

Actualidad Educativa

LATINOAMERICANA

ISSN 1959-1887

Septiembre, Vol. 10, N°1 2019



*Micotoxinas •
de Alternaria
en alimentos
frescos y productos
procesados:
métodos
de análisis y efectos
en la salud*

*La Institucionalidad •
del Sector
Agropecuario
Panameño*

*Técnica de Producción Agrícola •
a base de Hidrogel aplicada
al Cultivo de Tomate*

*Teak Efficiency and Environmental
Education Methods for Batipa*





Joyce K. Lezcano

y Pedro González Beermann

Departamento de Química,

Universidad Autónoma

de Chiriquí, El Cabrero,

David-Chiriquí, Panamá.

E-mail: joyce.lezcano@unachi.ac.pa

Micotoxinas de *Alternaria* en alimentos frescos y productos procesados: métodos de análisis y efectos en la salud

Resumen

La contaminación de frutas y vegetales por micotoxinas producidas por hongos del género *Alternaria* spp., suele ser una causa frecuente de intoxicación y de pérdidas económicas para productores y el sector industrial. La exposición a las toxinas de *Alternaria* spp., se ha relacionado con diversos efectos adversos para la salud en personas y animales. Se ha demostrado que estas micotoxinas tienen capacidad genotóxica, mutagénica, carcinogénica y citotóxica. *Alternaria* spp. es uno de los agentes fúngicos más frecuentes durante la época de maduración de los frutos, causando la podredumbre negra. Actualmente sus metabolitos tóxicos son investigados por su alta actividad biológica y potencial toxicogénico. La presente revisión bibliográfica se enfoca en las características generales de estas micotoxinas, los efectos tóxicos, así como los métodos de análisis y estudios recientes en diversos alimentos frescos y procesados.

Palabras claves: micotoxinas, *Alternaria* spp., métodos de análisis, inocuidad alimentaria.

Abstract

Mycotoxin contamination caused by fungi of the genus *Alternaria* spp., in fruits and vegetables, is usually a major cause of poisoning and economic losses to producers and the industrial sector. Exposure to the toxins of *Alternaria* spp., has been related to the occurrence of adverse health effects in people and animals; it has been shown to have genotoxic, mutagenic, carcinogenic and cytotoxic capacity. *Alternaria* spp. is one of the most frequent pollutants during the fruit ripening season, causing black rot; currently, its toxic metabolites are investigated for their high biological activity and toxicogenic potential. This review shows an update on the general characteristics of these mycotoxins, the toxic effects, as well as the methods of analysis and recent studies in various fresh and processed foods.

Keywords: mycotoxins, *Alternaria* spp., methods of analysis, food safety.





Introducción

La *Alternaria* spp., es un género fúngico muy común, que incluye especies patógenas ampliamente distribuidas en el suelo y la materia orgánica en descomposición; se encuentra además, con frecuencia en semillas, plantas y productos agrícolas (Benavidez Rozo, Patriarca, Cabrera, & Fernández Pinto, 2014). Es responsable de considerables pérdidas económicas, debido a que reduce el rendimiento de las cosechas y produce deterioro en los alimentos durante su almacenamiento. La presencia de *Alternaria* spp. es un problema importante, principalmente en los tomates; en los que causa la podredumbre negra (Terminiello & Fernández Pinto, 2005). Las micotoxinas, por su parte, son metabolitos secundarios producidos por hongos filamentosos. La contaminación por *Alternaria* spp. y la existencia de micotoxinas reduce la calidad de los alimentos, deteriorando los nutrientes en estos (Meena, Zehra, Dubey, Aamir, Gupta & Upadhyay, 2016). Constituye además un factor de riesgo para la salud del consumidor debido a las propiedades de las micotoxinas para inducir efectos graves de toxicidad aún en dosis bajas. Actualmente no hay un límite legal o de guía para estas micotoxinas en alimentos, por parte de las autoridades reguladoras a nivel internacional; sin embargo, los datos obtenidos en otros países dan cuenta de una exposición frecuente y prolongada a micotoxinas de *Alternaria* spp., en la dieta humana. Por lo tanto, es necesario más investigación sobre la existencia y caracterización de estas micotoxinas en los alimentos y sus inherentes riesgos para la salud humana y animal.

Micotoxinas de *Alternaria* spp.

Las micotoxinas son potentes toxinas que tienen un amplio rango de acción en animales y humanos. En este sentido, las toxinas de *Alternaria* spp. han demostrado poseer capacidad genotóxica, mutagénica, carcinogénica, citotóxica, inmunosupresora y nefrotóxica (Man, Liang, Li & Pan, 2016; Krska, Schubert-Ullrich, Molinelli, Sulyok, MacDonald & Crews, 2008). Actualmente, se conocen más de 120 metabolitos secundarios del género *Alternaria* spp; una cuarta parte de ellos se designan como micotoxinas (Brzonkalik, Herrling, Sylatk, & Neumann, 2011). Debido a la estabilidad de las micotoxinas, éstas pueden estar presentes en los alimentos cuando los hongos ya no están presentes. Además, un hongo puede producir diferentes micotoxinas y una micotoxina pueden ser producidas por diferentes hongos (Fernández-Cruz, Mansilla & Tadeo, 2010, p.113). La producción de micotoxinas varía con la cepa fúngica, el sustrato, el medio ambiente y las condiciones de crecimiento, esto incluye factores como la actividad del agua a_w , temperatura, valor pH y luz. Debido a su contenido de nutrientes, los alimentos para la nutrición humana y en especial los que tienen un alto contenido de humedad, como las frutas, son el medio de cultivo ideal para los hongos (Rychlik, 2012).

De los cientos de micotoxinas conocidas que pueden estar presentes en alimentos, sólo un número muy limitado está sujeto a reglamentaciones legales y monitoreo regular; tal es el caso de las aflatoxinas (AF), fumonisinas (FB), el deoxinivaleno (DON), la zearalenona (ZEN) y la ocratoxina A (OTA) que son analizadas con mayor frecuencia; sin embargo en los últimos años han tomado relevancia las denominadas micotoxinas "nuevas" o "emergentes" es decir, micotoxinas que no han recibido tanta atención científica como AF, FB, DON, ZEN y OTA, dentro de las que se encuentran las micotoxinas de *Alternaria* spp., (Streit, Schwab, Sulyok, Naehrer, Krska & Schatzmayr, 2013).

Dentro del género *Alternaria* spp., la especie *Alternaria alternata* es una de las de mayor interés porque produce varias micotoxinas. El crecimiento óptimo de la *A. alternata* se da cerca de 25 °C, la a_w mínimo para el crecimiento es de 0.88 y el pH óptimo es de 4-5.4 (Ostry, 2008, p.178). Las condiciones óptimas para la producción de las micotoxinas de *Alternaria* spp.: alternariol, alternariol monometil éter y ácido tenuazónico identificadas por Pose, Oatriarca, Kyanko, Pardo, Fernandez-Pinto (2009), fueron 21°C/0,954 a_w , 35°C/0,954 a_w y 21 °C/0,982 a_w , respectivamente.





La mayoría de las micotoxinas son relativamente estables al calor dentro del rango de las temperaturas de procesamiento de alimentos convencionales (80-121 °C), por lo que se produce poca o ninguna degradación en condiciones normales de cocción, como hervir, freír, o incluso después de la pasteurización (Gleadle, Mortby, Hatch, Burt, 1998). El impacto de la descomposición de alimentos producida por los hongos es grave; se estima que causa una pérdida del 25% del total de producción agrícola mundial (Rychlik, 2012), y estimaciones de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) indican que las pérdidas globales de productos alimenticios debido a las micotoxinas están en el rango de 1000 millones de toneladas por año.

Las frutas y vegetales afectados por *Alternaria* spp., presentan regularmente áreas podridas visibles; sin embargo, las toxinas de *Alternaria* spp., se pueden transferir de la parte podrida a los tejidos circundantes. Por lo tanto, estas toxinas podrían estar también presente en productos procesados debido a las limitaciones de los procedimientos industriales actuales, para eliminar completamente los tejidos en descomposición (Zhao, Shao, Yang & Li, 2015, p.343; Logriego, Moretti & Solfizzo, 2009). Las mejoras en la seguridad alimentaria en los países desarrollados han eliminado la micotoxicosis humana aguda, debido al uso de prácticas agrícolas modernas y la presencia de regulaciones legislativas; sin embargo éstas, aún ocurren en países en desarrollo, debido principalmente a las condiciones climáticas y de almacenamiento propicias para el crecimiento de hongos (Fernández-Cruz et al. 2010, p.114); así como a la falta de regulaciones en materia de micotoxinas.

Clasificación y estructura química de las micotoxinas de *Alternaria*

Las micotoxinas de *Alternaria* spp., pueden ser divididas dentro de cinco categorías dependiendo de su estructura química, incluyen derivados de dibenzopironas, derivados de ácidos tetrámicos, derivados de perileno, toxinas AAL (*Alternaria Alternata* f. sp. *Lycopersici*) y estructuras misceláneas:

- Dibenzopironas: AOH, AME y ALT.
- Perileno quinonas: ATX-I, -II, -III.
- Ácidos tetrámicos: TeA.
- AAL toxinas: AAL-TA1, AAL-TA2, AAL-TB1, AAL-TB2.
- Estructuras misceláneas: TEN.

El alternariol (AOH), altenariol monometil éter (AME), altenueno (ALT), ácido tenuazonico (TeA), altertoxinas I, II y III (ATX-I, ATX-II, ATX-III) y la tentoxina (TEN) son consideradas como las micotoxinas de *Alternaria* más importantes (Man et al. 2016; Prelle et al. 2013, p.161).

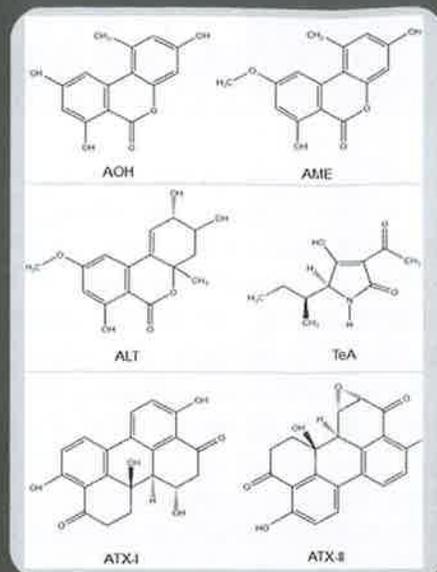


Fig. 1. Estructura química del AOH, AME, ALT, TeA, ATX-I y ATX-II

Toxicología

El impacto de las micotoxinas en la salud depende de la concentración y la duración de la exposición a la toxina, la toxicidad del compuesto, el peso corporal del individuo, la presencia de otras micotoxinas, factores ambientales, manejo en campo y efectos dietéticos (Kuiper-Goodman, 2004). La toxicidad de las micotoxinas de *Alternaria* spp., ha sido ampliamente establecida; existe fuerte evidencia de que el AME y AOH pueden ser mutagénicos ya que actúa como antagonista de la topoisomerasa; además, el AME provoca roturas de cadena de ADN. Se ha sugerido que el AME y el AOH en granos podría ser un factor responsable de la alta incidencia de cáncer de esófago en humanos en el condado de Linxian, China (Asam, Konitzer, Schieberle & Rychlik, 2009). La ingesta de dosis diarias de 10 mg/kg de peso corporal de TeA en perros, provocó la aparición de hemorragias en diversos órganos. En las aves domésticas, dosis de 10 mg/kg en la alimentación, disminuyó tanto la eficiencia alimenticia como la ganancia de peso e incrementó las hemorragias internas (Brzonkalik et al. 2011, p.1775; Streit et al. 2013). Ratones que consumieron pienso contaminado con TeA durante 10 meses, desarrollaron alteraciones en la mucosa esofágica (cambios precancerosos), con dosis diaria de 25 mg/kg de peso corporal, lo que sugiere la posibilidad de que la progresión al cáncer de esófago puede ocurrir después de una exposición prolongada (Yekeler, Bitmis, Ozcelik, Doymaz, & Calta, 2001).





Además, el consumo de sorgo contaminado con TeA, se ha relacionado con la aparición de un desorden hematológico humano conocido como Onyalai (Brzonkalik et al. 2011, p.1776), (Bottalico & Logriego, 1998). Entre las toxinas Alternarias, el TeA es considerado como el que tiene la toxicidad aguda más alta, mostrando valores de dosis letal media LD50 de 225 mg/kg (peso corporal) en ratones y 37.5 mg/kg en polluelos.

El TeA es un fuerte agente quelante con propensión a quelar iones metálicos en varias sustancias biológicamente importantes. Puede quelarse con calcio, magnesio, cobre y otros metales, y luego de la quelación se combina con el centro activo de la tripsina, por lo que se inhibe la formación de enlaces peptídicos de la síntesis de proteína (Carrasco & Vazquez, 1973; Robeson & Jalal, 1991; Brzonkalik et al. 2011). El TeA es la única micotoxina Alternaria que se incluyó en la lista de Registro de Sustancias Químicas Tóxicas de la Administración de Alimentos y Medicamentos FDA (Ostry, 2008). Las ATX I y II han mostrado una considerable citotoxicidad y potencial mutagénico, siendo la ATX II al menos 50 veces más potente como mutágeno que el AOH y el AME (Liu & Rychlik, 2015).

Estudios previos sobre micotoxinas de *Alternaria* spp. Las micotoxinas de *Alternaria* spp., han sido reportadas en investigaciones llevadas a cabo con diferentes alimentos; entre ellos, en tomates (Asam et al. 2011; Da Motta & Soares, 2000), zanahorias (Solfrizzo, De Girolamo, Vitti, & Visconti, 2004), jugos de manzanas (Scott & Kanhere, 2001), olivas (Visconti, Logriego, & Bottalico, 1986), cerveza (Siegel, Feist, Proske, Koch, & Nehls, 2010), entre otros. Noser, Schneider, Rother, & Schmutz (2011) evaluaron 85 productos de tomate, consistentes en tomates pelados y picados, sopa y salsas, purés y concentrados de tomate, ketchup, los cuales fueron tomados del mercado suizo. Encontrando que el TeA fue la micotoxina que se encontraba con mayor frecuencia (81/85 muestras) y en los niveles más altos de hasta 790 µg/kg. Tomates y productos de tomate del mercado brasileño fueron evaluados por Da Motta & Valente Soares (2001) para TeA, AOH y AME; encontrando niveles de entre 11 a 4021 µg/kg. Las concentraciones más altas se reportaron para las muestras de puré de tomate (≥ 1000 µg/kg). Terminiello, Patriarca, Pose & Fernández Pinto (2006), encontraron que 39 de 80 muestras de puré de tomate argentino contenían una o dos de las micotoxinas TeA, AOH o AME. Van de Perre et al., (2014) colectaron muestras de tomate fresco, pimientos, cebollas y frutos rojos; en varios mercados en diferentes países (Belgica, España, Egipto, Brasil, India y Sudáfrica), para examinarlas en su contenido AOH, AME, TeA, OTA y fumonisinas (FB1, FB2 y FB3). Encontrando que los datos de consumo belgas y el valor medio obtenido (4230 ng/kg peso corporal/día) fueron más altos que el valor umbral de preocupación toxicológica (TTC) de 1500 ng/kg peso corporal/día establecido por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria EFSA.

Métodos de análisis para micotoxinas de *Alternaria* spp.

Muchos de los métodos analíticos utilizados para la determinación de metabolitos fúngicos, son aún específicos para una sola micotoxina o un grupo estrechamente relacionado de micotoxinas; lo que constituye una limitación para controlar una gran cantidad de micotoxinas debido a que se requeriría un análisis por separado para cada micotoxina (Streit et al. 2013). Sin embargo, actualmente hay una fuerte tendencia hacia el desarrollo de métodos multi-micotoxinas para el análisis simultáneo de varias micotoxinas. Los métodos actuales generalmente incluyen un paso de extracción, un paso de purificación para reducir o eliminar co-extractos no deseados y un paso de separación con capacidad de detección específica adecuada (Krska et al. 2008). Para la etapa de extracción, las micotoxinas de *Alternaria* spp., (ALT, AOH, AME, TEN) son generalmente extraídas de los alimentos sólidos y líquidos a través de solventes orgánicos. Los procedimientos de purificación y concentración generalmente incluyen partición de solvente, extracción en fase sólida (SPE) mediante columnas o microextracción en fase sólida (SPME) (Scott & Kanhere, 2001), basadas principalmente en el uso de columnas de C18. Existe, además, otra técnica de preparación de muestra rápida, simple y efectiva, llamada QuEChERS (acrónimo en inglés) para abreviar, rápido, fácil, barato, efectivo, resistente y seguro, la cual había sido desarrollada inicialmente para la detección de plaguicidas en frutas y verduras, pero que se está utilizando cada vez más en el análisis de micotoxinas.

Entre las técnicas de análisis empleadas para la detección y cuantificación de estas micotoxinas se encuentran: la cromatografía de gases (GC), la cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS), la cromatografía líquida (LC), la cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS), especialmente la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) y la LC espectrometría de masas multi-etapa (LC-MSn), así como el Ensayo inmunosorbente ligado a enzima (ELISA). De las técnicas antes mencionadas, la Cromatografía Líquida, es la que más ampliamente ha sido utilizada para la detección de micotoxinas de *Alternaria* spp., particularmente la LC-MS/MS que tiene mayor sensibilidad en comparación con otros detectores como los UV, DAD y FLD. La LC-MS/MS basada en ionización por electrospray (ESI) o ionización química a presión atmosférica (APCI), ha sido crucial en el desarrollo de nuevos métodos de análisis multimicotoxinas. Sin embargo, a pesar de que el análisis HPLC-MS/MS, presenta múltiples ventajas como la alta selectividad y sensibilidad, esta técnica es susceptible a los efectos de la matriz. La ionización del analito puede verse afectado por compuestos de co-elución de la matriz, que pueden dar como resultado la supresión o intensificación de iones. Para compensar los efectos de matriz, a menudo se aplica el Análisis de Dilución de Isótopos Estables SIDA (acrónimo en inglés) el cual utiliza patrones isotópicamente etiquetados (Lohrey et al. 2013, p.115). Además, el SIDA, ofrece beneficios significativos para el análisis de trazas, rinde resultados más precisos y mejora la especificidad de la determinación. Los inmunoensayos también han sido utilizados para la determinación de micotoxinas Alternarias; dentro de ellos, destaca el Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas ELISA, el cual ofrece ventajas sobre los métodos instrumentales convencionales (como los cromatográficos) que requieren equipos costosos y técnicos altamente calificados (Sharma, Pillai, Gautam & Hajare, 2014, p.869).



CONCLUSIONES Y TENDENCIAS FUTURAS

La contaminación por *Alternaria* spp. y la existencia de micotoxinas constituye un factor de riesgo real para la salud de los consumidores. Es necesario disponer de programas de control de calidad que garanticen la inocuidad de los alimentos. Adicionalmente se requiere contar en el país con laboratorios de análisis químico, para la detección y cuantificación de estas micotoxinas. Esto permitiría adoptar las medidas necesarias para apartar de la cadena alimentaria los productos que puedan suponer un riesgo para la salud de los consumidores. Actualmente, la evaluación de riesgos relacionados de estas micotoxinas con la inocuidad de los alimentos en la Región Centroamericana es incipiente, existe una escasa fuente de datos cuantitativos, y se desconoce la contribución que hace cada alimento a la exposición dietética de estas toxinas. Esto deberá ser subsanado en los próximos años para poder garantizar la calidad de los productos alimentarios y así proteger a la población y la actividad agrícola.

REFERENCIAS

- Asam, S., Konitzer, K., Schieberle, P. & Rychlik, M. (2009). Stable Isotope Dilution Assays of Alternariol and Alternariol Monomethyl Ether in Beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 5152-5160.
- Asam, A., Liu, Y., Konitzer, K. & Rychlik, M. (2011). Development of a Stable Isotope Dilution Assay for Tenuazonic Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 2980-2987
- Bottalico, A. & Logrieco, A. (1998). Toxigenic *Alternaria* species of economic importance. En: *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*. Eds Sinha KK & Bhatnager D, Marcel Dekker, New York, 65-108.
- Benavidez Rozo, M.E., Patriarca, A., Cabrera, G. & Fernández Pinto, V.E. (2014). Determinación de perfiles de producción de metabolitos secundarios característicos de especies del género *Alternaria* aisladas de tomate. *Rev Iberoam Micol*;31(2):119-124
- Brzonkalik, K., Herrling, T., Sylдат, C. & Neumann, A. (2011). Process development for the elucidation of mycotoxin formation in *Alternaria alternata*. *AMB Express* 2011, 1:27
- Carrasco, L., Vazquez, D. (1973) *Biochem. Biophys. Acta -Nucleic Acids and Protein Synthesis* 319:209-215
- Da Motta, S. & Valente Soares, L.M. (2000). Simultaneous determination of tenuazonic and cyclopiyzonic acids in tomato products. *Food Chemistry* 71, 111-116.
- Gleadle, A.E., Mortby, E.M., Hatch, A., Burt, R. (1998). Scientific Co-operation Task on Aflatoxins: the co-ordinators view. In *Mycotoxins and Phycotoxins: Developments in Chemistry, Toxicology and Food Safety*.
- Fernández-Cruz, M.L., Mansilla, M. L. & Tadeo, J.L. (2010). Mycotoxins in fruits and their processed products: Analysis, occurrence and health implications. *Journal of Advanced Research* (2010) 1, 113-122.
- Krska, R., Schubert-Ullrich, P., Molinelli, A., Sulyok, M., MacDonald, S. & Crews, C. (2008) *Mycotoxin analysis: An update*, *Food Additives & Contaminants*, 25:2, 152-163
- Kuiper-Goodman, T. (2004). Risk assessment and risk management of mycotoxins in food. In *Mycotoxins in Food. Detection and Control*; Magan, N., Olsen, M., Eds.; CRC Press, Woodhead Publishin Limited: Abington Hall, Abington, MA, USA.
- Liu, Y. & Rychlik, M. (2015). Biosynthesis of seven carbon-13 labeled *Alternaria* toxins including altertoxins, alternariol, and alternariol methyl ether, and their application to a multiple stable isotope dilution assay. *Anal Bioanal Chem* (2015) 407:1357-1369.
- Lohrey, L., Marschik, S., Cramer, B., & Humpf, H.U. (2013). Large-Scale Synthesis of Isotopically Labeled 13C2-Tenuazonic Acid and Development of a Rapid HPLC-MS/MS Method for the Analysis of Tenuazonic Acid in Tomato and Pepper Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 114-120
- Logrieco, A., Moretti, A. & Solfrizzo, M. (2009). *Alternaria* toxins and plant diseases: an overview of origin, occurrence and risks. *World Mycotoxin Journal*, 2, 129-140.
- Man, Y., Liang, G., Li, A. & Pan, L. (2016). Analytical Methods for the Determination of *Alternaria* Mycotoxins. *Chromatographia*
- Meena, M., Zehra, A., Dubey, M., Aamir, M., Gupta V., & Upadhyay, R. (2016). Comparative Evaluation of Biochemical Changes in Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Infected by *Alternaria alternata* and Its Toxic Metabolites (TeA, AOH, and AME). *Frontiers in Plant Science* September 2016, 7.
- Noser, J., Schneider, P., Rother, M. & Schmutz, H. (2011). Determination of six *Alternaria* toxins with UPLC-MS/MS and their occurrence in tomatoes and tomato products from the Swiss market. *Mycotoxin Research* - November 2011.
- Ostry, V. (2008). *Alternaria* mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. *World Mycotoxin Journal*, May 2008; 1(2): 175-188
- Pavón Moreno, M. Á., González Alonso, I., Martín de Santos, R. & García Lacarra, T. (2012). Importancia del género *Alternaria* como productor de micotoxinas y agente causal de enfermedades humanas. *Nutr Hosp.* 2012;27(6):1772-1781
- Pose, G., Oatrarca, A., Kyanko, V., Pardo, A., Fernández Pinto, V. (2009) Effect of water activity and temperature on growth of *Alternaria alternata* on a synthetic tomato medium. *Int J Food Microbiol* 135(1):60-63
- Prelle, A., Spadaro, D., Garibaldi, A. & Gullino, M.L. (2013). A new method for detection of five *alternaria* toxins in food matrices based on LC-APCI-MS. *Food Chemistry* 140 (2013) 161-167.
- Robeson, D.J. & Jalal, M. (1991). Tenuazonic Acid Produced by an *Alternaria alternata* Isolate From *Beta vulgaris*. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 44, 109-116 (1991)
 - Rychlik, M. (2012). Mycotoxins in foods. Chapter 13 In book: *Chemical Contaminants and Residues in Food*, pp.320-34.
 - Scott, P. M., & Kanhere, S. R. (2001). Chromatographic method for *Alternaria* toxins in apple juice. *Methods in Molecular Biology*, 157, 225-234.
 - Siegel, D., Merkel, S., Koch, M., Nehls, I. (2010) Quantification of the *Alternaria* mycotoxin tenuazonic acid in beer. *Food Chem* 120:902-906
 - Sharma, A., Pillai, MRA., Gautam, & Hajare, SN. (2014). Immunological Techniques for Detection and Analysis. *Encyclopedia of Food Microbiology*, Volume 2
 - Solfrizzo, M., De Girolamo, A., Vitti, C. & Visconti, A. (2004). Liquid Chromatographic Determination of *Alternaria* Toxins in Carrots. *Journal of AOAC International* Vol. 87,(1):101-106
 - Streit, E., Schwab, C., Sulyok, M., Naehrer, K., Krska, R. & Schatzmayr, G. (2013). Multi-Mycotoxin Screening Reveals the Occurrence of 139 Different Secondary Metabolites in Feed and Feed Ingredients. *Toxins* 2013, 5, 504-523.
 - Terminiello, L., Patriarca, A., Pose, G. & Fernández Pinto, V. (2006). Occurrence of alternariol, alternariol monomethyl ether and tenuazonic acid in Argentinean tomato puree. *Mycotoxin Research*, 22(4), 236-240.
 - Van de Perre, E., Deschuyffeleer, N., Jaccs, L., Vekeman, F., Van Der Hauwaert, W., Asam, S., Rychlik, M., Devliaghre, F. & De Meulenaer, B. (2014). Screening of moulds and mycotoxins in tomatoes, bell peppers, onions, soft red fruits and derived tomato products. *Food Control* 37, 165-170
 - Yekeler, H., Bitmis, K., Ozcelik, N., Doymaz, M.Z., Calta, M. (2001). Analysis of toxic effects of *Alternaria* toxins on esophagus of mice by light and electron microscopy. *Toxicol. Pathol.* 2001, 29, 492-497.
 - Zhao, K., Shao, B., Yang, D. & Li, F. (2015). Natural Occurrence of Four *Alternaria* Mycotoxins in Tomato- and Citrus-Based Foods in China. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63 (1), pp 343-348.

