

# IV Workshop

## Libro de Abstracts



**Red nacional sobre las micotoxinas y hongos  
toxigénicos y de sus procesos de descontaminación**

**29-31 de mayo de 2019 - Facultad de Farmacia y Nutrición -  
Universidad de Navarra**



<http://micofood.es>

**ISSN: 2444-3158**

Editado en Valencia por: Red Nacional sobre las micotoxinas y hongos toxigénicos y de sus procesos de descontaminación.

Raquel Torrijos, Juan Manuel Quiles. **Micofood 2019**

## CONTENIDO

COMITÉ CIENTÍFICO	2
PROYECTO MICOFOOD	4
BIENVENIDA	5
PROGRAMA	6
ÍNDICE DE ABSTRACTS	9
COMUNICACIONES ORALES	12
POSTERS	32
COLABORADORES	57
NOTAS	58

## **COMITÉ CIENTÍFICO:**

Jordi Mañes Vinuesa (Universitat de València)  
Mónica Fernández Franzón (Universitat de València)  
Giuseppe Meca (Universitat de València)  
Misericordia Jiménez Escamilla (Universitat de València)  
Mar Rodríguez Jovita (Universidad de Extremadura)  
Vicente Sanchis Almenar (Universitat de Lleida)  
Agustín Ariño Moneva (Universidad de Zaragoza)  
Covadonga Vázquez Estévez (Universidad Complutense de Madrid)  
Elena González-Peñas (Universidad de Navarra)  
Adela López de Cerain (Universidad de Navarra)  
Luis González Candelas (Consejo Superior de Investigaciones Científicas)  
Alberto Cepeda Sáez (Universidad de Santiago de Compostela)  
Francisco Javier Cabañes Saenz (Universitat Autònoma de Barcelona)  
Ana María García Campaña (Universidad de Granada)

## **COMITÉ ORGANIZADOR:**

Jordi Mañes Vinuesa (Universitat de València)  
Elena González-Peñas (Universidad de Navarra)  
Adela López de Cerain (Universidad de Navarra)  
Monica Fernandez Franzon (Universitat de València)  
Cristina Juan Garcia (Universitat de València)  
Giuseppe Meca (Universitat de València)  
Lara Manyes Font (Universitat de València)  
Yelko Rodriguez Carrasco (Universitat de València)  
Dionisia Carballo Vera (Universitat de València)  
Noelia Pallares Barrachina (Universitat de València)  
Juan Manuel Quiles Beses (Universitat de València)  
Raquel Torrijos Caparros (Universitat de València)  
Thiago De Melo Nazareth (Universitat de València)  
Manuel Alonso Garrido (Universitat de València)

Veronica Zingales (Universitat de València)  
Alessandra Cimbalo (Universitat de València)  
Ariane Vettorazzi (Universidad de Navarra)  
Elena Lizarraga (Universidad de Navarra)  
Amaya Azqueta (Universidad de Navarra)  
Beatriz Arce-López (Universidad de Navarra)  
Borja Muñoz (Universidad de Navarra)  
María Alonso (Universidad de Navarra)  
Adriana Rodriguez (Universidad de Navarra)

## PROYECTO MICOFOOD

El objetivo de la red de excelencia trata de profundizar en la evaluación del riesgo, mejorar la calidad y seguridad alimentaria, y en definitiva proteger y promover la salud de la población, focalizándose en el estudio de distintos aspectos relativos a los hongos toxigénicos y a sus metabolitos las micotoxinas (MTs) con los siguientes objetivos concretos:

- Caracterizar las especies productoras de micotoxinas más relevantes de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*, en materias primas destinadas a la alimentación humana y animal.
- Establecer métodos rápidos, específicos y fiables para la detección de los hongos micotoxigénicos.
- Desarrollar métodos de análisis multi-micotoxinas en alimentos y fluidos biológicos.
- Evaluar la exposición de la población a través de los valores de contaminación de los alimentos de la dieta y los compuestos presentes en fluidos biológicos humanos
- Comprobar el empleo de diferentes tratamientos térmicos en la estabilidad y contenido de micotoxinas durante la fabricación y/o el procesado de alimentos y/o su posterior almacenamiento.
- Emplear compuestos naturales para reducir la presencia de hongos toxigénicos y sus respectivas micotoxinas en materias primas destinadas a la alimentación humana y animal.
- Caracterizar el peligro de las combinaciones de micotoxinas más frecuentemente encontradas en los estudios de exposición.
- Caracterizar las rutas de síntesis y su regulación genética y ambiental con el fin de evitar la contaminación en origen.

Ajustado a los objetivos del Programa Marco para la Investigación y la Innovación “Horizonte 2020”, MICOFOOD pretende profundizar la relación entre los investigadores, la industria alimentaria y la administración sanitaria con objeto de abordar y en lo posible minimizar los problemas provocados por la presencia de los hongos toxigénicos en los alimentos, así como favorecer la implantación y actuaciones de las medidas de gestión de la calidad.

**El coordinador de la red:**

*Dr. Jordi Mañes Vinuesa*

## BIENVENIDA

Queridos colegas y amigos.

Bienvenidos a Pamplona, a un nuevo workshop (y ya es el cuarto) de nuestra red MICOFOOD. En esta ocasión nos juntamos del 29 al 31 de mayo de 2019 en la Facultad de Farmacia y Nutrición de la Universidad de Navarra. Se nos presenta de nuevo la oportunidad de compartir unos días llenos de ciencia, trabajo y amistad. Hemos preparado con mucha ilusión este encuentro y los componentes de los Comités Organizador y Científico esperamos que esta reunión os resulte interesante y estimulante.

Durante estos días, los grupos de investigación sobre micotoxinas en España compartiremos nuestras últimas investigaciones y tendremos la oportunidad de escuchar a ponentes internacionales y a algunas de las empresas que con su trabajo nos proponen nuevas herramientas para poder abordar los nuevos retos a los que nos enfrentamos. Además de escuchar, tendremos la posibilidad de conversar, preguntar, aprender e idear nuevas líneas de investigación, colaboraciones y proyectos en este tema tan apasionante de los mohos toxigénicos y las micotoxinas.

Muy especialmente, damos la bienvenida a nuestros investigadores en formación, que representan el futuro. Esperamos que estos días de encuentro les sirvan para conocer nuevas perspectivas, nuevos puntos de vista y nuevos colegas.

Además del programa científico, hemos preparado algunas actividades de carácter social que os permitan conocer también la ciudad, su parte “vieja”, su catedral; y cómo no, su gastronomía. Esta faceta de convivencia es muy importante también en las relaciones profesionales, que se basan, en gran medida, en las relaciones humanas.

Agradecemos a la Facultad de Farmacia y Nutrición de la Universidad de Navarra la posibilidad de realizar este congreso en sus instalaciones y la ayuda que nos ha prestado en la organización de este workshop.

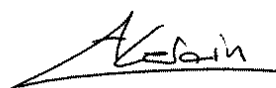
No nos podemos olvidar de las empresas que nos han apoyado y de todos los que, de una forma u otra, han participado en la organización.

Y por supuesto, muchas gracias a todos los que os habéis acercado a Pamplona para participar en la reunión y que habéis dedicado vuestro tiempo y esfuerzo para preparar unas ponencias de una gran calidad científica.

Esperamos que todos saquemos el máximo provecho y disfrutemos de estos días en Pamplona.



Elena González-Peñas



Adela López de Cerain

## PROGRAMA CIENTÍFICO

29/05/2019

### 18:00-19:00 Bienvenida y Sesión patrocinadores

Moderadores: **Jordi Mañes Vinuesa y María Elena González Peñas**

**18:15-18:30** **Análisis de micotoxinas en matrices alimentarias utilizando el sistema miniaturizado Ultivo Triple Quad LC/MS**  
K. Saitua, J. Morales, T. Sosienski (Agilent Technologies España)

**18:30-18:45** **Mycotoxin Analysis in Food**  
Fernando Rodríguez & Noemí Filloy (Phenomenex España, S.L.U.)

**18:45-19:00** **A brief overview on waters' solutions for target and untarget analysis of mycotoxins**  
P. de la Iglesia (Waters Cromatografía)

**19:00** **Salida por Pamplona. Cena de pinchos**

30/05/2019

8:45-9:30 – ACREDITACIÓN y ENTREGA DE DOCUMENTACIÓN

9:30-9:45 – INAUGURACIÓN DEL WORKSHOP

**09:45-10:30** **Conferencia invitada: Micotoxinas en el marco de la evaluación de la exposición: pasado, presente y futuro**  
B. De Santis, F. Debegnach, C. Brera (Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italia)

### Sesión I: Hongos toxigénicos

Moderadores: **Covadonga Vázquez Estévez y Misericordia Jiménez Escamilla**

**10:30-10:45** **Resecuenciación del genoma de cepas ocratoxígenas y no ocratoxígenas de *Aspergillus carbonarius***  
G. Castellá, M.R. Bragulat, L. Puig, W. Sanseverino, F.J. Cabañes (Universitat Autònoma de Barcelona)

**10:45-11:00** **Characterization of two genes putatively involved in griseofulvin biosynthesis in *Penicillium griseofulvum***  
A. Cometto, D. Spadaro, L. González-Candelas, and A.R. Ballester (IATA-CSIC)

**11:00-11:15** **Deciphering of *Penicillium expansum* secondary metabolome**  
C. Zetina, C. El Hajj Assaf, O. Rocher, S. Snini, E. L. Jamin, J. F. Martin, I. P. Oswald, O. Puel, S. Lorber (Université de Toulouse, INRA)

**11:15-11:45** **Coffee Break**



## Sesión II: Toxicología

Moderadores: Adela López de Ceráin Salsamendi y Mónica Fernández Franzón

<b>11:45-12:00</b>	<b>Effect of enniatins in mitochondrial processes of female rats</b> A. Cimbalo, L. Bayarri, M.J. Ruiz, M. Alonso, L. Manyes (Universitat de València)
<b>12:00-12:15</b>	<b>High overexpression of MTRF1A protein after BEA and EN B mixture exposure <i>in vitro</i></b> M. Alonso-Garrido, I.E. Pralea, C. Iuga, M.J. Ruiz, G. Font, L. Manyes (Universitat de València)
<b>12:15-12:30</b>	<b>Mycotoxins passage across blood-brain barrier <i>in vitro</i>: a metabolomics approach</b> N. Pallarés, M. Alonso-Garrido, M. Frangiamone, M.J. Ruiz, L. Manyes (Universitat de València)
<b>12:30-12:45</b>	<b>Detección de bases alquiladas mediante el ensayo del cometa</b> D. Muruzábal, J. Sanz-Serrano, S. Sauvaigo, B. Treillard, A. López de Cerain, A. Vettorazzi and A. Azqueta (Universidad de Navarra)
<b>12:45-13:30</b>	<b>Sesión de posters (premio al mejor poster)</b>
<b>13:30-15:00</b>	<b>Pausa comida</b>

## Sesión III: Análisis y control

Moderadores: Francisco Javier Cabañes Saenz y Ana M. García Campaña

<b>15:00-15:15</b>	<b>Método analítico para la cuantificación de 19 micotoxinas en plasma humano mediante LC-MS/MS</b> B. Arce-López, E. Lizarraga, M. Flores-Flores, Á. Irigoyen, E. González-Peñas (Universidad de Navarra)
<b>15:15-15:30</b>	<b>Utilización de aceites esenciales como método sostenible de control de <i>Aspergillus flavus</i></b> M. García-Díaz, A. Medina-Vaya, B. Patiño, E. García-Cela, C. Vázquez, J. Gil-Serna (Universidad Complutense de Madrid)
<b>15:30-15:45</b>	<b>Evaluación de la exposición a micotoxinas a través del consumo de bebidas alcohólicas y no alcohólicas</b> D. Carballo, G. Font, E. Ferrer, H. Berrada (Universitat de València)
<b>15:45-16:00</b>	<b>Evaluación del efecto de la utilización de especias en la elaboración de embutidos curado-madurados sobre la producción de Ocratoxina A</b> M.M. Álvarez , I. Martín , P. Padilla , A. Rodríguez, J.J. Córdoba, M.J. Andrade (Universidad de Extremadura)
<b>16:00-16:15</b>	<b>Evaluación de la presencia de micotoxinas en el sistema hepatobiliar de vacas de producción láctea</b> C.Nebot, C. Franco, E.M. Peris Montesa, Luis Quintela, A.Cepeda (Universidad de Santiago de Compostela)
<b>16:15-17:00</b>	<b>Reunión de coordinación de la red</b>
<b>18:30-19:30</b>	<b>Visita guiada a la catedral de Pamplona</b>
<b>21:00</b>	<b>Cena social en el restaurante El museo, Campus Universitario, s/n</b>

31/05/2019

## Sesión IV. Estrategias de reducción y prevención

Moderadores: Agustín Ariño Moneva y Mar Rodríguez Jovita

10:00-10:15	<b>Efecto de <i>Staphylococcus xylosus</i> en el crecimiento de mohos toxigénicos en sustratos cárnicos.</b> E. Cebrián, F. Núñez, A. Alía, E. Bermúdez, M. Rodríguez (Universidad de Extremadura)
10:15-10:30	<b>Potencial antifúngico de extractos de mostaza fermentados con bacterias ácido lácticas frente a <i>Fusarium</i> spp.</b> R. Torrijos, T.M. Nazareth , F.J. Martí, J.M. Quiles, C. Luz , J. Mañes , G. Meca (Universitat de València)
10:30-10:45	<b>Uso de compuestos de origen natural para reducir el crecimiento del <i>Aspergillus flavus</i> y la producción de aflatoxina B1 en almendras.</b> T.M. Nazareth, R. Torrijos, C. Luz, J.M. Quiles , K.C.P Bocate, F.B. Luciano, J. Mañes , G. Meca (Universitat de València)
10:45-11:00	<b>Engineered silver nanoparticles, a possible tool in the management of aflatoxigenic and ochratoxigenic fungi and aflatoxin and ochratoxin A production in food</b> J.V. Gómez, A. Tarazona, E.M. Mateo, J.V. Gimeno-Adelantado, R. Mateo-Castro, M. Jiménez, F. Mateo (Universitat de València)
11:00-11:30	<b>Coffee break</b>
11:30-13:00	<b>Mesa redonda: Del pienso a la mesa, por unos alimentos sin micotoxinas</b>  <i>Bárbara de Santis</i> , Istituto Superiore di Sanità <i>F. Javier Aldaz</i> , Gobierno de Navarra <i>Juan M. Garro</i> , S.A.T. Lacturale <i>Juana M<sup>a</sup> Beunza</i> , <a href="#">De Heus Nutrición Animal S.A.U.</a>
13:00-13:30	<b>CEREMONIA DE CLAUSURA DEL CONGRESO</b> Entrega de premios a mejor presentación oral y poster
13:30	<b>Comida</b>

## INDÍCE DE ABTRACTS

### COMUNICACIONES ORALES:

Análisis de micotoxinas en matrices alimentarias utilizando el sistema miniaturizado Ultivo Triple Quad LC/MS.....	13
Mycotoxin analysis in food.....	14
A brief overview on waters' solutions for target and untarget analysis of mycotoxins.....	15
Micotoxinas en el marco de la evaluación de la exposición: pasado, presente y futuro.....	16
Resecuenciación del genoma de cepas ocratoxígenas y no ocratoxígenas de <i>Aspergillus carbonarius</i> .....	17
Characterization of two genes putatively involved in griseofulvin biosynthesis in <i>Penicillium griseofulvum</i> .....	18
Deciphering of <i>Penicillium expansum</i> secondary metabolome.....	19
Effect of enniatins in mitochondrial processes of female rats.....	20
High overexpression of MTRF1A protein after BEA and EN B mixture exposure <i>in vitro</i> .....	21
Mycotoxins passage across blood-brain barrier <i>in vitro</i> : a metabolomics approach.....	22
Detección de bases alquiladas mediante el ensayo del cometa.....	23
Utilización de aceites esenciales como método sostenible de control de <i>Aspergillus flavus</i> .....	24
Evaluación de la exposición a micotoxinas a través del consumo de bebidas alcohólicas y no alcohólicas.....	25
Evaluación del efecto de la utilización de especias en la elaboración de embutidos curado-madurados sobre la producción de ocratoxina A.....	26
Evaluación de la presencia de micotoxinas en el sistema hepatobiliar de vacas de producción láctea.....	27
Efecto de <i>Staphylococcus xylosus</i> en el crecimiento de mohos toxigénicos en sustratos cárnicos.....	28
Potencial antifúngico de extractos de mostaza fermentada con bacterias ácido lácticas frente a <i>Fusarium spp.</i> .....	29
Uso de compuestos de origen natural para reducir el crecimiento de <i>Aspergillus flavus</i> y la producción de aflatoxinas B1 en almendras.....	30
Engineered silver nanoparticles, a possible tool in the management of aflatoxigenic and ochratoxigenic fungi and aflatoxin and ochratoxin a production in food.....	31

POSTERS:

P1) Does pumpkin extract protect mitochondria against mycotoxins? a transcriptional approach.....	33
P2) Silver nanoparticles as antifungal; revision of their genotoxicity.....	34
P3) <i>Aspergillus welwistchiae</i> aislados de uvas y pasas producen ocratoxina A.....	35
P4) Efecto de alil isotiocianato, del harina de mostaza amarilla y de las bacterias ácido láctica contra el crecimiento de <i>p. verrucosum</i> en cebada.....	36
P5) Efecto de aceites esenciales en la producción de ocratoxina de <i>Penicillium nordicum</i> en un sistema modelo de salchichón.....	37
P6) Combined toxicity of aflatoxins and ochratoxin a: a systematic review.....	38
P7) Determination of mycotoxins and polyphenolic compounds in hemp inflorescences using UHPLC-Q-ORBITRAP HRMS.....	39
P8) Presencia de mohos y micotoxinas en diferentes tipos de ensilado para ganado vacuno lechero en España.....	40
P9) Single and combined actions of ochratoxin A and beauvericin in HEPG2 cells: viability, micronucleus induction and cell cycle disturbance.....	41
P10) SH-SY5Y cells exposed to ochratoxin A and beauvericin: comparison of cytotoxic effects.....	42
P11) Control del crecimiento de hongos toxígenos con proteínas antifúngicas.....	43
P12) Mycotoxin occurrence and risk assesment in cereals from Algeria.....	44
P13) Evaluación de la contaminación por aflatoxinas en muestras de cacao en polvo	45
P14) Capacidad antifúngica de ptso frente a cepas micotoxigénicas de <i>Aspergillus parasiticus</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Penicillium verrucosum</i> y <i>Fusarium graminearum</i> ....	46
P15) Evaluation of mycotoxins during the dry process of <i>Triticum aestivum</i> silage from Tunisia.....	47
P16) Emerging mycotoxins in barley from tunisia: results of four years study (2015-2018).....	48
P17) Potencial de bacterias acido lácticas en el biocontrol contra hongos micotoxigénicos en naranja.....	49
P18) Control of <i>Aspergillus steynii</i> growth and ochratoxin A biosynthesis by bioactive evoh films containing essential oils.....	50
P19) Prediction by neural networks of ochratoxin A biosynthesis by <i>Aspergillus steynii</i> and <i>a. carbonarius</i> in selected media supplemented with ecological and non-ecological fungicides.....	51
P20) Predictive models for deoxynivalenol biosynthesis by <i>Fusarium culmorum</i> in maize grains under different enviromental conditions.....	52

P21) Comparación de los efectos tóxicos de la esterigmatocistina en las líneas celulares HEPG2 y SH-SY5Y.....	53
P22) Aplicación de la natamicina en el tratamiento de productos afectados por hongos toxigénicos.....	54
P23) Use of essential oils as a green potential alternative against mycotoxigenic fungi.....	55
P24) Purificación e identificación de péptidos obtenidos de la fermentación de desechos de la industria pesquera.....	56

## **COMUNICACIONES ORALES**

# ANÁLISIS DE MICOTOXINAS EN MATRICES ALIMENTARIAS UTILIZANDO EL SISTEMA MINIATURIZADO ULTIVO TRIPLE QUAD LC / MS

K. Saitua <sup>1</sup>, J. Morales <sup>2</sup>, Theresa Sosienski <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Account Manager Agilent Technologies España <sup>2</sup>, LCMS Product Specialist Agilent Technologies España, <sup>3</sup> Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.

[koldo\\_saitua@non.agilent.com](mailto:koldo_saitua@non.agilent.com)

Esta presentación demuestra un método sensible y preciso para analizar 12 micotoxinas en matrices de maíz y cacahuete y 5 micotoxinas en matriz de pimienta negra en el espectrómetro de masas Ultivo Triple Cuadropolo. Ultivo fue diseñado para ahorrar espacio de laboratorio, al tiempo que mantiene el rendimiento requerido para los análisis de alto rendimiento. Todas las micotoxinas podrían cuantificarse por debajo de los niveles máximos definidos por los Reglamentos de la Comisión Europea (CE) No. 1881/2006 y No. 105/2010 en cada matriz. Se logró una excelente precisión del método en el sistema Ultivo, con desviaciones estándar relativas (RSD%) de <10% en el nivel más bajo de cuantificación. La combinación de la limpieza de las interferencias de la matriz, la cromatografía y el triple cuadropolo recientemente desarrollado permite la detección sensible y precisa de las micotoxinas.

**Palabras clave:** LCMSMS, Miniaturizado, Triple-Cuadropolo, Micotoxinas, MRL

## MYCOTOXIN ANALYSIS IN FOOD

Fernando Rodríguez & Noemí Filloy

*Phenoemenex España, S.L.U. C/ Valgrande, 8 Edificio Thanworth II Planta 2.1.B 28108  
Alcobendas (Madrid)*

[fernandor@phenomenex.com](mailto:fernandor@phenomenex.com); [noemif@phenomenex.com](mailto:noemif@phenomenex.com)

This seminar will describe the main techniques used in the preparation of the sample for the analysis of mycotoxins, describing some of the methodologies for the treatment of the sample and some challenges in its determination.

We will visit the determination of aflatoxins, ochratoxin A, fumonisins, trichothecenes and zearalenone in cereals, the preparation of samples and their innovations in analytical methods by LC / MS for the quality control of food samples.

In addition, new techniques in the preparation of samples and the technology to face the current challenges in the analysis of multiresiduos will be studied.

**Acknowledgments:** We would like to thank especially to Scott Krepich's Industry Marketing Manager from Phenomenex for his contributions.

**References:** Introduction and Regulatory References, Analytical work flow, Analytical methods for mycotoxins, Multiple waste screening, Future perspectives



## A BRIEF OVERVIEW ON WATERS' SOLUTIONS FOR TARGET AND UNTARGET ANALYSIS OF MYCOTOXINS

P. de la Iglesia, Ph.D.

<sup>1</sup> *Waters Cromatografía. Ronda de Can Fatjó, 7A, 08290 Cerdanyola del Vallès, Barcelona*

[pablo\\_delaiglesia@waters.com](mailto:pablo_delaiglesia@waters.com)

Mycotoxins are toxic compounds produced by molds or other fungi that can grow on foodstuffs intended for domestic animal or human consumption. Ingestion of food containing only part-per billion concentration of some mycotoxins may cause health issues. Therefore, sensitive and reliable analytical methods are required to determine mycotoxins in foods and feeds.

In this presentation, different chromatographic alternatives aimed at analysis of mycotoxin will be reviewed. Less selective detectors such as optical fluorescence or single quadrupole MS require the complementary selectivity/specificity provided by immunoaffinity clean-up, especially for the analysis of complex matrices. Additionally, tandem quad MS methods offer more efficient alternatives in terms of analysis time, cost per sample, multi-toxin scope, and sensitivity. Untargeted analysis can be performed with Independent Data Acquisition (IDA) methods supported by high-resolution MS and Ion Mobility Spectrometry, which have proved to be useful to reveal masked mycotoxins in samples, some of them relevant from a toxicological perspective.

**Palabras clave:** Mycotoxins, liquid chromatography, mass spectrometry, ion mobility spectrometry.

## MICOTOXINAS EN EL MARCO DE LA EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN: PASADO, PRESENTE Y FUTURO

B. De Santis, F. Debegnach, C. Brera

*Department of Food Safety, Nutrition and Veterinary Public Health. Chemical Food Safety  
Unit. Istituto Superiore di Sanità. Roma. Italia*

*barbara.desantis@iss.it*

La exposición a las micotoxinas se ha descrito desde tiempos lejanos si se incluyen entre las primeras intoxicaciones las que produjeran las reacciones del fuego de San Antonio. Éstas se registraron en la edad media y fueron atribuidas a la contaminación por neurotoxinas, alcaloides del ergot, producidas por *Claviceps ssp.* Lamentablemente, hoy tenemos un mundo a doble velocidad ya que, por una parte, aún se registran episodios de micotoxicosis en algunos países en vías de desarrollo, y, mientras, se intenta perfeccionar un sistema armonizado de análisis del riesgo gracias a las acciones combinadas de evaluadores y gestores del riesgo con el fin de conseguir la garantía de un buen sistema de seguridad alimentaria.

Cogiendo como tema central y marco la evaluación de exposición a micotoxinas con su algoritmo de cálculo, seguiremos cómo han evolucionado en el tiempo las técnicas analíticas, la legislación, las acciones de las autoridades competentes, la conciencia de varios actores del sector agroalimentario y cómo cada elemento ha influido e influye en la exposición a estos contaminantes naturales. En los últimos tiempos las técnicas analíticas, conjuntamente a todo lo que hay en su entorno, han progresado tanto en la capacidad de bajar los límites de detección, cuanto en la disponibilidad de estándares, también isotópicamente marcados, y en la posibilidad de detectar multi-toxinas en una muestra. El tema de evaluación de exposición exige que los límites de detección sean lo más bajos posibles, manteniendo niveles de precisión satisfactorios. El tema de calidad de los datos está en el centro de discusiones de grupos de la EFSA, donde la atención a la recogida continua de datos de contaminación y al desarrollo de metodologías armonizadas de enfoque y de cálculo (determinístico o probabilístico) de la exposición a micotoxinas, permite la definición de escenarios de exposición adecuados.

En el tema de la legislación sobre seguridad alimentaria, el Directorado DG SANTE de la Comisión Europea tiene muy en cuenta la cuestión de las micotoxinas, que siempre están en el orden del día de la Comisión sobre contaminantes agrícolas. Esta Comisión define los límites de micotoxinas, tanto clásicas como emergentes, y durante los últimos 10 años ha integrado el fin último de protección del consumidor, aplicando medidas legislativas y definiendo los estándares que permitan una correcta aplicación de las medidas de prevención por parte de todos los actores de la cadena agro-alimentaria para que resulten eficaces.

A pesar de los esfuerzos realizados, hay temas sensibles que tardan en llegar a la atención de las autoridades, el papel de la comunidad científica es no permitir que se baje la guardia y que se trabaje para llenar el vacío que aún hay en muchos aspectos.

**Palabras clave:** Micotoxinas; Evaluación de la exposición; Calidad del dato; Análisis del riesgo

## RESECUENCIACIÓN DEL GENOMA DE CEPAS OCRATOXÍGENAS Y NO OCRATOXÍGENAS DE *ASPERGILLUS CARBONARIUS*

G. Castellá<sup>1</sup>, M.R. Bragulat<sup>1</sup>, L. Puig<sup>1</sup>, W. Sanseverino<sup>2</sup>, F.J. Cabañes<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Grup de Micologia Veterinària, Departament de Sanitat i d' Anatomia Animals, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona;* <sup>2</sup> *Sequentia Biotech S.L., Barcelona.*

*Gemma.Castella@uab.cat*

La ocratoxina A (OTA) es una micotoxina que se puede encontrar en una gran variedad de alimentos y bebidas. Es producida por varias especies de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*, siendo *Aspergillus carbonarius* la especie que se considera responsable de la presencia de OTA en uvas y sus productos derivados. En esta especie, casi el 100% de las cepas son ocratoxígenas. En *A. carbonarius* se ha descrito un hipotético clúster que contiene tres genes directamente relacionados con la biosíntesis de OTA: una péptido sintasa no ribosomal (*AcOTAnrps*), una polipeptido sintasa (*AcOTApks*) y una halogenasa (*AcOTAhal*). Se han descrito también dos genes localizados en la misma región y que pueden tener un papel en la biosíntesis de OTA: un citocromo p450 monooxigenasa (*AcOTAp450*) y un factor de transcripción (*AcOTAbZIP*). En este estudio presentamos la resecuenciación del genoma de una cepa productora de OTA de *A. carbonarius*, y de tres cepas atípicas no productoras de OTA. Las cepas fueron resecuenciadas utilizando la tecnología Illumina y se compararon con el genoma de referencia Acv3. Se realizaron análisis bioinformáticos específicos en los genes anteriormente citados que se centraron en la detección de mutaciones sin sentido y con cambio de sentido y también en la identificación de grandes deleciones en el genoma de las cepas no ocratoxígenas. En la cepa ocratoxígena se detectaron variantes en los genes *AcOTApks*, *AcOTAnrps*, *AcOTAbZIP* y *AcOTAp450*. En las cepas no ocratoxígenas se detectaron cinco variantes con cambio de sentido comunes a todas las cepas en el gen *AcOTApks*. Si bien se detectaron deleciones de más de 1.000 pb, éstas no se localizaron en los genes relacionados con la síntesis de OTA. Además, en las cepas no ocratoxígenas los genes relacionados con la biosíntesis de OTA estaban significativamente infraexpresados.

**Agradecimientos:** Este estudio ha estado financiado por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (AGL2014-52516-R).

**Palabras clave:** *Aspergillus carbonarius*, ocratoxina A, resecuenciación, genoma, genómica comparativa

## CHARACTERIZATION OF TWO GENES PUTATIVELY INVOLVED IN GRISEOFULVIN BIOSYNTHESIS IN *PENICILLIUM GRISEOFULVUM*

A. Cometto <sup>1</sup>, D. Spadaro <sup>1</sup>, L. González-Candelas <sup>2</sup>, and A.-R. Ballester <sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>*Department of Agricultural, Forestry and Food Sciences, University of Torino, Grugliasco, Italy;* <sup>2</sup>*Food Biotechnology Department. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC). Calle Catedrático Agustín Escardino 7, Paterna 46980, Valencia, Spain.*

[ballesterar@iata.csic.es](mailto:ballesterar@iata.csic.es)

*Penicillium griseofulvum* is worldwide distributed and it has been isolated from fruits, decayed plants, cereal grains and animal feed. *P. griseofulvum* has been associated with blue mould decay in storage of apple fruits, which is considered as one of the most important postharvest diseases of pome fruits worldwide. This fungus is also known to produce a wide array of important secondary metabolites, including griseofulvin and patulin. The griseofulvin biosynthetic gene cluster, consisting of 13 putative genes, was originally described in *P. aethiopicum* (Chooi et al., 2010). Banani et al. (2016) reported the complete genome sequence of *P. griseofulvum* strain PG3 and described the gene cluster responsible for the synthesis of griseofulvin, comparing it with griseofulvin gene cluster in *P. aethiopicum*. The putative transcription factor *gsfR1* is located inside the griseofulvin biosynthetic cluster, while, *gsfR2* is located outside the gene cluster. The aim of this work was the characterization, through *A. tumefaciens* mediated transformation, of the putative transcription factors GsfR1 and GsfR2, involved in the regulation of griseofulvin production in *P. griseofulvum*. These putative transcription factors have not been characterized yet and they could play an important role in the regulation of this compound. This work will enable to underline the role of the putative transcription factors encoded by *gsfR1* and *gsfR2* genes in griseofulvin biosynthesis.

**Keywords:** *Penicillium griseofulvum*, griseofulvin, knockout mutants

## DECIPHERING OF *PENICILLIUM EXPANSUM* SECONDARY METABOLOME

Chrystian Zetina, Christelle El Hajj Assaf, Ophélie Rocher, Selma Snini, Emilien L. Jamin, Jean-François Martin, Isabelle P. Oswald, Olivier Puel\*, Sophie Lorber  
*Toxalim (Research Centre in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRA, ENVT,  
INP-Purpan, UPS, Toulouse, France*  
[olivier.puel@inra.fr](mailto:olivier.puel@inra.fr)

*Penicillium expansum* is one of the best-known and most studied moulds of the genus *Penicillium*. This filamentous fungus can infest a wide range of products during harvest, storage and processing and cause the most important post-harvest disease in apples called the “blue mould”. Representing a significant economic problem for the fresh fruit industry, *P. expansum* is also known to produce a wide variety of secondary metabolites with diverse chemical structures, such as two important mycotoxins: patulin and citrinin. These mycotoxins are the final products of enzymatic cascades where involved enzymes are encoded by genes arranged in a contiguous fashion as a biosynthetic gene cluster (BGC). An AntiSmash analysis of T01 and d1 strain genomes predicted the presence of 63 secondary metabolites (SM) clusters. Given the number of predicted BGCs, the number of metabolites reported by *P. expansum* seems very low compared to what fungi could produce during their development. The production of some SMs depends on the state of development of the fungus (vegetative hypha, conidia, sclerotia...) but is also influenced by internal and external cues such as pH, light, carbon, nitrogen. Fungal development, asexual/sexual reproduction and secondary metabolism are regulated by different transcription factors. Among them, the VeA factor, a component of the “velvet complex”, is a phosphoprotein responding to abiotic factors, and more particularly to light. Depending on fungal species, VeA is involved in different physiological processes quoted above and virulence. BrlA is a C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> transcription factor required for conidiophore development in *Trichocomaceae* family. Studies have shown a contribution of BrlA to the production of SMs, particularly the regulation of metabolites involved in the formation of spores. In order to determine without ambiguity the chemical formula of all *P. expansum* SMs, an integrated approach combining high-resolution mass spectrometry and double isotopic labelling was carried out from wild type (WT) strain, PeΔ*veA* and PeΔ*brlA* null mutant cultures on wheat grains with different isotopic enrichments. In the second time, the metabolome was analyzed on synthetic media (MEA, PDA and CYA), in the dark and in the light and *in vivo* on infected apples. The production of secondary metabolites was then compared between the wild type strain and the null mutant PeΔ*veA* and PeΔ*brlA* strains. This work showed that patulin and citrinin biosynthesis are *veA*-dependent whilst the deletion of *brlA* did not affect roquefortin C, citrinin, chaetoglobosins and patulin production suggesting that the latter is not related to conidiogenesis. In another hand, the biosynthesis of expansolides, communesins and an unknown compound displaying C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as chemical formula is drastically altered. The LC-MS analysis of spores harvested outside apples artificially inoculated by *P. expansum* and incubated for one month in the dark showed a total absence of patulin and citrinin whereas significant amounts of patulin were detected in the fruits. This confirmed that only the hyphal filaments synthesize patulin.

## EFFECT OF ENNIATINS IN MITOCHONDRIAL PROCESSES OF FEMALE RATS

A. Cimbalo, L. Bayarri, M.J. Ruiz, M. Alonso, L. Manyes

*Laboratory of Food Chemistry and Toxicology, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Burjassot, Spain.*

*Alssandra.cimbalo@uv.es*

Enniatins are cyclic depsipeptide mycotoxins produced by a group of *Fusarium* fungi. They have been found as natural contaminants in food and feed and they can interfere severely with human health. In particular, it has been shown that they affect mitochondrial processes by modifying oxidative phosphorylation. The aim of the present study was to evaluate toxicological effects of ENs in the electron transport chain *in vivo*. A total of 14 female two months old Wistar rats were employed divided in three groups: control, medium and high exposure. The four rats of the control group were exposed to the vehicle (PBS) by esophageal intubation, while the five of the treated ones were intoxicated with medium concentrations: single dose of EN A 256, EN A1 353, EN B 540, EN B1 296  $\mu\text{g/mL}$ ; and other five with the higher ones: single dose of EN A 513, EN A1 706, EN B 1021, EN B1 593  $\mu\text{g/mL}$ . They were sacrificed after 8 hour exposure. Rats' liver, stomach and kidneys were analysed. RNA was extracted from tissues and transcriptional analysis was carried out by qPCR using SYBR method. Four genes of the electronic transport chain were selected by using KEGG Pathway Database. In particular ND1, CO1, ATP5, Sdha and S18 as a reference gene. Gene expression was calculated by StepOne Plus software. Statistical analysis was performed by applying T-student test. Results in liver showed a considerable group variability in gene expression among all the animals employed. In stomach, the main differences in gene expression have been reported between control and medium-dose treated rats, divided into up-regulation and down-regulation for all the genes analysed. In kidneys, ND1 and CO1 expression was clearly affected by the medium concentration used while Sdha expression varies according to the concentration employed. No changes have been observed for ATP5. To sum up, although the high concentration of ENs used, no significant changes in gene expression were observed.

**Acknowledgments:** This work was supported by the Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities (AGL 2016-77610R) and the Generalitat valenciana (GVPROMETEO2018-126).

**Keywords:** oxidative phosphorylation, gene expression, *in vivo*, qPCR

## HIGH OVEREXPRESSION OF MTRF1A PROTEIN AFTER BEA AND EN B MIXTURE EXPOSURE *IN VITRO*

M. Alonso-Garrido <sup>1</sup>, I.E. Pralea <sup>2</sup>, C. Iuga <sup>2</sup>, M.J. Ruiz <sup>1</sup>, G. Font <sup>1</sup>, L. Manyes <sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Laboratory of Food Chemistry and Toxicology, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Spain.* <sup>2</sup> *Department of Proteomics and Metabolomics, MedFuture Research Center for Advanced Medicine, Iuliu. Hatieganu University of Medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca, Romania.*

Beauvericin and enniatin B are two emergent mycotoxins from *Fusarium* fungi which are frequently detected concomitantly in cereals and cereal-based products. While *in vitro* they have shown ionophoric activity and subsequent mitochondriotoxic properties among others, *in vivo* slight adverse effects, as loss of weight, have been found. At transcriptomic level in Jurkat lymphoblastoid T-cell line, both revealed a similar down-regulation pattern affecting most of the genes involved in the electron transport chain pathway. In order to explore the adverse outcome pathway that leads to loss of homeostasis, it was proposed to investigate the changes in mitochondrial protein expression in Jurkat cells. The chosen combination of beauvericin and enniatin B was 1:1 at three different doses: 0.01 - 0.1 - 0.5  $\mu$ M. Control cells were exposed to 0.5% DMSO. Cells were treated during 24 h and then mitochondria were extracted. Three biological replicates and technical duplicates from each treatment were injected in a Nano-LC Q-TOF UDMS<sup>E</sup> and raw data were processed using Swissprot database. After comparing the control and the three doses results, from the 1821 proteins identified and quantified, 340 proteins were selected using the parameters: max fold change  $\geq 1.5$  and Anova p-value  $\leq 0.05$ . These selected proteins were analyzed by different bioinformatics tools for proteomics data interpretation. The most overrepresented pathways using Reactome version 66 were the citric acid cycle and respiratory electron transport, mitochondrial protein import and respiratory electron transport, ATP synthesis by chemiosmotic coupling, and heat production by uncoupling proteins. PANTHER version 14.1 indicated protein transmembrane import into intracellular organelle as the most overrepresented biological process and disulfide oxidoreductase activity as molecular function. Moreover, Jurkat cells exposed to beauvericin and enniatin B low concentration mixture highly overexpress mtRF1a, mitochondrial peptide chain release factor 1-like showing versus control a fold change  $> 34$  in all conditions.

**Acknowledgements:** This work was supported by the Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities (AGL 2016-77610R and BES-2017-081328).

**Keywords:** mycotoxin, mitochondria, proteomics, Jurkat

## MYCOTOXINS PASSAGE ACROSS BLOOD-BRAIN BARRIER *IN VITRO*: A METABOLOMICS APPROACH

Pallarés, N., Alonso-Garrido, M., Frangiamone, Ruiz, M.J., Manyes, L.

*Laboratory of Food Chemistry and Toxicology. Faculty of Pharmacy. University of Valencia. Avda. Vicent Andrés Estelles s/n 46100 Burjassot (SPAIN)*

*noelia.pallares@uv.es*

Metabolomics is an emerging ‘omics’ discipline that measures the dynamic responses of the metabolome to various stimuli. Mycotoxins are ingested through contaminated food and feed and are able to reach bloodstream and cross the blood-brain barrier (BBB). Among more than 400 mycotoxins identified, beauvericin and enniatins are cytotoxic compounds, with the ability to alter intracellular ion homeostasis; aflatoxins are classified as human carcinogens, their toxic effects include genotoxicity, teratogenicity and immunosuppressive activity; ochratoxin is a potent nephrotoxic and zearalenone shows endocrine disrupting effects. BBB is a permeable but selective cell wall which defends brain from toxic compounds by separating brain extracellular fluid from blood. The aim of this study is to investigate mycotoxins BBB passage, individually and mixed, and their neurotoxicity mechanisms from a metabolomics perspective. The BBB *in vitro* model was prepared using ECV 304 endothelial human cells over an insert and C6 glial rat cells on the bottom of the well, both plated at a density of 50,000 cel /mL. Transendothelial electric resistance was measured every day after day 4 to ensure the integrity of BBB. Around day 9 of coculture, coinciding with the highest integrity of the barrier, the experiment was carried out. ECV 304 differentiated cells were exposed to beauvericin, zearalenone, enniatins, aflatoxins and ochratoxin, individually or in combination, at concentration of 100 nM for 2 hours. Apical and basal media were collected separately for each insert-well for the extraction of extracellular metabolites. The extraction method distinguishes between lipidic and aqueous phases. Extracts were lyophilized (aqueous phase) or dried under N<sub>2</sub> stream (lipidic phase) and maintained at -20 °C before resuspension in mobile phase for injection. Finally, the extracellular metabolites were profiled using an Agilent 6540 Ultra High Definition UHD Accurate Mass Quadrupole Q-TOF LC/MS instrument. Results were analyzed by Mass Hunter software and metabolites were identified via METLIN database.

**Acknowledgements:** This work was supported by the Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities (AGL 2016-77610R and BES-2017-081328) and Universitat de València (UV-INV-PREDOC16F1-384781).

**Keywords:** ECV 304, C6, extracellular metabolites, Q-TOF LC/MS



## DETECCIÓN DE BASES ALQUILADAS MEDIANTE EL ENSAYO DEL COMETA

D. Muruzábal<sup>1</sup>, J. Sanz-Serrano<sup>1</sup>, S. Sauvaigo<sup>2</sup>, B. Treillard<sup>2</sup>, A. López de Cerain<sup>1,3</sup>,  
A. Vettorazzi<sup>1,3</sup> and A. Azqueta<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Universidad de Navarra, Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy and Nutrition, Irunlarrea 1, 310008 Pamplona, Spain. <sup>2</sup> LXRepair, Parvis Louis Néel, 38040 Grenoble, France. <sup>3</sup> IdiSNA, Navarra Institute for Health Research, Pamplona, Spain

[dmuruzabal@alumni.unav.es](mailto:dmuruzabal@alumni.unav.es)

El ensayo del cometa está incluido en la estrategia de la EFSA para evaluar la genotoxicidad de compuestos presentes en alimentos, entre ellos las micotoxinas. En su versión estándar detecta roturas en el ADN y lugares sensibles a la alcalinidad. Su combinación con enzimas del sistema de reparación del ADN permite detectar otro tipo de lesiones. El objetivo de este trabajo es la puesta a punto del ensayo del cometa en combinación con la enzima alquiladenina glicosilasa humana (hAAG), responsable de la escisión de algunas bases alquiladas, y la comparación de su actividad con las de otras enzimas que detectan bases alquiladas y oxidadas.

hAAG se tituló en células TK-6, sin tratar y tratada con metilmetanosulfonato (MMS) para inducir daño alquilante. Posteriormente, el ensayo del cometa combinado con hAAG, 8-oxoguanina ADN glicosilasa (hOGG1), formamidopirimidina ADN glicosilasa (Fpg) y endonucleasa III (Endo III), fue utilizado para evaluar diferentes compuestos genotóxicos con diferentes mecanismos de acción (MMS, KBrO<sub>3</sub>, etilmetanosulfonato – EMS- y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a concentraciones no citotóxicas. Además, se evaluó en Tritón X-100 a concentraciones citotóxicas.

La enzima hAAG detectó lesiones inducidas por MMS y EMS mientras se observó una baja y nula actividad en las células tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y KBrO<sub>3</sub>, respectivamente. Por otro lado, hOGG1 y Fpg detectaron lesiones inducidas por KBrO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y MMS, pero no por EMS. Finalmente, Endo III detectó lesiones inducidas por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y MMS, pero no por KBrO<sub>3</sub> y EMS. Aunque varias de las enzimas fueron capaces de detectar lesiones producidas por MMS, KBrO<sub>3</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, los niveles detectados dependen de la enzima utilizada. Ninguna enzima detectó daño al tratar las células con Triton X-100. Finalmente, se estudió la especificidad de todas las enzimas mediante biochips Glyco-SPOT de LXRepair, obteniendo los resultados esperados.

**Agradecimientos:** Ministerio de Economía y Competitividad (BIOGENSA, AGL2015-70640-R).

**Palabras clave:** Genotoxicidad, ensayo del cometa, hAAG, bases alquiladas

## UTILIZACIÓN DE ACEITES ESENCIALES COMO MÉTODO SOSTENIBLE DE CONTROL DE *ASPERGILLUS FLAVUS*

M. García-Díaz <sup>1</sup>, A. Medina-Vaya <sup>2</sup>, B. Patiño <sup>1</sup>, E. García-Cela <sup>2</sup>, C. Vázquez <sup>1</sup>, J. Gil-Serna <sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Universidad Complutense de Madrid (Departamento de Genética, Fisiología y Microbiología). <sup>2</sup> Cranfield University (Reino Unido) Grupo de Micología aplicada.

[martga43@ucm.es](mailto:martga43@ucm.es)

*Aspergillus flavus* es la especie más relevante productora de aflatoxinas (AFLs), y una de las micotoxinas más importantes debido al gran riesgo que suponen para la seguridad alimentaria. Actualmente, los aceites esenciales (AEs) han demostrado tener actividad fungicida y destacan como métodos sostenibles para controlar el crecimiento fúngico.

El presente estudio ha evaluado el efecto *in vitro* de siete AEs procedentes de cosechas de dos campañas consecutivas (2015-2016 y 2016-2017) sobre el crecimiento y la producción de AFLs en una cepa de *A. flavus* en medio CYA suplementado con dichos compuestos entre 10 y 1000 µg/mL. En general, todos los AEs fueron capaces de reducir el crecimiento fúngico y, especialmente la concentración de AFLs, siendo los más efectivos los extraídos de ajedrea (*Satureja montana*) y orégano (*Oreganum virens*) en las dos campañas.

Posteriormente, el efecto de estos dos últimos AEs sobre *A. flavus* se estudió en un rango de actividades de agua ( $a_w$  0,94-0,96-0,98) y concentraciones (350, 700 y 1000 µg/mL) en dos cepas (A7 y A10). El crecimiento fúngico se evaluó por turbidimetría utilizando un Bioscreen-C y la concentración de AFLs se determinó por HPLC.

En todas las concentraciones estudiadas, el AE de ajedrea retrasó el crecimiento del hongo más efectivamente que el AE de orégano, aunque en ambos casos el efecto fue muy dependiente de la  $a_w$ , mostrando mejores resultados a  $a_w$  0,94. No se encontraron diferencias significativas con respecto al crecimiento entre los aislados. En general, la concentración de AFLs detectada se redujo de forma proporcional a la concentración de AEs a  $a_w$  0,94 y 0,98. Sin embargo, a  $a_w$  0,96 se obtuvo una inducción en la producción de toxinas a las concentraciones más bajas de AE en ambos casos.

**Agradecimientos:** Trabajo financiado por el MINECO (AGL2014-53928-C2-2-R).

**Palabras clave:** Aflatoxinas, *A. flavus*, Aceite esencial, *Satureja montana* y *Oreganum virens*

## EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN A MICOTOXINAS A TRAVÉS DEL CONSUMO DE BEBIDAS ALCOHOLICAS Y NO ALCOHOLICAS

Carballo D <sup>1</sup>, Font G <sup>2</sup>, Ferrer E <sup>2</sup>, Berrada H <sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Asunción-Paraguay.* <sup>2</sup> *Laboratorio de Toxicología, Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología y Medicina Legal, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia.*

Aunque en la actualidad el consumo de las bebidas con bajo contenido de alcohol ha aumentado fomentando el estilo de vida saludable, la cerveza y el vino siguen siendo unas bebidas muy consumidas en la Unión Europea. Las micotoxinas son metabolitos secundarios de hongos comúnmente presentes en frutas (uva y manzana) y cereales (trigo de cebada y maíz) materia prima en la producción de vino y cerveza. Se analiza la presencia de 30 micotoxinas; AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, AOH, AME, ENA, ENA<sub>1</sub>, ENB, ENB<sub>1</sub>, BEA, FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub>, OTA, STG, DON, 3-ADON, 15-ADON, NIV, NEO, DAS, FUS-X, PAT, ZEA,  $\alpha$ -ZAL,  $\beta$ -ZAL,  $\alpha$ ZOL,  $\beta$ -ZOL, T-2 y HT-2 en 110 muestras de bebidas alcohólicas y no-alcohólicas como cervezas, vino, sidra y cava, para evaluar la exposición de la población valenciana a micotoxinas a través de estas matrices. Las muestras se extraen por micro-extracción líquida-líquida dispersiva (DLLME) y se determinan por cromatografía líquida (LC-MS/MS) y cromatografía de gases (GC-MS/MS) acopladas a espectrometría de masas en tándem. Los resultados muestran que la cerveza fue la matriz más contaminada (95%), en rangos de 0.24 a 54.76  $\mu$ g/L. Una incidencia significativa de AOH se detectó en vino (52%) que alcanzó niveles de concentración hasta 43.48  $\mu$ g/L. PAT y OTA fueron las micotoxinas más detectadas en muestras de cava y sidra con una incidencia de 26% y 40%, respectivamente. Solo una muestra de vino excedió el nivel máximo establecido por la UE para la OTA. Se ha realizado una evaluación de la exposición combinada, basada en la suma de las concentraciones de micotoxinas de las muestras para indicar la magnitud de la exposición dietética a las micotoxinas a través de estas bebidas. El riesgo asociado con los niveles de micotoxinas en las bebidas analizadas resultó poco significativo.

**Agradecimientos:** Ministerio de Economía y Competitividad AGL2016-77610-R y al Programa Nacional de Becas de Postgrado en el Exterior Don Carlos Antonio López – República del Paraguay.

**Palabras claves:** Micotoxinas, LC-MS/MS, GC-MS/MS

# EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA UTILIZACIÓN DE ESPECIAS EN LA ELABORACIÓN DE EMBUTIDOS CURADO-MADURADOS SOBRE LA PRODUCCIÓN DE OCRATOXINA A

M.M. Álvarez, I. Martín, P. Padilla, A. Rodríguez, J.J. Córdoba, M.J. Andrade

*Universidad de Extremadura/Instituto de Investigación de Carne y Productos Cárnicos/Facultad de Veterinaria/Higiene y Seguridad Alimentaria. Avda. de las Ciencias s/n, Cáceres,*

*maalvarezr@unex.es*

La actividad antibacteriana de las especias empleadas en la elaboración de los embutidos curado-madurados es ampliamente conocida; sin embargo, su actividad antagonista frente a mohos ocratoxigénicos de interés en dichos productos no ha sido estudiada con profundidad hasta el momento. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la adición de orégano, romero y tomillo en la producción de ocratoxina A (OTA) por *Penicillium nordicum* en un sistema modelo cárnico elaborado en base a salchichón. Para ello, *P. nordicum* CBS 323.92 fue inoculado en una tripa de colágeno previamente esterilizada y colocada sobre un medio de cultivo elaborado con salchichón liofilizado (25%) y cada una de las especias (0,2%) de forma individual, en presencia y ausencia de un preparado antifúngico comercial que contenía sorbato potásico y natamicina. Como control negativo se utilizó el medio sin especias ni preparado antifúngico. Tras un periodo de incubación de 14 días a 12 °C, se procedió a la cuantificación de la acumulación de OTA en el sistema modelo mediante LC-MS/MS con analizador triple cuadrupolo (QqQ). Los resultados obtenidos mostraron una reducción significativa de los niveles de la micotoxina en presencia de orégano o romero y sus combinaciones con el preparado antifúngico comercial. Sin embargo, el uso individual de dicho preparado antifúngico en una concentración subinhibitoria del crecimiento de *P. nordicum* no originó una reducción significativa de la cantidad de OTA respecto al control positivo. Por tanto, la utilización de orégano o romero como ingredientes durante la elaboración de los derivados cárnicos curado-madurados así como su combinación con el preparado antifúngico comercial parecen ser estrategias apropiadas para controlar el peligro asociado a la presencia de OTA.

**Agradecimientos:** Trabajo financiado por ayudas IB16045 y GR18056 (Junta de Extremadura-Consejería de Economía e Infraestructuras-, Fondo Europeo de Desarrollo Regional-“Una manera de hacer Europa”).

**Palabras clave:** *Penicillium nordicum*, ocratoxina A, especias, salchichón

## EVALUACION DE LA PRESENCIA DE MICOTOXINAS EN EL SISTEMA HEPATOBILIAR DE VACAS DE PRODUCCION LACTEA

C.Nebot\*<sup>1</sup>, C. Franco<sup>1</sup>, E.M. Peris Montesa<sup>2</sup>, Luis Quintela<sup>2</sup>, A.Cepeda<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Laboratorio de Higiene, Inspección y Control de Alimentos, Facultad de Veterinaria de la Universidad de Santiago de Compostela, 27002, Lugo.* <sup>2</sup> *Departamento de Patología Animal. Reproducción y Obstetricia. Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain*

[\\*Carolina.nebot@usc.es](mailto:Carolina.nebot@usc.es)

La ganadería lechera gallega ha perdido el 30% del censo de vacas de ordeño en los últimos 15 años, aun así, en 2017 la cabaña de vacuno lechero suponía el 42% de las reses del territorio nacional. Se ha observado en los últimos años un declive progresivo y preocupante de la fertilidad en la cría de ganado lechero, los datos indican un descenso de aproximadamente el 20% en los últimos 30 años. Factores tales como la genética, la ausencia de bienestar, alimentación inadecuada, mal manejo reproductivo y el incremento de enfermedades reproductivas pueden ser los causantes de este descenso. Una alimentación con sustancias tóxicas de origen ambiental puede tener efectos en el fluido folicular y en el contenido uterino y por tanto consecuencias nocivas en la eficiencia reproductiva. Las micotoxinas son un claro ejemplo de sustancias tóxicas de origen ambiental que pueden ser ingeridas por el animal a través de la alimentación suministrada.

Por todo ello y dada la importancia de la eficiencia reproductiva en la producción de leche influyendo en la rentabilidad de las explotaciones, el objetivo de esta investigación es la realización de un estudio preliminar para estimar la prevalencia de micotoxinas en bilis. Se tomaron 50 muestras de bilis a animales sacrificados en un matadero de Lugo y se evaluó la presencia de 10 micotoxinas con un método desarrollado por el laboratorio basado en columnas de inmutafinidad y posterior detección de las micotoxinas por HPLC-MS/MS. Ninguna de las muestras de bilis analizadas presentaron residuos de aflatoxina B1, B2, G1 y G2, deoxinivalenol, diacetoxiscirpenol, fumonisina B2, ocratoxina A, T2-toxina y zearalenona. Estos resultados concuerdan con datos facilitados por la Asociación Gallega de Fabricantes de Alimentos Compuestos ya que ellos tampoco detectaron presencia de las micotoxinas investigadas en las materias primas evaluadas.

**Palabras clave:** Vacuno lechero, Bilis, Micotoxinas.

## EFFECTO DE *STAPHYLOCOCCUS XYLOSUS* EN EL CRECIMIENTO DE MOHOS TOXIGÉNICOS EN SUSTRATOS CÁRNICOS

E. Cebrián, F. Núñez, A. Alía, E. Bermúdez, M. Rodríguez

*Higiene y Seguridad Alimentaria, Facultad de Veterinaria, Instituto de Investigación de Carne y Productos Cárnicos, Universidad de Extremadura. Avda. de las Ciencias s/n, Cáceres.*

[evcebrianc@unex.es](mailto:evcebrianc@unex.es)

Durante la maduración de los derivados cárnicos-curado madurados se alcanzan unas condiciones ecológicas que favorecen el crecimiento de mohos en su superficie. Algunos de ellos son productores de micotoxinas ocasionando un peligro para la seguridad alimentaria. Una estrategia para controlar este peligro es la utilización de microorganismos que se encuentran de manera habitual en estos alimentos, como son los cocos Gram +, catalasa + entre los que se encuentra el género *Staphylococcus*, uno de los grupos microbianos mayoritarios en este tipo de productos durante todo el procesado. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de una cepa de *Staphylococcus xylosus*, aislada de jamón curado, en el crecimiento de mohos productores de ocratoxina A (OTA), aflatoxinas (AFs) y ácido ciclopiazónico (ACP) a tres temperaturas diferentes (15, 20 y 25°C) en un medio de cultivo elaborado con salchichón liofilizado. Para ello, se utilizaron 10 cepas pertenecientes a 5 especies de mohos (2 cepas de cada especie): *Penicillium nordicum*, *P. verrucosum*, *P. griseovulfum*, *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*. Diariamente se midió el diámetro de las colonias en dos direcciones perpendiculares durante 30 días. Los resultados obtenidos mostraron que la presencia de *S. xylosus* reduce significativamente el crecimiento de todos los mohos en las tres temperaturas de estudio desde el comienzo de su crecimiento. Las cepas de mohos productores de OTA y las de AFs obtuvieron una mayor reducción de la velocidad de crecimiento en presencia de *S. xylosus* a 20°C. Sin embargo, las cepas productoras de ACP se desarrollaron más lentamente a 25°C. Estos resultados son prometedores, aunque se necesitan estudios más amplios, especialmente en la evaluación del efecto en la producción de las diferentes micotoxinas antes de proponerse como cultivo protector.

**Agradecimientos:** Trabajo financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad, la Junta de Extremadura y FEDER (AGL2016-80209-P, GR18056)

**Palabras clave:** Mohos toxigénicos, *Staphylococcus xylosus*, crecimiento, embutidos curado-madurados.

**POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE EXTRACTOS DE MOSTAZA  
FERMENTADOS CON BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS FRENTE A  
*FUSARIUM SPP.***

R. Torrijos <sup>1</sup>, T.M. Nazareth <sup>1,2</sup>, F.J. Martí <sup>1</sup>, J.M. Quiles <sup>1</sup>, C. Luz <sup>1</sup>, J. Mañes <sup>1</sup>, G. Meca <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Av. Vicent Andrés Estellés s/n 46100 Burjassot (Departamento de Medicina Preventiva, Facultad de Farmacia, Universitat de València) España; <sup>2</sup> Rua Imaculada Conceição 1155, 80215-910 Curitiba, Paraná (Pontifícia Universidade Católica, School of Life Science) Brasil.

*Raquel.Torrijos@uv.es*

La contaminación de productos alimentarios por hongos toxigénicos constituye actualmente un reto en seguridad alimentaria. Las bacterias ácido lácticas (BAL) son comúnmente empleadas en la industria alimentaria por sus propiedades metabólicas, siendo productoras de sustancias de interés como bacteriocinas, ácidos orgánicos y péptidos bioactivos. En el presente estudio se evaluaron dos tipologías de extractos acuosos elaborados a partir de harina de mostaza amarilla (YMF) y harina de mostaza oriental (OMF) fermentados con 9 especies de BAL aisladas de tomate y masa madre durante 48 h frente a hongos pertenecientes al género *Fusarium*. En primer lugar se realizó la evaluación cualitativa de la actividad antifúngica de los extractos en medio sólido (PDA). Las BAL que demostraron potencial antifúngico se seleccionaron para establecer la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y la Concentración Fungicida Mínima (MFC). Paralelamente se procedió a caracterizar los extractos, evaluándose la capacidad antioxidante mediante el ensayo de ABTS y el contenido de ácidos fenólicos previa extracción por QuEChERS e identificación por LC-ESI/MS Q-TOF. Cuatro cepas de *Lactobacillus plantarum* fueron seleccionadas por su capacidad antifúngica. Los extractos de YMF fermentados evidenciaron una mayor actividad antifúngica, presentando valores de MIC entre 7,8 y 31,3 g/L y de MFC oscilando entre 15,6 y 62,5 g/L. La acción de la fermentación bacteriana incrementó la capacidad antioxidante de los extractos ensayados, presentando un mayor contenido de compuestos antioxidantes los extractos elaborados a partir de YMF. Respecto al contenido de compuestos fenólicos, fueron identificados 9 ácidos fenólicos con potente capacidad antimicrobiana. Futuros ensayos procederán al estudio del contenido proteico y peptídico, focalizándose en sus respectivas acciones antimicrobianas.

**Agradecimientos:** Este estudio ha sido realizado gracias al Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2016-77610R), al Proyecto Prometeo/2018/126 subvencionado por la Generalitat Valenciana y al programa predoctoral del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (FPU17/06104).

**Palabras clave:** Actividad antifúngica, Bacterias ácido lácticas, *Fusarium spp.*, mostaza.

## USO DE COMPUESTOS DE ORIGEN NATURAL PARA REDUCIR EL CRECIMIENTO DEL *ASPERGILLUS FLAVUS* Y LA PRODUCCIÓN DE AFLATOXINA B<sub>1</sub> EN ALMENDRAS.

T.M. Nazareth<sup>1-2</sup>, R. Torrijos<sup>1</sup>, C. Luz<sup>1</sup>, J.M. Quiles<sup>1</sup>, K.C.P Bocate<sup>2</sup> F.B. Luciano<sup>2</sup>, J. Mañes<sup>1</sup>, G. Meca<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia (Universitat de Valencia, Laboratory of Food Chemistry and Toxicology, Faculty of Pharmacy) Spain; <sup>2</sup> Rua Imaculada Conceição 1155, 80215-910 Curitiba, Paraná (Pontifícia Universidade Católica, School of Life Science) Brasil.

[tiago@uv.es](mailto:tiago@uv.es)

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la harina de mostaza amarilla (HMA), harina de mostaza oriental (HMO), isotiocianato de alilo (AITC) y fermentado de bacterias lácteas (FBL) contra el crecimiento de *Aspergillus flavus* y la producción de aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) en almendras. Las almendras fueron tratadas por fumigación en contacto directo (HMA y FBL) e indirecto (HMO y AITC), según la capacidad de volatilización de los compuestos naturales evaluados. En los días 7 y 15 se realizó los análisis de recuento microbiológico y la producción de micotoxinas por HPLC. Los resultados demostraron que el uso de AITC y HMO inhibieron el crecimiento y la producción de micotoxinas, cuando dosis superiores a 5 µL/L y 2g/L fueron aplicadas, respectivamente. La aplicación de como fumigante redujo. La aplicación de HMA y FBL resultaron en el aumento significativo de la población fúngica, así como, la concentración de AFB<sub>1</sub> en las almendras. Como conclusión, solamente los tratamientos naturales que contienen AITC en su formulación presentaron efectos antifúngico y antimicotoxigenico. Además, los resultados evidenciados en este trabajo pueden auxiliar a la elaboración de nuevas tecnologías para la conservación y aumento de la seguridad alimentaria de los frutos secos.

**Agradecimientos:** Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2016-77610R) y al Consejo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (CAPES/CNPq Project 400896/2014-1) – Brasil

**Palabras clave:** AITC, Aflatoxina B<sub>1</sub>, Mostaza amarilla, Mostaza oriental, Bacterias lácteas.



# ENGINEERED SILVER NANOPARTICLES, A POSSIBLE TOOL IN THE MANAGEMENT OF AFLATOXIGENIC AND OCHRATOXIGENIC FUNGI AND AFLATOXIN AND OCHRATOXIN A PRODUCTION IN FOOD

J.V. Gómez<sup>1</sup>, A. Tarazona<sup>1</sup>, E.M. Mateo<sup>2</sup>, J.V. Gimeno-Adelantado<sup>3</sup>, R. Mateo-Castro<sup>3</sup>, M. Jiménez<sup>1</sup>, F. Mateo<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup> Dpto. Microbiología y Ecología, Facultad de C. Biológicas, Universitat de València (UV); <sup>2</sup> Dpto. Microbiología y Ecología, Facultad de Medicina y Odontología, UV; <sup>3</sup> Dpto. Química Analítica, Facultad de Química, UV; <sup>4</sup> Dpto. Ingeniería Electrónica, Escuela Técnica Superior de Ingeniería, UV

[Fernando.mateo@uv.es](mailto:Fernando.mateo@uv.es)

The most important and frequent mycotoxins in foods and feeds are aflatoxins (AFs) and ochratoxin A (OTA). These fungal secondary metabolites have strong detrimental impact on public health and economy. The main fungal species associated with AFs are *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* and with OTA *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. steynii*, *A. westerdijkiae* and *Penicillium verrucosum*. Nanotechnology is not new, particularly, nanoparticles have immense applications in agriculture, nutrition, medicine, health and other sciences. The potential use of nanotechnology in the control of toxigenic fungi and mycotoxin production has been little explored. In this report, engineered silver nanoparticles (AgNPs) were synthesized and characterized by Transmission Electron Microscopy and Single Particle Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry. Then, their effectiveness on control growth of all these fungal species and AF and OTA production by aflatoxigenic and ochratoxigenic species was studied. Spore suspensions supplemented with AgNPs (size 30 nm, range 14–100 nm) at doses 0–45 µg/mL were incubated for 2–30 h. At selected exposure times, the percentage of viable spores, effective doses (EDs) to inhibit the number of viable spores to 50%, 90% and 100% and fungal growth rates (GR) in maize-based medium (MBM) were estimated. AFs and OTA in cultures were determined by UPLC-ESI/MS/MS. Under the assayed conditions, EDs of AgNP, colony GR and AF and OTA levels in MBM cultures decreased when exposure time increased. EDs were higher for *A. flavus* and *A. parasiticus* than for ochratoxigenic species. The factors species, AgNP dose, exposure time and their interactions significantly affect fungal growth and AF and OTA accumulation in MBM. The results suggest that AgNPs alone or as active ingredient hosted in paints, films or other polymers could be a good strategy in the management of the main aflatoxigenic and ochratoxigenic species affecting food and AF and OTA contamination.

**Acknowledgements.** The authors acknowledge financial support from the Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO, Spanish Government) (Project AGL2014-53928-C2-1-R and Ph.D. contract BES-2015-071242).

**Keywords:** Silver nanoparticles, aflatoxins, ochratoxin A, effective doses, toxigenic fungi

## **POSTERS**

## DOES PUMPKIN EXTRACT PROTECT MITOCHONDRIA AGAINST MYCOTOXINS? A TRANSCRIPTIONAL APPROACH

M. Alonso-Garrido, W. Zanned, G. Font, L. Manyes

*Laboratory of Food Chemistry and Toxicology, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Spain.*

Pumpkin “Delica” (*Cucurbita maxima*) is well known for its high concentration on carotenoids, its dietary benefits and antioxidant activity. Mycotoxins are common toxins present in food and feed with an extended toxicity profile in humans and animals. Carotenoids and mycotoxins accumulate in a wide range of tissues and organs and both molecules possess the capability to penetrate the blood brain barrier. Since carotenoids protect against oxidation and mycotoxins have been reported to modify diverse cellular processes, human epithelial cells ECV 304 were selected as *in vitro* model to analyze both cell viability (MTT) using non-differentiated cells and gene expression (qPCR) using differentiated cells at day 9 and exposed for 2h. Samples were: (a) non-treated (b) pumpkin extract (500 nM) treated cells, (c) treated cells only with mycotoxin mixtures (100 nM each mycotoxin) and (d) with pumpkin extract (500 nM) and mycotoxin mixtures (100 nM). Previous studies showed altered mitochondrial pathways due to mycotoxins, so key mitochondrial (MT-ND2, MT-ND3, MT-ND4, MT-ND4L, MT-ND5, MT-CO1, MT-ATP8) and nuclear (OSGIN1, RNR2) genes were chosen for analysis. The joint exposure to pumpkin extract and aflatoxins individually and combined did decreased cell viability at 24, 48 and 72h, while exposure to enniatins individually and combined did not show a tendency. Pumpkin extract treatment up-regulated all genes analyzed. In summary, conclusions are specific for each mycotoxin mixture and no pattern effect against the toxicity caused by these mycotoxins in ECV 304 could be found for pumpkin extract.

**Acknowledgements:** This work was supported by the Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities (AGL2016-77610-R and BES-2017-081328).

**Keywords:** qPCR, blood brain barrier, ECV 304.

# SILVER NANOPARTICLES AS ANTIFUNGAL; REVISION OF THEIR GENOTOXICITY

A. Rodriguez-Garraus, A. Azqueta, A. López de Cerain

*Department of Pharmacology and Toxicology. School of Pharmacy and Nutrition.  
University of Navarra.*

[arodriguez.53@alumni.unav.es](mailto:arodriguez.53@alumni.unav.es)

Mycotoxins are secondary fungal metabolites that can be found as natural food contaminants in plants-origin and animal-derived products. The most important ones for human health are aflatoxins, produced by *Aspergillus* species, mainly *A.flavus* and *A.parasiticus*, ochratoxin, produced by *Penicillium* and *Aspergillus* species, and fumonisins, trichothecenes and zearalenones, synthesized by over 50 *Fusarium* species. Cereals, more specifically corn and wheat, are the main product affected by fungal contamination due to inadequate conditions pre-crop, during storage and post-harvest, limiting global crop production and crop quality.

Antimicrobial agents used against mycotoxin producer fungi, can lead to resistant pathogens, and new fungicides are required in the field of agriculture to increase food availability, to reduce food waste and to increase food safety. In this regard, nanotechnology can provide new compounds, as silver nanoparticles, that have shown their antifungal activity and potency to disrupt mycotoxins production. Since the nineteenth century, silver-based compounds have been used in many antimicrobial applications, but there is a need to understand the risk that this material poses to human health.

A bibliographic revision of 29 scientific articles has been made to batch and compare the silver nanoparticles genotoxicity results. From 49 comet, 15 FPG, 8 Endo-III and 1 OGG1 modified comet, 51 micronucleus and 6 mouse lymphoma *in vitro* assays, 40, 10, 6, 1, 31 and 6 showed significant genotoxic results, respectively. From 10 comet, 2 Endo-III and 2 OGG1 modified comet, 16 micronucleus, 2 Pig-a, 3 chromosome aberration, 2 DNA deletion and 4 HX2A determination *in vivo* assays, 4, 2, 2, 9, 0, 3, 2 and 3 reported positive genotoxic results, respectively. Smaller nanoparticles produce higher genotoxic effects. The results showed increased genotoxicity of nanoparticles coated with citrate compared to PVP. AgNPs accumulation in liver leads to long-term effects. Pig-a showed not to be appropriate to study AgNPs genotoxicity.

**Key words:** mycotoxins, silver nanoparticles, antifungal, genotoxicity.

# **ASPERGILLUS WELWISTCHIAE AISLADOS DE UVAS Y PASAS PRODUCEN OCRATOXINA A**

F.J. Cabañes, M.L. Abarca, G. Castellá y M.R. Bragulat

*Grup de Micologia Veterinària, Departament de Sanitat i Anatomia Animals, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona*

*javier.cabanes@uab.cat*

Recientemente, *Aspergillus niger* sensu stricto se ha escindido en dos especies: *A. niger* y *A. welwitschiae*. Ambas especies no pueden ser diferenciadas mediante características fenotípicas incluyendo los perfiles de extrólitos. Por el momento, no existe información acerca la ecofisiología de *A. welwitschiae*. En este estudio, se han ensayado siete cepas de este taxón aisladas de uvas y pasas, previamente identificadas como *A. niger* y caracterizadas como productoras de ocratoxina A (OTA). Mediante secuenciación del gen de la calmodulina se pudo determinar que dos de ellas pertenecían a *A. niger* y cinco a *A. welwitschiae*. En este estudio se han ensayado los efectos sobre el crecimiento y la producción de OTA en estas cepas teniendo en cuenta los siguientes factores: actividad de agua ( $a_w$ ): 0.90, 0.95 y 0.98-0.99, medio de cultivo: Yeast Extract Sucrose Broth (YESB), Synthetic Grape Juice Medium, White grape juice y temperatura: 15, 25 y 35 °C. Los ensayos se realizaron por duplicado utilizando placas de microtitulación, determinando el crecimiento mediante la medida de la absorbancia a 530nm (ABS) y la concentración de OTA a 1, 2, 4 y 10 días de incubación. Entre los resultados obtenidos, podemos destacar que no se encontraron diferencias significativas para la ABS y la concentración de OTA producida entre ambas especies. La mayor concentración de OTA se detectó a una  $a_w$  de 0.98-0.99. Ninguna de las cepas ensayadas presentó la capacidad de elaborar OTA a una  $a_w$  de 0.90. Para ambas especies, el medio YESB ha sido el más favorable para la producción de OTA. Los valores medios de OTA más elevados se detectaron a 25°C para las cepas de *A. niger* y a 15°C para las de *A. welwitschiae*. En este estudio se ha confirmado la capacidad ocratoxígena de cepas de *A. welwitschiae* aisladas de uvas y pasas.

**Agradecimientos:** Estudio financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2014-52516-R).

**Palabras clave:** *Aspergillus welwitschiae*, uvas, pasas, ocratoxina A

## EFECTO DE ALIL ISOTIOCIANATO, DEL HARINA DE MOSTAZA AMARILLA Y DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICA CONTRA EL CRECIMIENTO DE *P. VERRUCOSUM* EN CEBADA

K.C.P. Bocate<sup>1</sup>, M. M. Navarro<sup>2</sup>, T.M. Nazareth<sup>2</sup>, M. Rivola<sup>3</sup>, C. Luz<sup>2</sup>, R. T. Caparrós<sup>2</sup>, J. Quiles<sup>2</sup>, J. Mañes<sup>2</sup>, G. Meca<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Programa de Posgrado en Ciencia Animal, Universidad Católica Pontificia de Paraná, Brasil; <sup>2</sup>Laboratorio de Toxicología de Alimentos, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, España; <sup>3</sup>Departamento de Agricultura y Ciencia dos Alimentos, Alma Mater Studiorum, Universidad de Bologna, Italia.

[karlabocate@gmail.com](mailto:karlabocate@gmail.com)

El alil isotiocianato (AITC) es un ingrediente activo del aceite esencial de la mostaza que ha demostrado acción antimicrobiana en estudios anteriores. La mostaza amarilla es una planta del género Brassicaceae que contiene alil isotiocianato (AITC), un compuesto volátil liberado como resultado del daño mecánico en las células de las plantas. Se ha estudiado por su capacidad antimicrobiana, antifúngica y antimicotoxigénica. Se proponen medidas alternativas para reducir el crecimiento de los hongos micotoxigénicos y la producción de toxinas, especialmente compuestos naturales, que reciben una mejor aceptación por parte de los consumidores. Como compuestos naturales, su uso puede atender a la demanda comercial de sustitutos de los químicos que tradicionalmente se utilizan como conservantes en la industria. Esto también se aplica a las bacterias ácidos lácticas (LAB) porque algunos de sus metabolitos incluyen sustancias conservantes.

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la eficacia de AITC como fumigante, harina de mostaza amarilla (YMF) y bacterias ácido-lácticas contra el crecimiento de *Penicillium verrucosum* en cebada. Se aplicaron diferentes tratamientos: por contacto directo con la cebada y por atmósfera modificada con diferentes concentraciones de los compuestos. Los métodos para analizar la eficacia de los compuestos fueron la concentración mínima inhibitoria (MIC<sub>50</sub>), la concentración fungicida (MFC), la población residual, la humedad y el porcentaje de germinación.

Los resultados mostraron que en la concentración de 10 ppm de AITC se redujo el crecimiento fúngico, y la cebada germinó un 85,8%, pero los tratamientos con LAB y YMF no mostraron actividad antifúngica y redujeron la capacidad de germinación.

**Palabras clave:** Compuestos naturales; antifúngicos; harina de mostaza; Bacteria ácido-láctica.

# EFECTO DE ACEITES ESENCIALES EN LA PRODUCCIÓN DE OCRATOXINA DE *PENICILLIUM NORDICUM* EN UN SISTEMA MODELO DE SALCHICHÓN

E. Roncero, M.M, Álvarez, M.A. Asensio, L. Sánchez-Montero, J.J. Rondán, M.J. Andrade

*Universidad de Extremadura/Instituto de Investigación de Carne y Productos Cárnicos/Facultad de Veterinaria/Higiene y Seguridad Alimentaria. Avda. de las Ciencias s/n, Cáceres*

[eroncerob@unex.es](mailto:eroncerob@unex.es)

En la industria elaboradora de derivados cárnicos curado-madurados uno de los principales peligros es la ocratoxina A (OTA), producida fundamentalmente por *Penicillium nordicum* y *Penicillium verrucosum*. Aunque actualmente para controlar dicho peligro se aplican compuestos antifúngicos sobre la superficie de embutidos, existe una tendencia creciente a sustituir estos aditivos químicos por otros de origen natural. Dentro de estos últimos encontramos los aceites esenciales de plantas aromáticas, cuyo efecto frente a mohos toxigénicos ha sido escasamente estudiado. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad antagonista de aceites esenciales de especias habitualmente empleadas en la elaboración de los embutidos (romero, tomillo y orégano) frente a mohos ocratoxigénicos. Para ello *P. nordicum* FHSCC Pn15 se inoculó en un medio elaborado con salchichón liofilizado (25%) junto con dos concentraciones diferentes de cada extracto individualmente. Como control positivo se añadió un preparado comercial con sorbato potásico y natamicina a dos concentraciones. Como control negativo se utilizó el medio de cultivo sin aceite esencial ni preparado comercial. Tras su incubación durante 15 días a 12 °C, se evaluó visualmente el crecimiento del moho y se cuantificó la OTA mediante LC-MS/MS con analizador triple cuadrupolo (QqQ). A pesar de que no se detectaron diferencias en el crecimiento en función del tratamiento, se observó un incremento significativo en los niveles de OTA respecto al control en presencia de 150 µL de preparado antifúngico y una disminución por debajo del límite de detección con aceite esencial de romero a la concentración de 500 µL/mL. Por ello, el empleo de aceite esencial de romero se plantea como una estrategia alternativa al uso de compuestos antifúngicos comerciales para controlar el peligro de OTA en embutidos curado-madurados.

**Agradecimientos:** Trabajo financiado por ayudas IB16045 y GR18056 (Junta de Extremadura-Consejería de Economía e Infraestructuras-, Fondo Europeo de Desarrollo Regional-“Una manera de hacer Europa”).

**Palabras clave:** Embutidos curado-madurados, ocratoxina A, actividad antagonista, aceites esenciales

## COMBINED TOXICITY OF AFLATOXINS AND OCHRATOXIN A: A SYSTEMATIC REVIEW.

M. Alonso-Jáuregui<sup>1</sup>, A. López de Cerain<sup>1,2</sup>, E. González-Peñas<sup>3</sup>, A. Vettorazzi<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Universidad de Navarra, School of Pharmacy and Nutrition, Department of Pharmacology and Toxicology, Pamplona, Spain. <sup>2</sup>IdiSNA, Navarra Institute for Health Research, Pamplona, Spain. <sup>3</sup>Universidad de Navarra, School of Pharmacy and Nutrition, Department of Pharmaceutical Technology and Chemistry, Pamplona, Spain

[malonso.17@alumni.unav.es](mailto:malonso.17@alumni.unav.es)

Mycotoxins are natural contaminants of food and feed. This suppose a public health concern due to human and animal exposure. Among them, aflatoxins (AFs) are considered as genotoxic carcinogens and no levels of exposure are considered as safe. Ochratoxin A (OTA) is a potent nephrotoxin and was classified as a possible carcinogen to humans. The current approach of toxicity studies and policies undertake the assumption of single exposure. However, the study of the combined toxicity resembles the real situation more effectively. The aim of the present work is to gather *in vitro*, *in vivo* and review articles derived from a systematic review of AFs and OTA combined toxicity. For that purpose, PubMed database was used with the following keywords: aflatoxin AND ochratoxin AND toxicity. Scarce data were obtained. Although 234 records were identified, after applying exclusion criteria, 22 articles were finally analysed. All the studies selected, used AFB1 and OTA, except one article which analysed AFM1+OTA combined toxicity. On the one hand, the *in vitro* analysis (8 articles) of the combination resulted in cytotoxic additive effects in the cell lines representing the target organ of each mycotoxin (liver and kidney). Intestinal Caco-2 cells obtained dual interaction depending on concentration tested. The binary mixture had no greater effects than OTA individually in MA-10 Leydig cells. Regarding immunotoxic potential, increased levels were registered in combination. However, no conclusive results regarding genotoxicity have been achieved. On the other hand, the interaction gathered *in vivo* (9 articles) turned out to be antagonism in general and developmental toxicity, as well as, genotoxicity. Even though, additive interaction resulted in immunological response. Finally, 5 review articles were retrieved. The items explored were: co-occurrence at different levels (worldwide, EU-level and country rating), combined toxicity and experimental and statistical aspects for characterize interactions.

**Palabras clave:** (Aflatoxin, ochratoxin A, combined toxicity, mixture)



## DETERMINATION OF MYCOTOXINS AND POLYPHENOLIC COMPOUNDS IN HEMP INFLORESCENCES USING UHPLC-Q-ORBITRAP HRMS

A. Narváez<sup>1</sup>, L. Izzo<sup>1</sup>, A. Gaspari<sup>1</sup>, G. Graziani<sup>1</sup>, A. Ritieni<sup>1</sup>, Y. Rodríguez -Carrasco<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Via D. Montesano, 49 - 80131 Napoli. Università di Napoli Federico II, Department of Pharmacy, Italy; <sup>2</sup>Av/ Vicent A. Estellés, s/n, 46100, Burjassot, Valencia. University of Valencia, Department of Food Chemistry and Toxicology, Spain.

[alfonsonsimon@gmail.com](mailto:alfonsonsimon@gmail.com)

*Cannabis sativa* is a plant which produces a vast number of pharmacologically relevant compounds. Because of its therapeutic potential, *C. sativa* has been totally or partially legalized in countries like USA, Canada and others inside the EU. Alongside legalization, regulation about content in contaminants and therapeutic compounds has been set in only a few. Mycotoxins are toxic secondary metabolites produced by several fungi and *Fusarium* species have been reported as the third fungus more common in *C. sativa*. The most restrictive legislation (SOR/2018-144, Canada) sets limits for aflatoxins B1, B2, G1 and G2 and ochratoxin A, but *Fusarium spp.* can also produce different mycotoxins with a wide range of toxicological effects. Referring to therapeutic compounds, analysis are based on cannabinoids and terpenes, but *C. sativa* produces also polyphenolic compounds with biological activity reported. The aim of this study was to detect and quantify simultaneously different mycotoxins ( $n=19$ ) and polyphenolic compounds ( $n=42$ ) in hemp inflorescences throughout ultra high performance liquid chromatography (UHPLC) coupled to Q-Orbitrap. Regulated mycotoxins were not found in any sample but beauvericin (*Fusarium* toxin) was quantified in four out of eight samples, in a range from 72.6 to 86.2 ng/g. These values are highly above the ones reported by several studies in grains and grain-based foodstuffs, and there are no maximum limits set by any legislation. Referring to polyphenols, 30 different compounds were found. The most important ones were the flavonoids luteolin, rutin and myricetin, which occurred in a wide range of concentrations, from 1 to 20 mg/g, whereas other phenolic compounds were quantified at concentrations below 1 mg/g. Since consumers use to have health issues, exposure to both regulated and non-regulated mycotoxins should be taking into account. Therefore, this procedure stands for an useful tool to control mycotoxins and therapeutical compounds in hemp.

**Palabras clave:** Beauvericin; *Canabis sativa*; *Fusarium*; polyphenols; Orbitrap

## PRESENCIA DE MOHOS Y MICOTOXINAS EN DIFERENTES TIPOS DE ENSILADO PARA GANADO VACUNO LECHERO EN ESPAÑA

M. Rodríguez-Blanco, S. Marín, V. Sanchis, A.J. Ramos

*Unidad de Micología Aplicada, Departamento de Tecnología de Alimentos, ETSEA-Universitat de Lleida, UTPV-XaRTA, Agrotecnio, Av. Rovira Roure 191, 25198 Lleida, España.*

[ajramos@tecal.udl.cat](mailto:ajramos@tecal.udl.cat)

El ensilado es una práctica utilizada en todo el mundo para conservar diferentes tipos de cultivos manteniendo su valor nutricional durante largos periodos de almacenamiento. Al ser uno de los principales componentes de las raciones para ganado vacuno, los ensilados son una potencial fuente de micotoxinas debido a su posible contaminación por hongos filamentosos. En este estudio se analizó la presencia de aflatoxinas y toxinas de *Fusarium* en diferentes tipos de ensilados (maíz, hierba, alfalfa, pulpa de remolacha, grano de maíz húmedo y raygrass) recogidos en granjas localizadas en cuatro áreas de España. Así mismo, se analizaron los valores de pH y actividad de agua, y se realizaron recuentos fúngicos y de bacterias lácticas. Los principales géneros identificados fueron *Penicillium* (4-26%), *Geotrichum* (2-21%) y *Monascus* (0,34-3%). Un 10% de las muestras presentaron aflatoxinas, detectándose en ensilados de maíz, alfalfa y grano de maíz húmedo. El 40% de las muestras fueron positivas para la presencia de toxinas de *Fusarium*, siendo las fumonisinas las más frecuentemente detectadas. Estas toxinas se encontraron en muestras de ensilado de maíz, hierba, alfalfa, pulpa de remolacha y grano de maíz húmedo. Las muestras más contaminadas fueron las de ensilado de maíz, siendo 30 de las 44 muestras analizadas positivas para alguna de las toxinas de *Fusarium*: el 41% de las muestras contenían FBs, el 14% deoxinivalenol, el 23% 15-acetildeoxinivalenol y un 16% zearalenona. En ninguna de las muestras positivas los niveles de micotoxinas superaron los valores recomendados por la UE. La falta de relación entre el recuento de *Fusarium* y sus micotoxinas sugiere que la producción de micotoxinas posiblemente tiene lugar antes del ensilado. Los resultados indican que el crecimiento de mohos y la presencia de micotoxinas en ensilados debe monitorizarse de forma regular para minimizar la exposición del ganado vacuno a pienso contaminado.

**Palabras clave:** ensilado, análisis multi-micotoxina, UHPLC-FLD, HPLC-MS/MS

# SINGLE AND COMBINED ACTIONS OF OCHRATOXIN A AND BEAVERICIN IN HEPG2 CELLS: VIABILITY, MICRONUCLEUS INDUCTION AND CELL CYCLE DISTURBANCE

A. Juan-García\*, C. Juan, J. Tolosa and M.J. Ruiz

*Laboratory of Food Chemistry and Toxicology, Faculty of Pharmacy, University of  
Valencia, Spain.*

[ana.juan@uv.es](mailto:ana.juan@uv.es)

Mycotoxins are produced by a number of fungal genera spp as e.g. *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium* and *Claviceps*. Beauvericin (BEA) and Ochratoxin A (OTA) are present in various cereal crops and processed grains. This study aims to determine their combination effect in HepG2 cells as for the first time presented. In this study, the type of interaction among BEA and OTA through isobologram method, cell cycle disturbance by flow cytometry and, micronucleus induction (genotoxicity) by following the TG 487 (OECD, 2016) were studied. All three assay were performed individually and combined in HepG2 cells. Cytotoxic concentration ranges studied by the MTT assay, over 24, 48 and 72h were from 0 to 25  $\mu$ M for BEA; from 0 to 100  $\mu$ M for OTA while BEA + OTA combinations at 1:10 ratio from 3.4 to 27.5  $\mu$ M. The toxicity observed for BEA was higher than for OTA at all times assayed; additive and synergistic effect were detected for their mixtures. Cell cycle arrest in G0/G1 phase was detected for OTA and BEA + OTA treatment in HepG2 cells. Genotoxicity by MN induction revealed significant effects for BEA, OTA and in combinations underlining the importance of studying real exposure scenario of chronical exposure to mycotoxins.

**Palabras clave:** combination, micronucleus, viability, HepG2 cells

## SH-SY5Y CELLS EXPOSED TO OCHRATOXIN A AND BEAUVERICIN: COMPARISON OF CYTOTOXIC EFFECTS

A. Juan-García\*, F. Agahi and C. Juan

*Laboratory of Food Chemistry and Toxicology, Faculty of Pharmacy, University of  
Valencia, Spain.*

*ana.juan@uv.es*

The undifferentiated neuroblastoma cell line SH-SY5Y is a subclone of the SK-N-SH cell line derived from a bone marrow biopsy. It shares few properties with mature neurons; therefore, it is frequently used as a model to simulate the neuronal function and their differentiation. Fungal growth in human foods and animal feeds can cause formation of mycotoxins. Mycotoxins are known as secondary metabolites and main fungi genera producers belong to *Fusarium*, *Aspergillus* and *Penicillium*. The aim of this work is in one side to collect the studies and effects of various mycotoxin on SH-SY5Y; on the other side, to study the cytotoxic effects of beauvericin (BEA), and ochratoxin A (OTA) in that cell line.

All articles selected address on in vitro cellular based assays. Cell viability has been studied by: propidium iodide assay, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay, neutral red assay, lactate dehydrogenase leakage assay or reduction of the total cellular protein concentration. Here, cytotoxicity was measured by MTT assay, over 24, 48 and 72 hours with a single treatment at the concentration range of 0.01 to 2.5  $\mu\text{M}$  for bea and, from 0.2 to 50  $\mu\text{M}$  for OTA at 1:2 dilutions. Based on the conversion of MTT into formazan crystal by cells that are alive, this assay determines mitochondrial activity and concentration that reach 50% inhibition of cellular proliferation (IC<sub>50</sub>). Individual IC<sub>50</sub> values detected was diverse and BEA resulted to present higher toxic potential than OTA on SH-SY5Y cells.

**Palabras clave:** neuronal cells, OTA, BEA, MTT, review

## CONTROL DEL CRECIMIENTO DE HONGOS TOXÍGENOS CON PROTEÍNAS ANTIFÚNGICAS

J. Iribarren<sup>1</sup>, J. Gil-Serna<sup>1</sup>, A. Martínez del Pozo<sup>2</sup>, B. Patiño<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Av. José Antonio Novais, 12 (Departamento de Genética, Fisiología y Microbiología, Facultad de CC. Biológicas, Universidad Complutense de Madrid). <sup>2</sup>Av. Complutense, s/n (Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de CC. Químicas, Universidad Complutense de Madrid)

[jgilsern@ucm.es](mailto:jgilsern@ucm.es)

La contaminación de cultivos por hongos toxígenos, como *Fusarium* spp. o *Aspergillus* spp., genera grandes pérdidas económicas y en cuanto a valores nutricionales de los alimentos. Aun teniendo en cuenta tan grave problema, es difícil encontrar métodos eficaces que impidan la producción de micotoxinas por parte de estos hongos. En este estudio se enfrentan hongos comunes en cultivos de interés alimentario y posibles limitadores del crecimiento, concretamente dos proteínas de diferentes orígenes: *Fusarium graminearum* Antifungal Protein (Fg-AFP) y *Latrodectin I* (Ltd-I). La primera es producida por la especie *Fusarium graminearum* para competir con otros hongos, y la segunda proviene del veneno de la araña *Latrodectus hesperus*. Se enfrentaron 10 cepas de los géneros *Fusarium* y *Aspergillus* con distintas concentraciones de las proteínas purificadas (7 µg/µL, 3,5 µg/µL, 1,4 µg/µL y 0,7 µg/µL) en agar Czapek, incubando a 25°C. Se observaron halos de inhibición del crecimiento a distintas concentraciones en 7 de las cepas enfrentadas con Fg-AFP, pudiendo apreciarse halos mayores a concentraciones más altas de proteína. Los enfrentamientos realizados con Ltd-I no tuvieron efecto sobre el crecimiento, pero fue posible observar claros aumentos de la esporulación en 8 cepas, siendo un indicador de estrés. Para los estudios posteriores se seleccionaron 4 especies: *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Fusarium proliferatum* y *F. verticilloides*. Se cultivaron en el mismo medio suplementado con 100 µL de proteína en superficie a 1,5 µg/µL, confirmando unos porcentajes de reducción del crecimiento del 46,90%, 26,17%, 71,08% y 78,14%, respectivamente, en presencia de Fg-AFP, e inhibición nula con la proteína Ltd-I. La producción de aflatoxina B1 por *A. flavus* y ocratoxina A por *A. niger*, comprobada mediante TLC, no se vio afectada por la presencia de la proteína, así como la expresión del gen *fum1* en *F. proliferatum* y *F. verticilloides*, evaluada por RT-PCR a tiempo real.

**Agradecimientos:** Trabajo financiado por el MINECO (AGL2014-53928-C2-2-R).

**Palabras clave:** Micotoxinas, *Antifungal Protein*, *Latrodectin-I*, Biocontrol, Agroalimentación

## MYCOTOXIN OCCURRENCE AND RISK ASSESMENT IN CEREALS FROM ALGERIA

C.K. Mahdjoubi<sup>1,2</sup>, N. Arroyo-Manzanares<sup>3</sup>, N. Hamini<sup>2</sup>, A.M. García-Campana<sup>1</sup>, L. Gámiz-Gracia<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Dept. Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, Spain;* <sup>2</sup>*Dept. Biology, Faculty of Natural and Life Science, University of Oran 1, Algeria;* <sup>3</sup>*Dept. Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Murcia, Murcia, Spain*

*[lgamiz@ugr.es](mailto:lgamiz@ugr.es)*

The aim of this study was to evaluate the mycotoxin contamination of 120 samples of cereals (maize, rice, wheat and barley) from Algerian markets, considering that in this country there is no legislation about maximum allowed contents. With this purpose, a method using a QuEChERS-based extraction and ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UHPLC–MS/MS) was developed. The target analytes included the mycotoxins regulated by the EU in cereals (aflatoxin B1, B2, G1 and G2, ochratoxin A, deoxynivalenol, zearalenone, fumonisin B1 and B2, T-2 and HT-2 toxin), other commonly studied mycotoxins (fusarenon-X, citrinin, sterigmatocystin) and emerging mycotoxins (beauvericin and enniatin A, A1, B and B1).

Analytical results showed that 116 out of 120 total cereal samples (96%) were contaminated with at least one toxin. Aflatoxin G1 was the most frequently detected (69 samples, 57%) at concentrations up to 64 µg/kg. Moreover, fumonisins, zearalenone and deoxynivalenol registered very high concentrations, ranging from 0.004-449 (fumonisin B1+B2), 0.009-0.58 and 0.023-2.06 mg/kg, respectively, and in some maize samples the concentration of fumonisins exceeded in more than 25 times the maximum concentration allowed by EU. Remarkably, 57% of the samples were contaminated with emerging mycotoxins, and in 10 wheat samples the total concentration of emerging mycotoxins were as high as 2-10 mg/kg.

Risk assessment was evaluated for all the mycotoxins with total dietary intake (TDI) available. The results showed that Algerian consumers are at a high risk of exposure to fumonisins (FB1+FB2) through maize (%TDI of 635.2) and to deoxynivalenol, zearalenone and the sum of HT-2 and T-2 toxins through wheat consumption (%TDI of 442, 234.6 and 231.5, respectively). These results alert about the potential risk for Algerian consumers regarding mycotoxins.

**Acknowledgements:** The authors gratefully acknowledge the financial support of the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (Project ref: AGL2015-70708-R, MINECO/FEDER, UE)

**Palabras clave:** cereals, Argelia, QuEChERS, UHPLC-MS/MS, multimycotoxin

## EVALUACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN POR AFLATOXINAS EN MUESTRAS DE CACAO EN POLVO

M. Herrera, P. Alfonso, M. Biota, E. García-Rodríguez, S. Lorán, J.J. Carramiñana, T. Juan, A. Herrera, A. Ariño

*Instituto Agroalimentario de Aragón - IA2 (Universidad de Zaragoza-CITA), Facultad de Veterinaria, Miguel Servet 177, 50013, Zaragoza.*

[herremar@unizar.es](mailto:herremar@unizar.es)

Las aflatoxinas suponen un grave riesgo para la seguridad alimentaria y provocan elevadas pérdidas económicas, contaminando los cultivos en el campo y durante su almacenamiento, por lo que contaminan una gran variedad de materias primas y alimentos elaborados. Además, la incidencia de estas micotoxinas se ha visto incrementada en los últimos años por factores relacionados con el cambio climático. Los alimentos contaminados plantean amenazas sobre la inocuidad de los alimentos, pudiendo afectar a la población más vulnerable, como la infantil. Por ello, es relevante investigar la presencia de aflatoxinas en alimentos como el cacao, que son consumidos frecuentemente por este grupo poblacional. Además, actualmente existe cierta laguna legal ya que, en el cacao y productos derivados, no está legislado el contenido de las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2, que son cancerígenas para personas (Grupo 1 del IARC).

El objetivo de este estudio consistió en evaluar las tasas de contaminación por aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 en 50 muestras comerciales de cacao en polvo (11 ecológicas y 39 convencionales). Las micotoxinas se extrajeron con una mezcla de metanol/agua (80:20) seguida de una purificación mediante columnas de inmunoafinidad. Finalmente, la determinación se realizó por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detectores fotoquímico y de fluorescencia, con límite de detección de 0,02 µg/kg para las 4 aflatoxinas.

El porcentaje de positividad a aflatoxinas totales fue del 44% (n= 22), con unas tasas comprendidas entre 0,02 µg/kg y 3,33 µg/kg. La incidencia de las distintas aflatoxinas fue: B1 (13 muestras), G1 (11 muestras) y B2 (3 muestras); no se detectó aflatoxina G2. Las aflatoxinas B1, B2 y G1 se detectaron de forma simultánea en 1 muestra, la B1 y G1 en 3 muestras, mientras que la B1 y B2 coexistieron en 2 muestras. La positividad a aflatoxinas totales fue muy similar en las muestras de cacao de origen ecológico (45,5%) y convencional (43,6%).

**Agradecimientos:** Gobierno de Aragón y FEDER 2014-2020 (Grupo A06\_17R).

**Palabras clave:** micotoxinas, aflatoxinas, cacao, HPLC

**CAPACIDAD ANTIFÚNGICA DE PTSO FRENTE A CEPAS  
MICOTOXIGÉNICAS DE *ASPERGILLUS PARASITICUS*, *ASPERGILLUS  
FLAVUS*, *PENICILLIUM VERRUCOSUM* Y *FUSARIUM GRAMINEARUM***

P. Abad<sup>1</sup>, N. Arroyo-Manzanares<sup>2</sup>, J.J. Ariza<sup>1</sup>, A. Baños<sup>1</sup>, L. Gámiz-Gracia<sup>3</sup>, A.M.  
García-Campaña<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*DMC Research Center S.L.U., Alhendín, Granada;* <sup>2</sup>*Depto. Química Analítica,  
Facultad de Química, Universidad de Murcia;* <sup>3</sup>*Depto. Química Analítica, Facultad de  
Ciencias, Universidad de Granada*

[amgarcia@ugr.es](mailto:amgarcia@ugr.es)

Los compuestos organosulfurados característicos del género *allium*, incluyendo propil propano tiosulfonato (PTSO), son compuestos antimicrobianos potencialmente útiles para aplicaciones alimentarias, incluyendo su aplicación como aditivos en piensos. En este estudio, se ha evaluado la actividad antifúngica del PTSO frente a distintas cepas de hongos aflatoxigénicos (*Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus flavus*), una cepa productora de ocratoxina A (OTA) (*Penicillium verrucosum*) y otra cepa productora de zearalenona (ZEA) (*Fusarium graminearum*) empleando un ensayo en medio de cultivo. La realización de este estudio ha permitido establecer la dosis letal de PTSO frente a cada una de las cepas estudiadas, obteniéndose valores de 10.0, 4.0, 7.5 y 17.5 mg/kg para *Penicillium verrucosum*, *Fusarium graminearum*, *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus flavus*, respectivamente. Igualmente, considerando que la producción de micotoxinas está asociada al crecimiento de hongos, en este estudio se ha evaluado la influencia de PTSO sobre dicha producción, empleando UHPLC-MS/MS para la determinación de las micotoxinas bajo estudio. Los resultados mostraron que, además de su actividad antifúngica, el PTSO también induce una reducción en el contenido de las micotoxinas ZEA y aflatoxina B2 (AFB2) producidas por los hongos *Fusarium graminearum* y *Aspergillus flavus*, respectivamente. La concentración de ZEA se redujo a la mitad cuando se aplicaron dosis de PTSO de 1.88 y 3.75 mg/kg, mientras que el contenido de AFB2 se redujo diez veces usando dosis de PTSO de 7.5 y 15 mg/kg. Sin embargo, no se observó ningún cambio en las concentraciones de las demás micotoxinas estudiadas (OTA en *Penicillium verrucosum* y aflatoxina B1 (AFB1), aflatoxina G1 (AFG1), aflatoxina G2 (AFG2) y AFB2 en *Aspergillus parasiticus*).

**Palabras clave:** PTSO, cepas micotoxigénicas, medios de cultivo, UHPLC-MS/MS



## EVALUATION OF MYCOTOXINS DURING THE DRY PROCESS OF *TRITICUM AESTIVUM* SILAGE FROM TUNISIA

A. Mannai<sup>1</sup>, S. Oueslati<sup>2</sup>, H. Ben Salem<sup>1</sup>, H. Berrada<sup>3</sup>, J. Mañes<sup>3</sup>, C. Juan<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Animal and Forage Productions (National Institute of Agronomic Research of Tunisia, INRAT); <sup>2</sup>Regional Field Crop Research Center of Beja (CRRGC), Tunisia <sup>3</sup>Laboratory of Food Chemistry and Toxicology (Faculty of Pharmacy, University of Valencia).

\*[Cristina.juan@uv.es](mailto:Cristina.juan@uv.es)

The incidence of *Fusarium* mycotoxins has proved interesting for assessing the quality of silage. The aim of this work was study the incidence of 23 mycotoxins in a set of 18 *Triticum aestivum* silage samples, obtained from two different geographical regions in the Northern Tunisia (Bizerte and Ariana) during 4 periods of the dried silage procedure.

Mycotoxins were separated and purified from samples by a liquid-solid extraction procedure using C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>N/H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>COOH (79:20:1, v/v/v) and determined with liquid chromatography coupled to a triple quadrupole mass spectrometry (LC-MS/MS).

Presence of DON, ENB, ENB<sub>1</sub>, HT-2, ENA<sub>1</sub>, BEA, and ZEA were detected in the analyzed samples at the following percentages: 29%, 29%, 12%, 12%, 6%, 6% and 6%. DON and ENB were the most detected mycotoxin in wheat silage samples with mean values of 40 ng/kg, and 1987 µg/kg, respectively. The most contaminated samples were detected during the first and fourth period of dried silage process in both regions. However, the Ariana cultivated silage was the most contaminated, in fact 58% of them presented mycotoxins and the majority contamination was associated to ENB (33%). These results suggested that DON and ENB are the most field mycotoxins found after the processes of fermentation in *Triticum aestivum* silage.

**Acknowledgments:** AGL2016-77610-R.

**Keywords:** Deoxynivalenol, nivalenol, *Triticum aestivum* silage, LC-MS/MS.

## EMERGING MYCOTOXINS IN BARLEY FROM TUNISIA: RESULTS OF FOUR YEARS STUDY (2015-2018)

S. Oueslati<sup>1\*</sup>, H. Berrada<sup>2</sup>, J. Mañes<sup>2</sup>, C. Juan<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Regional Field Crop Research Center of Beja (CRRGC), Tunisia;* <sup>2</sup>*Laboratory of Food Chemistry and Toxicology (Faculty of Pharmacy, University of Valencia).*

*\*[souheibo@yahoo.fr](mailto:souheibo@yahoo.fr)*

As all other countries across the Mediterranean, Tunisia is suffering from the climate changes and it is necessary nowadays to develop strategies to guarantee the availability and the quality of staple food such as cereals for its population. These changes are stimulating, among other bioccontaminants, toxigenic fungi, which are able to produce a group of emerging mycotoxins mainly Enniatins (ENA, ENA1, ENB, and ENB1) as well as Beauvericin (BEA).

In this study, the natural occurrence of ENA, ENA1, ENB, ENB1 and BEA, in the main cultivated barley varieties intended for human consumption was assessed. The varieties samples termed Manel, Kounouz, Rihane, Lemsi were cultivated in the same area, and the same agronomic conditions were performed all along. Samples were collected in the Northern Tunisia (region of Béja) and the monitoring was realized along four successive years (2015-2018).

The collected samples were extracted using a liquid-solid extraction using a mixture of acetonitrile:water (84:16, v/v) prior to a liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination. Results showed the presence of both ENB and ENB1 in the Manel sample collected in 2017. Values reached 46.6 and 5.4 µg/Kg for ENB and ENB1, respectively. While, all the other samples of each studied year were not contaminated by the analyzed mycotoxins.

To the better of our knowledge, this is the first survey of Tunisian barley varieties contamination by the emerging mycotoxins for a period of consecutive four years. Even though, meteorological conditions may be favorable for the growth of toxigenic fungi mainly *Fusarium avenaceum* in our case, the varietal resistance itself and the agronomic pack performed within the field were able to insure a production with no toxicological issues. Such results may be used in national breeding programs in order to continue improving barley varieties to fight against climate changes.

**Acknowledgments:** AGL2016-77610-R.

**Keywords:** Ennatins, Beauvericin, LC-MS/MS, barley, Tunisia.

## POTENCIAL DE BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS EN EL BIOCONTROL CONTRA HONGOS MICOTOXIGÉNICOS EN NARANJA

V. D'Opazo, C. Luz, T. Raquel, N. Tiago, J. Quiles, J. Mañes, G. Meca

*Laboratorio de Química de los Alimentos y Toxicología. Universidad de Valencia.  
España.*

*vicdota@alumni.uv.es*

Debido a la creciente tendencia de reducir el uso de conservantes químicos en los alimentos se está recuperando el uso de técnicas de preservación que por su largo historial de uso se sabe que son seguras. La fermentación ha sido desde la antigüedad uno de los métodos de biopreservación más usados, ergo una buena alternativa a los actuales. Siguiendo esta tendencia, en este estudio se ha probado la actividad de 9 cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) contra hongos micotoxigénicos contaminantes de alimentos pertenecientes a los géneros *Fusarium*, *Penicillium*, y *Aspergillus* empleando los métodos de difusión en agar, “overlay”, y MIC/MFC (Minimum Inhibitory Concentration-Minimum Fungicidal Concentration). También se realizó una determinación de los principales compuestos orgánicos volátiles (COV) que producen las cepas de BAL objeto de estudio en un medio MRS fermentado durante 72h, empleando CG-MS. Por último, los medios de cultivo fermentados con una menor MIC-MFC fueron empleados para un ensayo de inhibición del crecimiento fúngico en naranjas inoculadas con esporas de *Penicillium expansum* y *Penicillium digitatum*. El tratamiento se realizó mediante pulverización del medio fermentado a una concentración de 25 g/L sobre las naranjas. Los resultados de la actividad antifúngica evidenciaron unas MIC-MFC entre 1.6-100 mg/mL y 3.1-100 mg/mL, siendo el género *Aspergillus* el más resistente, y *Fusarium* el más sensible. Los principales COV detectados fueron las pirazinas que conforman entre el 39-75% del total de CVO. En los resultados de la prueba en alimentos se evidenció una reducción del crecimiento para *P. expansum*.

**Palabras clave:** Biopreservación, hongo toxigénico, bacteria ácido lácticas.

## CONTROL OF *ASPERGILLUS STEYNI* GROWTH AND OCHRATOXIN A BIOSYNTHESIS BY BIOACTIVE EVOH FILMS CONTAINING ESSENTIAL OILS

A. Tarazona<sup>1</sup>, J.V. Gómez<sup>1</sup>, E.M. Mateo<sup>2</sup>, R. Gavara<sup>3</sup>, R. Mateo-Castro<sup>4</sup>, J.V. Gimeno-Adelantado<sup>4</sup>, M. Jiménez<sup>1</sup>, F. Mateo<sup>5\*</sup>

<sup>1</sup>Dpto. Microbiología y Ecología, Facultad de C. Biológicas, Universitat de València (UV); <sup>2</sup>Dpto. Microbiología y Ecología, Facultad de Medicina y Odontología, UV;

<sup>3</sup>Laboratorio de Envases, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, CSIC;

<sup>4</sup>Dpto. Química Analítica, Facultad de Química, UV; <sup>5</sup>Dpto. Ingeniería Electrónica, Escuela Técnica Superior de Ingeniería, UV.

*Fernando.mateo@uv.es*

*Aspergillus steynii* is possibly the main ochratoxin A (OTA) producing species in food and feed. OTA is a potent nephrotoxic, teratogenic, embryotoxic, genotoxic, neurotoxic, carcinogenic and immunosuppressive compound. Cereals are the main OTA source in the diet. The aim of this study was to develop effective bioactive films for controlling *A. steynii* growth and OTA production in maize grains and, by extension, in other possible food and feed. To this purpose i) bioactive ethylene-vinyl alcohol copolymer (EVOH) films incorporating cinnamaldehyde (CINHO), linalool (LIN), isoeugenol (IEG) or citral (CIT) (considered in the GRAS category) were prepared, ii) the ability of the designed active films to reduce/inhibit the growth of *A. steynii* in maize grains under different environmental conditions was determined, and iii) the effect of these active films to inhibit OTA accumulation in the seeds under the assayed conditions was tested. ANOVA showed that film class, aw, temperature and their interactions significantly affected growth rates and OTA production. The most effective films were those containing CINHO. ED50, ED90 and ED100 ranged 165–350, 297–601, 333–666 µg EVOH-CINHO/25 g maize grains, respectively, depending on environmental conditions. The least efficient were EVOH-LIN films since the ED50, ED90 and ED100 were 2800–>3330, >3330 and >3330 µg EVOH-LIN/25 g maize grains, respectively. The effectiveness of bioactive films increased with increasing doses. Optimal fungal growth and OTA production happened at 32 °C. This species can be very competitive in warm climates and under storage conditions. The EVOH-CINHO films followed by EVOH-IEG and EVOH-CIT films, designed in this study can be potent antifungal agents against *A. steynii* and strong inhibitors of OTA biosynthesis in maize grains at very low doses. This is the first study on the impact that interacting environmental conditions and bioactive films have on the growth of *A. steynii* and OTA production.

**Acknowledgements:** The authors acknowledge financial support from the Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO, Spanish Government) (Project AGL2014-53928-C2-1-R and Ph.D. contract BES-2015-071242).

**Keywords:** *Aspergillus steynii*, bioactive films, essential oils, effective doses, ochratoxin A

# PREDICTION BY NEURAL NETWORKS OF OCHRATOXIN A BIOSYNTHESIS BY *ASPERGILLUS STEYNI* AND *A. CARBONARIUS* IN SELECTED MEDIA SUPPLEMENTED WITH ECOLOGICAL AND NON-ECOLOGICAL FUNGICIDES

E.M. Mateo<sup>1\*</sup>, A. Tarazona<sup>2</sup>, J.V. Gómez<sup>2</sup>, M.A. García-Esparza<sup>3</sup>, J.V. Gimeno-Adelantado<sup>4</sup>, F. Mateo<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Dpto. Microbiología y Ecología, Facultad de Medicina y Odontología, Universitat de València (UV); <sup>2</sup>Dpto. Microbiología y Ecología. Facultad de C. Biológicas, UV;

<sup>3</sup>Dpto. Farmacia, Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad Cardenal Herrera CEU; <sup>4</sup>Dpto. Química Analítica, Facultad de Química, UV; <sup>5</sup>Dpto. Ingeniería Electrónica, Escuela Técnica Superior de Ingeniería, UV.

[Eva.mateo@uv.es](mailto:Eva.mateo@uv.es)

Toxigenic fungi and mycotoxins cause devastating effects on agricultural crops, economy, food security and human and animal health. Ochratoxin A (OTA) is a potent nephrotoxin also known to be teratogenic, immunosuppressive and carcinogenic. In Spain, *Aspergillus steynii* and *A. carbonarius* are the main ochratoxigenic species in cereals and grapes, respectively. Copper oxychloride and sulfur are nonsystemic fungicides, widely used against many fungal diseases, especially in ecological agriculture. Mancozeb is a broad range contact non-selective fungicide but it is not authorized in organic farming. The aims of this study were: i) to assay the effect of these fungicides on OTA biosynthesis by *A. steynii* and *A. carbonarius* isolates from Spanish oat grains and grapes, respectively, under different temperatures and ii) to study the possibility of using artificial neural networks (NNs) encompassing both multilayer perceptrons (MLP–NN) and radial-basis function networks (RBFN) to predict OTA accumulation over time in cultures. Oat-based agar medium and grape-based agar medium were used for *A. steynii* and *A. carbonarius* cultures, respectively. Media were supplemented with mancozeb (1–30 mg/L), copper oxychloride (5–500 mg/L) and sulfur (10–8000 mg/L). Incubation temperatures were 15 and 25 °C. OTA determination was performed by UPLC–ESI/MS/MS. MLP–NN with 1/2 hidden layers (HL) of *N* nodes were tested to predict as accurately as possible OTA levels in cultures. Temperature, fungicide-dose and time (inputs) significantly influenced OTA concentration (output) in cultures. Sub-inhibitory doses of these antifungal agents can enhance OTA production. Mancozeb proved more effective than ecological fungicides to prevent OTA production at similar doses. Good MLP–NN topologies for both fungi were 3:26:1 or 3:24:1 (1 HL) and 3:14:12:1 or 3:16:10:1 (2 HL) without validation. With validation, MLPs with the same topologies showed slightly higher MSEtest, but the overtraining drawbacks can be avoided. RBFN with 60-65 nodes proved also useful. **Acknowledgements.** The authors acknowledge financial support from the Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO, Spanish Government) (Project AGL2014-53928-C2-1-R and Ph.D. contract BES-2015-071242).

**Keywords:** *Aspergillus steynii*, *A. carbonarius*, neural networks, ochratoxin A, antifungal agents.

# PREDICTIVE MODELS FOR DEOXYNIVALENOL BIOSYNTHESIS BY *FUSARIUM CULMORUM* IN MAIZE GRAINS UNDER DIFFERENT ENVIRONMENTAL CONDITIONS

F. Mateo<sup>1\*</sup>, A. Tarazona<sup>2</sup>, J.V. Gómez<sup>2</sup>, J.V. Gimeno-Adelantado<sup>3</sup>, D. Romera<sup>4</sup>, E.M. Mateo<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Dpto. Ingeniería Electrónica, Escuela Técnica Superior de Ingeniería, Universitat de València (UV); <sup>2</sup>Dpto. Microbiología y Ecología, Facultad de C. Biológicas, UV; <sup>3</sup>Dpto. Química Analítica, Facultad de Química, UV; <sup>4</sup>Centro Superior de Investigación en Salud Pública, Generalitat Valenciana; <sup>5</sup>Dpto. Microbiología y Ecología, Facultad de Medicina y Odontología, UV.

[Fernando.mateo@uv.es](mailto:Fernando.mateo@uv.es)

Deoxynivalenol (DON) is produced mainly by *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* in cereal crops worldwide. Pathogen surveys indicate that *F. culmorum* is the primary etiological agent of *Fusarium* crown rot in Mediterranean countries. DON affects emetic response, growth, immune function and reproduction. Accurate forecasting of DON accumulation in cereals is of great interest although many factors affect its biosynthesis. The possibility of using artificial neural networks (NNs) encompassing both multilayer perceptron (MLP-NN) and radial-basis function networks (RBFN) to predict DON accumulation over time in maize grain cultures of *F. culmorum* has been tested. The input variables were temperature, aw, time and fungal contamination level. The output was DON concentration. For MLP-NN development, a data subset was used for training/building models. Another subset was used (or omitted) for hold-out validation and another one, not used for training, served to test the NN. No validation subset is needed for RBFN. The criterion for model optimization was minimizing the mean square error (MSE) for test. Models were developed using the NN toolbox of MATLAB.

DON levels depended on all the input variables. NNs can predict the behavior of the strain regarding DON accumulation when the input variables are shown to the networks. Prediction accuracy depended on NN type. For MLPs, the training algorithm and the fact of using/omitting validation conditioned the number of hidden nodes ( $N$ ) for the optimum architecture. A MLP-NN with one hidden layer without validation gave the minimum MSE<sub>test</sub> among the MLPs. The optimum architecture implied  $N=8$  hidden nodes. When validation was applied, the best MLP had two hidden layers with  $N_1=N_2=12$ . A RBFN with  $N=80$  nodes produced the lowest MSE<sub>test</sub> and proved the best network with a  $R^2 = 0.978$  for predicted vs observed DON level plot. Thus, accurate predictability of DON level *in vitro* can be attained using NNs.

**Acknowledgements:** The authors acknowledge financial support from the Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO, Spanish Government) (Project AGL2014-53928-C2-1-R and Ph.D. contract BES-2015-071242).

**Keywords:** Predictive models, artificial neural networks, *F. culmorum*, DON, maize, climatic change

## COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS TÓXICOS DE LA ESTERIGMATOCISTINA EN LAS LÍNEAS CELULARES HEPG2 Y SH-SY5Y

Zingales, V, Fernández-Franzón M, Ruiz MJ.

*Laboratorio de Toxicología. Facultat de Farmàcia. Universitat de València. Av. Vicente Andrés Estellés s/n 46100 Burjassot, Valencia, España.*

[vezin@uv.es](mailto:vezin@uv.es)

La esterigmatocistina (STE) es una micotoxina producida principalmente por hongos del género *Aspergillus*. Teniendo en cuenta las propiedades hepatocarcinogénicas de la STE y el número limitado de estudios sobre su toxicidad sobre el sistema nervioso, el objetivo de este estudio fue evaluar los efectos tóxicos producidos por la STE en las células HepG2 de hepatocarcinoma humano y las SH-SY5Y de neuroblastoma humano. Para llevar a cabo este objetivo se investigaron los efectos de STE sobre la viabilidad celular, los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la alteración del potencial de membrana mitocondrial (MMP). El rango de concentración utilizado para evaluar los efectos sobre la viabilidad celular fue entre 0,78 y 50µM. La STE disminuyó la proliferación celular dependiendo de la concentración y del tiempo de exposición en ambas células. No obstante, no se obtuvieron valores de IC50 en las células HepG2 a ninguno de los tiempos de exposición ensayados (24, 48 y 72h), y en las células SH-SY5Y sólo se obtuvieron valores de IC50 a los tiempos de exposición más altos, 48h ( $2,12 \pm 2,04$ ) y 72h ( $0,52 \pm 0,08$ ). Para determinar el mecanismo de toxicidad de STE en las células de estudio, se expusieron ambas líneas celulares durante 24h a 0,78; 1,56 y 3,12µM de STE. Los resultados demostraron que la STE no produce ROS en ninguna de las líneas celulares mientras que altera significativamente el MMP en las células HepG2 a la concentración más alta ensayada. En conclusión, los resultados muestran que la STE es más citotóxica para las células neuronales que las hepáticas. El efecto tóxico parece no relacionarse con el aumento temprano de las ROS en ambas líneas celulares, mientras que podría relacionarse con la alteración de la MMP en las células HepG2. Sin embargo, otros mecanismos de acción deberían ser investigados.

**Agradecimientos:** este trabajo forma parte de un Proyecto de investigación financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2016-77610-R) y por el programa de formación de personal investigador de carácter pre-doctoral “Programa Santiago Grisolia (GRISOLIAP/2018/092) CPI-18-117” de la Universitat de Valencia.

**Palabras clave:** Esterigmatocistina; Citotoxicidad; Estrés oxidativo; Potencial de membrana mitocondrial; Células HepG2 y SH-SY5Y.

## APLICACIÓN DE LA NATAMICINA EN EL TRATAMIENTO DE PRODUCTOS AFECTADOS POR HONGOS TOXIGÉNICOS

R. Torrijos<sup>1</sup>, J. Pérez<sup>1</sup>, T.M. Nazareth<sup>1,2</sup>, J.M. Quiles<sup>1</sup>, C. Luz<sup>1</sup>, J. Mañes<sup>1</sup>, G. Meca<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Av. Vicent Andrés Estellés s/n 46100 Burjassot (Departamento de Medicina Preventiva, Facultad de Farmacia, Universitat de València) España; <sup>2</sup> Rua Imaculada Conceição 1155, 80215-910 Curitiba, Paraná (Pontifícia Universidade Católica, School of Life Science) Brasil.

Raquel.Torrijos@uv.es

La natamicina es un polieno macrólido producido por la fermentación de la bacteria *Streptomyces natalensis*. El objetivo del estudio fue la evaluación de la natamicina como agente antifúngico frente a múltiples cepas pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*, estableciéndose la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y la Concentración Fungicida Mínima (MFC). Se estudiaron tres estrategias de tratamiento para productos afectados por hongos toxigénicos. La primera estrategia evaluó la aplicación de la natamicina mediante pulverizado a 0.25, 0.5 y 1 mg/dm<sup>2</sup> sobre la superficie de queso mozzarella contaminado con *P. commune* CECT 20767. La siguiente estrategia estudió la incorporación de la natamicina a 0.25, 0.5 y 1 mg/dm<sup>2</sup> en biofilms de hidroxietilcelulosa (HEC) 2% (p/v) y glicerol (0.5% p/v) en el mismo producto previamente analizado. La última estrategia evaluó la aplicación de la natamicina mediante pulverizado en maíz previamente contaminado con *F. graminearum* ITEM 126 a unas dosis de 25, 50 y 100 µg/g, determinándose el contenido de micotoxinas a los 20 y 40 días de incubación mediante LC-ESI/MS Q-TOF. La natamicina resultó efectiva frente a todas las cepas ensayadas. Las estrategias evaluadas para la reducción del crecimiento fúngico de *P. commune* en queso mozzarella resultaron efectivas, incrementándose la vida útil del producto. Tres micotoxinas (Fumonisina B1, Neosolaniol y Fusarenon X), junto a dos metabolitos (Deoxynivalenol-3-glucosido, T2-triol) fueron detectados en maíz a 40 días de incubación. La dosis de 100 µg/g de natamicina permitió reducir la presencia de estas micotoxinas entre un 31.7 y un 77.1%, mientras que para el restante de micotoxinas se logró una inhibición completa. La natamicina ha mostrado ser una sustancia de interés en la aplicación de productos comúnmente afectados por hongos toxigénicos, constituyendo una alternativa al uso de aditivos químicos de síntesis.

**Agradecimientos:** Este estudio ha sido realizado gracias al Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2016-77610R), al Proyecto Prometeo/2018/126 subvencionado por la Generalitat Valenciana y al programa predoctoral del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (FPU17/06104).

**Palabras clave:** Biofilm, Maíz, MIC y MFC, Natamicina, Queso.



## USE OF ESSENTIAL OILS AS A GREEN POTENTIAL ALTERNATIVE AGAINST MYCOTOXIGENIC FUNGI

G. Pronesti<sup>1</sup>, K.C.P. Bocate<sup>2</sup>, C. Luz<sup>3</sup>, G. Meca<sup>3</sup>, Y. Rodríguez-Carrasco<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Pharmacy, University of Camerino, Italy; <sup>2</sup> Postgraduate Program in Animal Science, Pontifical Catholic University of Paraná, Brazil; <sup>3</sup> Laboratory of Food Chemistry and Toxicology, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Spain

\*Yelko.Rodriguez@uv.es

Essential oils (EOs) are natural compounds biosynthesized in different plant organs and obtained by hydrodistillation. EOs are employed in food industries for their antifungal and antimycotoxigenic properties against pathogenic fungi which can colonize foodstuffs. Thus, the aim of this work is to evaluate the inhibition activity of several EOs from different plant families against six different mycotoxigenic fungi belonging to *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* genera. Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Fungicidal Concentration (MFC) were investigated. EOs from *Apiaceae*, *Lamiaceae* and *Asteraceae* families showed the lower values ranging from 75 ppm and 1200 ppm for the MIC<sub>50</sub> and from 300 ppm and 2500 ppm for the MFC. *Carlina radix* (*Asteraceae*) and *Thymus capitatus* (*Lamiaceae*) showed the lowest values MIC<sub>50</sub> (75 ppm) and MFC (600 ppm) against *P. verrucosum*. These results suggest that many EOs are able not only to inhibit, but also to get rid the most significant mycotoxigenic fungi which are able to release important compounds from a toxicological point of view. These preliminary *in vitro* data suggest to promote future studies for considering EOs as a potential food preservatives but changes in their organoleptic properties due to the usage of these volatile compounds must be studied further.

**Keywords:** Essential oils; antifungal; antimycotoxigenic; MIC<sub>50</sub>; MFC.

# PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS OBTENIDOS DE LA FERMENTACIÓN DE DESECHOS DE LA INDUSTRIA PESQUERA

C. Luz, A. Tornos, A. Princep, F. Barba, J. Mañes, G. Meca

*Laboratorio de Química de los Alimentos y Toxicología. Facultat de Farmàcia.  
Universitat de València. España.*

*Carlos.Luz@uv.es*

La industria del pescado genera una gran cantidad de subproductos del procesado, representa entre un 30 y 70 % del peso de la materia prima. En el caso de la lubina, los principales desechos los constituyen cabeza, vísceras, espinas y piel. El interés de la industria por buscar un nuevo potencial de uso para estos subproductos y revalorizarlos está en aumento. El objetivo del presente estudio fue aislar Bacterias Ácido Lácticas (BAL) a partir de la lubina para ser utilizarlas en el desarrollo de procesos fermentativos y poder obtener compuestos bioactivos antimicrobianos que aumenten el valor de estos subproductos. Para ello, se aislaron bacterias procedentes de estómago, intestino y colón de la lubina, mediante cultivo en medio MRS Broth a 37°C en anaerobiosis. Con las bacterias aisladas, se fermentaron dos tipos de caldos; caldo de desechos, realizado con los denominados desechos del pescado, y caldo de carne, realizado con los filetes del pescado. Tras la inoculación de las bacterias y 72 h de incubación a 37°C el caldo fermentado obtenido se liofilizó para concentrar la muestra. Se realizaron estudios cualitativos y cuantitativos de actividad antifúngica frente a una selección de hongos toxigénicos, así como la actividad antioxidante mediante el método ABTS. A continuación, mediante SDS PAGE se realizó un estudio del perfil proteico de los caldos. Los caldos fermentados por las bacterias más proteolíticas se seleccionaron para realizar una purificación e identificación mediante cromatografía de exclusión molecular y análisis mediante CL-ESI-MS-TOF de los péptidos generados de la fermentación. Se evidenció actividad antifúngica frente a todos los géneros estudiados y capacidad antioxidante superior al caldo control no fermentado. El análisis mediante MS-TOF y procesado de datos mediante el software SpectrumMill identificaron una serie de péptidos procedentes de la hidrólisis de proteínas de lubina.

**Palabras clave:** Actividad antifúngica, revalorización de subproductos, hongos toxigénicos, pescado, secuenciación de péptidos.

COLABORADORES



Universidad de Navarra

VNIVERSITAT DE VALÈNCIA [ò\*] Facultat de Farmàcia























<http://microfood.es>