

DETERMINACIÓN DE AFLATOXINAS EN ALIMENTOS DE MAYOR CONSUMO INFANTIL COMERCIALIZADOS EN LA CIUDAD DE PAMPLONA, NORTE DE SANTANDER

Rojas Contreras Olga Liliana
Wilches Flórez Angela María

Universidad de Pamplona, Facultad de Ciencias Básicas
Departamento de Microbiología
Grupo de Investigación en Microbiología y Biotecnología GIMBIO
olrojas@unipamplona.edu.co
angelamaw@unipamplona.edu.co

RESUMEN

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios, producidos principalmente por los hongos *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*, los cuales inducen a una gran variedad de efectos tóxicos en seres vivos expuestos con alimentos contaminados. Se evaluó la presencia de aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ y G₂) en muestras de alimentos de consumo infantil comercializados en la ciudad de Pamplona, Norte de Santander. Se aplicaron técnicas analíticas estandarizadas en el Laboratorio de Toxicología (Facultad de Medicina Veterinaria) de la Universidad Nacional de Colombia, basadas en técnicas reconocidas por la Asociación Oficial de Química Analítica de los Estados Unidos (AOAC) para análisis de alimentos. Se detectaron aflatoxinas en el 10% de las muestras, con niveles entre 18.42 µg/kg y 71.25 µg/kg de AFB₁. Los niveles detectados de aflatoxinas superan el valor máximo admisible por la legislación colombiana (10 µg/kg) y por la Unión Europea (0.10 µg/kg) para alimentos infantiles y alimentos elaborados a base de cereales para lactantes y niños de corta edad.

Las micotoxinas pueden causar efectos adversos en la salud humana, por lo que se recomienda controlar la presencia de niveles de aflatoxinas en los alimentos de consumo infantil, mediante la utilización de métodos preventivos (aplicación de buenas prácticas agrícolas, control biológico) que eviten el crecimiento de hongos toxicogénicos o a través de sistemas de descontaminación y detoxificación en el alimento.

Palabras claves: Aflatoxinas, alimentos infantiles, cromatografía, toxicogénico.

ABSTRACT

The aflatoxins are secondary metabolites, produced principally for the fungi *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*, which induce to a great variety of toxic effects in alive(vivacious) beings exposed with contaminated food. The presence of aflatoxins (B₁, B₂, G₁ y G₂) was evaluated

in food samples of infantile consumption · commercialized in Pamplona, North of Santander. There were applied analytical technologies standardized in the Laboratory of Toxicology (Faculty of Veterinary Medicine) of the National University of Colombia, stocks in technologies recognized by the Official Association of Analytical Chemistry of the United States (AOAC) for food analysis. Aflatoxins were detected in 10 % of the samples with levels between 18.42 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 71.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of AFB₁. The levels detected of aflatoxins overcome the maximum admissible value for the Colombian legislation (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) and for the European Union (0.10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) for infantile food and food elaborated based on cereals for breast-fed babies and children of short age. The micotoxins can cause adverse effects in the human health, for what one recommends to control the level presence of aflatoxins in food of infantile consumption, by means of the utilization of preventive methods (application of good agricultural practices, biological control) that avoid the growth of fungi toxigenics or across systems of decontamination and detoxification in the food.

Key words: aflatoxins, infantile food, chromatography, toxicogenics.

INTRODUCCIÓN

La palabra aflatoxina proviene de la primera letra “A” que denota al género *Aspergillus*, seguida de las tres letras “FLA” correspondiente a la especie *flavus* y el sustantivo “toxina” que significa veneno (Ellis *et al.*, 1991).

Las aflatoxinas constituyen un grupo muy relacionado de metabolitos heterocíclicos sintetizados principalmente por los hongos *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* (Palmgren *et al.*, 1987). Hasta el momento han sido identificadas 20 aflatoxinas diferentes, sin embargo únicamente las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ se originan de manera natural en sustratos contaminados por *Aspergillus* aflatoxigénicos. Las demás aflatoxinas (M₁, M₂, P₁, Q₁, aflatoxicol, etc.) ocurren como productos metabólicos de sistemas microbianos o animales (Smith *et al.*, 1991). Las toxinas tipo B se caracterizan por la fusión de un anillo ciclopentanona a un anillo lactona de la estructura cumarina, mientras las toxinas G contienen un anillo lactona fusionado en lugar del anillo ciclopentanona (Figura 1).

La aflatoxina B₁, es la más frecuente y tóxica. La nomenclatura hace referencia a sus propiedades físico – químicas, ya que las de tipo B presentan fluorescencia azul (blue) y las de tipo G fluorescencia verde (green) cuando se les observa bajo luz ultravioleta a 365 nm (De Jimeno *et al.*, 1980). El subíndice 1 indica mayor movilidad cromatográfica que el 2. En estado puro son polvos cristalinos que se descomponen al alcanzar el punto de fusión (B₁ 268-269° C, B₂ 286-289° C, G₁ 244-246, G₂ 237-240, M₁ 299° C, M₂ 330° C) (Detroy *et al.*, 1971).

Existen varios derivados hidroxilados de las aflatoxinas B₁ y B₂ (Figura 1). Los derivados de aflatoxinas B₁ y B₂ conocidos como aflatoxinas M₁ y M₂ respectivamente, se excretan en la leche de animales que consumieron alimentos contaminados con aflatoxinas. Las aflatoxinas M₁ y M₂ son igualmente activas y eso constituye un riesgo para la salud humana. Estos derivados hidroxilados, pueden estar presentes en leche líquida y en polvo (Blunden *et al.*, 1991).

Biotransformación. Clifford y Rees (1967), citados por Zintzen, sugirieron que el mecanismo de acción de las aflatoxinas en el organismo toma la siguiente secuencia:

- a. Penetración a las células y a sus núcleos.
- b. Combinación con el ADN.
- c. Reducción de la síntesis de ARN, especialmente del m-ARN.

- d. En pocos minutos bloquean la proteosíntesis y a causa de la inhibición del m-ARN también se inhibe la mitosis.
- e. La inhibición de la mitosis es seguida por la muerte celular.

El metabolismo de las aflatoxinas en células hepáticas humanas, y presumiblemente en otros tejidos, dependerá en gran parte del contenido del Citocromo P-450 el cual está controlado por factores exógenos y endógenos.

Los factores externos incluyen tanto los nutrientes tomados en la dieta como las sustancias específicas (inhibidoras o activantes), (Ellis, 1987). Entre los determinantes endógenos, los cuales se consideran análogos a las distintas diferencias que existen entre las especies animales, hay una evidencia creciente de polimorfismo en el contenido del Citocromo P-450 del hígado humano, en el cual el tipo de citocromos presentes o de sus actividades, son genéticamente segregados en cohortes específicos dentro de la población general.

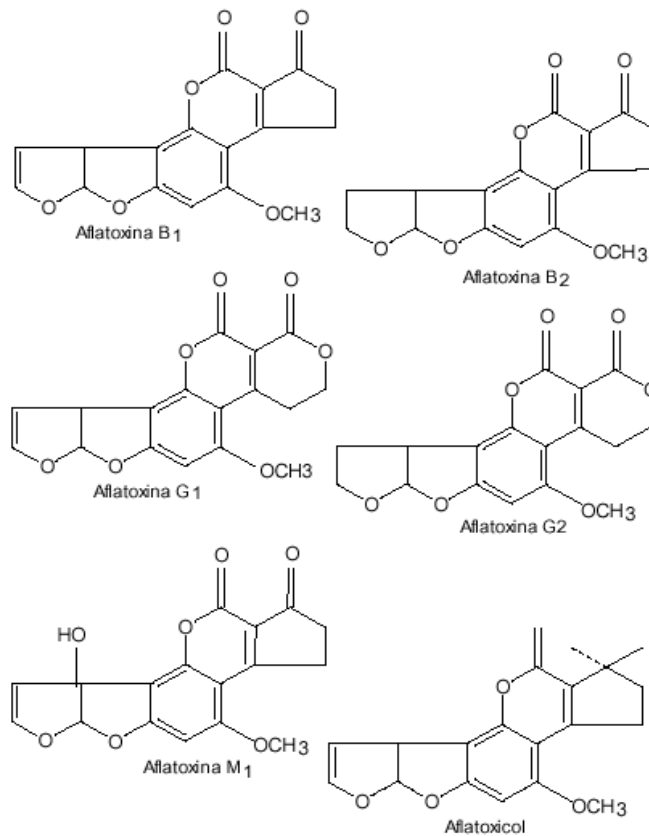


Figura 1. Estructura de las principales aflatoxinas
Fuente: FAO: Alimentación y Nutrición, 1991.

La AFB₁ requiere la activación del Citocromo P-450 dependiente de la oxidasa de función mixta para convertirse en distintos metabolitos activados. Una vez absorbida la AFB₁ desde el tracto digestivo llega al tejido hepático donde pasa por dos fases.

Fase I: por acción del Complejo Citocromo P-450 monooxigenasa, produce derivados reducidos y oxidados que supuestamente no presentan actividad carcinogénica. Pero, también produce AFB₁

2,3- epóxido, que es un producto inestable y que forma aductos con el ADN, ya que se une al N-7 de la guanina formando el aducto AFB₁-GUA. Esta unión conlleva a mutaciones en proto-oncogen y genes supresores de tumores. Reacción importante para el inicio del cáncer.

Fase II: el epóxido formado se conjuga con proteínas, puede sufrir hidroxilación o puede conjugarse con el Glutati6n (GSH) en el h6gado, por la acci6n de la glutati6n -S transferasa y ser excretado en la orina y en las heces como 6cido Mercapt6rico, combin6ndose con proteínas a los diferentes tejidos y provocando las diferentes clases de intoxicaciones, adem6s de los efectos carcinog6nicos, la AFB₁ y sus metabolitos pueden afectar a cualquier 6rgano.

Presencia en productos alimenticios. De las cuatro aflatoxinas principales (B₁, B₂, G₁ y G₂), la que se observa habitualmente en mayores concentraciones es la B₁, es considerada el compuesto biol6gicamente m6s activo de la familia de las aflatoxinas y se presenta en un n6mero importante en alimentos para animales as6 como tambi6n en ma6z, algod6n y man6. Ocasionalmente, **A. flavus** y **A. parasiticus** pueden colonizar peque6os granos de cereales como cebada, avena y trigo y producir niveles de aflatoxinas de bajos a moderados. La soya no es un sustrato en donde se producen niveles apreciables de aflatoxina B₁ (Pier, 1992).

Las cuatro toxinas pueden estar presentes simult6neamente aunque no necesariamente y sus concentraciones relativas y su presencia pueden variar seg6n la cepa f6ngica y el sustrato. Por ejemplo, (Hesseltine *et al.*, 1970) comprobaron que la mayor parte de las cepas f6ngicas que produc6an aflatoxina G₁ produc6an tambi6n aflatoxina B₁, pero que no todas las cepas productoras de aflatoxina B₁ formaban aflatoxina G₁. Una cepa de **A. flavus** tomada de pimienta negra produjo s6lo aflatoxina B₂ en dos sustratos naturales ensayados (Schroeder y Carlton, 1973).

Algunos estudios han mostrado que los nutrientes y el tipo de sustrato son importantes para la producci6n de aflatoxinas, la cual se puede ver estimulada por un alto nivel de carbohidratos y un bajo nivel de prote6nas; los carbohidratos proveen los dos carbonos precursores para la s6ntesis de la toxina. El ma6z, es de esta forma un buen sustrato para la producci6n de aflatoxinas debido a su alto contenido de carbohidratos y bajo contenido de n6tr6geno (Viquez *et al.*, 1994).

Efectos t6xicos. Entre las principales manifestaciones asociadas a la exposici6n de aflatoxinas, est6n el da6o hep6tico (cirrosis) y renal, mutag6nesis (por la mutaci6n en el cod6n 249 de hepatoc6lulas humanas), teratog6nesis (ya que pueden cruzar la placenta humana y crean malformaciones fetales), inmunosupresi6n (ya que suprime la respuesta mediada por c6lulas, altera la funcionalidad del sistema del complemento y enmudece la acci6n de la IgA y la IgG), genotoxicidad (por la formaci6n de aductos con el ADN y con la alb6mina que induce a la mutaci6n de genes y alteraciones cromos6micas como intercambio entre crom6tidas hermanas y recombinaci6n) (R. Eley, 1992).

La evaluaci6n de los resultados epidemiol6gicos y de laboratorio llevada a cabo en 1987 por el Centro Internacional de Investigaciones sobre el c6ncer (CIIC) determin6 que existen suficientes datos demostrativos del efecto carcinog6nico de mezclas naturales de aflatoxinas en el ser humano, las cuales se clasifican por ello como carcin6genos del Grupo 1, salvo en el caso de la aflatoxina M₁, que se considera posiblemente carcin6gena para el hombre (Grupo 2B) (CIIC, 1987).

Carcin6nesis hep6tica. Se le empez6 a dar importancia a la presencia de aflatoxinas en alimentos cuando se observ6 que generalmente su efecto no es agudo sino cr6nico, puesto que la toxina se acumula y puede llegar a inducir el desarrollo de c6ncer hep6tico. Se tiene referencia de un hombre de Missouri que tuvo carcinomas de recto y de h6gado y se le detectaron aflatoxinas en

la biopsia de hígado. El efecto carcinogénico de las aflatoxinas se le atribuye a la transformación química que sufren después de ingeridas en el hospedero.

Dado que las aflatoxinas son frecuentes en alimentos y materias primas de consumo humano, el objetivo del presente estudio es detectar la presencia y cuantificación de la mencionada micotoxina en alimentos de consumo infantil.

MATERIALES Y MÉTODOS

La técnica utilizada en el estudio fue desarrollada y/o estandarizada en el Laboratorio de Toxicología (Facultad de Medicina Veterinaria) de la Universidad Nacional de Colombia, basada en técnicas reconocidas por la AOAC para análisis de alimentos.

Análisis de Aflatoxinas. La estructura cumarínica de la aflatoxina, las insaturaciones y la presencia de grupos cetónicos en la molécula, le confieren dos propiedades importantes para la detección cromatográfica: la polaridad y la fluorescencia bajo la luz ultravioleta (Moreno, 1990).

Para los análisis del presente estudio se utilizó una técnica adoptada como oficial por la AOAC después de realizar un estudio colaborativo a nivel internacional (Trucksess *et al.*, 1994). Mediante esta técnica las aflatoxinas son extraídas con una mezcla de acetonitrilo:agua (84:16) y purificadas con una columna Micotox® 2006 según el método descrito por Wilson y Romer (1991). Luego de adicionar al extracto un reactivo de derivatización, se llevó a baño termostático (65° C) por 10 minutos y de esta forma, las AFB₁ y AFG₁ son derivatizadas a sus correspondientes hemiacetales (AFB_{2a} y AFG_{2a}). La separación de las cuatro aflatoxinas [B₁ (B_{2a}), B₂, G₁ (G_{2a}) y G₂] se hace en una columna cromatográfica de fase reversa (RP18). Las aflatoxinas son finalmente detectadas y cuantificadas mediante un espectrofotómetro de fluorescencia acoplado a un integrador-graficador.

1.1 Extracción. En un recipiente de vidrio se mezclaron 50 g de muestra con 100 mL de acetonitrilo:agua (84:16) se homogenizaron durante 3 minutos en una licuadora. Posteriormente, se filtraron a través de papel filtro y se colectaron 5 mL de filtrado en un tubo de ensayo de 10 mL.

1.2 Purificación del extracto. Se insertó el extremo con el tapón de caucho de una columna Micotox® 2006 en el tubo de ensayo, presionando lentamente hasta obtener cerca de 250 µL de extracto purificado.

1.3 Concentración y derivatización. Se transfirieron cuantitativamente 200 µL de extracto purificado a un vial de 4 mL de capacidad con tapa de teflón; posteriormente se adicionaron 700 µL de reactivo de derivatización (ácido trifluoroacético/ácido acético/agua; 2:1:7). El contenido se calentó a 65° C (derivatización) durante 10 minutos en baño termostático y se dejó enfriar a temperatura ambiente.

1.4 Separación y cuantificación. El derivatizado se filtró a través de membrana Millipore de 0.45 µm de diámetro de poro y se inyectan 50 µL en el cromatógrafo de líquidos. Los extractos derivatizados AFB_{2a} y AFG_{2a} son estables en congelación durante 8 a 14 días sin pérdida significativa de fluorescencia.

1.5 Condiciones cromatográficas.

Cromatógrafo Shimadzu LC – 9A

- Bomba cromatográfica LC – 9A
- Horno CTO – GA 50° C
- Detector de fluorescencia FLD – GA de longitudes de onda fijas.

Longitud de onda de excitación: pico a 350 nm, banda espectral 330 – 370 nm.

Longitud de onda de emisión: 450 – 800 nm.

Response: slow. Sensitivity: high Range: 1

- System controller SCL – GB
- Integrador CR4 – 4 (Attn: 0; speed: 2 mm/min; run time: 18 min). File “AFLA”
- Fase móvil: Agua: MeOH (60:40), flujo: 0.6 ml/min.
- Columna analítica: Merck LiChroCART® 125 – 4 HPLC – Cartridge LiChrospher® 100 RP – 18 (5 µm).
- Temperatura: 30° C.
- Precolumna: Merck LiChroCART® 4 – 4 HPLC – Guard column LiChrospher® 100 RP – 18 (5 µm).
- Temperatura: 30° C.
- Presión: 76 kg/cm² con columna y precolumnas nuevas.
- Orden de elusión: AFG₁ (AFG_{2a}), AFB₁ (AFB_{2a}), AFG₂, AFB₂
- Tiempos de retención aproximados: AFG₁ 4.2 min.
AFB₁ 5.9 min.
AFG₂ 8.4 min.
AFB₂ 13.2 min.

En la Figura 2 se presenta el cromatograma de un estándar de aflatoxinas: B₁, B₂, G₁ y G₂.

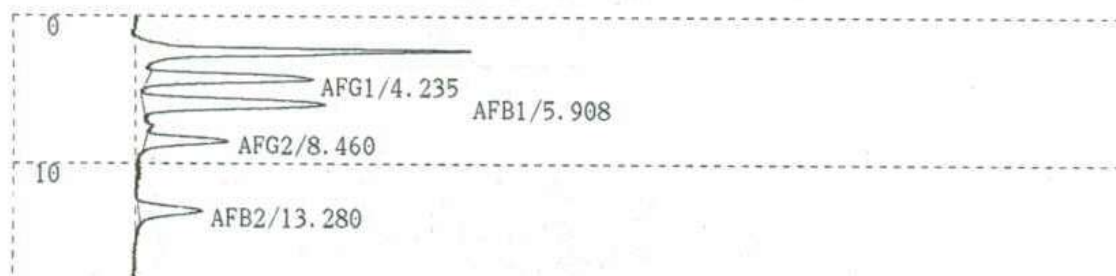


Figura 2. Cromatograma de un estándar de aflatoxinas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados (Tabla 1) mostraron que el 10% de las muestras (3/30), presentaron niveles detectables de AFB₁, los cuales oscilaban entre 18.42 µg/kg y 71.25 µg/kg, con una media de 4.21 µg/kg (Tabla 2). El nivel más alto 71.25 µg/kg fue hallado en una muestra de colada para teteros, preocupante dada su acción hepatocarcinógena.

Las muestras analizadas demostraron la no presencia de aflatoxinas B₂, G₁ y G₂, este hecho se puede atribuir al proceso de muestreo, de igual forma es muy poco probable que los productos básicos contengan estas aflatoxinas y no la aflatoxina B₁, en tanto que la concentración de la suma de las aflatoxinas B₂, G₁ y G₂ es generalmente menor que la concentración de la aflatoxina B₁ sólo.

Tabla 1. Concentración de Aflatoxinas en muestras de alimentos de consumo infantil

MUESTRA	ÁREA				CONCENTRACIÓN				AFLATOXINAS TOTALES	D	ND
	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	AFB	AFB	AFG	AFG			
					1	2	1	2			
M001	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		X
M002	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		X
M003	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		X
M004	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		X
M005	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		X
M006	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		X
M007	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		X
M008	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		X
	2737	0	0	0	36.5						
M009					5	0.00	0.00	0.00	36.55	X	
	1372	0	0	0	18.4						
M010					2	0.00	0.00	0.00	18.42	X	
M011	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		X
	4292	0	0	0	71.2					X	
M012					5	0.00	0.00	0.00	71.25		
M013	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		X
M014	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		X
M015	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		X
M016	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		X
M017	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		X
M018	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		X
M019	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		X
M020	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		X
M021	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		X
M022	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		X
M023	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		X
M024	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		X
M025	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		X
M026	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		X
M027	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		X
M028	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		X
M029	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		X
M030	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		X

D: Detectable
 ND: No detectable



Cromatograma de una muestra positiva a Aflatoxina B₁

Tabla 2. Estadística descriptiva de los resultados de aflatoxinas

VARIABLES	VALID N	MEAN	MINIMUM	MAXIMUM	STD.DEV.
AFB ₁	30	4,21	0,00	71,25	14,65
AFB ₂	30	0,00	0,00	0,00	0,00

AFG ₁	30	0,00	0,00	0,00	0,00
AFG ₂	30	0,00	0,00	0,00	0,00
AFLAS TOTALES	30	4,21	0,00	71,25	14,65

La aflatoxina de mayor incidencia fue la aflatoxina B₁, lo cual coincide con la mayoría de estudios reportados a nivel internacional. La incidencia total de AFB₁ fue del 10%, superior a lo reportado por Díaz y Perilla, 2001, quienes analizaron 284 alimentos colombianos para evaluar la ocurrencia de aflatoxina B₁ y se encontró que 22 de ellas (8.9%) presentaron niveles de AFB₁. Esta incidencia es mucho más baja que el 29% de la incidencia de AFB₁ encontrada en aves de corral y alimentos para cerdos y para ganado, usados en Colombia; reportado por Céspedes y Díaz, 1997.

A nivel nacional, estudios llevados a cabo en el Laboratorio de Toxicología de la Universidad Nacional de Colombia indican que en harinas de arroz se han detectado los niveles más altos de AFB₁ (2.7 – 52.8 ppb) con una incidencia del 33.3%. Estos niveles son relativamente bajos si se comparan con los obtenidos en el presente estudio.

CONCLUSIONES

- Sólo se detectó una aflatoxina de ocurrencia natural (AFB₁) en las muestras de alimentos de consumo infantil analizadas. Ninguna muestra presentó contaminación con aflatoxinas B₂, G₁ y G₂.
- La incidencia de aflatoxinas en alimentos de mayor consumo infantil comercializados en Pamplona fue del 10%, presentando niveles detectables que oscilan entre 18.42 µg/kg y 71.25 µg/kg. Por lo tanto, los niveles de contaminación con aflatoxinas se encuentran superando el nivel máximo permisible por la legislación colombiana (10 µg/kg) y por la legislación establecida por la Unión Europea (0,10 µg/kg) para alimentos infantiles y alimentos elaborados a base de cereales para lactantes y niños de corta edad. El 6.67% de las muestras analizadas no cumple con los requisitos estipulados por la FDA (20 µg/kg).

RECOMENDACIONES

- Es conveniente la realización de un muestreo más amplio y en otros tipos de alimentos altamente susceptibles para determinar el índice de contaminación con aflatoxinas en alimentos de consumo humano en regiones específicas del país, con el propósito de establecer bases para una regulación que permita tener productos seguros para la población y que puedan competir en el mercado internacional.
- Es relevante aplicar programas para el control de aflatoxinas, con el fin de conducir a un mayor conocimiento de la problemática originada por estos compuestos tóxicos en el país y contribuir a la estructuración y promulgación de una legislación estricta y más acorde a las exigencias de los consumidores.
- El control de las micotoxinas debería ser enfocado dentro de un programa de “Control Integrado” es decir, aplicar medidas preventivas en todas las fases de producción de los alimentos. Estos controles y medidas deben hacerse extensivas a las siguientes etapas: cultivo de las materias primas, periodo de cosecha, almacenamiento, transporte y distribución.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Blunden G, Roch O, Rosers D, Coker R, Bradburn N and John A. (1991). Mycotoxins in Food. *Medical Laboratory Sciences* 48: 271 – 282.
2. Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer. (1987). *Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC Monographs volumen 1 to 42. Report of an IARC Expert Committee. Lyon.* (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Supplement 7).
3. Céspedes A. y Díaz G. (1997). Análisis of aflatoxins in poultry and pig feeds used in Colombia. *J AOAC Int* 80: 1215 – 1219.
4. De Jimeno M, Ruiz N y Peña N. (1980). Incidence of Aflatoxins in Animal Feedstuffs: A Decade's Scenario in India. *Journal of AOAC International*, 78 (3): 693 – 698.
5. Detroy R. (1971). Aflatoxin and related compounds. pp. 4-178. En: *Microbial Toxins* vol. 6. Ciegler A. et al., editores. Academic Press, New York.
6. Díaz G, Perilla N and Rojas Y. (2001). Ocurrence of aflatoxins in selected Colombian foods. *Mycotoxin Research*, 17: 15 – 19.
7. Ellis H. (1987). Series in food science and technology. Natural Toxicant in Foods: Progress and Prospects. Editado por D.H. Watson. Alemania.
8. Ellis W, Smith J, Simpson B. and Oldham J. (1991). Aflatoxins in Food: Ocurrente, Biosíntesis, Effects on Organisms, Detection and Methods of Control. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 30 (3): 403 – 439.
9. FAO (1991). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Alimentación y nutrición. Manual para el control de calidad de los alimentos. 10: Capacitación en análisis de micotoxinas. pp. 144.
10. Hesseltine C, Sorensen W y Smith M. (1970). Taxonomic studies of the aflatoxin producing strains in the *Aspergillus flavus* group. *Mycologia*, 62: 123-132.
11. Moreno J. (1990). Aflatoxina: Metodologías para detección y evaluación. *Avicultura Andina*. 14 (65): 34 – 35.
12. Palmgren M and Hayes A. (1987). Aflatoxins in Food. *Mycotoxins in Food*. Cap 4: 65 – 94.
13. Pier A. (1992). Major Biological Consequences of Aflatoxicosis in Animal Productions. *J. Anim. Sci.*, 70: 3964 – 3967.
14. R. Eley. (1992). Intoxicaciones Alimentarias de Etiología Microbiana. Editorial Acribia. Zaragoza. España.

15. Schroeder H. y Carlton W. (1973). Accumulation of only aflatoxin B₂ by a strain of ***Aspergillus flavus***. *Appl Microbiol* 25: 146 – 148.
16. Smith J y Ross K. (1991). The toxigenic ***Aspergilli***. pp. 101-108. En: Mycotoxins and Animal Foods. Smith J, Henderson R. editores. CRC Press, Boca Ratón, Florida.
17. Trucksess M, Stack M and Nesheim S. (1994). Multifunctional Column Coupled with Liquid Chromatography for Determination of Aflatoxins B₁, B₂, G₁, and G₂ in Com, Almonds, Brazil Nuts, Peanuts, and Pistachio Nuts: Collaborative Study. *Journal of AOAC International*, **77** (6): 1512 – 1521.
18. Viquez OM, Castell – Pérez, MA, Shelby RA and Brown G. (1994). Aflatoxin Contamination in Com Samples Due to Environmental Conditions, Aflatoxin – Producing Strains and Nutrients in Grain Grown in Costa Rica. *J. Agric. Food Chem.*, 42: 2551 – 2555.
19. Zintzen H. (1975). El Problema de las Aflatoxinas: Pub. Cient. Roche Int. Moyo. Montevideo. Uruguay.

