S., Naylor J. 1997. *Food Addit. Contam.* 14: 173-175.
- Selim MI., Tsuei MH. 1993. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 54: 135-41.
- Senyuva HZ., Gilbert J., Ozcan S., Ulken U. 2005. *J. Food Prot.* 68: 1512-1515.
- Serra J., Escola R. 1997. *J. Agric. Food Chem.* 45: 725-732.
- Serra R., Abrunhosa L., Kozakiewicz Z., Venancio A. 2003. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 63-68.
- Sforza S., Dall'asta C., Marchelli R. 2006. *Mass Spectrom. Rev.* 25: 54-76.
- Sharman M., Patey A.L., Bloomfield D.A, Gilbert J. 1991. *Food Addit. Contam.* 8: 299-304.
- Shepherd M.J., Gilbert J. 1986. *J Chromatogr.* 358: 415-422.
- Somashekar D., Rati E. R., Anand S., Chandrashekar A. 2004. *Food Microbiol.* 21: 809-813.
- Soriano J.M., Berrada H., Blesa J., Moltó J.C., Mañes J. 2006. *Control and decontamination of OTA in food processing: The key of traceability.* In: *New Issues in Food Policy, Control and Research.* A.P.Riley. (Ed.) Nueva York. pp. 85-107.
- Soriano J.M., Moltó J.C., Mañes J. 2007. *Análisis de micotoxinas en alimentos.* En: *Micotoxinas en Alimentos.* Soriano del Castillo, J.M. (Ed.) Díaz de Santos. Madrid. pp. 91-117.
- Stenier W., Rieker R.H., Battaglia R. 1988. *J. Agric. Food Chem.* 36, 88-91.
- Stroka J., Anklam E., Jorissen U., Gilbert J. 2000. *J. AOAC Int.* 83: 320-340.
- Suhr K.I., Nielsen P.V. 2004. *Int. J. Food Microbiol.* 9: 67-78.
- Tatu C.A., Orem W.H., Feder G.L. 1998. *EHP.* 106: 689-702.
- Thirumala-Devi K., Mayo M.A., Reddy G., Reddy D.V. 2002. *J. Food Prot.* 65: 1338-40.
- Tinker P.B. 2001. *A review of UK Farming System.* Shade of Green: Royal Agricultural Society of England (Ed.). Stoneleight Park.

---

*Bibliografía*

- Tomlins K. I., Jewers K., Coker R. D., Nagler M. J. 1989. *Chromatographia* 27: 49-52.
- Tripathi D. N., Chauhan I. R., Bhattacharya A. 1991. *Anal. Sci.* 7: 423-426.
- Trucksess M.W., Giler J., Young K., White K.D., Page S.W. 1999. *J AOAC Int.* 82: 85-89.
- Trung T.S., Bailly J.D., Querin A., Lebars P., Guerre P. 2001. *Rev. Med. Vet.* 152: 555– 560.
- Tsao R., Zhou T. 2000. *J. Agric. Food Chem.* 48: 5231-5235.
- Urraca J.L., Benito-Pena E., Perez-Conde C., Moreno-Bondi M.C., Pestka J.J. 2005. *J. Agric. Food Chem.* 53: 3338-3344.
- Van der Merwe K.J., Steyn P.S., Fourie L., Scott DB., Theron J.J. 1965. *Nature.* 205: 1112-1113.
- Van Walbeek W., Scott P.M., Harwig J., Lawrence J.W. 1969. *Can. J. Microbiol.* 15: 1281-1285.
- Varga J., Kevei E., Rinyu E., Térzen J., Kozakiewicz Z. 1996. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4461-4464.
- Vildes M. S. 2005. *Aflatoxin and food safety: Recent South American Perspectives*. In: Abbas H.K. (Ed.). *Aflatoxin and Food Safety*. Stoneville. pp. 29-57.
- Wafa E.W., Yahya R.S., Sobh M.A., Eraky I., El-baz M., El-gayar HAM., Betbeder AM., Creppy EE. 1998. *Hum. Exp. Toxicol.* 17: 124-129.
- Wang J., Liu X.M. 2006. *Chin. J. Prev. Med.* 4: 33-37.
- Weidenböchner M. 2001. *Encyclopedia of food mycotoxins*. Springer-Verlag. (Ed.) Berlín.
- Wennrich L., Popp P., Moder M. 2000. *Anal. Chem.* 72: 546- 551.
- Wolf J., Bresch H., Cholmakow-Bodechtel C., Engel G., Erhardt S., Gareis M., Majerus P., Rosner H., Scheuer R. 2000. Burden of ochratoxin A in food and in the consumer. Final report. Institute for the Biochemistry of Cereals and Potatoes. Federal Institute for Research on Cereals, Potatoes and Fat.

- Wood G.M., Patel A., Entwisle A.C., Boenke A. 1996. *Food Addit. Contam.* 13: 519-539.
- Xiao H., Madhyastha S., Marquardt R.R., Li S., Vodela J.K., Frohlich A.A., Kemppainen B.W. 1996. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 137: 182-192
- Yazdanpanah H., Miraglia M., Calfapietra F.R., Brera C. 2001. *Mycotoxin Research* 17: 21-30.
- Yazdanpanah H., Mohammadi T., Abouhossain G., Majid Cheraghali A. 2005. *Food Chem. Toxicol.* 43: 1135-1139.
- Yiannikouris A., Jouany J.P. 2002. *INRA Prod. Anim.* 15: 3-16.
- Zeng H., Li Y., Jin J., Sun H. 2003. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 34: 333-336.
- Zepni H., Völkel W., Dekant W. 2003. *Toxicol. Appl. Pharm.* 192: 36-44.
- Zhai C.K., Jiang X.L., Xu Y.S., Lorenz K.J. 1994. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie.* 27: 380-383.
- Zhai C.K., Lu C.M., Zhang X.Q., Sun G.J., Lorenz K.J. 2001. *J. Food Comp Anal.* 14: 371-382.
- Zhou S.N., Lai E.P.C., Miller J.D. 2004. *Anal. Bioanal. Chem.* 378: 1903-1906
- Zimmerli B. and Dick R. 1995. *J. Chromatogr B* 666: 85-99.
- Zinedine A., Brera C., Elakhdari S., Catano C., Debegnach F., Angelini S., De Santis B., Faid M., Benlemlih M., Minardi V., Miraglia M. 2006. *Food Control* 17: 868-874.
- Zinedine A., González-Osnaya L., Soriano J.M., Moltó J.C., Idrissi L., Mañes J. 2007a. *Int. J. Food Microbiol.* 114: 25-29.
- Zinedine A., Juan C., Soriano J.M., Moltó J.C., Idrissi L., Mañes, J. 2007b. *Int. J. Food Microbiol.* 115: 124-127.
- Zinedine A., Soriano J.M., Juan C., Mojemmi B., Moltó J.C., Bouklouze A., Cherrah Y., Idrissi L., El Aouad R., Mañes J. 2007c. *Food Addit. Contam.* 24: 285-291.

*Bibliografía*

---

Zoellner P., Leither A., Lubda D., Cabrera K., Lindner W. 2000. *Chromatographia* 52: 818-820.

Zollner P., Mayer-Helm B. 2006. *J. Chromatogr. A* 1136: 123-169.



❖ ANEXO ❖





## 7. ANEXO

### 7.1. DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS

El presente trabajo ha dado lugar a las siguientes publicaciones en revistas científicas:

**Accelerated Solvent Extraction of Ochratoxin A from rice samples.** Juan C., González L., Soriano J.M., Moltó J.C., Mañes J. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* (2005) 53: 9348-9351.

**Occurrence and daily intake of Ochratoxin A of organic and non-organic rice and rice products.** González L., Juan C., Soriano J.M., Moltó J.C., Mañes J. *International Journal of Food Microbiology* (2006) 107: 223-227.

**Determination of ochratoxin A in maize bread samples by HPLC with fluorescence detection.** Juan C., Lino C.M., Pena A., Moltó J.C., Mañes J., Silveira I. *Talanta* (2007) 73: 246-250.

**Incidence of ochratoxin A in rice and dried fruits available in Rabat and Salé area, Morocco.** Zinedine A., Soriano J. M., Juan C., Mojemmi B., Moltó J.C., Bouclouze A., Cherrah Y., Idrissi L., EL Aouad R., Mañes J. *Food Additives and Contaminants* (2007). 24(3): 285-291.

**Limited survey for the occurrence of aflatoxins in cereals and poultry feeds from Rabat, Morocco.** Zinedine A., Juan C., Soriano J. M., Moltó J.C., Idrissi L.,

Mañes J. *International Journal of Food Microbiology* (2007) 115: 124-127.

**Aflatoxins levels in dried fruits and nuts from Rabat-Salé area, Morocco.**

Zinedine A., Juan C., Moltó J.C., Idrissi L., Mañes J. *Food Control* (In press, available online 29 August, 2007).

**Occurrence of ochratoxin A in bread consumed in Morocco.** Zinedine A., Juan

C., Idrissi L., Mañes J. *Microchemical Journal* (2007) 87: 154-158.

**Determination of ochratoxin A in organic and nonorganic cereals and cereal products from Spain and Portugal.** Juan C., Moltó J.C., Lino C.M., Mañes J.

*Food Chemistry* (2008) 107: 525-530.

