

## ACTAS DE LAS VII JORNADAS DE FORMACIÓN EN TOXICOLOGÍA, VALENCIA 2019

**Comité Científico:** Dra. Mónica Fernández-Franzón. Dra. Guillermina Font, Dra. María José Ruiz, Dra. Houda Berrada, Dra. Emilia Ferrer, Dra. Ana Juan-García, Dra. Cristina Juan y Dr. Giuseppe Meca.

**Comité Organizador:** Dra. Lara Manyes, Juan Manuel Quiles, Noelia Pallarés, Carlos Luz Mínguez, Dionisia Carballo, Raquel Torrijos, Manuel Alonso y Alessandra Cimbalo.

Organizadas por la Asociación Española de Toxicología (AETOX) el 11 de Abril de 2019 en el Salón de Grados de la Facultat de Farmàcia. Universitat de València. Colocación de carteles en el Hall de la Facultat de Farmàcia

### CONFERENCIA

#### PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES EN MODELOS “in vivo”. TRANSPARENCIA EN LA INVESTIGACIÓN CON ANIMALES

**Dra. Rosario Moyano Salvago**

*Catedrática de Toxicología. Departamento de Farmacología, Toxicología y, Medicina legal y Forense. Facultat de Veterinaria. Universidad de Córdoba*

El modelo animal es una pieza fundamental en la investigación biomédica. Son usados como modelos para investigar y comprender las causas, mecanismo de acción, diagnóstico y tratamiento de enfermedades que afectan al humano y a los animales. Es necesario que la investigación básica y aplicada la elección de un buen modelo y un adecuado diseño experimental para dar una respuesta fiable y reproducible.

La elección de los modelos animales adecuados en la investigación biomédica es fundamental a la hora de obtener datos predictivos para los humanos. Son herramienta fundamental para la investigación de las bases etiopatogénicas de una enfermedad y/o para el desarrollo de nuevas dianas terapéuticas biológicas que permitan nuevas estrategias de tratamiento de enfermedades.

Por otro lado, se requiere la máxima seguridad de los productos de consumo (alimentos, fármacos...) y por tanto es necesaria la evaluación del riesgo para proteger la salud de la población. Pues bien, todos estos procesos conllevan estudios in vivo, y es esencial la elección de modelos animales adecuados.

En toxicología experimental con fines reguladores, existen normativas muy rígidas que deben ser seguidas, que exigen la evaluación de sustancias con diferentes requerimientos según su uso previsto, aplicando protocolos de ensayo estandarizados (OCDE...). Así las autoridades en materia de seguridad alimentaria (Efsa, Aecosan) establecen para la autorización de nuevos alimentos una directrices de estudios y datos relativos a la inocuidad (ensayos de toxicidad de 28 días en roedores, toxicidad subcrónica de 90 días,...). En todos los casos, estos procedimientos con animales debe hacerse cumpliendo las normativas de protección de los animales de experimentación, deben ser autorizados por la autoridad competente (Directiva 2010/63/UE; R.D. 53/2013) y basándose en el principio de la 3Rs (reemplazo (métodos alternativos), refinamiento y reducción).

La Confederación de Organizaciones y Sociedades Científicas de España (COSCE), en colaboración con EARA, ha desarrollado una propuesta para mejorar la información disponible para los ciudadanos sobre el uso de animales en investigaciones científicas. La propuesta es un Acuerdo de transparencia sobre el uso de animales en experimentación científica en España que proporciona cuatro principios para ayudar a los centros de investigación a mejorar la información proporcionada al público. A este acuerdo se han adherido unas 130 sociedades científicas.

### COMUNICACIONES ORALES

**Moderadoras:** Dra. Houda Berrada Ramdani y Dra. Emilia Ferrer

García.

#### 01) ESTUDIO DE CITOTOXICIDAD DE MICROPARTICULAS DE SILIE MCM-41 FUNCIONALIZADAS CON CARVACROL

**Fuentes C 1, Ruiz-Rico M 1, Fuentes A 1, Barat JM 1, Ruiz MJ 2, Byrne HJ 3**

*1 Departamento de Tecnología de Alimentos, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022, Valencia, España; 2 Laboratorio de Química de Alimentos y Toxicología, Facultat de Farmàcia, Universitat de València, Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia, España; 3 FOCAS Research Institute, TU Dublin, Camden Row, Dublin 8, Ireland*

La predicción del riesgo de diferentes sustancias químicas, como son aquellas con actividad biocida, es un aspecto esencial en la evaluación del riesgo por exposición a estas sustancias. Entre los distintos métodos predictivos conocidos destacan los métodos computacionales, los cuales presentan numerosas ventajas frente a ensayos de laboratorio, permitiendo reducir el número de ensayos con animales de experimentación, o incluso reemplazarlos, siendo completamente válidos a nivel regulatorio. La técnica computacional más utilizada consiste en el desarrollo y aplicación de los llamados modelos de relación cuantitativa estructura-actividad (“Quantitative Structure-Activity Relationship”, QSAR), los cuales permiten predecir diversos parámetros biológicos y ambientales partiendo de la estructura química de la sustancia (Gozalbes et al., 2014). Estos métodos están siendo actualmente desarrollados en ProtoQSAR para su aplicación dentro del proyecto europeo COMBASE (“Computational tool for the assessment and substitution of biocidal active substances of ecotoxicological concern”), cuyo objetivo principal se centra en el desarrollo de una herramienta basada en la toxicología computacional que integrará modelos predictivos de la toxicidad acuática asociada a sustancias biocidas para cuatro niveles tróficos: bacteria, alga, crustáceo y pez. Esta herramienta permitirá predecir también los metabolitos, productos de degradación y de reacción generados durante el ciclo de vida de las sustancias activas, así como sus efectos ecotoxicológicos. De esta manera, COMBASE tendrá un carácter altamente innovador, y será la primera vez en Europa que se integrará una base de datos con información ecotoxicológica específica centrada en biocidas, y un conjunto de modelos computacionales que serán objeto de una validación experimental que confirme su eficacia y les otorgue validez regulatoria.

**Palabras clave:** QSAR; ecotoxicidad; BPR; evaluación del riesgo.

**Agradecimientos:** Programa LIFE+ de la Comisión Europea.

**Referencias:** [1] M. Ruiz-Rico, É. Pérez-Esteve, A. Bernardos, F. Sancenón, R. Martínez-Mañez, M. Marcos, J.M. Barat. Food Chem. 2017, 233, 228-236. [2] S. Ribes, M. Ruiz-Rico, É. Pérez-Esteve, A. Fuentes, P. Talens, R. Martínez-Mañez, J.M. Barat. Food Control. 2017,81,181-188.

#### 02) CYTOTOXIC EFFECTS OF STERIGMATOCYSTIN IN CELL CULTURE AND OXIDATIVE STRESS MECHANISM OF ACTION. A REVIEW.

**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. e-mail: vezin@uv.es*

Sterigmatocystin (STE) is a noticeably health hazardous mycotoxin. It is mainly produced by fungi belonging to the genus *Aspergillus*. Considering the evidence on its capability to induce tumors in animals, STE has been classified as possible human carcinogen (Group 2B) by International Agency for Research on Cancer (IARC). The aim of the present study is to summarize the data available from literature on the cytotoxic effect of STE in different cell lines, at different exposure times and performed by different assays, with a particular focus on the oxidative stress as mechanism of action. It has been shown that STE is

able to decrease cell viability in different cell lines, including HepG2, CHO-K1, Hep3B, A549, L-929 and Neuro-2a. The molar concentration of mycotoxin able to reach 50% inhibition of cellular proliferation (IC<sub>50</sub>) was evaluated, obtaining a wide range of IC<sub>50</sub> values. In particular, after 24h of exposure STE has been shown to decrease cell viability at high micromolar concentrations in CHO-K1 (IC<sub>50</sub>=25.0µM), Hep3B (IC<sub>50</sub>=58.0µM), HepG2 (IC<sub>50</sub>=286.1µM), L-929 (IC<sub>50</sub>=163.3µM) and Neuro-2a (IC<sub>50</sub>=40.1µM) cells. However, lower IC<sub>50</sub> values were obtained in A-549 cells (IC<sub>50</sub>=3.7µM) and in HepG2 cells (IC<sub>50</sub>=3µM). Data for IC<sub>50</sub> values after 48h of STE exposure are available only in CHO-K1 and Hep3B cells (IC<sub>50</sub>=17.5 and 22µM, respectively) and after 72h in CHO-K1 cells (IC<sub>50</sub>=12.5µM). Differences between IC<sub>50</sub> values could be caused by different cell sensitivity of each type of cell line and, among the same cell line, by different supplements in the medium and cytotoxic assay conditions. Regarding the mechanisms underlying STE cytotoxicity, data from literature demonstrates that STE inhibits cell proliferation through different mechanisms of action and the increase in oxidative stress represents one of these.

**Keywords:** Sterigmatocystin; cytotoxicity; oxidative stress.

**Acknowledgments:** Ministry of Economy and Competitiveness (AGL 2016-77610-R) and the pre-doctoral research training program "Santiago Grisolia (GRISOLIAP/2018/092)CPI-18-117"

### O3) DOES PUMPKIN EXTRACT PROTECT MITOCHONDRIA AGAINST MYCOTOXINS? A TRANSCRIPTIONAL APPROACH.

*Alonso-Garrido M., Frangiamone M., Font G., Manyes L. Laboratory of Food Chemistry and Toxicology, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Spain. Av Vicente Andrés Estellés s/n 46100 Burjassot. Manuel.alonso-garrido@uv.es*

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 2h exposure. Previous studies showed altered mitochondrial pathways due to mycotoxins, so key mitochondrial (MT-ATP6, MT-ATP8, MT-ND2, MT-ND3, MT-ND4, MT-ND4L) and nuclear (OSGIN1, SRXN1, TXNIP) genes were chosen for analysis. The joint exposure to pumpkin extract (500 nM) and different mycotoxins individually and combined (ochratoxin A, zearalenone, enniatins and beauvericin) 24, 48 and 72h did not always increase cell viability referred to mycotoxin without extract. Moreover, these differences among mycotoxin effects were confirmed by qPCR: (a) treated cells only with mycotoxin mixtures (100 nM each mycotoxin), (b) with pumpkin extract (500 nM) and mycotoxin mixtures (100 nM), (c) nontreated and (d) pumpkin extract treated cells. In summary, conclusions are specific for each mycotoxin mixture and no global effect against the toxicity caused by these mycotoxins in ECV 304 can be found for pumpkin extract.

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

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

### O4) EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN A MICOTOXINAS A TRAVÉS DEL CONSUMO DE PLANTAS MEDICINALES LISTAS PARA SU CONSUMO

*Pallarés.N, Carballo.D, Manyes.L, Font.G, Berrada.H, Ferrer.E. Laboratorio de Toxicología. Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología y Medicina Legal. Facultad de Farmacia. Universidad de Valencia. Av Vicente Andrés Estellés s/n 46100 Burjassot*

Según la OMS, por planta medicinal se entiende cualquier planta silvestre o cultivada utilizada como agente terapéutico o ingrediente activo en una formulación medicinal (OMS, 2018). El consumo de plantas medicinales se ha incrementado en los últimos años por ser productos naturales, con propiedades beneficiosas para la salud y características organolépticas agradables (Trucksess & Scott, 2008). Durante la recolección, almacenamiento y distribución, las plantas medicinales pueden verse sujetas a la contaminación por hongos productores de micotoxinas viéndose comprometida su seguridad. Las micotoxinas son metabolitos secundarios, que causan efectos tóxicos tales como neurotoxicidad, carcinogenicidad, teratogenicidad e inmunotoxicidad (Ashiq et al., 2014). En la actualidad, hay escasa información acerca de la exposición de los consumidores a micotoxinas a través del consumo de las plantas medicinales preparadas para su consumo. El objeto del presente trabajo es llevar a cabo una evaluación del riesgo a micotoxinas a través del consumo de bebidas de plantas medicinales. Para ello se realizó el análisis multimicotoxina [(AFs, ZEA, micotoxinas emergentes (ENNs and BEA)] de 112 muestras de diferentes plantas medicinales preparadas para su consumo mediante extracción por DLLME y determinación por LC-MS/MS-IT. Los resultados muestran presencia de AFB<sub>2</sub>, AFG1, AFG2, ZEA, ENB y ENB en las bebidas de plantas medicinales, con contenidos que oscilaron entre <LOQ y 156.19 µg/L. La caracterización del riesgo muestra valores de EDIs menores de las TDIs establecidas, por lo que el riesgo de la población no es elevado, no obstante el riesgo aumenta en grandes consumidores de plantas medicinales.

**Palabras clave:** plantas medicinales, micotoxinas, DLLME, LC-MS/MS-IT, caracterización del riesgo

**Agradecimientos:** este trabajo forma parte de un proyecto de investigación financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad AGL 2016-77610-Ry por el programa de formación de personal investigador de carácter pre-doctoral: "Atracció de Talent" de la Universidad de Valencia.

#### Bibliografía

1) Ashiq, S.; Hussain, M.; Ahmad, B (2014). *Fungal Genet. Biol.* 66, 1-10. 2) Trucksess, M. W.; Scott, P. M (2008). *Food Addit Contam.* 25(2), 181-192. WHO (2018). 3) WHO Technical Report Series, 81-152.

### O5) APLICACIÓN DE LA NATAMICINA EN EL TRATAMIENTO DE CEREALES AFECTADOS POR *FUSARIUM SPP.*

*Torrijos R, Pérez J, Sanchis A, Nazareth TM, Quiles JM, Luz C, Mañes J, Meca G*

*Laboratorio de Toxicología. Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública. Facultad de Farmacia. Universidad de Valencia. Av Vicente Andrés Estellés s/n 46100 Burjassot. Raquel.Torrijos@uv.es*

*Fusarium* spp. es un género de hongos filamentosos fitopatógenos que afectan a numerosos cultivos durante su desarrollo como el maíz o el trigo, generando importante pérdidas económicas a nivel productivo. Además, determinadas especies son capaces de sintetizar micotoxinas, compuestos altamente tóxicos derivados de su metabolito secundario. Dentro de estas toxinas, resultan de especial interés por su incidencia y efectos tóxicos las Fumonisin y los Tricotecenos, constituidos por Deoxinivalenol (DON), Nivalenol, Neosolaniol, Fusarenon X y la toxina T-2, entre otras [1]. La natamicina es un polieno macrólido producido mediante fermentación de la bacteria *Streptomyces natalensis* [2]. En el presente estudio, se determinó la actividad antifúngica de la natamicina frente a diferentes cepas toxigénicas del género *Fusarium*, estableciéndose la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y la Concentración Fungicida Mínima (MFC). Se evaluó el empleo de la natamicina mediante pulverizado sobre maíz contaminado con *F. graminearum* a tres diferentes dosis: 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. Todas las cepas fúngicas ensayadas presentaron sensibilidad frente a la natamicina, obteniéndose valores de MIC oscilando entre los 0,8-6,3 µg/mL y valores de MFC oscilando entre los 1,6-12,5 µg/mL. Tres micotoxinas (Fumonisina B1, Neosolaniol y Fusarenon X), junto a dos metabolitos

(Deoxynivalenol-3-glucosido y T2-triol) fueron detectados a los 40 días en el control del experimento. La aplicación de natamicina a una dosis de 100 µg/g permitió reducir la presencia de Deoxynivalenol-3-glucosido, T2-triol y Neosolaniol entre un 31,7 y un 77,1 %, mientras que se obtuvo una completa inhibición de biosíntesis de FB1 y Fusarenon X tras 40 días de incubación. La natamicina ha mostrado ser una sustancia de interés en el tratamiento de cereales comúnmente afectados por especies del género *Fusarium* spp. debido a su potencial antifúngico y antitoxigénico.

#### Bibliografía:

- [1] Tola, M. & Kebede, B. (2016). *Cogent Food Agric* 2:1.  
[2] Aparicio, J.F. et al. (2004). *Curr Med Chem* 11:1645-1656.

**Palabras clave:** *Fusarium*, Natamicina, LC-ESI/MS, Tricotecenos, Fumonisinias

### O6) CAN ENNIATINS MODIFY MITOCHONDRIAL GENE EXPRESSION?

*Címbalo A, Bayarri, L., Tenelema, D., Manyes, L.*

Laboratory of Food Chemistry and Toxicology, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Spain. Av Vicente Andrés Estellés s/n 46100 Burjassot.

*Fusarium* emerging mycotoxins are cyclic depsipeptides biosynthesized by a wide variety of *Fusarium* fungi and interfere severely with human health. The most frequently detected in food and feedstuff are EN A, A1, B and B1 which are structurally similar and have similar modes of action. The toxicological effects of ENs on mitochondrial processes were studied in rat tissues. In particular, liver, stomach and kidneys. A total of 14 female two months old Wistar rats were employed divided in three groups: control, medium and high exposure. Four rats of the control group ingested the vehicle (PBS), while five of the treated ones were orally administrated with medium concentrations: EN A 256, EN A1 353, EN B 540, EN B1 296 µg/mL PBS ; and other five with the higher ones: EN A 513, EN A1 706, EN B 1021, EN B1 593 µg/mL PBS during 8 hours exposure. RNA was extracted from tissues and its quality was tested by NanoDrop instrument. Transcriptional analysis was carried out by qPCR using SYBR method. Two genes related to the electronic transport chain (ND1, CO1) were selected and each pair of primers was designed using Primer-BLAST software. Gene expression was calculated by StepOnePlus software. At last, statistical analysis was performed by applying T-Student test. Results in liver showed more variability in gene expression among control group animals than between treated and control groups. In stomach, a percentage of treated rats showed altered expression. In kidneys, gene expression was clearly affected by the medium concentration used. Further investigations should focus in longer exposures to study chronic effects of ENs.

**Keywords:** *in vivo*, electronic transport chain, qPCR.

**Acknowledgments:** This work was supported by the Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities (AGL 2016-77610R) and the Generalitat valenciana (GV PROMETEO2018-126).

### COMUNICACIONES TIPO CARTEL

#### C1) DETERMINING MYCOTOXINS IN COMERCIAL COFFEE CAPSULES

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

Mycotoxins are secondary toxic metabolites produced by filamentous fungi that commonly contaminate a wide range of crops, including coffee. The European legislation (Regulation CE No 1881/2006) is often considered as the most stringent, but for

coffee only maximum level (ML) of ochratoxin A (OTA) was established (ML: 5-10 ng/g). Recently, some authors reported the occurrence of some major mycotoxins in coffee beans and by-products. Hence, the aim of this study was to investigate the simultaneous occurrence of mycotoxins ( $n=14$ ), including ochratoxin A, aflatoxins and thricothecenes, and emerging mycotoxins, including enniatins and beauvericin, in commercially available coffee capsules due to the large number of consumers of these ready-to-use products. Analysis were performed throughout an acetonitrile-based extraction followed by clean-step and ultra-high performance liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry (UHPLC-Q-Orbitrap HRMS) determination. Results showed the occurrence of OTA in two out of the eleven analyzed samples at levels below limit of quantification (<1.2 ng/g). Nonetheless, all samples showed mycotoxin contamination with non-regulated mycotoxin in coffee. It has to be highlighted the occurrence of aflatoxins (carcinogenic compounds to humans) in 5 out of 11 samples at levels of up to 6.3 ng/g. Moreover, thricothecenes and enniatins were also found at high incidence and at concentrations of hundreds ng/g, being in agreement with scientific literature. The results obtained highlight the necessity of monitoring the occurrence of mycotoxins in the coffee beans and by-products even though coffee is a minor contributor to mycotoxin exposure from the diet.

**Keywords:** mycotoxins, coffee capsules, co-occurrence.

#### C2) OCCURENCE OF ENNIATINS IN COW MILK FROM TUNISIA

*Mannai A<sup>1,2</sup>, Oueslati S<sup>3</sup>, Ben Salem H<sup>1</sup>, J. Mañes<sup>4</sup>, Juan C<sup>4</sup>*

<sup>1</sup>Laboratory of Animal and Forage Productions, National Institute of Agronomic Research of Tunisia (INRAT), street Hédi Karray, 2049 Ariana, Tunisia ; <sup>2</sup>National Institute of agronomy of Tunisia (INAT), University of Carthage, 43 Street Charles Nicolle, Tunis 1082, Tunisia; <sup>3</sup>Laboratory of Materials, Molecules and Applications. Preparatory Institute for Scientific and Technical Studies. BP 51 La Marsa 2070, Tunisia; <sup>4</sup>Laboratory of Food Chemistry and Toxicology, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100, Burjassot-València, Spain.

In Tunisia, forage silage is mainly distributed to dairy cattle that require quality feeds and balanced diets to express their potential milk production. Contaminated forage with toxigenic fungi and subsequent mycotoxins could be induced by inappropriate storage conditions compromising in this case milk production. Then, human exposure to mycotoxins could occurs through the consumption of animal products. Regulation of the maximum presence of mycotoxins in milk and milk products is generally limited for aflatoxin M1 (from 5 µg/kg powder milk in MERCOSUR to 0.05 µg/kg raw milk, heat-treated milk and milk for the manufacturer of milk-based product in EU). However, one of the most detected mycotoxins in feed are enniatins (ENs). They haven't an EU legislation but can appear in animal milk due to that exposition and some metabolites of ENB had been identified in animal serum, liver and eggs.

The objective of the present study was to evaluate the presence of four enniatins (ENA, ENA1, ENB, ENB1), in 11 cow milk samples from animals feeding with different grass silage samples (including oat, wheat and barley crops) in the Northern Tunisia. Mycotoxins were extracted with a solution of 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 determinate with liquid chromatography coupled to a triple quadrupole mass spectrometry (LC-MS/MS).

ENs presence was recorded in 9 samples (81%) with levels from 4.22 and 38.42 ng/mL. ENB was the most frequently detected (81%). Maximum-recorded amounts were 38.42 ng/mL for ENB.

To the best of our knowledge, this is the first survey ever realized on ENs in cow milk from Tunisia. It is important to declare that no toxicological risk is shown from the obtained results and the milk is safe for the consumer's health. However, a constant and routinely analysis of such highly consumed product is needed to keep responding to the quality and safety norms.

**Keywords:** Enniatins, cow milk, Tunisia, LC-MS/MS.

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

**C3) EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN A MICOTOXINAS A TRAVÉS DEL CONSUMO DE FRUTAS DESECADAS**Carballo D<sup>1</sup>, Sánchez, M.I., Pallarés, N, Font G<sup>2</sup>, Berrada H<sup>2</sup>, Ferrer E<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.

Las frutas desecadas son una matriz susceptible al crecimiento de hongos filamentosos debido a sus características intrínsecas de contenido de nutrientes, pH y alto tiempo de almacenamiento. Diversos géneros de hongos como *Alternaria*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* producen micotoxinas. El objetivo del estudio es analizar 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 35 muestras de frutas desecadas (ciruela, pasas, higos, arándanos, albaricoque, dátiles, naranja) y evaluar la exposición de la población valenciana a través del consumo de estas frutas. Las muestras se extraen por métodos QuEChERS y se determinan por cromatografía gaseosa y líquida ambos acopladas a espectrometría de masas en tandem (GC-MS/MS y LC-MS/MS). Los resultados muestran que el 80% de las muestras estaban contaminadas con al menos una micotoxina. Solo se han detectado seis micotoxinas BEA, OTA, HT-2, PAT, NEO, NIV con incidencias de 9%, 11%, 14%, 17%, 20%, 34% respectivamente. La concentración e incidencia más alta hallada se detectó para NIV (1109  $\mu$ g/kg) en muestras de albaricoque. Se realizó la evaluación de la exposición y los niveles de micotoxinas encontrados en las diferentes frutas desecadas no representan un riesgo significativo para la salud humana de la población valenciana.

**Palabras claves:** Micotoxinas, frutas desecadas, espectrometría de masas

**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.

**C4) MYCOTOXIN EVALUATION IN COFFEE SAMPLES ANALYZED IN THE LAST DECADE. A REVIEW.**Caselli C.<sup>1</sup>, Juan C.<sup>2</sup><sup>1</sup>Faculty of Pharmacy, University of Camerino, Via Sant'Agostino 1, 62032 Camerino, Italy. <sup>2</sup>Laboratory of Food Chemistry and Toxicology, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100, Burjassot-Valencia, Spain.

Assessment of mycotoxins human exposure through analyzed samples is an important component of food safety strategies. The present review summarizes studies about the mycotoxins presence in coffee samples carried out in different countries. In the last years, the scientist literature picks up about coffee in ground roasted, roasted beans and green beans have been analyzed to determinate the presence of mycotoxins, mainly the ochratoxin-A (OTA) incidence. This toxin is nephrotoxic, teratogenic and mutagenic in several animals (Abrunhosa, et al., 2006). OTA was classified by the International Agency for Research on Cancer (IARC) as a possible human carcinogen (IARC, 1993). The European Union has set a maximum limit (ML) of 5  $\mu$ g/kg for roasted and ground coffee beans and 10  $\mu$ g/kg for soluble coffee (Commission Regulation (EC) No 1881/2006).

Eleven articles have been revised in this review, which 386 total coffee samples had been analyzed, including 64 of ground roasted coffee, 101 of roasted beans coffee and 169 green beans coffee. The distribution of coffee samples according the origin are as follow: Spain (193), France (14), Portugal (11), Chile (24), Brazil (22), Colombia (8), Argentina (29), Mexico (2), Guatemala (2), Africa (6), Ethiopia (51), Vietnam (41), Indonesia (4), China (4), and one from Puerto Rico, Honduras, Peru and India. Regarding the mycotoxins and levels detected the maximum levels were 7.26

$\mu$ g/kg, 32.40  $\mu$ g/kg and 20.30  $\mu$ g/kg for ground roasted (Benites et al., 2015) roasted beans (García-Moraleja et al., 2015) and green beans (Vanesa et al., 2013), respectively. A high values were observed, in fact 13 samples were above the EU ML, corresponding to ground roasted (6/13) (Vanesa et al., 2013, Coronel et al., 2011), roasted beans (5/13) (García-Moraleja et al., 2015) and green coffee (2/13) (Geremew et al., 2019). Despite this high levels, they represent only the 4% of samples, it should be interesting to estimate of daily intake of OTA through coffee consumption by countries and include them in total diet studies.

**Keywords:** coffee, mycotoxins, ochratoxin-A, review.

**C5) CARACTERIZACIÓN DEL POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE BACTERIAS LÁCTICAS AISLADAS DESDE ALIMENTOS**

Luz C, D'Opazo V, Torrijos R, Nazareth T, Quiles J, Mañes J, Meca G

<sup>1</sup>Laboratorio de Química de los Alimentos y Toxicología. Facultad de Farmacia. Universitat de València. España. Carlos.Luz@uv.es

Las fermentaciones microbianas han representado durante mucho tiempo un modo de biopreservación natural de materias primas. Las bacterias ácido lácticas (BAL) son microorganismos considerados como GRAS y, por lo tanto, son una buena alternativa a los aditivos que se utilizan comúnmente en la conservación de alimentos. Un total de 9 BAL aisladas e identificadas de tomate y masa panaria fermentada fueron caracterizadas para determinar su potencial biotecnológico; actividad antioxidante, antifúngica y enzimática. El método ABTS fue empleado para la determinación de la actividad antioxidante de los medios MRS Broth fermentados por las BAL a tres tiempos de fermentación (24, 48 y 72h). El estudio de la actividad antifúngica de las BAL fue realizado frente a 30 hongos pertenecientes a los géneros *Fusarium*, *Penicillium* y *Aspergillus* mediante métodos cualitativos en medio sólido y cuantitativo determinando MIC-MFC en medio líquido. El Kit APIZYM fue utilizado para estudiar el espectro de actividad enzimática de las BAL mediante un ensayo colorimétrico semicuantitativo. También se realizó una identificación y cuantificación de los ácidos orgánicos, compuestos orgánicos volátiles y ácidos fenólicos mediante HPLC-DAD, CG-MS y HPLC-ESI-MS-TOF, respectivamente. Referido a los resultados, varias cepas de BAL presentaron un potencial como uso biotecnológico en diversas aplicaciones; se evidenciaron medios fermentados con actividad antioxidante en el rango de 4.5-19.1  $\mu$ M Trolox, la actividad antifúngica frente a los hongos seleccionados fue evidenciada con la formación de halos de inhibición y con valores de MIC MFC en el rango de 0.8-100 g/L. Fueron identificados y cuantificados en los medios fermentados; ácidos orgánicos tales como ácido láctico, ácido acético, ácido málico y ácido succínico, compuestos orgánicos volátiles de los que podemos destacar las pirazinas, así como dentro del grupo de los ácidos fenólicos el ácido feniláctico, ácido hidroxicaféico, ácido benzoico y ácido vanílico.

**Palabras clave:** Biopreservación, bacterias ácido lácticas, actividad antifúngica, tomate, masa madre.

**C6) DISPOSITIVO ANTIFÚNGICO BASADO EN ALIL ISOTIOCIANATO (AITC) PARA INHIBIR EL DESARROLLO DE ASPERGILLUS FLAVUS Y PENICILLIUM VERRUCOSUM EN CEREALES**Nazareth TM<sup>1,2</sup>, Torrijos R<sup>1</sup>, Quiles JM<sup>1</sup>, Rivola M<sup>1</sup>, Bocate KCP<sup>2</sup>, Luciano FB<sup>2</sup>, Mañes J<sup>1</sup>, MecaG<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 (Pontificia Universidade Católica, School of Life Science) Brasil.

El objetivo de este estudio fue evaluar la eficacia de un dispositivo antifúngico basado en el compuesto natural AITC para reducir el crecimiento de *Aspergillus flavus* y *Penicillium verrucosum*, así como la producción de Aflatoxina B1 (AFB1) y Ocratoxina A (OTA). En primer lugar, se llevó a cabo un sistema de silo simulado a escala de

Actas de las Jornadas de Formación en Toxicología  
laboratorio en frascos de 1 L que contenían 300 g de cebada, maíz o trigo. La cebada y el trigo se contaminaron con *P. verrucosum* y el maíz con *A. flavus*. Posteriormente, las matrices se trataron con un dispositivo de gel que contenía 500 µL de AITC, 12% de hidroxietilcelulosa y agua. Los mini-silos se incubaron durante 30 días a temperatura ambiente. El segundo paso fue un silo simulado de 100 L que contenía aproximadamente 70 kg de granos. La cebada, el maíz y el trigo se contaminaron y se trataron con un dispositivo de gel que contenía 5 ml de AITC, 12% de hidroxietilcelulosa y agua. Posteriormente, los silos se cerraron e incubaron durante 60 días a temperatura ambiente. En el sistema de minisilo, el crecimiento de hongos se inhibió completamente después de 30 d. En maíz, la concentración de AFB1 detectada en las muestras fue de 8.07 y 0.12 ppb para el grupo de control y el grupo tratado, respectivamente. Además, en la cebada, la concentración de OTA fue de 0.28 y 0.09 ppb, respectivamente. En el silo de 100 L, la población de hongos se redujo significativamente después de 60 días de almacenamiento. Además, el dispositivo AITC evitó la producción de OTA en 98 y 72% en cebada y trigo, respectivamente.

**Palabras clave:** *A. flavus*, Ocratoxina A, AITC, Aflatoxin B1, *P. verrucosum*.

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

### C7) THE APPLICATION OF YELLOW AND ORIENTAL MUSTARD FLOURS, LACTIC ACID BACTERIA AND AITC AGAINST *A. FLAVUS* GROWTH AND AFB1 PRODUCTION IN ALMONDS

Rivola M.<sup>1</sup>, Bocate K.<sup>2</sup>, Nazareth T.M.<sup>3</sup>, Meca G.<sup>3</sup>

*Food Science Campus of Cesena, Alma Mater Studiorum – University of Bologna, Italy*

*Post Graduation program in Animal Science, Pontifical Catholic University of Parana, Brazil*

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

Yellow and oriental mustard are Brassicaceae plants containing allyl isothiocyanate (AITC), a volatile compound released as a result of mechanical damage to plant cells. It's studied for your antimicrobial, antifungal and mycotoxic capacity. For this reason, products containing AITC are potential natural preservative for food industry. This also applies to lactic acid bacteria (LAB): some of their metabolites include preservative substances.

The aim of this project was to test the antifungal effect of yellow (YMF) and oriental (OMF) mustard flours, AITC and lactic acid bacteria against *A. flavus* in contaminated almonds. Different methods of treatment were applied by the direct contact with the almonds and by modified atmosphere with different concentration of the compounds.

The results were determinate by the minimum concentration inhibitory (MIC), the fungicide concentration (MFC) and the fungal growth was observed at 3, 5, 7 and 15 days. Finally, the presence of mycotoxin was determinate by HPLC.

On the one hand, the effectiveness of AITC (5, 10, 20 ppm) was confirmed by the absence of growth and no AFB1 production was detected; the OMF (0,025, 0,0125 and 0,00625 g) has demonstrate the reduction of 74% of *A. flavus* after 7 days. On the other hand, LAB and the YMF in spray (0,5, 0,8 and 1 g) didn't show antifungal activity.

**Reference:** Mañes, Jordi et al. 2018. "Aflatoxins and *A. flavus* Reduction in Loaf Bread through the Use of Natural Ingredients." *Molecules* 23(7): 1638.

**Keywords:** aflatoxins; mustard flour; mycotoxin reduction; HPLC; Lactic acid bacteria.

### C8) USE OF ALLYL ISOTHIOCYANATE, YELLOW MUSTARD FLOUR, LACTIC ACID BACTERIA AGAINST *P. VERRUCOSUM* GROWTH IN BARLEY

Bocate, K.C.P.<sup>2</sup>, Mahiques, M.N.<sup>3</sup>, Rivola, M.<sup>1</sup>, Nazareth T.M.<sup>3</sup>,

Luciano F. B.<sup>2</sup>, Meca G.<sup>3</sup>

*Food Science Campus of Cesena, Alma Mater Studiorum – University of Bologna, Italy*

*Postgraduate Program in Animal Science, Pontifical Catholic University of Paraná, Brazil*

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

Alternative measures are proposed to reduce the growth of mycotoxigenic fungi and the production of toxins, especially natural compounds, which receive better acceptance by consumers. Allyl isothiocyanate (AITC) are active ingredients of mustard essential oil, and have shown antimicrobial action in previous studies. As natural compounds, their use can attend the commercial demand for substitutes to chemicals traditionally used as preservatives in industry. This also applies to lactic acid bacteria (LAB) because some of their metabolites include preservative substances.

Thus, the focus of this study was to evaluate the efficacy of AITC as a fumigant, yellow mustard flour (YMF) and lactic acid bacteria against the growth of *Penicillium verrucosum* as producer of ochratoxin A in barley. Different methods of treatment were applied by the direct contact with the barley and by modified atmosphere with different concentration of the compounds.

The methods to analyse the efficacy of the compounds were minimum concentration inhibitory (MIC<sub>50</sub>), fungicide concentration (MFC), residual population, humidity and percentage of the germination.

The results showed that in the concentration of 10 ppm of AITC the fungal growth was reduced, and the barley have capacity to germinate 85,8%, but the treatments with LAB and the YMF in spray did not show antifungal activity and reduced the capacity of the germination.

**References:** Quiles, Juan Manuel et al, 2019. "Development of an Antifungal and Antimycotoxigenic Device Containing Allyl Isothiocyanate for Silo Fumigation", *Toxins* 11, 137.

**Keywords:** Natural compounds; antifungal; mustard flour; Lactic acid bacteria.

### C9) ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE METABOLITOS BIOACTIVOS OBTENIDOS POR FERMENTACIÓN DE DESHECHOS DE LA INDUSTRIA PESQUERA

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

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

Durante la producción y el procesamiento de pescado, se genera una gran cantidad de subproductos, que representan entre el 30 y el 70% del peso inicial después del proceso industrial. En el caso de la lubina, los principales desechos los constituyen cabeza, vísceras, espinas y piel. Durante los últimos años la industria pesquera se ha visto obligada a buscar un potencial uso a estos subproductos y darles una segunda utilidad. 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 colon 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. A ambos caldos se les añadió 2% de glucosa para facilitar el crecimiento bacteriano. Tras 72 h de incubación a 37°C el caldo fermentado obtenido se liofilizó para concentrar la muestra. Con dicho concentrado se realizó un ensayo de actividad antifúngica en medio sólido con dos cepas diferentes de los géneros *Penicillium*, *Aspergillus* y *Fusarium*. Se observó que en el caldo de carne fermentado por la bacteria E3, tiene actividad antifúngica frente a 6 hongos, evidenciando halos de inhibición en medio sólido. Respecto a los caldos de desechos fermentados, las bacterias E3 y E4, presentan una actividad antifúngica frente a todos los géneros estudiados. En conclusión, varias cepas aisladas de pescado presentan la capacidad de producir compuestos con actividad antifúngica mediante la fermentación de caldos formulados con desechos de la

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

### C10) BIOCONTROL POTENTIAL OF LACTIC ACID BACTERIA AGAINST MYCOTOXYGENIC FUNGI ON TOMATO

*D'Opazo V, Luz C, Torrijos R, Nazaret T, Quiles J, Mañes J, Meca G.*

*Laboratory of Food Chemistry and Toxicology. Faculty of Pharmacy. University of Valencia. Spain. vicdota@alumni.uv.es*

Microbial fermentations have long represented a way of natural biopreservation of raw materials, which frequently originated new food products. LAB are food grade microorganisms and therefore a good alternative to chemicals to be applied in food preservation. A total of 9 LAB isolates from tomato and sourdough bread were screened for antimicrobial activities against spoiler toxigenic fungi belonging to the genus *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria*, and *Aspergillus* using agar diffusion test, overlay method, and Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC) determination. Characterization and identification of organic acids, in addition to the main volatile organic compounds (VOC), from MRS fermented by each bacteria during 72h, was carried by HPLC-DAD and CG-MS respectively. The antifungal activity of the most promising LAB where tested spraying a low concentrated solution of fermented MRS on injured tomatoes inoculated with fungi spores. Fermented mediums showed MIC ranged from 1.6-100 mg/mL and MFC from 3.1-100 mg/mL. Genus *Aspergillus* showed the highest resistance, while *Fusarium* was the most sensitive. As expected, the most abundant acid was lactic acid ranged from 25 to 282 mg/g, followed by acetic acid, from 21 to 76 mg/g. Principal detected VOC's were pyrazines, from 39 to 75 %. No significant reduction of the fungi growth was achieved. Therefore, future tests will be performed with concentrations of fermented MRS similar to the MFC results.

**Keywords:** Biopreservation, lactic acid bacteria, toxigenic fungi, shelf life.

### C11) TOXICOLOGICAL EFFECTS OF OCHRATOXIN A AND ZEARELENOL MYCOTOXINS ON AN UNDIFFERENTIATED NEUROBLASTOMA CELL LINE

*Agahi F\*, Juan C, Juan-García A*

*Laboratory of Food Chemistry and Toxicology, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Spain. fojan@alumni.uv.es*

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*. Such natural contaminants are found in cereals and agricultural products, which now, more recent studies have demonstrated that they can accumulate in the brain and cause neuronal damage [1,2]. It has been suggested the potential link between exposure of human to mycotoxins and neurological disease [3]. This work is focused on studying the cytotoxic effects of the mycotoxins ochratoxin A (OTA), zearalenol (ZEA) and its metabolites ( $\alpha$ -ZOL and  $\beta$ -ZOL) in an undifferentiated neuroblastoma cell line.

The aim of this study is to determine the cytotoxic of the mycotoxins OTA, ZEA and its metabolites on undifferentiated SH-SY5Y cells with single treatment at the concentration range of 0.2 to 50  $\mu$ M for OTA and from 0.4 to 100  $\mu$ M for ZEA  $\alpha$ -ZOL and  $\beta$ -ZOL by the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay, over 24, 48 and 72 hours. 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 at all times assayed, ranged from 5 to 34  $\mu$ M for OTA; for  $\alpha$ -ZOL ranged from 14 to 20  $\mu$ M; and  $\beta$ -ZOL ranged from 7 to 94  $\mu$ M; while for ZEA no IC<sub>50</sub> was

reached. Among all mycotoxins assayed, OTA presented the highest toxic potential.

**Keywords:** ZEA; OTA; Mycotoxins; Cytotoxicity; SH-SY5Y;

**Acknowledgment:** This work has been funded by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness AGL2016-77610-R.

### C12) IN VITRO ASSAYS FOR ANALYZING COFFEE EXTRACTS: A REVIEW.

*de Simone G<sup>1</sup> and Juan-García A<sup>2</sup>*

*<sup>1</sup>School of Pharmacy, University of Camerino, Via Sant'Agostino 1, 62032 Camerino, Italy-- <sup>2</sup>Laboratory of Food Chemistry and Toxicology, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Spain.*

Coffee is a worldwide beverage consumed by people from all over the world no matter countries or cultures. Nonetheless, it has been argued that an excessive consumption of coffee may have negative impact in consumers at several levels. Besides that, understanding the biology of coffee and its impact on health is complicated by the fact that coffee contains many bioactive compounds which are often attributed the health-promoting properties of coffee. Subsequently many research investigations and epidemiological studies have been performed revealing its inverse correlation with that of various cancer cell lines. This work is focused on the effects of coffee and the possibility to affect a long list of diseases including malignant conditions and its influence in several ways. For this purpose, a compilation of articles available online on different data bases from last ten years have been reviewed. All articles selected addresses on *in vitro* human cellular based assay to monitor cytotoxicity, glutathione content, reactive oxygen species (ROS) and genotoxicity in cells after coffee (extracts, brews and infusions) treatment. The different type of human cell lines that have been studied are: human lung cancer cell line (A549), chinese hamster ovary cell line (AA8), human colorectal adenocarcinoma (Caco-2), human hepatocellular carcinoma (HepG2), human embryo lung fibroblastic cell line (MRC-5), human oesophageal carcinoma (OE-33), neuroblastoma cell line (SH-SY5Y), human colon cancer cells (SW480), human urinary bladder carcinoma (T24) and human leukemia cells (K562). For each study several assay have been conducted as: cytotoxicity through crystal violet and MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assays, Annexin V-FITC and caspase-3 assay for apoptosis detection, comet assay for genotoxicity, dichlorofluorescein assay for ROS detection, fluorometric assay and immunofluorescence  $\gamma$ H2AX Focus assay.

**Keywords:** coffee; human cell lines; *in vitro*, review.

**Acknowledgements:** This work has been funded by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness AGL2016-77610-R.

### C13) ZEARELENONE MYCOTOXIN AND IN VITRO BASED ASSAYS IN DIFFERENT TYPE OF CELLS.

*Drakonaki M<sup>1</sup> and Juan-García A<sup>2</sup>*

*<sup>1</sup>Department of Food Technology, Faculty of Food Technology and Nutrition, University of West Attica Greece - <sup>2</sup>Laboratory of Food Chemistry and Toxicology, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Spain.*

Zearalenone (ZEA) is a mycotoxin produced by *Fusarium* species. This review is focused on zearalenone (ZEA) and its metabolites  $\alpha$ -zearalenol ( $\alpha$ -ZOL) and  $\beta$ -zearalenol ( $\beta$ -ZOL). Also studies were ZEA or its metabolites have been studied simultaneously or in combinations with other mycotoxins are also included; some of those mycotoxins are: ochratoxin A (OTA), deoxynivalenol (DON), fumonisin B1 (FB1), genistein (GEN) and alternariol (AOH).

For this purpose, articles of *fusarium* mycotoxins available on databases as Science Direct, Scopus and Current Content from the last ten years, have been compiled. All articles selected deal with cell cultures so *in vitro* assays are putting together. Different type of cells as: RAW 264.7, liver hepatocellular carcinoma cells, human intestinal epithelial cells, human plasma, breast cancer cell line and Ishikawa cell line have been conducted for ZEA toxicity evaluation. Cytotoxicity is the main assay performed in all articles; nonetheless, other assays are comprised: alkaline phosphatase assay, oxidative

Actas de las Jornadas de Formación en Toxicología  
stress, MTT assay, nuclear damage, analysis of mitochondrial membrane potential, caspase-3 assay, liquid chromatography–mass spectrometry, glutathione assay, mass spectrometry assay, lactate dehydrogenase assay and sulforhodamine B assay.

**Keywords:** mycotoxins; zearalenone; *in vitro*; review

**Acknowledgements:** This work has been funded by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness AGL2016-77610-R.

#### C14) CYTOTOXICITY EFFECTS OF T-2 TOXIN IN MAMMALIAN CELLS

**Hosseinchi H., Ruiz M.J., Fernández-Franzón M.**

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

T-2 toxin is a trichothecene mycotoxins produced by several *Fusarium* species which may grow on a variety of cereal grains, especially in cold climate regions or during wet storage conditions. The aim of this study is to summarize the data about the cytotoxic activity of T-2, performed with different cell lines, exposure time and cytotoxicity assay. *In vitro* cell viability and cytotoxicity assays with cultured cells are widely used for cytotoxicity tests as dye exclusion methods (Trypan blue), fluorometric assays (AlamarBlue assay) or colorimetric assay (LDH release, WST-1 assay, MTT assay, BrdU Cell Proliferation Assay and NRU assay).

The cells selected to study T-2 toxin cytotoxicity, were human cells (A204, A375, A549, HGF, B-MCV, BEAS-2B, Caco-2, HeLa, K562, Reh, CEH, 8E5, Hep2, HepG-2, HUVEC, IM-9, JurkatT, LCLPI, MN, GLL, MOLT-4, MRC-5, NHLF, NK, RAJI, RPMI8226, RPTEC, SK-Me1/27, SW742, U937), bovine (MDBK), hamster (BHK-21, V79), and mouse (SP2/O, 3T3, EL-4). Data shows that the most studied cell line is HepG-2. The IC<sub>50</sub> for T-2 at 24 h exposure was from 0.2 ng/ml in IM-9 (Lymphoid cells line B) by Trypan blue to 980 nM in HepG-2 (hepatocellular carcinoma cell line) by WST-1 assay. At 72h, the IC<sub>50</sub> range was from 7.7 ng/ml in HUVEC (Umbilical vein endothelial cell line) by WST-1 to 10.8 ng/ml in Caco-2 (Adenoma colon cell line) by WST-1. As a conclusion, the cytotoxicity results depend on the assay method and cell type used. It is recommended to use more than one assay to increase the reliability of the results.

**Keywords:** T-2 toxin, cell lines, cytotoxicity, IC<sub>50</sub>

**Acknowledgment:** This work has been funded by the Ministry of Economy, Industry and Competitiveness (AGL2016-77610-R)

#### C15) CONTROLES DE AGUAS, ALIMENTOS Y AMBIENTES INTERIORES EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

**Pérez R y Juan-García A.**

*Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología i Medicina Legal, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia.*

La contaminación de aguas, alimentos y ambientes interiores pueden suponer graves problemas en la población dando lugar a la aparición de diferentes intoxicaciones e toxiinfecciones. El análisis rutinario a estos niveles, siguiendo los criterios de la legislación, garantizan la seguridad alimentaria.

En el análisis del agua es importante tener en cuenta el tipo de agua que se va a analizar, así como su origen, ya que los análisis varían. Dicho análisis consiste en el control y prevención de *Legionella* (*Legionella pneumophila*) principalmente, por ser causante de infecciones graves, así como de brotes epidémicos. A nivel físico-químico, y sobretodo para aguas de consumo, los parámetros a controlar son: olor, sabor, color, turbidez, conductividad, pH, amonio, cobre, niveles de cloro, hierro y plomo. El interés del cloro reside en su utilización para el tratamiento de potabilización de aguas de consumo.

Para el análisis de alimentos, se realizan controles higiénicos de los productos alimentarios, análisis de patógenos, estudios de caducidad y vida útil, estudios de composición nutricional y etiquetado, análisis de alérgenos y de mutirresiduos entre otros. Los microorganismos comúnmente analizados en alimentos son

*Escherichia coli*, recuento de enterobacterias totales, *Salmonella spp.*, aeróbios mesófilos, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* y *Bacillus cereus*.

Por último, los controles de ambientes interiores y superficies microbiológicas requieren de análisis en los sistemas de climatización y salas blancas. El control de las superficies de trabajo se basa en el recuento del número de colonias en una placa o laminocultivo, o con hisopo en caso de superficies de difícil acceso. Los análisis de microorganismos más comunes que se utilizan son enterobacterias totales, aerobios mesófilos, y mohos y levaduras. El análisis de agua, alimentos y ambientes interiores de rutina en la industria alimentaria proporcionan garantías de seguridad en los alimentos que en ella se produzcan.

**Keywords:** aguas, industria, alimentos.

#### C16) ESTUDIOS DE ECOTOXICIDAD DE PLAGUICIDAS EN APIS MELLIFERA

**Rios P.<sup>1</sup>, Veses MC.<sup>1,\*</sup> Ruiz MJ.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Estudiantes de Grado en Farmacia, Facultad de Farmacia, Universitat de València.* <sup>2</sup>*Departamento de Medicina Preventiva, Facultad de Farmacia, Universitat de València.*

\*vejicar@alumni.uv.es

Las abejas realizan la polinización más efectiva sobre los cultivos agrícolas. Las principales causas de la disminución de la población de abejas son las enfermedades, los parásitos (*Varroa destructor* y *Nosema ceranae*) y los plaguicidas. La exposición a plaguicidas hace más susceptibles a las abejas para sufrir parasitosis, trastornos fisiológicos, alteración del comportamiento, movilidad, aprendizaje y cambios en el patrón alimentario. Se ha detectado plaguicidas de uso agrícola en cera, polen y miel de abejas, destacando los neonicotinoides fenilpirazoles, organofosforados y piretroides. Para determinar la toxicidad de estos plaguicidas en *A. mellifera*, se han realizado estudios de ecotoxicidad por contacto y absorción oral encontrándose valores de DL<sub>50</sub> por vía oral que varían de 0,0037

µg/abeja (imidacloprid) a 17,32 µg/abeja (tiacloprid) ambos neonicotinoide y valores de DL<sub>50</sub> por contacto que varían entre 0,0015 µg/abeja para deltametrina (piretroide) y 8,09 µg/abeja para acetamiprid (neonicotinoide). Estos resultados ponen de manifiesto el efecto tóxico que supone el empleo de estos fitosanitarios para las abejas, y la necesidad de buscar alternativas al uso de estos compuestos. Este reto medioambiental requiere un cambio en el modelo productivo agrícola que elimine las sustancias más tóxicas para las abejas, o un cambio hacia una agricultura ecológica sin plaguicidas. Por otra parte, aunque los niveles encontrados de residuos de plaguicidas en la miel no son perjudiciales para los seres humanos, la acumulación y las mezclas de plaguicidas en miel, polen y cera suponen un efecto tóxico sinérgico para los consumidores.

**Palabras clave:** plaguicidas, *Apis mellifera*, ensayos ecotoxicidad

**Bibliografía:** Botías C., Sánchez-Bayo F. 2018. Ecosistemas 27(2), 34-41. Conseil Supérieur de la Santé. Publication du conseil supérieur de la Santé n° 9241. Évaluation des effets des néonicotinoides et du fipronil sur la biodiversité et la santé. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Effects on biotic systems.

#### C17) ESTUDIO SOBRE LA EXPOSICIÓN A ACRILAMIDA EN ESPAÑA

**Cantó A, Fernández-Franzón, M.**

*Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología y Medicina Legal. Universitat de València.*

Uno de los temas que más preocupa en la actualidad relacionado con la seguridad alimentaria es la presencia de acrilamida en los alimentos. Esta sustancia, clasificada dentro de la categoría 2A (probablemente cancerígeno) por la IARC, se encuentra presente en alimentos que consumimos a diario y en cantidades significativas, por ello es de vital importancia conocer todas las repercusiones que conlleva la exposición a acrilamida. Existen numerosos estudios en los que se realizan estimaciones de la exposición alimentaria a acrilamida tanto en población española como en otros países de Europa. No obstante,

en la mayor parte de estos estudios no se tiene en cuenta la exposición a acrilamida proveniente del tabaco, que es la fuente secundaria. Este trabajo pretende realizar una estimación tan precisa como sea posible sobre la exposición a acrilamida tanto alimentaria como del tabaco, en toda España, diferenciando por Comunidades Autónomas. Para realizar la estimación se han recabado datos sobre el consumo de los alimentos que contienen acrilamida, y sobre el consumo de tabaco en España utilizando las bases de datos del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación y del Instituto Nacional de Estadística respectivamente. Tras ello se han realizado los cálculos pertinentes para determinar el contenido en acrilamida. Los resultados obtenidos permiten conocer una estimación de la exposición por las dos fuentes principales a este tóxico. Los resultados reflejan que el tabaco en ciertas ocasiones puede ser la fuente primaria, y que los alimentos que más contribuyen a la exposición total son el pan y el pan tostado. Las Comunidades Autónomas con mayor exposición son Asturias, Galicia y País Vasco.

**Palabras clave:** Acrilamida, Alimentos, Tabaco y Evaluación de la Exposición.

### C18) USE OF COCAINE IN PREGNANCY: REPERCUSSIONS FOR THE NEWBORN

*Izquierdo Monterde D., Navarro Martínez J., Penalva Olcina R., Fernández-Franzón M.*

*Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología y Medicina Legal, Facultad de Farmacia, Universidad de València.*

Drug use among pregnant women has become a big concern as a consequence of the increase in its practice throughout the past years. Approximately 3% of all pregnant women aged 15 to 44 years exposed their fetus to 1 or more illicit drugs. This may have problems in the developing fetuses and future children at a physiological and/or neurological level. Analysis of different epidemiological studies. Comparison of the teratogenic and long term adverse effects between groups of prenatally exposed vs. non-exposed fetuses to cocaine and the neonatal outcome. Cocaine-exposed infants were generally born earlier (1.2 weeks), lighter (536 grams) and shorter (2.6 cm). Also head circumference was smaller in exposed infants (1.5 cm). At a nervous system level (central and autonomic), symptoms were more frequent in the group of exposed infants. These symptoms could be jittery/tremors, high-pitched cry, irritability, excessive suck, hyperalertness and autonomic instability. Infants who were exposed were rated as more fussy/difficult and unadaptable<sup>3</sup> than those who were not. Exposed infants had more infections (syphilis, hepatitis, HIV) than non-exposed. Central and autonomic nervous systems symptoms are transient and due to the cocaine effect itself whereas rare anatomic results previously reported were not confirmed. The increase of viral infections among exposed individuals may propose a public health concern.

#### **Bibliography:**

<sup>1</sup>Bauer CR<sup>1</sup>, Langer JC, Shankaran S, Bada HS, Lester B, Wright LL, Krause-Steinrauf H, Smeriglio VL, Finnegan LP, Maza PL, Verter J. (2005) Acute neonatal effects of cocaine exposure during pregnancy. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 159(9):824-34.

<sup>2</sup>Lester BM, & Lagasse LL (2010). Children of addicted women. *J Addict Dis*, 29(2), 259-276.

### C19) CITALOPRAM Y ESCITALOPRAM. MEDIDAS DE PREVENCIÓN DE RIESGOS.

*León Miralles A., Llorca Llopis I., Santiago Martínez L. Universidad de Valencia, España.*

La Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) se encarga del seguimiento continuo de la seguridad, eficacia y control de calidad de medicamentos y publica 'Notas informativas' y 'Notas de seguridad' si existe algún riesgo para la salud humana, con el objetivo de mantener informada a la población y, especialmente, a los profesionales sanitarios. Citalopram y Escitalopram son principios activos que se usan en la preparación de medicamentos pertenecientes al grupo terapéutico de antidepresivos

y para los cuales se ha publicado 'Nota informativa'. Se ha realizado una revisión bibliográfica mediante la cual se pretende aportar información estructurada sobre dichos principios activos. Está basada, principalmente, en las 'Notas informativa' de Citalopram<sup>1</sup> y Escitalopram<sup>2</sup>. Ambas moléculas se han asociado a un fenómeno dosis-dependiente de alargamiento del intervalo QT en el electrocardiograma, pudiendo agravarse a arritmias (como *Torsade de Pointes*). Como prevención, se han reducido las dosis máximas de Citalopram y Escitalopram, especialmente en personas mayores de 65 años. El papel del personal farmacéutico en la detección de pacientes que se encuentran en situaciones similares a las descritas en la nota informativa es de elevada relevancia, encargándose de informar a dichos pacientes y/o al médico, con el objetivo de cambiar la pauta posológica (reducir la dosis prescrita) o recomendando la reevaluación del paciente y retirada gradual del fármaco en caso de síntomas cardiovasculares.

#### **Bibliografía:**

<sup>1</sup>Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Madrid: AEMPS; 27/10/2011. Citalopram: Prolongación del intervalo QT del electrocardiograma (Nota Informativa MUH (FV) 19/2011).

<sup>2</sup>Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Madrid: AEMPS; 02/12/2011. Escitalopram: Prolongación del intervalo QT del electrocardiograma (Nota Informativa MUH (FV) 23/2011).

**Palabras clave.** Toxicología, Medicamentos, Citalopram, Escitalopram, Prevención.

### C20) ASSESSMENT OF ANTIFUNGAL ACTIVITY OF DIFFERENT ESSENTIAL OILS AGAINST *PENICILLIUM EXPANSUM*

*Pronesti G.<sup>1</sup>, Bocate K.C.P.<sup>2</sup>, Luz C.,<sup>3</sup> Meca G.<sup>3</sup>, Rodríguez-Carrasco Y.<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 volatile, natural and complex compounds obtained from aromatic plants. They are widely used in industrial applications such as flavoring of foods and liqueur production, but also as antimicrobial and antioxidant agents instead of synthetic ones in order to preserve integrity of food items corrupt by pathogenic fungi. Fungi can contaminate foodstuffs causing a reduction of shelf-life of food among other important problems. Hence, the aim of this work is to evaluate the antifungal activity of several EOs from different plant families, through the assessment of the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Fungicidal Concentration (MFC) after *Penicillium expansum* treatment. EOs both from Apiaceae and Lamiaceae families showed the lower MIC<sub>50</sub> values ranging from 0.03% to 0.25%. Similarly, MFC found ranged from 0.12 % to 0.5%. These preliminary results suggest that many EOs present a strong power as antifungal compounds, and consequently they could be used in food industry in low concentrations to avoid organoleptic changes. Based on the before mentioned data future studies should be carried out to further investigate both the antifungal and antimycotoxigenic activity of these natural products.

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

### C21) BIOMONITORIZACIÓN DE METABOLITOS DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN ORINA

*Butikofer, L.; Fernández, S.; Pardo, O.; Cantalapiedra, F. Laboratorio de Salud Pública de Valencia. Subdirección General de Salud de la Generalitat Valenciana. España.*

Los PAHs (Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos), son compuestos orgánicos generados por la combustión de materia orgánica como resultado de contaminación medioambiental por incendios, procesos industriales, combustibles de coches y/o directamente por medio del



Actas de las Jornadas de Formación en Toxicología  
tratamiento de los alimentos a altas temperaturas o en ahumados  
(AECOSAN, 2017).

Algunos de estos han sido clasificado como cancerígenos o posibles cancerígenos para el humano (IARC, 2019) por lo que su control en el organismo es importante para el diseño de políticas de prevención en salud, medio ambiente y sector alimentario.

La biomonitorización consiste en el análisis y evaluación de la exposición de compuestos o sustancias químicas en matrices biológicas humanas como sangre, cabello, uñas, saliva, orina, semen, meconio y leche entre otras. Estas sustancias pueden ser adquiridas por exposición de aire, agua, alimentos o por contacto directo a través de la piel. Al ingresar en el organismo sufren reacciones de biotransformación, convirtiendo moléculas complejas en metabolitos pequeños, lo que en muchos casos puede modificar su solubilidad y con esto facilitar su transporte para su posterior excreción (Bandrés, 2015). Los metabolitos de PAHs pueden ser detectados mediante técnicas analíticas como LC-MS/MS, la cual detecta sus masas y cuantifica su cantidad en función de volumen de matriz, en este caso, orina.

La finalidad de biomonitorizar sustancias como estas es servir como instrumento para diseñar políticas que permitan desarrollar medidas de prevención en sectores como salud, medio ambiente y sector alimentario (Ibarluzea, 2016).

La implantación de un sistema de biomonitorización en España ha dado sus primeros pasos, pero necesita avanzar en las líneas teóricas y estratégicas (CDC, 2019).

**Palabras Clave:** Biomonitorización, orina, PAHs, LC-MS/MS.

**Referencias:** AECOSAN. (2017). Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs).

Bandrés, F. (2015). Aspectos Fundamentales del Citocromo P450. Madrid: ADEMÁS - Colección Docencia Universitaria.

CDC. (2019). Fourth National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals, Update Table.

IARC. 2019. IARC Monograph on the Identification of Carcinogenesis Hazards to Humans.

Ibarluzea J., Aurrekoetxea J. J., Porta M., Sunyer J. y Ballester F. (2016). La biomonitorización de sustancias tóxicas en muestras biológicas. *Elvesier*, 45-54.