



Ocratoxina A en plasma humano: nuevos datos de exposición en España

Pérez de Obanos A¹, López de Ceraín A^{1*}, Jiménez AM¹, González Peñas E², Bello J¹

¹ Dpto de Bromatología, Tecnología de alimentos y Toxicología.

² Dpto de Química Orgánica y Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Navarra. c/ Irunlarrea s/n. 31008 Pamplona.

Recibido 24 de Octubre de 2000 / Aceptado 21 de Diciembre de 2000

Resumen: Se ha investigado la presencia de Ocratoxina A en plasma humano en la provincia de Granada, por medio del análisis de 83 muestras obtenidas de mujeres residentes en esa zona. El método analítico está basado en la extracción líquido-líquido, con posterior análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección de fluorescencia. Este método analítico ha sido validado obteniéndose un límite de detección de 0,21 ng/mL. Se ha detectado la presencia de ocratoxina A en un 72% de las muestras. La concentración media hallada ha sido de 0,63 ng/mL, con una desviación estándar de 0,41 ng/mL y un rango de concentraciones entre 0,11 ng/mL y 6,96 ng/mL. Estos resultados son equiparables a los encontrados previamente en otras dos zonas del norte y del centro de España, y en los países del entorno. El análisis estadístico de los datos, por medio de un test de Kruskal-Wallis ($n = 70$; $\chi^2 = 4,591$; $p = 0,597$), no evidenció que existiera ninguna diferencia significativa de los niveles plasmáticos de ocratoxina A en relación con la época del año en la que fueron extraídas las muestras.

Estos resultados constituyen una prueba más de la exposición generalizada de la población española a esta micotoxina, si bien el valor de la ingesta diaria de ocratoxina A calculado a partir de la concentración media hallada en el presente estudio, es muy inferior al máximo recomendado por el Comité de expertos sobre aditivos alimentarios de la Organización Mundial de la Salud.

Palabras clave: ocratoxina A, micotoxinas, HPLC, concentración plasmática.

Abreviaturas: JECFA: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives.

Abstract: Ochratoxin A in human plasma: new data of exposition in Spain. In order to study the occurrence of Ochratoxin A in a southern region of Spain, Granada, 83 blood plasma samples collected from women have been analysed. The method of analysis is based on a liquid-liquid extraction followed by a High Performance Liquid Chromatographic (HPLC) analysis with fluorescence detection. The method has been validated and a detection limit of 0.21 ng/mL has been obtained.

Ochratoxin A has been detected in 72% of the samples. The mean value was 0.63 ng/mL, with a standard deviation of 0.41 ng/mL and a range of concentrations from 0.11 ng/mL to 6.96 ng/mL. These results are similar to those found in other northern and medium regions of Spain, and to those found in the surrounding countries. Statistical analysis by Kruskal-Wallis ($n = 70$;

$\chi^2 = 4.591$; $p = 0.597$), did not show any difference between plasma levels and the season when the samples were collected. These findings prove the general and wide exposition to Ochratoxin A of Spanish population, although the Daily Ochratoxin A Intake calculated from the mean value obtained in this study, is lower than the maximum level recommended by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives.

Key words: Ochratoxin A, mycotoxins, HPLC, plasma levels.

Abbreviations: JECFA: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives.

Introducción

La ocratoxina A (OTA) es una micotoxina producida por varias especies de hongos filamentosos de la subdivisión Ascomycotina pertenecientes a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. Se presenta como contaminante natural de los alimentos, principalmente de los cereales (cebada, trigo, maíz, avena, arroz) y también del café, vino, cacao, frutos secos, legumbres, etc. Numerosos estudios demuestran que la OTA es nefrotóxica, inmunotóxica, genotóxica, teratogénica y neurotóxica [1]. Es carcinogénica en animales y la Agencia Internacional para la Investigación contra el Cáncer (IARC) la ha clasificado como posible carcinógeno humano (grupo 2B) [2]. Su órgano diana es el riñón, en donde causa una nefritis intersticial crónica demostrada en diversas especies animales, y se discute su contribución en la etiología de una nefropatía humana, endémica en la región de los Balcanes, entre otras razones por la semejanza entre esta enfermedad y la nefropatía a que da lugar su consumo crónico en los cerdos [3,4]. Asimismo existen datos que indican, en contra de lo que se pensaba, un posible efecto genotóxico [5-11]. Estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de evaluar la exposición humana a dicha micotoxina.

En los últimos quince años, diversos trabajos han puesto de manifiesto que el ser humano está expuesto a la OTA, bien sea por exposición directa a través del consumo de alimentos contaminados, bien sea por exposición indirecta a través del consumo de carne, leche, etc.

* A quien dirigir la correspondencia. Dra. Adela López de Ceraín. Tfno: 948 425653. Fax: 948 425652. Email: acerain@unav.es

de animales nutridos con alimentos contaminados. Se han detectado casos de contaminación prácticamente en todo el mundo: Estados Unidos, Canadá, Suecia, Alemania, Inglaterra, Francia, Italia, Polonia, Australia, África y Sudamérica, si bien los países subdesarrollados con un consumo importante de cereales son aquellos en los que las micotoxicosis son más frecuentes [2]. En España existen dos estudios recientes donde se demuestra la exposición de la población española a la OTA en zonas de Navarra [12] y Madrid [13]. El objetivo de este trabajo ha sido determinar la presencia de OTA en sangre de población humana residente en el sur de España para ampliar los datos de exposición y comparar los niveles encontrados con los de las otras zonas geográficas referidas.

Material y Métodos

Descripción de las muestras

Se han analizado un total de 83 muestras de plasma humano que han sido proporcionadas para realizar este estudio por la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada. Todas las muestras corresponden a mujeres de edades comprendidas entre los 30 y 70 años, residentes en la provincia de Granada. Las extracciones de sangre se han realizado a lo largo de los años 1996 y 1997, excepto 2 muestras que corresponden a extracciones de los años 1992 y 1994, y 11 cuya fecha exacta de extracción no pudo ser determinada.

Aparatos y Equipos

Se ha utilizado un equipo cromatográfico Hewlett-Packard modelo 1090 conectado a un espectrofotómetro de fluorescencia Hewlett-Packard modelo 1046A con un filtro de 370 nm. Se ha empleado una columna Spherisorb ODS-2 (25 × 0,3 cm D.I.; 10 μM) y una precolumna Spherisorb ODS-2 (Teknokroma, Barcelona). Para la medida de absorbancia de las soluciones de OTA se ha utilizado un espectrofotómetro UV de Kontron Uvikon modelo 923.

Ocratoxina A

Se han preparado soluciones madre de OTA (SIGMA®) de 100 mg/mL en metanol y se han mantenido a -20°C. La concentración exacta de estas soluciones se ha determinado mediante espectrofotometría UV a 333 nm (PM: 403,8; ε: 5500 M⁻¹ cm⁻¹).

Reactivos

Se han utilizado disolventes de las casas comerciales Riedel-de Hæn (Seelze, Germany) y E. Merck (Darmstadt, Germany). Los utilizados para la extracción han sido de grado "para análisis" y los componentes de la fase móvil de grado "HPLC". El agua desionizada procede de un sistema Milli-Q® (Millipore).

Extracción y purificación de las muestras

Para la obtención de la OTA a partir de las muestras de plasma se ha utilizado el método descrito por Jiménez y col. [12], que se basa en el de Bauer y Gareis [14], con una ligera modi-

ficación en el proceso final de evaporación del cloroformo. Se realiza una extracción líquido-líquido basada en la diferente solubilidad que presenta la ocratoxina A en cloroformo y bicarbonato sódico, a diferentes pH del medio. En primer lugar, sobre 5 mL de plasma, se añaden 40 mL de una disolución de MgCl₂/HCl para precipitar las proteínas. Tras acidificar hasta un pH inferior a 2,5, se añaden 10 mL de cloroformo, se agita y se centrifuga a 3000 rpm durante 10 minutos. Se extrae dos veces con 10 mL de bicarbonato sódico. La OTA, finalmente, se extrae de la disolución de bicarbonato con 10 mL de cloroformo, que se evaporan a sequedad en tubos de cristal de fondo cónico inmersos en un baño de agua a 40°C, bajo corriente de nitrógeno y en campana de seguridad química.

Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución

Las condiciones cromatográficas utilizadas han sido las descritas por Jiménez y col. [15] con la excepción de que, en esta ocasión, el extracto final se ha disuelto en fase móvil para su posterior análisis cromatográfico. El análisis cromatográfico de las muestras se llevó a cabo utilizando dos métodos analíticos que difieren entre sí en la proporción de los componentes de la fase móvil (acetato sódico 5 mM, metanol y acetonitrilo): para concentraciones superiores a 2 ng/mL, 40:30:30 v/v y para concentraciones inferiores a este valor, 48:26:26 v/v. La sensibilidad de la detección (PMT) también ha variado entre los dos métodos, siendo 14 y 17, respectivamente. Para ambos métodos, el flujo de la fase móvil se ha fijado en 1,5 mL/min., el volumen de inyección ha sido 25 μL, la temperatura de análisis 40°C y las longitudes de onda de emisión y de excitación 225 nm y 461 nm respectivamente.

Validación del método analítico

Para la validación del método se han evaluado los apartados de linealidad, precisión (repetibilidad y reproducibilidad), exactitud, recuperación, límites de detección (LD) y cuantificación (LC) y confirmación de las muestras positivas. Para el estudio de linealidad se estimó el intervalo de concentraciones en función de los niveles hallados en las muestras. Se han elaborado dos rectas de calibrado; la primera con las concentraciones de 0,4, 0,8, 1, 1,5 y 2 ng/mL y la segunda de 2, 2,5, 3, 3,5 y 4 ng/mL. Se cromatografiaron tres réplicas de cada concentración. Ambas rectas de calibrado presentaron una buena relación entre el área de los picos y la concentración de OTA en el rango de concentraciones estudiado. Los parámetros de las curvas de calibrado fueron, $y = 309,2x - 17,1$ ($r = 0,999$) para el rango de concentraciones de 0,4 a 2 ng/mL y para el rango de concentraciones de 2 a 4 ng/mL, $y = 29,8x + 0,124$ ($r = 0,999$) donde y es el área de pico y x es la concentración de OTA en ng/mL. Además, se ha comprobado la linealidad representando gráficamente los resultados obtenidos con las rectas de calibrado frente a las concentraciones preparadas, dando lugar a rectas de pendientes y coeficientes de correlación muy cercanos a la unidad (>0,999) y ordenadas que no diferían significativamente de 0. Se ha evaluado la precisión como repetibilidad y reproducibilidad. Para el estudio de repetibilidad se han preparado y analizado tres muestras de las concentraciones baja, media y

alta de cada recta en el mismo día. Para el cálculo de la reproducibilidad se han preparado y analizado tres muestras de las concentraciones baja, media y alta de cada recta en tres días distintos. Los resultados obtenidos, $CV < 15\%$ para todas las concentraciones estudiadas (Tabla 1) indican que el método tiene adecuada repetibilidad y reproducibilidad [16].

Tabla 1. Resultados del estudio de validación

| | | |
|---------------------------------|-----------------------------|----------------------------------|
| Linealidad | Rango: (0,4-2 ng/mL) | $r = 0,999; y = 309,19x - 17,06$ |
| | Rango: (2-4 ng/mL) | $r = 0,999; y = 29,84x + 0,124$ |
| Precisión | Repetibilidad ($n=3$)* | $CV < 9,6\%$ |
| | Reproducibilidad ($n=9$)* | $CV < 6,7\%$ |
| Recuperación ($n=12$)* | | 91,9% ($CV = 12,9\%$) |
| Límite de Detección | | 0,22 ng/mL |
| Límite de Cuantificación | | 0,43 ng/mL |

* (Niveles de ensayo: 0,4-2-4 ng/mL)

Los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) se han determinado por la relación señal-ruido de concentraciones decrecientes de OTA en plasma, considerándose como LD o LC la concentración de OTA que presenta una relación señal-ruido de 2 ó 6 respectivamente.

La recuperación se ha calculado comparando las áreas de pico de OTA obtenidas a partir de muestras de plasma y muestras de calibrado a distintas concentraciones.

La confirmación de las muestras positivas se ha llevado a cabo mediante dos procedimientos: a) la observación del desplazamiento del pico de OTA, como consecuencia de la modificación de la proporción de disolvente acuoso en la fase móvil b) la adición de cierta cantidad conocida de OTA, con el consiguiente aumento del pico resultante.

Resultados

Validación del método analítico

En la validación del método se han obtenido resultados adecuados para todos los apartados evaluados (Tabla 1).

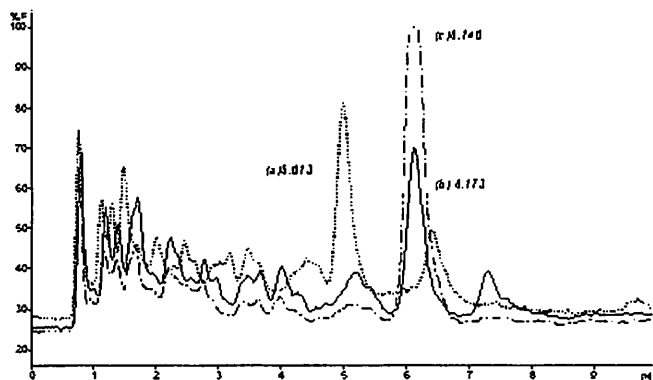


Figura 1. Cromatogramas correspondientes al análisis de la muestra n° 33: (a) Fase móvil: 48% de acetato sódico 5 mM, 26% de acetonitrilo y 26% de metanol. (b) Fase móvil: 49% de acetato sódico 5 mM, 25.5% de acetonitrilo y 25.5% de metanol. (c) Se ha añadido a la muestra 106 mL de una disolución de 1 ng/mL y el análisis se ha realizado con una fase móvil compuesta por: 49% de acetato sódico 5 mM, 26% de acetonitrilo y 26% de metanol.

Se han confirmado un 22% de las muestras positivas con resultados satisfactorios en todos los casos. La figura 1 muestra los dos procedimientos de confirmación. Se observa cómo el pico de OTA correspondiente a la muestra n° 33 (0,53 ng/mL) que aparece a un tiempo de retención de 5,01 min., se desplaza hasta un valor de 6,14 min. al aumentar la proporción de disolvente acuoso en la fase móvil en un 1%. Este mismo pico aumenta su área al añadirle un volumen conocido de disolución de ocratoxina A.

Niveles de OTA en plasma

De las 83 muestras de plasma analizadas, 72 resultaron positivas, esto es, han presentado valores de OTA por encima de 0,22 ng/mL (LD). El valor máximo encontrado ha sido 6,96 ng/mL y la concentración media 0,63 ng/mL. La estimación de la concentración media se ha calculado considerando un valor de 0,11 ng/mL para concentraciones inferiores al LD y de 0,22 ng/mL para concentraciones comprendidas entre el LD y el LC. Del total de muestras positivas, 50 presentaban unos niveles de OTA por encima del LC (0,43 ng/mL) y 9 de ellas han presentado valores superiores a 1 ng/mL. Los resultados obtenidos en este estudio y en los otros dos realizados en España se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Concentraciones plasmáticas de Ocratoxina A (ng/mL) en diferentes regiones españolas

| | N | Rango de concentraciones (ng/mL) | | | |
|----------------|-----|----------------------------------|----------------|-------------|---------------|
| | | LD (ng/mL) | % de positivos | Media (DE) | Mínimo Máximo |
| Granada | 83 | 0,22 | 84,7 | 0,63 (0,41) | <0,22 6,96 |
| Madrid | 168 | 0,02 | 100 | 0,89 (?) | 0,02 5,58 |
| Navarra | 75 | 0,52 | 53,3 | 0,71 (0,69) | <0,52 4,00 |

Se han estudiado también las posibles variaciones a lo largo de las distintas estaciones del año, excluyendo aquellas muestras de las que se desconocía la fecha de extracción (Fig. 2). Se ha realizado el test no paramétrico de Kruskal-Wallis que demuestra que no existen diferencias significativas entre los niveles de OTA en plasma de las muestras recogidas en 1996 y 1997 ($n = 70; \chi^2 = 4,591; p = 0,597$).

Discusión

Diversos datos obtenidos en los estudios sobre exposición humana a OTA a través del análisis del plasma pueden ser utilizados para comparar los resultados, tales como porcentaje de muestras positivas, concentración plasmática media o rango de concentraciones. Debido a la variedad de técnicas analíticas empleadas y a los diferentes límites de detección y cuantificación obtenidos, la comparación de los rangos de concentración parece más adecuada que la comparación del por-

centaje de positivos o incluso la concentración media, sin tener idea sobre la dispersión de los resultados [12]. En el caso de España se observa que el rango de concentraciones obtenidos en las tres regiones estudiadas es bastante semejante. Los niveles plasmáticos medios encontrados en Granada, son similares a los encontrados en Navarra y ligeramente inferiores a los presentes en la zona media, mientras que el porcentaje de muestras positivas es superior en Madrid, seguido de Granada y por último Navarra (Tabla 2). Estas discrepancias aparentes posiblemente se deben a la diferente sensibilidad de las técnicas: en el estudio de Madrid el LD conseguido es muy bajo (0,020 ng/mL), por lo cual el 100% de las muestras son positivas, aunque, la mayoría de ellas, con valores en torno a 1 ng/mL. El LD conseguido por nosotros es del orden de 10 a 20 veces superior, lo que explica que el porcentaje de positivos sea más bajo. No obstante, en todos los estudios, la mayoría de los valores son inferiores a 1 ng/mL y solamente algunos valores exceden esta media, algunos de los cuales son considerados valores extremos o "outliers" (Fig. 2).

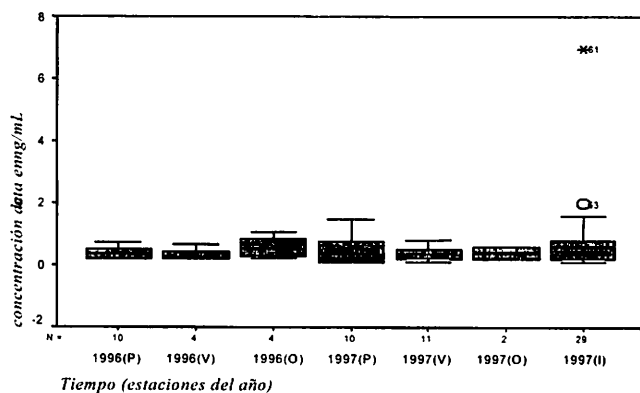


Figura 2. Distribución de los datos de concentración plasmática de OTA a lo largo de los años 1996 y 1997. P = Primavera, V = Verano, O = Otoño, I = Invierno.

Estos datos de exposición son totalmente equiparables a los encontrados en otros países de nuestro entorno, como Francia [17] o Italia [18], aunque inferiores a los encontrados en zonas geográficas próximas a los Balcanes [3, 19].

En el presente trabajo, a diferencia de los anteriores publicados en España, no se han encontrado diferencias significativas entre los valores de las muestras obtenidas en distintas estaciones del año. En este estudio sólo se han analizado muestras de plasma aisladas a partir de mujeres. En estudios anteriores, nunca se han encontrado diferencias entre sexos [12, 20, 21], razón por la cual, no sería lógico pensar que en varones, se hubieran encontrado resultados distintos.

La exposición humana a esta micotoxina se puede estimar en base a su ingesta diaria, que se puede obtener evaluando el nivel de OTA presente en los alimentos consumidos diariamente. Sin embargo, ante la dificul-

tad que entraña el cálculo de esta exposición por la ausencia de datos suficientes, se propuso la determinación de los niveles plasmáticos de OTA como indicador indirecto de la exposición humana a esta micotoxina [22, 23]. A la hora de realizar el cálculo de la ingesta diaria es preciso tener en cuenta los parámetros toxicocinéticos de biodisponibilidad y aclaramiento, no conocidos con exactitud en el hombre, pero estimados por Hagelberg en base a una serie de suposiciones [24]. Así, utilizando la ecuación propuesta por Klaasen [25] $K_o = Cl_p \times C_p / A$, donde K_o es la ingesta diaria (ng/Kg pc día); A la Biodisponibilidad (0,57); Cl_p el aclaramiento plasmático (0,67 mL/Kg día) y C_p la concentración media en plasma (ng/mL), se obtiene el valor de ingesta diaria de OTA. Teniendo en cuenta el valor medio obtenido en el presente estudio, 0,63 ng/mL, el valor de ingesta diaria correspondiente a la población de Granada, sería de 0,74 ng/kg pc/día. Este valor es muy inferior al nivel recomendado por el JECFA (16 ng/Kg pc/día) [26] y por el Comité Nórdico de expertos (5 ng/Kg pc/día) [27]. Sin embargo, si se hiciera el cálculo considerando la concentración plasmática máxima obtenida, 6,96 ng/mL, el valor de ingesta diaria resultante, 8,18 ng/mL, sería superior al aconsejado por el Comité Nórdico de Expertos [27].

Los resultados obtenidos en este trabajo, indican que existe una exposición continuada y generalizada de la población de Granada a la OTA, y constituye otra evidencia más para apoyar la teoría de que la exposición humana a la OTA es de ámbito mundial, si bien a la vista del estado actual de los conocimientos sobre la toxicidad de la OTA, no representa un problema de salud pública. No obstante, sería interesante indagar el origen de las altas concentraciones plasmáticas de OTA encontradas en algunas personas, en las cuales unos niveles de exposición tan elevados de forma continuada, podrían afectar a su salud.

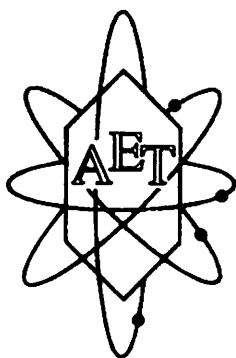
Agradecimientos

Los autores desean expresar su agradecimiento a la Dra. Fátima Olea de la Universidad de Granada por las muestras de plasma que amablemente les ha proporcionado, lo que les ha permitido realizar este trabajo.

Bibliografía

- López de Cerain A, Jiménez AM, Ezepeleta O, Bello J (2000): Efectos tóxicos de la Ocratoxina A. *Revista de Toxicología*. 17:61-69.
- IARC (1993) Ochratoxin A. En: Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol 56: 489-521.
- Krogh P y Elling F (1976): Fungal toxins and endemic (Balkan) nephropathy. *The Lancet*. July: 3-40.
- Barnes JM, Carter RL, Peristianis GC, Austwick PKC, Flynn FV y Aldridge WN (1977) Balkan (endemic) nephropathy and a toxin-producing strain of *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium*: an experimental model in rats. *The Lancet*. 26: 671-675.

5. Pfohl-Leszkowicz A, Grosse Y, Kane A, Creppy EE and Dirheimer G (1993a) Differential DNA adduct formation and disappearance in three mouse tissues after treatment with the mycotoxin Ochratoxin A. *Mutation Research*. 289: 265-273.
6. Föllmann W, Hillebrand IE, Creppy EE y Bolt HM (1995) Sister chromatid exchange in cultured isolated porcine urinary bladder epithelial cells (PUBEC) treated with Ochratoxin A and alpha. *Archives of Toxicology* 69: 280-286.
7. Obrecht-Pflumio S, Grosse Y, Pfohl-Leszkowicz A y Dirheimer G (1996) Protection by indomethacin and aspirin against genotoxicity of Ochratoxin A, particularly in the urinary bladder and kidney. *Archives of Toxicology* 70: 244-248.
8. Degen GH, Gerber MM, Obrecht-Pflumio S y Dirheimer G (1997) Induction of micronuclei with Ochratoxin A in ovine seminal vesicle cell cultures. *Archives of Toxicology* 71: 365-371.
9. Dörrenhaus A y Föllmann W (1997) Effects of Ochratoxin A on DNA repair in cultures of rat hepatocytes and porcine urinary bladder epithelial cells. *Archives of Toxicology* 71: 709-713.
10. Dirheimer G (1998) Recent advances in the genotoxicity of mycotoxins. *Revue Médicale Vétérinaire* 149: 605-616.
11. Flieger A, Reckwitz T, Golka K, Sculze H, Föllmann W and Bolt HM (1998) Genotoxicity of the mycotoxin Ochratoxin A detected by UDS in primary cultures of human urothelial cells. *Toxicology Science*. 42(1-S), 79 (abstract).
12. Jiménez AM, López de Cerain A, González-Peñas E, Bello J, Betbeder AM, y Créppy EE. (1998). Exposure to ochratoxin A in Europe: comparison with a region of northern Spain. *Journal of Toxicology-Toxins Reviews* 17: 479-491.
13. Burdaspal P.A. y Legarda T.M. (1998) Datos sobre presencia de ocratoxina A en plasma humano en España. *Alimentaria*, Mayo: 103-109.
14. Bauer J y Gareis M (1987) Ochratoxin A in der Nahrungsmittelkette (Ochratoxin A in the food-chain). *Journal of Veterinary Medicine Series B* 34: 613-627.
15. Jiménez AM, López de Cerain A, González-Peñas E, Bello J (1999) A high performance liquid chromatographic method for the determination of Ochratoxin A in human plasma. *Chromatographia* 50: 457-460.
16. Bressolle F, Bromet-Petit M y Audran M (1996) Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. Application to pharmacokinetics. *Journal of Chromatography B* 686: 3-10.
17. Creppy EE, Betbeder AM, Gharbi A, Counord J, Castegnaro M, Bartsch H, Moncharmont P, Fouillet B, Chambon P, Dirheimer G (1991) Human ochratoxicosis in France. En: M Castegnaro, R Plestina, G Dirheimer, IN Chernozemsky, H Bartsch. *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours*. Lyon: IARC Science Publications No.115: 145.
18. Palli D, Miraglia M, Saieva C, Masala G, Cava E, Colatosti M, Corsi AM, Russo A y Brera C. (1999) Serum levels of ochratoxin A in healthy adults in Tuscany: correlation with individual characteristics and between measurements. *Cancer, Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 8: 265-269.
19. Fuchs R, Radic B, Ceovic S, Sostaric B, Hult K (1991) human exposure to ochratoxin A. En: *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours*. M. Castegnaro, R. Plestina, Dirheimer G, Chernozemsky IN, y Bartsch H, editores. Lyon: IARC Science publications No.115: 131.
20. Ruprich J, Ostry V (1993) Study of human exposure to ochratoxin A and assessment of possible sources. *Central European Journal of Public Health*. 1: 46-48.
21. Fröhlich AA, Marquardt RR y Ominsky KH (1991) Ochratoxin A as a contaminant in the human food chain: a canadian perspective. *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary tract Tumours*. Castegnaro M, Plestina R, Dirheimer G, Chernozemsky In Y Bartsch H. Editores. Lyon: IARC Science publications No.115: 139.
22. Smith JE, Lewis CW, Anderson JG, y Solomons GL (1994) The penicillium toxins-pathology and epidemiology. Goulden ML. *Mycotoxins in Human Nutrition and Health*. Agro-Industral Research Division, DG xii. European Commission, EUR16048EN, 111.
23. Breiholtz A, Olsen M, Dahläck A y Kult K (1991) Plasma Ochratoxin A levels in three swedish populations surveyed using an ion-pair HPLC technique. *Food Additives and Contaminants*. 8: 183-186.
24. Hageberg S, Fuchs P y Hult K (1989) Toxicokinetics of Ochratoxin A in several species and its plasma-binding properties. *Journal of Applied Toxicology* 9: 91-96.
25. Klaassen CD (1986) Distribution, excretion and absorption of toxicants. Casarett and Doull's *Toxicology. The Basic Science of Poisons*, Klaassen, Amdur y Doull (Eds.), 3ª edición, Nueva York. Mc Millan, pp. 33-63.
26. JECFA (1995) Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 44 th Meeting. *Technical Report Series N° 859*, Ginebra, OMS.
27. Olsen M, Thorup I, Knudsen I, Larsen JJ, Hald B y Olsen J (1991) Health evaluation of Ochratoxin A in food products. *Nordiske Seminar-og Arbejdsrapporter*, Copenhagen, Nordic Council of Ministers, vol. 545.



Asociación Española de Toxicología

aetox@uhm.es

Revista de Toxicología

revista.toxicologia@ccma.csic.es

<http://tox.umh.es/aet/revista/>