



VNIVERSITATIS VALÈNCIA

**Departamento de Microbiología y Ecología
Programa de doctorado en Biomedicina y Biotecnología**

TESIS DOCTORAL

**AFLATOXINAS, TRICOTECENOS DE TIPO A
Y HONGOS PRODUCTORES EN MAÍZ Y AVENA.
NUEVOS ANTIFÚNGICOS Y SU IMPACTO
EN SALUD**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR:
*José Vicente Gómez Pérez***

**Dirigida por:
Profesora: *Eva María Mateo Jiménez***

Valencia, Enero de 2021



VNIVERSITATIS VALÈNCIA

La Dra. Eva María Mateo, profesora del Departamento de Microbiología y Ecología, de la Universitat de València, como directora de la tesis doctoral titulada “Aflatoxinas, tricotecenos de tipo A y hongos productores en maíz y avena. Nuevos antifúngicos y su impacto en salud” realizada por José Vicente Gómez Pérez, autoriza la lectura y defensa de la misma.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firma la presente en Valencia, en enero de 2021.

Prof. Eva María Mateo

A mi familia
A la memoria de mi abuelo Máximo

AGRADECIMIENTOS

Resulta más complicado de lo que pensaba mencionar a las personas a las que deseo agradecer su ayuda y motivación durante este periodo de mi vida.

En primer lugar, quiero agradecer el apoyo y la confianza que ha depositado en mí mi directora de tesis, la profesora Eva María Mateo. Su permanente dirección, enseñanzas, y la motivación que me ha transmitido han sido fundamentales para que el barco llegue a buen puerto. Además, quiero agradecer especialmente a la profesora Misericordia Jiménez Escamilla su dedicación y perseverancia. He podido aprender mucho de ella y eso no lo olvido.

También quiero agradecer la gran ayuda del resto de profesores del grupo del Departamento de Química Analítica: Rufino Mateo, José Vicente Giméno y Juan Peris. Vuestro apoyo en el diseño y optimización de las técnicas para el análisis de micotoxinas ha sido fundamental. Me ha encantado trabajar con vosotros. He aprendido mucho. Del mismo modo manifiesto mi agradecimiento al profesor Antonio Doménech por haberme permitido trabajar en su laboratorio y su ayuda en el aprendizaje y comprensión de técnicas de voltamperometría, ensayadas por vez primera en esta tesis para la caracterización de hongos productores de micotoxinas. Para concluir mis agradecimientos a los doctores expertos en Química Analítica no puedo olvidar a Paco Valle, miembro del grupo y buen conocedor y sufridor del equipo de HPLC. Desde la distancia me has resuelto muchas dudas. ¡Muchas gracias Paco!

Por supuesto no me olvido de Andrea, mi compañera de grupo, despacho y laboratorio. Ha sido un placer trabajar contigo. Creo que nos hemos organizado muy bien, y a la vista están los resultados. Agradezco tu paciencia y lamento haber manifestado mi estrés en ciertas ocasiones, ya sabes que soy muy nervioso. Quiero agradecerte tus consejos y ánimos, no solo en relación con el trabajo, y también transmitirte a ti mucho ánimo con tu tesis. ¡Vamos, que ya casi la tienes!

También quiero expresar mi agradecimiento a las personas con las que he compartido el día a día en el laboratorio, en los pasillos y en los despachos: A los profesores Sergi Ferrer y Sergi Maicas, a la profesora Isabel Pardo y a las compañeras y los compañeros del laboratorio: Lucía, Lorena, Isi y muy especialmente a Sara porque me ha transmitido su entusiasmo por la ciencia y la investigación y por su asesoramiento cuando era novato en materia de edición de textos y cuando no era tan novato. Ha sido un placer conocer a Sara, no cambies nunca porque eres genial. También quiero agradecer la simpatía que siempre me ha demostrado Toñi y el trato cordial y ánimos de Ángela. Lamento que no hayamos podido compartir más tiempo.

Quiero expresar mi agradecimiento en general a todo el personal docente e investigador del departamento de Microbiología y Ecología por haberme hecho sentir como uno más durante este tiempo. ¡Muchas gracias a todas y todos!

Deseo también expresar mi agradecimiento al Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (MINECO) por la concesión en el año 2015 del contrato de Formación de Personal Investigador (FPI) que me ha permitido realizar esta Tesis, y al Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (MICIU) por el mantenimiento de dicha ayuda.

No puedo olvidar a las colaboradoras que han realizado el TFG en nuestro laboratorio, especialmente a Sara y Fatín, gracias por compartir vuestro tiempo con nosotros. Ahora ya sois dos biólogas, os reitero mi enhorabuena y os doy mucho ánimo porque os espera un gran futuro. Tenéis madera y podéis lograr lo que os propongáis.

Finalmente, quiero agradecer a mi familia su enorme paciencia e incondicional apoyo, especialmente a mis padres y hermano que son los que más han vivido mis buenos y malos momentos, y a mis amigas y amigos de Macastre (los de toda la vida), y a Aldi, por aparecer en mi vida y por tus muestras de apoyo. Ni os imagináis lo necesario que ha sido para mi teneros a mi lado. Confío en que esta nota de agradecimientos os hará sonreír. Muchísimas gracias.

RESUMEN

Los hongos filamentosos son organismos ampliamente distribuidos en la naturaleza. Muchos de ellos son beneficiosos para la humanidad en campos estratégicos como la industria alimentaria, química, farmacéutica, etc. Sin embargo, numerosas especies son perjudiciales ya sea como agentes causantes de infecciones en el hombre, animales o plantas, o como productores de metabolitos tóxicos, entre los que destacan los conocidos como micotoxinas. Dependiendo del tipo y de los niveles ingeridos, las micotoxinas pueden ocasionar intoxicaciones agudas o crónicas con efectos teratogénicos, cancerígenos y alteraciones en los sistemas digestivo, nervioso, inmunológico, reproductor, etc. Los hongos implicados en la producción de micotoxinas son, principalmente, especies de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria* y *Claviceps*. Estos hongos y micotoxinas son, por tanto, importantes riesgos en Salud y Seguridad Alimentaria. Por ello, la mayoría de países, entre ellos los de la Unión Europea, cuentan con una legislación que regula los límites máximos tolerables de las principales micotoxinas en alimentos.

El avance del cambio climático está facilitando la adaptación de especies productoras de micotoxinas a nuevas condiciones de estrés térmico e hídrico y ello está afectando a sus patrones de distribución geográfica en cultivos agrícolas básicos en la alimentación humana y animal. Entre los alimentos de mayor riesgo figuran los cereales como el maíz y la avena, estudiados en esta Tesis Doctoral. Estos nuevos escenarios facilitan la adaptación y dominancia de las especies mejor adaptadas lo que se traduce en la emergencia de ciertas micotoxinas en el cereal y alimentos derivados como las aflatoxinas (AF) en maíz o los tricotecenos de tipo A (toxinas T-2 y HT-2) en avena en Europa y otros lugares del mundo. Se plantean, por tanto, nuevos retos en materia de salud, seguridad alimentaria y gestión de estos riesgos que es necesario afrontar.

Basándonos en ello, en la presente Tesis se aborda: 1) el estudio de las principales especies del género *Aspergillus* productoras de AF y del genero *Fusarium* productoras de las toxinas T-2 y HT-2 en maíz y avena consumidos en España, 2) la determinación y evaluación de las micotoxinas producidas por estas especies en todas las muestras analizadas durante un periodo de cinco años, 3) el estudio de la influencia de las condiciones ambientales, principalmente, temperatura y actividad de agua en equilibrio con la humedad relativa ambiental como principales factores que pudieran influir en el crecimiento de las especies fúngicas más relevantes y en la producción de las mencionadas micotoxinas y 4) el diseño y ensayo de nuevas estrategias basadas en antifúngicos convencionales y, especialmente, nuevos antifúngicos naturales, envases bioactivos y nanopartículas que permitan la prevención y control del crecimiento de estos hongos y la biosíntesis de micotoxinas.

Para la realización de esta investigación de carácter multidisciplinar se han recogido y analizado 198 muestras de maíz y avena, según la normativa vigente en la UE, en todas las comunidades españolas en el periodo comprendido entre 2015 y 2019 lo que le convierte en el primer estudio de este tipo realizado en España. La investigación se centra después en la identificación de los hongos productores de AF y las toxinas T-2 y HT-2 por métodos microbiológicos convencionales, basados en la morfología y fisiología del hongo y métodos específicos de PCR, cuando se considera necesario. Adicionalmente, se ha diseñado y optimizado un nuevo método rápido basado en voltamperometría para la identificación fúngica con buenos resultados. La identificación y cuantificación de las micotoxinas en las muestras de maíz y avena y en los ensayos con antifúngicos *in vitro* se ha realizado mediante HPLC-FLD, HPLC-DAD o UPLC-ESI-MS/MS. Se han ensayado diferentes formulaciones de antifúngicos sintéticos convencionales como procloraz y tebuconazol y antifúngicos naturales como los aceites esenciales (AE) (compuestos GRAS) de orégano y canela o componentes activos puros de AE como cinamaldehído, carvacrol, citral o linalol, susceptibles de empleo en

agricultura y alimentación ecológica. Como nuevas estrategias se han diseñado y fabricado films bioactivos con copolímeros de etileno-alcohol vinílico (EVOH) suplementados con estos principios activos naturales que podrían llegar a ser uno de los conceptos más innovadores de envasado activo para el control del crecimiento fúngico y de la producción de micotoxinas. Otro de los métodos novedosos ensayado por vez primera en esta Tesis ha sido el uso de nanopartículas de plata que se han fabricado y caracterizado mediante microscopía electrónica de transmisión y técnicas espectrométricas. Posteriormente, se ha ensayado su efectividad *in vitro* frente al crecimiento de las especies fúngicas más relevantes y frente a la producción de micotoxinas. Los resultados apuntan a que esta herramienta basada en nanotecnología puede tener un gran impacto en seguridad alimentaria y salud, a través de la alimentación, la agricultura, la medicina, etc. En todos los ensayos con agentes antifúngicos (convencionales, ecológicos, films bioactivos o nanopartículas) se han estandarizado los métodos. Se ha determinado las dosis efectivas para la reducción del crecimiento del hongo en un 50, 90 y 100%, se ha estudiado su efectividad en el control del crecimiento de las especies fúngicas citadas y en la reducción o inhibición total de la biosíntesis de AF y las toxinas T-2 y HT-2. Todos los ensayos con agentes antifúngicos se han realizado en diferentes condiciones ambientales para determinar su posible influencia e interacciones.

Los resultados han mostrado que los hongos del género *Aspergillus* de la sección *Flavi*, especialmente, *Aspergillus flavus* son predominantes en las muestras de maíz mientras que en las muestras de avena la principal especie aislada productora de las toxinas T-2 y HT-2 ha sido *Fusarium sporotrichioides*. Se ha observado una buena correlación entre el nivel de infección de la semilla por hongos aflatoxigénicos y el nivel de AF, así como entre los hongos productores de las toxinas T-2 y HT-2 y las concentraciones de estos metabolitos en las muestras. Se encontró también con relativa frecuencia la especie *F. poae*, relacionada con la producción de nivalenol, aunque

esta toxina no se ha detectado en ninguna de las muestras de cereales analizadas. En los ensayos con agentes antifúngicos el crecimiento de los diferentes hongos y la producción de las micotoxinas dependió de factores individuales como: especie fúngica, temperatura, a_w /humedad relativa, tipo de agente antifúngico y dosis y de las interacciones entre todos ellos. Es importante señalar que se han registrado claras evidencias de adaptaciones a condiciones de estrés hídrico y térmico de las especies estudiadas, especialmente *A. flavus*. También se ha observado que determinados tratamientos con agentes antifúngicos (azoles y AE) a dosis bajas, ocasionalmente inducen un incremento de la producción de algunas micotoxinas.

Por tanto, en esta tesis se realiza el primer estudio sobre la incidencia de AF y las toxinas T-2 y HT-2 en maíz y avena española lo que aporta datos de gran valor en Salud Pública. Como fruto de la investigación se proponen métodos rápidos de identificación fúngica, métodos de extracción, purificación y análisis de micotoxinas rápidos, reproducibles y sensibles transferibles al sector público y empresarial. También se diseñan, ensayan y proponen estrategias muy innovadoras basadas en el uso de AE, films bioactivos y nanopartículas de plata para la prevención y control de hongos productores de AF o de las toxinas T-2 y HT-2 y de esos metabolitos fúngicos en alimentos.

ABSTRACT

Filamentous fungi are widely distributed organisms in nature. Many of them are beneficial to humanity in strategic fields such as food, biotechnology, pharmacology, etc. However, numerous species are harmful either as etiological agents of infections in man, animals or plants, or as agents that produce toxic metabolites, among which those known as mycotoxins should be emphasized. Depending on the type of mycotoxin and the levels ingested, they can produce acute or chronic poisonings with teratogenic and carcinogenic effects, and alterations in the digestive system, nervous system, immune system, reproductive system, etc. These fungi and mycotoxins are, therefore, important risks in Public Health and Food Safety. For this reason, most countries, including those of the European Union, have legislation that regulates the maximum tolerable limits of the main mycotoxins in food. The fungi involved in the production of mycotoxins are mainly species of the genera *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria* and *Claviceps*.

The advance of climate change is facilitating the adaptation of mycotoxin-producing species to new conditions of thermal and water stress, and this is affecting its geographical distribution patterns and in the different foods, among which cereals and cereal derivatives, such as maize and oats, studied in this Doctoral Thesis are emphasized. These scenarios facilitate the adaptation and dominance of the best adapted species, which results in the emergence of certain mycotoxins in foods such as aflatoxins (AF) in maize or type A trichothecenes (T-2 and HT-2 toxins) in oats in Europe and other places of the world. Therefore, new challenges arise in terms of food safety and the management of these risks that must be addressed.

Based on this, the present Thesis addresses: 1) the study of the main fungi belonging to the genus *Aspergillus* able to produce AF and *Fusarium* able to produce T-2 and HT-2 toxins in maize and oats

produced and marketed in Spain in the period 2015-2019, 2) the determination and evaluation of the mycotoxins produced by these species in all the analyzed samples, 3) the study of the influence of environmental conditions, mainly, temperature and water activity in balance with the relative environmental humidity as main factors that could influence the growth of the most relevant fungal species and the production of the aforementioned mycotoxins, and 4) the design and testing of new strategies based on conventional antifungal products and, especially, new natural antifungal treatments, bioactive packaging and nanoparticles allowing for the prevention and control of the growth of these fungi and for mycotoxin biosynthesis.

To carry out this multidisciplinary research, nearly 200 samples of maize and oats were collected according to the regulations in force in the EU, in all Spanish communities in the period 2015-2019, which makes it the first study of this type carried out in Spain. The investigation then focuses on the identification of fungi that produces either AF or T-2 and HT-2 toxins, out by conventional microbiological methods, based on the morphology and physiology of the fungus, and its confirmation by specific PCR methods. Additionally, a new fungal identification method based on voltammetry has been designed and optimized. Identification and quantification of mycotoxins in samples of maize and oats and in *in vitro* antifungal trials has been performed using HPLC-FLD, HPLC-DAD or UPLC-ESI-MS/MS. Different formulations of conventional synthetic antifungals have been tested. They are prochloraz and tebuconazole, and natural antifungal agents, such as essential oils (GRAS compounds) of oregano and cinnamon or pure active components of essential oils, such as cinnamaldehyde, carvacrol, citral or linalool, suitable for use in agriculture and organic food. Bioactive films with copolymers of ethylene-vinyl alcohol (EVOH) supplemented with these natural active ingredients have been designed and manufactured as new strategies. These films could become one of the most innovative concepts in active packaging for the control of fungal growth and mycotoxin production. Other of the novel methods tested for the first time in this Thesis has been the use of

silver nanoparticles that were synthesized and characterized by means of transmission electron microscopy and spectrometric techniques. Subsequently, its *in vitro* effectiveness against the most relevant fungal species and against the production of mycotoxins were tested. The results suggest that this nanotechnology-based tool can have a great impact on health and food safety through food, agriculture, medicine, etc. The methods applied in all test with antifungal (conventional, ecological, bioactive films or nanoparticles) have been standardized. The effective doses for reducing fungal growth by 50, 90, and 100%, their effectiveness in controlling the growth of the aforementioned fungal species and in reducing or totally inhibiting the biosynthesis of AF and T-2 and HT-2 toxins have been determined. All tests with antifungal agents have been performed under different environmental conditions to record their possible influence and interactions.

The results show that fungi of the genus *Aspergillus* belonging to the *Flavi* Section are predominant in the maize samples and those of the genus *Fusarium* of the *Sporotrichiella* Section are predominant in the oat samples. A good correlation has been observed between the level of infection of the seed by aflatoxigenic fungi and the level of AF and between the fungi that produce toxins T-2 and HT-2 and the concentrations of these metabolites in the samples. The predominant species related to the production of AF or T-2 and HT-2 toxins were *A. flavus*, *A. parasiticus* and *F. sporotrichioides*. *F. poae*, which is related with the production of nivalenol, was also found with relative frequency even when this toxin was not detected in the analyzed cereal samples. In the tests with antifungal agents, the growth of different fungi and the production of mycotoxins depended on individual factors such as fungal species, temperature, a_w /relative humidity, type of antifungal agent and dose, and the interactions between all of them. It is important pointing that clear evidences of adaptations to conditions of hydric and thermal stress of the studied species have been registered. It has also been observed that certain treatments (azoles and EO) at low doses, occasionally, induce an increase in the production of some mycotoxins compared to controls.

Therefore, the first study on the incidence of fungal species able to produce either AF or T-2 and HT-2 toxins in Spanish maize and oats is carried out in this Thesis, which provides data of great value in Public Health. As a result of the research, fast methods of fungal identification and fast, reproducible and sensitive methods of extraction, purification and analysis of mycotoxins transferable to the public and business sector have been proposed. In addition, very innovative strategies based on EO, bioactive packaging and nanotechnology have been designed, tested and proposed for the prevention and control of fungi able to produce AF and T-2/HT-2 toxins and control of these toxic metabolites in food.

LISTADO DE FIGURAS

F.1	Celda electroquímica con los electrodos de trabajo, de referencia y auxiliar conectados.....	18
F.2	Morfología del instrumento “Aspergillum” (izquierda) y conidióforos de hongos del género <i>Aspergillus</i> (derecha).....	20
F.3	Morfología de la cabeza conidial en especies del género <i>Aspergillus</i>	23
F.4	Esclerocios visibles en cultivo de <i>A. flavus</i>	23
F.5	Características fenotípicas usadas para la diferenciación de morfotipos. (a) Morfotipo <i>A. flavus</i> ; (b) Morfotipo <i>A. parasiticus</i> . De izquierda a derecha: color de la colonia en CYA (Czapek yeast autolysate); color del reverso de la colonia en AFPA (<i>A. flavus</i> y <i>A. parasiticus</i> agar) y ornamentación de los conidios.....	24
F.6	<i>A. flavus</i> . A) colonias en Agar Czapek incubadas durante 14 días a 25 °C, B) colonias en MEA incubadas durante 14 días a 25 °C, C) conidióforo (cuerpo fructífero) X530,	

	D) conidios X1820, E) conidios X8655. C, D y E son imágenes obtenidas por SECM.....	25
F.7	Dos visualizaciones de un gráfico de escalamiento multidimensional (multidimensional scaling, MDS graph) obtenido a partir de similitudes de secuencias de las regiones IGS e ITS, secuencias parciales del gen de la β -tubulina, producción de metabolitos (datos cromatográficos), AFLPs y datos fenotípicos de cepas de <i>F. poae</i> ●, <i>F. sporotrichioides</i> * y <i>F. langsethiae</i> ◆.....	29
F.8	<i>F. sporotrichioides</i> a) cultivos de 7 días en PSA a 25 °C en oscuridad, b) conidióforos y micelio aéreo, c) macroconidios y microconidios.....	30
F.9	<i>F. poae</i> a) cultivos de 7 días en PSA a 25 °C en oscuridad, b) conidióforos y micelio aéreo, c) macroconidios.....	30
F.10	<i>F. langsethiae</i> a) cultivos de 7 días en PSA a 25 °C en oscuridad, b, c, d, e y f) cabezas conidiales, micelio aéreo y conidios de <i>F. langsethiae</i>	31
F.11	Estructura de las aflatoxinas B1, B2, G1, G2, M1 y M2.....	33
F.12	Granos y mazorca de maíz contaminados con <i>A. flavus</i>	35
F.13	Estructura de los tricotecenos. Toxinas T-2 y HT-2.....	40
F.14	Distribución de los resultados analíticos relativos a la concentración de los tricotecenos T-2, HT-2 y la suma de ambos en granos de cereales de distintos países europeos entre los años 2011 y 2016.....	44
F.15	Distribución de los resultados analíticos relativos a la concentración de los tricotecenos T-2, HT-2 y la suma de ambos en diferentes cereales entre los años 2011 y 2016.	44

F.16	Toneladas métricas de maíz producidas en 2018 por los principales países productores a nivel mundial.....	48
F.17	Toneladas métricas de avena producidas en 2018 por los principales países productores a nivel mundial.....	48
F.18	Superficie agrícola (ha) dedicada al cultivo de avena en España en 2017 (barras de color azul) y producción (Tm) (barras de color naranja).....	49
F.19	Superficie agrícola (ha) dedicada al cultivo de maíz en España en 2017 (barras de color azul) y producción (Tm) (barras de color naranja).....	50
F.20	Perfiles de temperatura de crecimiento de cinco cepas de diferentes especies de <i>Fusarium</i> crecidas en PDA en oscuridad.....	53
F.21	Fórmula molecular de los fungicidas: a) procloraz, b) tebuconazol.....	74
F.22	Fórmula estructural de los componentes puros de algunos aceites esenciales de plantas: carvacrol, cinamaldehído, isoeugenol, citral y linalol.....	79
F.23	Diagrama del microscopio electroquímico de barrido CH 920C (izquierda); Soporte de la celda/muestra (derecha).....	126
F.24	Porcentaje de muestras de maíz contaminadas con <i>Aspergillus</i> spp. de la sección <i>Flavi</i> (a) y con <i>Fusarium</i> spp. de la sección <i>Sporotrichiella</i> (b) y niveles de contaminación en UFC/g de maíz en ambos casos.....	159
F.25	Porcentaje de muestras de avena contaminadas con <i>Aspergillus</i> spp. de la sección <i>Flavi</i> (a) y con <i>Fusarium</i> spp. de la sección <i>Sporotrichiella</i> (b), y niveles de	

	contaminación en UFC/g de avena en ambos casos.....	159
F.26	Perfil voltamperométrico de onda cuadrada (SWV) de muestras de colonias de cultivos de 7 días de <i>A. flavus</i> (a) y <i>A. parasiticus</i> (b) adheridas a un GCE en contacto con una disolución acuosa de HAc/NaAc 0,25 M a pH 4,75. El potencial de barrido se inició a -0,85 V en dirección positiva. Los incrementos de potencial fueron de 4 mV; la amplitud de onda cuadrada fue de 25 mV; la frecuencia fue de 5 Hz.....	166
F.27	Perfil voltamperométrico de onda cuadrada (SWV) de micromuestras de colonias de cultivos de 7 días de <i>F. sporotrichioides</i> (a), <i>F. poae</i> (b) y <i>F. langsethiae</i> (c) adheridas a un GCE en contacto con una disolución acuosa de HAc/NaAc 0,25 M a pH 4,75. Las condiciones de barrido son las mismas que las que se indican en la Figura 26.....	166
F.28	SECM a, b) mapa en color; c, d) imágenes topográficas de una micromuestra de una colonia de <i>A. carbonarius</i> depositada sobre un sustrato de pasta de carbón inmerso dentro de una disolución de $K_4Fe(CN)_6$ 2,0 mM y HAc/NaAc 0,25 M, pH 4,75. $E_T = +0,45$ V; a, c) $E_S = 0,00$ V; b, d) $E_S = +0,80$ V. e, f) Imágenes obtenidas mediante FESEM de una espora de <i>A. flavus</i> e) antes y f) después de la aplicación de un potencial oxidativo de +0,80 V durante 5 min a una muestra de la colonia del hongo adherida al electrodo de grafito en contacto con una disolución tampón de HAc/NaAc 0,25 M de pH 4,75.....	169
F.29	Esquema en cascada que ilustra la discriminación electroquímica de diferentes secciones de <i>Aspergillus</i> spp. y <i>Fusarium</i> spp. productoras de micotoxinas basada en la presencia o ausencia de picos voltamperométricos...	172

- F.30 Diagrama bidimensional de las relaciones de intensidades de corriente para pares seleccionados de potenciales (en mV) registrados en los voltamperogramas de onda cuadrada. Representación de $I(-450)/I(\text{máx})$ vs. $I(+700)/I(\text{máx})$ para *Aspergillus* spp. Las barras de error corresponden a los valores extremos obtenidos en tres réplicas independientes para cada hongo..... 174
- F.31 Diagrama bidimensional de las relaciones de intensidades de corriente para pares seleccionados de potenciales (en mV) registrados en los voltamperogramas de onda cuadrada. Representación de $I(-150)/I(+900)$ vs. $I(+400)/I(+900)$ para *Fusarium* spp. Las barras de error corresponden a los valores extremos obtenidos en tres réplicas independientes para cada hongo..... 175
- F.32 Cromatogramas de patrones de micotoxinas adicionados al extracto de una muestra de maíz blanco obtenidos mediante el modo MRM en el sistema UPLC-(ESI+)-MS/MS. AFB1, 2 ng/mL; AFB2, 2 ng/mL. Q: ion cuantificador; q: ion cualificador..... 178
- F.33 Cromatogramas de patrones de micotoxinas adicionados al extracto de una muestra de maíz blanco obtenidos mediante el modo MRM en el sistema UPLC-(ESI+)-MS/MS. T-2, 25 ng/mL; HT-2, 25 ng/mL; AFG1, 2 ng/mL; AFG2, 2 ng/mL. Q: ion cuantificador; q: ion cualificador; q': ion cualificador alternativo (no usado normalmente)..... 179
- F.34 Cromatogramas de muestras de maíz contaminado naturalmente obtenidos en modo MRM mediante UPLC-(ESI+)-MS/MS conteniendo a) 184 ng AFB1/g; b) 8,85 ng AFB2/g; c) 12,1 ng de toxina T-2/g; d) 11,7 ng de toxina HT-2/g..... 182
- F.35 Comparación de la tasa de crecimiento (mm/día) de la cepa M34 de *A. flavus* sobre medio de cultivo YES bajo

	diferentes condiciones de temperatura, a_w y dosis de antifúngicos. P: procloraz; T: tebuconazol. Las barras verticales representan las desviaciones estándar.....	195
F.36	Comparación de los niveles de AFB1 (A) y AFB2 (B) producidos por la cepa M34 de <i>A. flavus</i> sobre medio YES bajo diferentes condiciones de temperatura, a_w y dosis de antifúngicos. P: procloraz; T: tebuconazol. Las barras verticales representan las desviaciones estándar.....	196
F.37	Comparación de la tasa de crecimiento (mm/día) de la cepa M34 de <i>A. flavus</i> sobre granos de maíz bajo diferentes condiciones de temperatura, a_w y dosis de tratamientos antifúngicos. P: procloraz; T: tebuconazol. Las barras verticales representan las desviaciones estándar.....	200
F.38	Comparación de los niveles de AFB1 (A) y AFB2 (B) producidos por la cepa M34 de <i>A. flavus</i> sobre granos de maíz bajo diferentes condiciones de temperatura, a_w y dosis de tratamientos antifúngicos. P: procloraz; T: tebuconazol. Las barras verticales representan las desviaciones estándar.....	201
F.39	Tasa de crecimiento (mm/día) de <i>A. flavus</i> en MEM con diferentes a_w y diferentes dosis de ORE, CAR, CIN y CINHO, incubado a 37 y 25 °C. Las barras de error representan las desviaciones estándar.....	210
F.40	Tasa de crecimiento (mm/día) de <i>A. parasiticus</i> en MEM suplementado con diferentes a_w y diferentes dosis de ORE, CAR, CIN y CINHO, incubado a 37 y 25 °C. Las barras de error representan las desviaciones estándar.....	211
F.41	Producción de AFB1 y AFB2 por <i>A. flavus</i> en MEM en	

	presencia de orégano (Ore), carvacrol (Car), canela (Cin) y cinamaldehído (CinHO) a diferentes dosis, valores de a_w y temperaturas. El periodo de incubación fue de 12 días. Las barras de error representan las desviaciones estándar.....	215
F.42	Producción de AFB1 y AFB2 por <i>A. parasiticus</i> en MEM en presencia de orégano (Ore), carvacrol (Car), canela (Cin) y cinamaldehído (CinHO) a diferentes dosis, valores de a_w y temperaturas. El periodo de incubación fue de 12 días. Las barras de error representan las desviaciones estándar.....	216
F.43	Producción de AFG1 y AFG2 por <i>A. parasiticus</i> en MEM en presencia de orégano (Ore), carvacrol (Car), canela (Cin) y cinamaldehído (CinHO) a diferentes dosis, valores de a_w y temperaturas. El periodo de incubación fue de 12 días. Las barras de error representan las desviaciones estándar.....	217
F.44	Tasa de crecimiento (mm/día) de <i>A. flavus</i> en granos de maíz en presencia de los films EVOH-ORE, EVOH-CAR, EVOH-CIN y EVOH-CINHO a diferentes temperaturas y valores de a_w . Las barras de error representan las desviaciones estándar.....	227
F.45	Tasa de crecimiento (mm/día) de <i>A. parasiticus</i> en granos de maíz en presencia de los films EVOH-ORE, EVOH-CAR, EVOH-CIN y EVOH-CINHO a diferentes temperaturas y valores de a_w . Las barras de error representan las desviaciones estándar.....	228
F.46	Producción de AFB1 y AFB2 por <i>A. flavus</i> en granos de maíz en presencia de los films EVOH-ORE, EVOH-CAR, EVOH-CIN y EVOH-CINHO con diferentes dosis y a diferentes temperaturas y valores de a_w . El periodo de incubación fue de 12 días. Las barras de error	

	representan las desviaciones estándar.....	234
F.47	Producción de AFB1 y AFB2 por <i>A. parasiticus</i> en granos de maíz en presencia de los films EVOH-ORE, EVOH-CAR, EVOH-CIN y EVOH-CINHO, con diferentes dosis y a diferentes temperaturas y valores de a_w . El periodo de incubación fue de 12 días. Las barras de error representan las desviaciones estándar.....	235
F.48	Producción de AFG1 y AFG2 por <i>A. parasiticus</i> en granos de maíz en presencia de los films EVOH-ORE, EVOH-CAR, EVOH-CIN y EVOH-CINHO, con diferentes dosis y a diferentes temperatura y valores de a_w . El periodo de incubación fue de 12 días. Las barras de error representan las desviaciones estándar.....	236
F.49	Tasa de crecimiento (mm/día) de <i>F. sporotrichioides</i> en avena en presencia de los films EVOH-CINHO, EVOH-IEG, EVOH-CIT y EVOH-LIN a diferentes temperaturas y valores de a_w . Las barras de error representan las desviaciones estándar.....	245
F.50	Niveles de las toxinas T-2 y HT-2 (ng/g) en cultivos de <i>F. sporotrichioides</i> en avena tratados con films de EVOH con CINHO, IEG, CIT y LIN con diferentes niveles del compuesto activo (dosis en μg de compuesto activo/cultivo en placa Petri). Temperatura de incubación: 15 °C; a_w : 0,96 y 0,99. Periodo de incubación: 30 días.....	249
F.51	Niveles de las toxinas T-2 y HT-2 (ng/g) en cultivos de <i>F. sporotrichioides</i> en avena tratados con films de EVOH con CINHO, IEG, CIT y LIN con diferentes niveles del compuesto activo (dosis en μg de compuesto activo/cultivo en placa Petri). Temperatura de incubación: 20 °C; a_w : 0,96 y 0,99. Periodo de incubación: 30 días....	249

F.52	Niveles de las toxinas T-2 y HT-2 (ng/g) en cultivos de <i>F. sporotrichioides</i> en avena tratados con films de EVOH con CINHO, IEG, CIT y LIN con diferentes niveles del compuesto activo (dosis en μg de compuesto activo/cultivo en placa Petri). Temperatura de incubación: 28 °C; a_w : 0,96 y 0,99. Periodo de incubación: 30 días.....	250
F.53	Distribución de tamaños de AgNPs analizadas por SP-ICP-MS.....	255
F.54	A) Micrografía de las AgNPs analizadas por TEM, A) Espectro UV-Visible de la suspensión de AgNPs en Tween 80 (0,005%) a las 0, 2, 4, 20 y 30 h.....	256
F.55	Distribución de tamaños de AgNPs analizadas por TEM.....	257
F.56	Viabilidad de las esporas fúngicas de <i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. langsethiae</i> y <i>F. poae</i> en MEM tras los tratamientos con las diferentes dosis de AgNPs. Las barras de error representan las desviaciones estándar.....	259
F.57	Fase lag (días) de las colonias de <i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. langsethiae</i> y <i>F. poae</i> en MEM crecidas a partir de inóculos de esporas no tratadas (controles) y de esporas tratadas con diferentes dosis de AgNPs. Las barras de error no se incluyen debido a su escasa visibilidad.....	262
F.58	Tasa de crecimiento radial (mm/día) de las colonias de <i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. langsethiae</i> y <i>F. poae</i> crecidas en MEM tras los tratamientos con las diferentes dosis de AgNPs. Las barras de error representan las desviaciones estándar.....	264

- F.59 Producción de aflatoxinas ($\mu\text{g/g}$) por *A. flavus* y *A. parasiticus* en los cultivos en MEM tras tratamientos con diferentes dosis de AgNPs. Periodo de incubación: 10 días. Temperatura 37 °C. Las barras de error representan las desviaciones estándar..... 271
- F.60 Producción de tricotecenos T-2 y HT-2 por *F. sporotrichioides* y *F. langsethiae*, y de NIV por *F. poae* ($\mu\text{g/g}$) en MEM tras tratamientos con diferentes dosis de AgNPs. Periodo de incubación: 10 días. Temperatura: 28 °C (*F. sporotrichioides* y *F. poae*) y 25 °C (*F. langsethiae*). Las barras de error representan las desviaciones estándar..... 272

LISTADO DE TABLAS

T.1	Datos de contaminación con AFB1 en muestras de cereales en diversos países en la última década. (Adaptado de Rushing y Selim, 2019).....	35
T.2	Niveles de toxina T-2, toxina HT-2 y la suma de ambas en diferentes granos de cereal no procesados. Algunos percentiles del 95% (P95) no son indicados por no ser estadísticamente robustos al contar con menos de 60 resultados analíticos (EFSA, 2017b).....	41
T.3	Niveles máximos ($\mu\text{g}/\text{kg}$) de aflatoxinas en alimentos autorizados en la UE.....	100
T.4	Niveles máximos recomendados de T-2 + HT-2 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en alimentos en la UE.....	104
T.5	Perfiles de producción de micotoxinas ($\mu\text{g}/\text{g}$) ($n = 3$) de los diferentes aislados de <i>Aspergillus</i> spp. y <i>Fusarium</i> spp. en cultivos <i>in vitro</i> incubados a 25 °C y a_w 0,98.....	165
T.6.	Picos voltamperométricos que aparecen a intervalos de potencial bien definidos (separación mínima de 100 mV) en SWV de micromuestras de colonias fúngicas de las especies ensayadas.....	171

T.7	Parámetros optimizados del método cromatográfico UPLC-ESI-MS/MS operando en modo ESI+. El valor de R^2 fue $>0,99$ para todas las micotoxinas.....	177
T.8	Límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ), porcentaje de recuperación media y desviación estándar relativa media para micotoxinas adicionadas a granos de maíz blancos a cuatro niveles y analizadas mediante UPLC-(ESI+)-MS/MS.....	177
T.9	Límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ), porcentaje de recuperación media y desviación estándar relativa media para micotoxinas adicionadas a granos de avena blancos a cuatro niveles y analizadas mediante UPLC-(ESI+)-MS/MS.....	178
T.10	Presencia de aflatoxinas y de las toxinas T-2 y HT-2 en granos de maíz consumido en España en el periodo 2015-2019 (n= 98).....	180
T.11	Variación anual de aflatoxinas y de las toxinas T-2 y HT-2 en granos de maíz consumido en España entre 2015 y 2019. La AFG1 se ha omitido porque los niveles hallados fueron inferiores al LOQ (concentraciones en ng/g).....	181
T.12	Presencia y niveles de aflatoxinas y de toxinas T-2 y HT-2 en grano de avena comercializadas en España en el periodo 2015-2019 (n= 100).....	186
T.13	Variación anual de los niveles cuantificables de aflatoxinas y de las toxinas T-2 y HT-2 (ng/g) en muestras de avena comercializadas en España entre 2015 y 2019. La AFG1 se ha omitido porque los niveles encontrados fueron siempre inferiores al LOQ.....	187
T.14	DE ₅₀ y DE ₉₀ (mg/L) de los antifúngicos procloraz,	

	tebuconazol y de la mezcla de ambos frente a <i>A. flavus</i> sobre medio YES bajo diferentes condiciones de incubación.....	198
T.15	DE ₅₀ y DE ₉₀ (mg/kg) de los antifúngicos procloraz, tebuconazol y de la mezcla de ambos frente a <i>A. flavus</i> en granos de maíz bajo diferentes condiciones de incubación.....	202
T.16	DE ₅₀ y DE ₉₀ (mg/L) de ORE, CAR, CIN y CINHO frente a <i>A. flavus</i> en MEM bajo diferentes condiciones de incubación.....	212
T.17	DE ₅₀ y DE ₉₀ (mg/L) de ORE, CAR, CIN y CINHO frente a <i>A. parasiticus</i> en MEM bajo diferentes condiciones de incubación.....	212
T.18	DE ₅₀ y DE ₉₀ (mg/placa Petri) de los films de EVOH con ORE, CAR, CIN y CINHO en fase gaseosa contra <i>A. flavus</i> en granos de maíz bajo diferentes condiciones de incubación.....	230
T.19	DE ₅₀ y DE ₉₀ (mg/placa Petri) de los films de EVOH con ORE, CAR, CIN y CINHO en fase gaseosa contra <i>A. parasiticus</i> en granos de maíz bajo diferentes condiciones de incubación.....	230
T. 20	DE ₅₀ , DE ₉₀ y DE ₁₀₀ (µg de compuesto activo/cultivo en placa Petri) de films de EVOH con CINHO, IEG, CIT y LIN en fase gaseosa frente a <i>F. sporotrichioides</i> en avena bajo diferentes condiciones de incubación.....	246
T.21	Dosis efectivas de AgNPs (µg/mL) para reducir el número de esporas viables en MEM en un 50% (DE ₅₀), 90% (DE ₉₀) y 100% (DE ₁₀₀) con respecto a los controles, tras tratamientos con diferentes tiempos de exposición.....	260
T.22	Dosis efectivas de AgNPs (µg/mL) para reducir la tasa de	

	crecimiento radial de las colonias en MEM en un 50% (DE ₅₀), 90% (DE ₉₀) y 100% (DE ₁₀₀) con respecto a los controles, tras tratamientos con diferentes tiempos de exposición.....	265
T.23	Disposición de grupos homogéneos en relación a las dosis de AgNPs, especies fúngicas y tiempos de exposición, con respecto los efectos de AgNPs sobre la viabilidad de las esporas, la fase lag y la tasa de crecimiento en cultivos en MEM según el procedimiento de comparación múltiple de Duncan.....	268
T.24	Disposición de grupos homogéneos en relación a las dosis de AgNPs, tiempos de exposición y especies fúngicas, con respecto a los efectos de las AgNPs en la acumulación de AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2 en cultivos de <i>A. flavus</i> y <i>A. parasiticus</i> en MEM según el procedimiento de comparación múltiple de Duncan.....	273
T.25	Disposición de grupos homogéneos en relación a las dosis de AgNPs, tiempos de exposición y especies fúngicas, con respecto a los efectos de las AgNPs en la acumulación de T-2, HT-2 y NIV en cultivos de <i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. langsethiae</i> y <i>F. poae</i> en MEM según el procedimiento de comparación múltiple de Duncan.....	274

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

- 3-Ac-DON: 3-acetil-deoxinivalenol.
- a.C.: Antes de Cristo.
- AE: Aceite esencial.
- AF (Aflatoxinas): AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, AFM1, AFM2, AFM2A, AFG2A, AFGM1, AFGM2, AFGM2A, AFB3, AFP1, AFQ.
- AFI: Aflatoxin hazard Index/Índice de peligro de aflatoxinas.
- AFPA: *A. flavus* and *A. parasiticus* agar.
- AgNPs: Nanopartículas de plata.
- ANOVA: Analysis of variance/Análisis de la varianza.
- ASE: Accelerated solvent extraction/Extracción acelerada con disolventes.
- ATA: Aleucia tóxica alimentaria.
- ATP: Adenosín trifosfato.
- BEA: Beauvericina.
- CAM: Coconut agar medium/Medio agar coco.
- CAR: Carvacrol.

- CIN: Cinnamon essential oil/Aceite esencial de canela.
- CINHO: Cinamaldehído.
- CIT: Citral.
- CMF: Minimal fungicide concentration/Concentración mínima fungicida.
- CMI: Minimal inhibitory concentration/Concentración mínima inhibitoria.
- CREA: Medio agar creatina sacarosa.
- CV: Cyclic voltammetry/Voltimetría cíclica.
- CYA: Medio agar Czapek extracto de levadura.
- Da: Daltons.
- DAS: Diacetoxiscirpenol.
- DAD: Diode array detector/Detector de fila de diodos.
- d.C.: Después de Cristo.
- DON: Deoxinivalenol.
- DNA: Deoxyribonucleic acid/Ácido desoxirribonucleico.
- cDNA: ADN complementario.
- rDNA: ADN ribosómico.
- ECD: Electron capture detector/Detector de captura de electrones.
- DE₅₀, DE₉₀, DE₁₀₀: Dosis efectivas para la reducción del crecimiento en un 50%, 90% y 100%, respectivamente.
- EFSA: European Food Security Authorities/Autoridades Europeas para la Seguridad Alimentaria.
- ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay.
- ESI: Electrospray ionization/Ionización por electronebulización.
- EO: Essential oil.

- EPA: Environmental Protection Agency/Agencia de protección ambiental.
- EU: European Union.
- EVOH: Ethylene-vinyl alcohol copolymer/Copolimero de etileno-alcohol vinílico.
- FDA: U. S. Food and Drug Administration/Administración de alimentos y medicamentos de Estados Unidos.
- FESEM: Field emission scanning electron microscopy/Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo.
- FIA: Fluorescence immunoassay/Inmunoensayo de fluorescencia.
- FID: Flame ionization detector/Detector de ionización de llama.
- FLD: Fluorescence detector/Detector de fluorescencia.
- GC: Gas chromatography/Cromatografía de gases.
- GCE: Glassy carbon electrode/Electrodo de pasta de carbón vitrificado.
- GRAS: Generally recognized as safe/Generalmente reconocido como seguro.
- ha: Hectárea(s).
- HPLC: High performance liquid chromatography/Cromatografía líquida de alta eficacia.
- IAC: Immunoaffinity columns/Columnas de inmunoafinidad.
- IARC: International agency for research on cancer/Agencia internacional para la investigación sobre el cáncer.
- ICP-MS: Inductively coupled plasma mass spectrometry/Espectrometría de masas por plasma acoplado inductivamente.
- IEG: Isoeugenol.
- IGS: Intergenic spacer region/Región espaciadora intergénica.
- ITS: Internal transcribed spacer region/Región espaciadora transcrita interna.

- IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry/Unión Internacional de Química Pura y Aplicada.
- JECFA: Joint Expert Committee on Food Additives/Comité Conjunto de Expertos en Aditivos Alimentarios.
- kGY: Kilogray.
- LAB: Lactid acid bacteria/Bacterias del ácido láctico.
- LDPE: Low-density polyethylene/Polietileno de baja densidad.
- LIN: Linalol.
- LOD: Limit of detection/Límite de detección.
- LOQ: Limit of quantification/Límite de cuantificación
- LSV: Linear sweep voltammetry/Voltametría de exploración de potencial lineal.
- MAE: Microwave-assisted extraction/Extracción asistida por microondas.
- MEA: Medio agar extracto de malta.
- MEC: Medio agar extracto de malta-cloranfenicol.
- MEM: Maize extract medium/Medio extracto de maíz.
- MISPE: Molecular imprinted solid-phase extraction/Extracción en fase sólida por impronta molecular (cartuchos de extracción).
- MLs: Maximum levels/Niveles máximos.
- MMEAL: Maize meal extract agar medium/Medio agar extracto de harina de maíz.
- mPA: Megapascal(es).
- MRL: Maximum residue limit/Límite máximo de residuo.
- MRM: Multiple reaction monitoring/Monitorización de reacciones múltiples.
- NEO: Neosolaniol.
- NIV: Nivalenol.

- OMS: Organización Mundial de la Salud.
- ORE: Orégano.
- OTA: Ocratoxina A.
- Pa: Pascal(es).
- PCR: Polymerase chain reaction/Reacción en cadena de la polimerasa.
- PDA: Potato dextrose agar/Agar patata dextrosa.
- PDA-D: Potato dextrose agar-Dichloran/Agar patata dextrosa-Diclorán.
- PET: Polyethylene terephthalate/Tereftalato de polietileno.
- PP: Polipropileno.
- PSA: Agar patata sacarosa.
- PVDF: Fluoruro de polivinilideno (filtros).
- qPCR: Quantitative PCR/PCR cuantitativa.
- RAPDs: Random amplified polymorphic DNA/Técnica de DNA polimórfico amplificado al azar.
- RFLPs: Restriction fragment length polymorphism/Fragmentos de restricción de longitud polimórfica.
- RNA: Ribonucleic acid/Ácido ribonucleico.
- ROS: Reactive oxygen species/Especies reactivas del oxígeno.
- RSD: Relative standard deviation/Desviación estándar relativa.
- RT-PCR: Reverse transcription-PCR/PCR asociada a la transcripción inversa.
- SECM: Scanning electrochemical microscopy/Microscopía electroquímica de barrido.
- SFE: Supercritical fluid extraction/Extracción con fluidos supercríticos.
- SPE: Solid-phase extraction/Extracción en fase sólida (cartuchos de extracción).

- SP-ICP-MS: Espectrometría de plasma acoplado inductivamente con detector de masas en modo partícula única.
- SSE: Solución salina estéril.
- SWV: Square wave voltammetry/Voltametría de onda cuadrada.
- TD-GC: Cromatografía de gases de desorción térmica.
- TDI: Tolerable daily intake/Ingesta diaria tolerable.
- TEM: Transmission electron microscopy/Microscopía electrónica de transmisión.
- TLC: Thin-layer chromatography/Cromatografía en capa fina.
- Tm: Toneladas métricas.
- UE: Unión Europea.
- UFC: Unidades formadoras de colonia.
- UPLC-ESI-MS/MS: Ultra-high performance liquid chromatography-ionization electrospray-tandem mass spectrometry/ Cromatografía líquida de ultra alta eficacia acoplada a espectrometría de masas en tándem mediante ionización por electronebulización.
- UV: University of Valencia/Universidad de Valencia.
- VCR: Velocidad de crecimiento radial.
- VIMP: Voltammetry of immobilized particles/Voltametría de partículas inmovilizadas.
- YEPD: Yeast extract peptone dextrose broth/Caldo extracto de levadura con peptona y glucosa.
- YES: Yeast extract sucrose medium/Medio agar extracto de levadura-sacarosa.
- ZEA: Zearalenona

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN

1.	Características generales de los hongos.....	1
2.	Micotoxicosis. Evolución histórica	5
3.	Taxonomía fúngica	11
3.1.	Caracterización morfológica y molecular.....	13
3.2.	Nuevos métodos de identificación basados en voltamperometría de estado sólido.....	17
4.	Género <i>Aspergillus</i> : Sección <i>Flavi</i>	20
5.	Género <i>Fusarium</i> : Sección <i>Sporotrichiella</i>	26
6.	Micotoxinas en cereales.....	32
6.1.	Aflatoxinas.....	32
6.1.1.	Presencia.....	34
6.1.2.	Toxicidad.....	37
6.2.	Tricotecenos: Las toxinas T-2 y HT-2.....	39

6.2.1.	Presencia.....	41
6.2.2.	Toxicidad.....	46
7.	Producción mundial de maíz y avena.....	47
8.	Factores que afectan al desarrollo fúngico y a la producción de micotoxinas.....	50
8.1.	Temperatura.....	51
8.2.	Actividad de agua.....	54
8.3.	Sustrato.....	55
8.4.	Concentración de iones H ⁺ (pH).....	56
8.5.	Composición de gases de la atmósfera.....	57
8.6.	Fotoperiodo.....	58
8.7.	Interacciones microbianas.....	59
8.8.	Insectos.....	61
8.9.	Prácticas agrícolas y de almacenamiento.....	62
9.	Agentes antifúngicos.....	68
9.1.	Antifúngicos sintéticos.....	70
9.1.1.	Procloraz.....	71
9.1.2.	Tebuconazol.....	73
9.2.	Antifúngicos naturales: aceites esenciales.....	76
10.	Films bioactivos y su posible aplicación en el control de hongos productores de aflatoxinas o de las toxinas T-2 y HT-2.....	79
11.	Nanopartículas de plata (AgNPs) y su posible aplicación en el control de hongos productores de aflatoxinas o de las toxinas T-2 y HT-2.....	84

12.	Métodos para la determinación de micotoxinas en granos de cereales.....	86
13.	El cambio climático y su efecto en el crecimiento de hongos y en la producción de micotoxinas.....	93
14.	Legislación de micotoxinas en alimentos en la UE.....	98

II. OBJETIVOS

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1.	Material.....	107
1.1.	Reactivos, disolventes, patrones de micotoxinas y pequeño material.....	107
1.1.1.	Reactivos.....	107
1.1.2.	Disolventes.....	109
1.1.3.	Patrones de micotoxinas.....	110
1.1.4.	Pequeño material.....	110
1.2.	Medios de cultivo y disoluciones.....	111
1.3.	Agentes antifúngicos.....	115
1.3.1.	Agentes antifúngicos sintéticos.....	115
1.3.2.	Aceites esenciales.....	116
1.4.	Equipos.....	116
1.5.	Software.....	118
2.	Métodos.....	119
2.1.	Análisis de las especies productoras de aflatoxinas o de las toxinas T-2 y HT-2 en las muestras de maíz y	

avena.....	119
2.1.1. Toma de muestras de maíz y avena.....	119
2.1.2. Recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) de posibles especies productoras de aflatoxinas o de las toxinas T-2 y HT-2.....	120
2.1.3. Confirmación de la identificación de las especies fúngicas por métodos basados en el DNA.....	121
2.1.4. Análisis estadístico.....	123
2.2. Aplicación de métodos de identificación fúngica basados en voltamperometría de estado sólido.....	124
2.2.1. Mediciones electroquímicas.....	125
2.2.2. Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM, Field emission scanning electron microscopy).....	126
2.3. Determinación de aflatoxinas y de las toxinas T-2 y HT-2 en las muestras de maíz y avena.....	127
2.3.1. Disoluciones estándar de las micotoxinas.....	127
2.3.2. Extracción y análisis de las micotoxinas.....	127
2.3.3. Validación del método UPLC-ESI-MS/MS.....	129
2.3.4. Tratamiento de datos.....	130
2.4. Ensayos con agentes antifúngicos incluidos en el medio de cultivo.....	131
2.4.1. Efecto de procloraz y tebuconazol en el crecimiento fúngico.....	131
2.4.2. Efecto de procloraz y tebuconazol en la producción de micotoxinas.....	134
2.4.3. Efecto de los aceites esenciales en el crecimiento	

fúngico.....	137
2.4.4. Efecto de los aceites esenciales en la producción de micotoxinas.....	139
2.5. Ensayos con films bioactivos.....	140
2.5.1. Efecto de los films bioactivos en el crecimiento de <i>A. flavus</i> y <i>A. parasiticus</i> y en la producción de aflatoxina	140
2.5.2. Efecto de los films bioactivos en el crecimiento de <i>F. sporotrichioides</i> y en la producción de las toxinas T-2 y HT-2.....	145
2.6. Ensayos con nanopartículas de plata (AgNPs).....	146
2.6.1. Preparación de las AgNPs.....	146
2.6.2. Caracterización de las AgNPs.....	148
2.6.3. Efecto de las AgNPs en el crecimiento de los hongos.	149
2.6.4. Efecto de las AgNPs en la producción de micotoxinas.	152

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Contaminación de las muestras de maíz y avena con hongos productores de aflatoxinas o de las toxinas T-2 y HT-2.....	157
1.1. Confirmación de la identificación de las especies por métodos basados en el DNA.....	163
1.2. Discriminación entre especies fúngicas productoras de micotoxinas por métodos de voltamperometría de estado sólido.....	163
1.2.1. Ruta electroquímica.....	167
1.2.2. Discriminación de especies.....	170
2. Aflatoxinas y tricotecenos de tipo A (toxinas T-2 y HT-	

2) en las muestras de maíz y avena.....	176
2.1. Validación del método.....	176
2.2. Determinación de micotoxinas en las muestras de maíz y avena.....	180
3. Ensayos con agentes antifúngicos.....	194
3.1. Eficacia de los azoles en el control del crecimiento de <i>A. flavus</i> y en el control de la producción de aflatoxinas.....	194
3.2. Efecto de diferentes aceites esenciales y de componentes de los mismos en el crecimiento de <i>A.</i> <i>flavus</i> y <i>A. parasiticus</i> y en la producción de aflatoxinas.....	208
3.2.1. Efecto en el crecimiento.....	208
3.2.2. Efecto en la producción de aflatoxinas.....	213
3.3. Eficacia de films de EVOH con aceites esenciales en el crecimiento de <i>A. flavus</i> y <i>A. parasiticus</i> y en la producción de aflatoxinas.....	225
3.3.1. Características de los films activos obtenidos.....	225
3.3.2. Efecto en el crecimiento.....	226
3.3.3. Efecto en la producción de aflatoxinas.....	231
3.4. Efecto de films de EVOH con compuestos activos de aceites esenciales en el crecimiento de <i>F.</i> <i>sporotrichioides</i> y en la producción de las toxinas T-2 y HT-2.....	244
3.4.1. Efecto sobre el crecimiento.....	244
3.4.2. Efecto sobre la producción de las toxinas T-2 y HT-2..	247
3.5. Efecto de nanopartículas de plata (AgNPs) en el crecimiento de las especies productoras de	

	aflatoxinas o de las toxinas T-2 y HT-2 y en la producción de las micotoxinas.....	254
3.5.1.	Caracterización de las AgNPs.....	254
3.5.2.	Efecto de las AgNPs en la viabilidad de las esporas....	258
3.5.3.	Efecto de las AgNPs en el crecimiento de las colonias fúngicas.....	261
3.5.4.	Efecto de las AgNPs en la producción de micotoxinas.	269

V. CONCLUSIONES

VI. BIBLIOGRAFÍA

I. INTRODUCCIÓN

1. Características generales de los hongos

Los hongos son organismos eucariotas ampliamente distribuidos en la naturaleza. Presentan una pared celular compuesta principalmente por quitina y glucosamina que confiere rigidez a las células manteniendo su forma al tiempo que previene su lisis osmótica. Además de ello, la pared celular fúngica limita la entrada al interior de la célula de compuestos que puedan resultar perjudiciales para el hongo. Las células fúngicas carecen de cloroplastos y clorofila y, por tanto, no llevan a cabo la fotosíntesis. Son, por ello, organismos quimioheterótrofos. Para descomponer la materia orgánica producen una amplia variedad de exoenzimas que, en algunos casos, pueden servirles como factores de virulencia frente al hospedador.

Se conoce más de medio millón de especies fúngicas (Hawksworth et al., 1995), pero se cree que pueden existir entre un millón y un millón y medio. Inicialmente los hongos fueron incluidos en

el Reino *Plantae*. Sin embargo, estudios filogenéticos mediante la aplicación de técnicas moleculares han descartado su pertenencia a dicho reino y han revelado que están incluso más cerca del reino *Animalia* que del reino *Plantae*. Ya en el sistema de clasificación de los seres vivos en cinco reinos propuesto por Robert Harding Whittaker en 1969 (Whittaker, 1969) y apoyado posteriormente por otros científicos como Lynn Margulis o Karlene V. Schwartz (Margulis, 1974; Margulis y Schwartz, 1998), se consideró el reino *Fungi* (o reino Hongos), como un reino con características anatómicas, fisiológicas y estructurales propias e independientes del resto de reinos (*Monera*, *Protista*, *Plantae* y *Animalia*). Posteriormente, los estudios filogenéticos llevados a cabo por Woese y basados en las secuencias del RNA de la subunidad pequeña de los ribosomas dividieron a los seres vivos en tres dominios: *Archaea*, *Bacteria* y *Eukaria* (Woese et al., 1990). Los hongos presentan básicamente dos tipos de morfología: los hongos pluricelulares presentan una morfología filamentosa, mientras que los hongos unicelulares presentan una morfología levaduriforme.

Los hongos filamentosos pueden desarrollarse sobre materia orgánica como frutas o cereales generando colonias de diverso aspecto: algodonoso, pulverulento, aterciopelado, etc., y de diversas tonalidades. El cuerpo principal de estos hongos lo constituyen las hifas, que se originan a partir de la germinación de las esporas, aunque con menor frecuencia pueden generarse a partir de células de hifas preexistentes. Las hifas tienden a ramificarse produciendo una maraña de filamentos denominada micelio. El micelio sufre una diferenciación celular conformándose por un lado el micelio vegetativo que penetra en el sustrato invadido por el hongo para obtener los nutrientes de este y, por otro, el micelio aéreo, que se extiende sobre el sustrato sin penetrar en él y genera las estructuras vegetativas o reproductoras.

En cuanto a su reproducción, en la mayoría de los hongos esta es tanto por vía sexual como asexual. El estado sexual se denomina teleomorfo o meiospórico y el asexual, anamorfo o mitospórico. Algunos hongos presentan doble nomenclatura asociada a ambos

estados debido a que en un principio fueron nombrados independientemente como dos especies distintas.

Los hongos tienen una gran versatilidad para adaptarse a diferentes sustratos, hospedadores y condiciones ambientales. Esto hace que sean contaminantes habituales en diversas cosechas. Generalmente los hongos filamentosos son aerobios estrictos, mientras que los levaduriformes son anaerobios facultativos. Todos los hongos, por lo general son capaces de tolerar una amplia gama de temperaturas y niveles de actividad de agua, aunque los distintos géneros y especies presentan diferentes valores óptimos en los cuales su crecimiento se ve favorecido. En cuanto al pH del medio, la mayoría de hongos crecen de forma óptima a pH en torno a 5.

Los hongos pueden usar como nutrientes compuestos orgánicos como ácidos nucleicos, proteínas, carbohidratos y lípidos, todos ellos compuestos esenciales para su metabolismo primario que se asocia con las fases de germinación y crecimiento. Los metabolitos secundarios se producen tras el desarrollo inicial del hongo. Estos son una serie de compuestos no esenciales para el crecimiento vegetativo.

Cabe destacar que muchas especies fúngicas proporcionan importantes beneficios a la humanidad (Meyer et al., 2011) como fuente de alimentos, aplicaciones en farmacología (producción de antibióticos, por ejemplo), biotecnología o biorremediación, por su participación en los ciclos biogeoquímicos, etc. Entre los beneficios de estas especies cabe destacar la producción de enzimas, metabolitos secundarios de interés, aminoácidos o ácidos orgánicos. Como ejemplos se pueden citar las especies *Aspergillus oryzae*, que ha sido empleada para la producción de α -amilasa, enzima muy utilizada en la industria panadera (Wosten et al., 2007) o *A. niger* que ha sido empleada para la producción de ácido cítrico y ácido glucónico (Papagianni, 2007). Los productos obtenidos a partir de estas dos especies poseen la Categoría General de Alimentos Seguros (GRAS, Generally Recognized as Safe) de la Agencia Estadounidense de Alimentación y Medicamentos (FDA, 2016). Sin embargo, la mayor

parte de especies fúngicas son patógenas para el hombre, animales o plantas, bien por generar infecciones agudas y crónicas, podredumbres y deterioro de alimentos o por producir compuestos tóxicos. Entre estos destacan las micotoxinas, metabolitos fúngicos secundarios de frecuente incidencia en productos agroalimentarios destinados a la alimentación humana y animal. Por ello, considerando la capacidad productora de micotoxinas de muchas especies fúngicas, es importante la realización de una correcta caracterización y la elección de una cepa adecuada para evitar problemas sanitarios relacionados con intoxicaciones alimentarias.

Las micotoxinas son producidas por los llamados hongos toxigénicos. La función de estos metabolitos es defensiva, pues ayudan a las especies fúngicas a lidiar con competidores en un determinado sustrato; de hecho, su producción suele ser estimulada bajo condiciones de estrés ambiental ligadas a la activación de los genes implicados en su biosíntesis (Jayashree y Subramanyam, 1999; Schmidt-Heydt et al., 2008). De entre estos, las especies más relevantes pertenecen a los géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Alternaria* (Pitt y Hocking, 2009). Estos hongos proliferan e invaden cultivos agrícolas, como cereales, frutales u hortalizas, entre otros, al tiempo que liberan micotoxinas que quedarán en estos productos y podrán ser incorporadas a la cadena alimentaria. Los efectos de las micotoxinas sobre la salud se conocen como micotoxicosis. Su gravedad depende de la micotoxina, de la vía y grado de exposición, de la edad y el estado nutricional del individuo y de los posibles efectos sinérgicos o antagónicos entre diferentes micotoxinas u otros agentes químicos a los que haya estado expuesto el individuo. La incidencia de las micotoxicosis es superior en las zonas más pobres, como determinados países de África donde cuentan con una mala gestión del transporte y el almacenamiento, además de un clima caracterizado por una elevada temperatura y una alta humedad (FAO, 1991). Las micotoxicosis pueden ser agudas, caracterizadas por una gran toxicidad debido a la ingesta de elevadas dosis, que pueden conducir a una muerte casi instantánea del individuo, o crónicas, asociadas al

consumo de dosis bajas durante un periodo de tiempo más prolongado.

Esta Tesis Doctoral se centra en especies relevantes de los géneros *Aspergillus* (*A. flavus* y *A. parasiticus*) y *Fusarium* (*F. sporotrichioides*, *F. langsethiae* y *F. poae*) y las micotoxinas que producen. Estas especies y micotoxinas están consideradas como objetivo prioritario en materia de calidad y seguridad alimentarias, principalmente en maíz y avena (Horizon, 2020).

2. Micotoxicosis. Evolución histórica

Las micotoxicosis han tenido una gran influencia en las sociedades humanas a lo largo de su historia. Ya en el Éxodo de la Biblia están documentadas una serie de plagas históricas para las que la ciencia, con el paso del tiempo, ha encontrado explicaciones razonables. Entre los siglos XVI y XV a.C. entró en erupción un gran volcán situado en la isla Santorini (Grecia) que afectó a una amplia zona del Mediterráneo y, especialmente, a Egipto. Como consecuencia de dicha erupción se originó una gran cantidad de cenizas ricas en sulfatos que provocaron una acidificación de las aguas del río Nilo y que estas adquiriesen una tonalidad rojiza, lo cual explica la auténtica razón de la que fue interpretada como la primera de las plagas de Egipto descritas en el Éxodo (“Las aguas se convirtieron en sangre”). La acidificación de las aguas del Nilo provocó la muerte de poblaciones enteras de peces y alteró sustancialmente la cadena trófica del ecosistema del Nilo. Este hecho, junto con los efectos provocados por la erupción volcánica, puede explicar las siguientes ocho plagas bíblicas. Hay que tener en cuenta que el Nilo fue muy importante para Egipto, pues sus aguas tuvieron un gran interés para el regadío y la pesca. La décima plaga tiene su origen en la escasez de alimentos que se originó cuando los sedimentos del Nilo no pudieron fertilizar los campos de cultivo y la pesca se vio diezmada. En aquella época existía la tradición de proteger especialmente a los primogénitos de

cada familia por ser los futuros herederos del patrimonio familiar; así eran estos los primeros en ser alimentados con las reservas de grano que habían sido almacenadas en silos durante largos periodos de tiempo y bajo unas condiciones de temperatura y humedad que favorecerían el desarrollo y proliferación de hongos filamentosos que producirían grandes cantidades de micotoxinas y, por tanto, estos individuos murieron debido a micotoxicosis agudas. Al ser los primogénitos los primeros a los que se ofrecían las reservas de grano, estos consumían la porción superior de los silos, que es la que había estado en mayor contacto con el aire y en la que, por tanto, el desarrollo fúngico debió ser mayor y, por ende, también, la producción de micotoxinas. Tras la muerte de los primogénitos, el faraón (probablemente Ramsés II de la decimonovena dinastía (1301-1234 a.C.) decidió la liberación del pueblo judío al asociar todo lo acontecido con un castigo divino y estos pudieron emigrar a la tierra prometida (Mart y Maloy, 1996).

El imperio romano fue pionero en el desarrollo de metodologías de conservación de alimentos frente al desarrollo fúngico. Estos asignaron a partir del siglo VII a.C. la protección de cosechas y árboles al dios Robigus. En su honor, y para rogar la protección de sus cultivos frente a la roya negra (*Puccinia graminis*), hongo que contaminaba sus cosechas, establecieron la festividad que fue denominada “Robigalia” y que se celebraba cada 25 de abril, época en la que se empezaban a formar las espigas en los cereales. Esta festividad consistía en una procesión que partía del centro de Roma y finalizaba a las afueras de la ciudad donde se ofrecía el sacrificio de una oveja y un perro al dios Robigus como ofrenda para rogarle por la protección de las cosechas. Esta festividad fue acogida posteriormente por el cristianismo, y paso a ser conocida como la festividad de San Marcos. La tradición de la procesión fue mantenida hasta el siglo VII (Richard, 2007).

Situándonos en el continente europeo, la única micotoxicosis de proporciones epidémicas de la que se tiene constancia a lo largo de la historia ha sido el ergotismo provocado por la ingesta de micotoxinas alcaloides durante la Edad Media. Estas toxinas son producidas por

hongos del género *Claviceps* (*C. purpurea* y *C. fusiformis*), y conocidos también como ergot o cornezuelo del centeno. Pese a ser hongos patógenos del centeno, también pueden afectar a otras especies de cereales y vegetales en general. Las esporas producidas por estos hongos permanecen en estado inactivo en el suelo y, en condiciones de temperatura templada y humedad, se desarrollan en forma de tallo en cuya cabeza esférica se forman las ascosporas, que son liberadas en torno a los ocho días tras la formación del tallo. Estas esporas al desarrollarse originan micelios y, posteriormente, a partir de estos surgen esclerocios, que albergan reservas alimenticias y constituyen, por tanto, estados de resistencia. El ergotismo se caracteriza por episodios de vasoconstricción periférica que puede inducir dolor y gangrenas, así como diversas alteraciones del sistema nervioso central. Fue conocido como “el fuego sagrado” debido a que provocaba una sensación de quemazón en las piernas de las personas afectadas. Durante siglos, se produjeron en Europa varios brotes de ergotismo asociados a periodos de guerra y hambrunas prolongados, en los que era muy frecuente que las personas recurriesen al consumo de centeno almacenado durante grandes periodos de tiempo y contaminado por estos alcaloides debido a las proclives condiciones de los silos de almacenamiento para el desarrollo de los hongos productores.

En el siglo XI, San Antonio fue asociado a la protección del ergotismo y sus reliquias fueron trasladadas desde Constantinopla hasta Francia. Cabe decir que Francia era uno de los países europeos más aquejados por la epidemia. En la ciudad francesa de Vienne se fundó la Orden de San Antonio, y fue reconocida por el Papa Urbano II en el año 1093 d.C., con lo que se popularizó la figura de este santo, y la visita a su santuario fue considerada la mejor cura frente al ergotismo. Sin embargo, y dejando a un lado la religión, la causa de la mejora de los pacientes que realizaban la peregrinación hacia este santuario se basó en que, durante el viaje de peregrinación, que podía durar varias semanas, cesaba la exposición a la comida contaminada por ergot (Hardman et al., 1996). A partir del renacimiento, los grandes

brotos epidémicos del ergotismo fueron reemplazados por brotes localizados en Francia, Alemania, Inglaterra, Irlanda, Noruega, Suecia y Rusia.

Se piensa que las personas que fueron consideradas culpables de practicar la brujería en realidad eran enfermos y enfermas aquejados de ergotismo, pues los comportamientos que se describieron en ellos coinciden con los síntomas de la enfermedad (alucinaciones, convulsiones, espasmos y desordenes en el habla). Un ejemplo de esto es el caso de los juicios de Salem: En la ciudad de Salem se originó un brote de ergotismo entre diciembre de 1691 y agosto de 1692 que afectó principalmente a niñas y mujeres jóvenes. Las consecuencias de dicho brote se pueden atribuir a las condiciones climáticas de la primavera y el verano precedentes a las cosechas de los cereales, que fueron estaciones cálidas y húmedas, lo que pudo favorecer el desarrollo del cornezuelo del centeno. Tras los juicios, veinte personas fueron condenadas a muerte y ejecutadas por brujería y otras dos murieron en la cárcel (Caporael, 1976). Con los avances en agricultura y la diversificación de la alimentación la frecuencia de aparición de casos de ergotismo se redujo rápidamente, no obstante, han llegado a existir epidemias de la enfermedad en el norte y el este de Europa hasta el siglo XIX, y el más reciente caso conocido y de importante trascendencia ocurrió en China entre 1984 y 1985 (Coker, 2000).

En 1942, en plena Segunda Guerra Mundial, se describieron en la antigua URSS episodios hemorrágicos por consumo de pan preparado a partir de cereales que habían sido contaminados por hongos del género *Fusarium* (principalmente *F. poae* y *F. sporotrichioides*) productores de tricotecenos. Estos episodios se acompañaron de una elevada caída en el nivel de leucocitos (leucopenia). Esta enfermedad fue denominada aleucia tóxica alimentaria (ATA) (Yagen y Joffe, 1976). A lo largo de la historia hay descritos más episodios relacionados con la ATA. Entre ellos destaca un envenenamiento de caballos en Japón asociado al consumo de vainas de judías (Ueno et al., 1972). La ATA se caracteriza por una

primera fase aguda que se produce unas horas después de la ingesta de las toxinas fúngicas y cuyos principales síntomas son irritación generalizada de las mucosas del aparato digestivo superior (cavidad bucal y faringe), debilidad, vómitos y sensación de quemazón bucal; seguida de una segunda fase crónica en caso de que continúe la ingesta de las toxinas, consistente en leucopenia, granulopenia, trombocitopenia, linfocitosis, aparición de erupciones rojizas en la piel y más hemorragias. En la última fase de la enfermedad debido a fenómenos gangrenosos y necróticos en la faringe, la deglución se vuelve muy dolorosa. Esta fase viene además acompañada de hemorragias nasales, orales, gástricas e intestinales (Peraica y Raši, 2012).

Otro fenómeno trascendente asociado a micotoxicosis es el síndrome del arroz amarillo o “beri beri”, consistente en una afección cardíaca aguda asociada con la ingesta de citreoviridina presente en arroz contaminado por *Penicillium citreonigrum*. Este episodio ocurrió en regiones frías de Japón entre finales del siglo XIX y principios del siglo XX, cuando debido a las bajas temperaturas se generó un clima idóneo para el desarrollo de esta especie fúngica tras la cosecha del arroz.

Otro episodio destacable fue la nefropatía endémica de los Balcanes, descrita por primera vez en 1956 en dicho lugar, y que tiene como protagonista a la ocratoxina A (OTA) (Radic et al., 1997).

Sin embargo, el hecho que verdaderamente marca el inicio del interés por las micotoxinas y el reconocimiento de sus perjuicios sobre la salud humana y animal ocurrió en 1960, cuando una enfermedad hepática aguda diezmo las poblaciones de pavos en granjas de Gran Bretaña. Esta patología que causó la muerte de más de cien mil pavos fue conocida en un principio como “Enfermedad X de los pavos”. Más tarde se descubrió que esta patología había sido causada por unas micotoxinas conocidas como aflatoxinas, producidas por hongos del género *Aspergillus* y, en concreto, de la sección *Flavi*, siendo el principal y más conocido productor *Aspergillus flavus* (de hecho, el

nombre “aflatoxinas” se atribuye a la abreviatura de “*Aspergillus flavus* toxins”). El brote procedía de una partida de harina de cacahuete originaria de Brasil y transportada en barco. A partir de este incidente se estudiaron las micotoxinas por considerarlas unos compuestos de gran gravedad en alimentos y, concretamente, se comprobó que las aflatoxinas (AF) eran potentes hepatocarcinógenos en humanos y animales. En 1961 se estudiaron métodos para el cultivo de cepas de *A. flavus* y las condiciones idóneas para la producción de AF, y se pudo comprobar que solo el 30% de las cepas de esta especie eran productoras, y que los métodos microbiológicos clásicos de identificación fúngica no eran suficientes para distinguir entre cepas productoras y no productoras de AF o de cualquier otra micotoxina (Bradburn et al., 1994), por lo que se fue avanzando en la implantación de métodos de caracterización fisiológicos y moleculares.

Otro brote importante de AF ocurrió en 2004 en Kenia, donde 125 personas fallecieron y 317 resultaron gravemente afectadas por intoxicación tras ingerir maíz contaminado con estas micotoxinas. Estas muertes se vincularon mayoritariamente al consumo de maíz producido por pequeños agricultores. Debido a la escasez de alimentos, los granjeros pudieron haber cosechado el maíz con anterioridad al periodo habitual para prevenir hurtos en sus campos, de manera que los granos no estarían suficientemente maduros ni secos en el momento de la recogida, por lo que pudieron ser más susceptibles a la contaminación fúngica con posterioridad a la cosecha (Lewis et al., 2005).

Los que se han mencionado son solo algunos de los acontecimientos históricos relacionados con hongos filamentosos y micotoxinas, aunque se han registrado muchos más. Sin embargo, esta reseña resulta útil para ilustrar la importancia que tuvo la búsqueda de explicaciones científicas a las enfermedades que se consideraban capricho de los dioses o actos de brujería y la implicación que han podido tener los hongos productores de micotoxinas en estos episodios.

3. Taxonomía fúngica

Según la clasificación de Whittaker, el Reino *Fungi* se divide en 4 filos denominados *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Zygomycota* y *Chytridiomycota*. Actualmente se conoce también el filo *Glomeromycota* (Ruggiero et al., 2015), y este está compuesto por especies que fueron inicialmente clasificadas dentro del filo *Zygomycota*. Los filos *Ascomycota* y *Basidiomycota* pertenecen al subreino *Dikarya* y se caracterizan por presentar una fase dicariótica bien diferenciada, y los filos *Zygomycota*, *Chytridiomycota* y *Glomeromycota* pertenecen al subreino *Eomycota* y se caracterizan por ser hongos quitinosos sin auténtica fase dicariótica. A continuación se detallan estos filos:

Los hongos ascomicetos (Filo *Ascomycota*) constituyen una división muy amplia que incluye más de 30000 especies lo que supone un 45% de las especies de hongos conocidas actualmente. Estos hongos presentan micelio septado y dicariótico. En algunos grupos los poros que forman los septos están taponados por los denominados *corpúsculos de Woronin*. Este es el filo más amplio del Reino *Fungi* y agrupa tanto a hongos filamentosos como levaduriformes. Su reproducción puede ser asexual por formación de conidios, procesos de fragmentación de las hifas, fisión o gemación, y sexual, mediante esporas exógenas (conidios o conidiosporas), por contacto entre gametangios, por espermatización, por somatogamia o por conjugación en el caso de las levaduras. En general, son saprófitos o descomponedores, aunque también existen parásitos (de animales, del hombre y de plantas) y simbioses con insectos como las hormigas o formando parte de líquenes y micorrizas. Están presentes mayoritariamente en ambientes terrestres, aunque también se conocen algunos que habitan en aguas dulces y saladas.

Los hongos basidiomicetos (Filo *Basidiomycota*) representan el filo más evolucionado y más conocido con más de 20000 especies, aproximadamente un 30% del total de los hongos conocidos. Poseen

hifas septadas dicarióticas (con dos núcleos). Su estructura tiene forma de botella y se conoce con el nombre de basidio; microsporangio que produce las basidiosporas, que son esporas haploides, exógenas y uninucleadas originadas por meiosis. Su reproducción asexual tiene lugar por gemación, fragmentación del micelio en segmentos pluricelulares, fragmentación de hifas en porciones unicelulares y por producción de conidios. Su reproducción sexual ocurre por somatogamia debida a la fusión de hifas compatibles, aunque también se da por procesos de espermatización en los que los espermacios se fusionan con hifas somáticas o con hifas receptoras especializadas. Pueden ser saprófitos, simbioses o parásitos. Entre los representantes de este filo destacan setas, trufas, royas, tizones y levaduras.

Los hongos zygomycetos (Filo *Zygomycota*) se caracterizan por presentar un micelio cenocítico y muy ramificado, aunque algunas especies con micelio muy reducido presentan septos espaciados regularmente. Forman diferentes tipos de esporas: por un lado, las zygosporas, que presentan gruesas paredes y son de origen sexual, y por otro, las esporangiosporas o esporas endógenas que se forman en el interior de los esporangios y los conidios o esporas exógenas que son de origen asexual. Atendiendo a su ecología estos hongos pueden ser saprófitos, parásitos de plantas, animales u otros hongos o simbioses con las raíces de plantas vasculares formando las micorrizas. El moho negro del pan (*Rhizopus nigricans*) es un representante bien conocido de este grupo, así como la mayoría de hongos conocidos como mohos que producen masas de hifas sobre diversos alimentos como frutas y pan deteriorándolos.

Los hongos chytridiomicetos (Filo *Chytridiomycota*) son los únicos representantes del reino *Fungi* que desarrollan células móviles en algún momento de su ciclo de vida, motivo por el cual tradicionalmente han sido considerados protistas. Aunque algunos quitridios habitan en plantas o insectos la mayoría vive en aguas dulces o en tierra firme. Su reproducción puede ser sexual o asexual. Para que se produzca la reproducción asexual se han de formar en los esporangios planosporas o zoosporas que pierden el flagelo y

pueden sufrir enquistamientos antes de germinar. Son mayormente saprófitos, pues actúan invadiendo materia orgánica y degradando principalmente quitina y queratina, aunque también los hay parásitos de protistas, plantas y animales, de entre los que destacan representantes del género *Batrachochytrium*, patógenos de anfibios que amenazan su población mundial.

Los hongos glomeromicetos (Filo *Glomeromycota*) son mayoritariamente simbioses de plantas terrestres que forman endomicorrizas con las raíces de estas, aunque también los hay simbioses de cianobacterias. Sus esporas, conocidas como glomerosporas, son asexuales, de gran tamaño, multinucleadas, carecen de flagelos y cuentan con varias cubiertas. Estas, al germinar, desarrollan hifas que crecen hacia las raíces de las plantas. Las micorrizas que desarrollan pueden ser arbusculares (forman ramificaciones o arbusculos) o vesiculares (forman nodos con sustancias de reserva). Sus hifas son cenocíticas o escasamente septadas. Las especies del género *Glomus* spp. son algunas de las representantes de este filo.

3.1. Caracterización morfológica y molecular

La identificación de hongos filamentosos tradicionalmente ha sido llevada a cabo atendiendo a características morfológicas o estructurales, a las que pronto se unió el estudio de características fisiológicas, en particular de los perfiles de producción de micotoxinas. Con el paso de los años han surgido nuevos métodos que han complementado a los anteriores, particularmente útiles en los casos de identificaciones conflictivas.

La caracterización morfológica incluye los métodos más antiguos que hasta el presente no han perdido su importancia y vigencia. Estos se basan en la observación macroscópica y microscópica de los hongos crecidos en medios generales, selectivos y diferenciales. Los

criterios macroscópicos son principalmente el color de las colonias en el anverso y el reverso de las placas al crecer en diferentes medios de cultivo, la posible pigmentación del medio como consecuencia del crecimiento del hongo, la textura de la colonia (lisa, rugosa, en anillos, verrucosa o estriada), el grado de esporulación, la morfología del borde de las colonias (entera, rizada, erosionada, ondulada o lobulada), la consistencia (algodonosa, viscosa, pulverulenta o mantecosa) o la presencia o ausencia de exudado. Algunos de los principales criterios microscópicos se basan en la morfología de las hifas, que pueden ser septadas o cenocíticas, en la morfología de los conidióforos o cuerpos fructíferos y en la morfología de las esporas.

Este tipo de caracterización cuenta con ciertas desventajas como la laboriosidad de los métodos empleados y el hecho de que no permita diferenciar cepas de una misma especie ni, en ocasiones, especies de un mismo género, por lo que estos métodos no siempre son concluyentes y pueden dar lugar a identificaciones erróneas (Frisvad et al., 2005; Pildain et al., 2008). Debido a esto el desarrollo de otros métodos que permiten una discriminación a nivel de especie y cepa ha tenido un gran impacto en la taxonomía fúngica. Estos han sido los métodos moleculares, basados en el DNA del hongo que son especialmente útiles en la distinción de especies y cepas fúngicas morfológicamente indistinguibles. El uso combinado de las características micro- y macromorfológicas y los métodos basados en el DNA permiten de una manera sencilla la distinción entre especies cercanas filogenéticamente, como *F. sporotrichioides*, *F. langsethiae* y *F. poae* (Schmidt et al., 2004a) así como entre cepas productoras y no productoras de AF (Degola et al., 2009; Sardiñas et al., 2011).

Los primeros métodos de biología molecular aplicados a la identificación y taxonomía fúngica fueron “Southern Blot” y “DNA fingerprinting” (Varela et al., 2000). Ambos procedimientos básicamente consisten en la hibridación del DNA para el reconocimiento de secuencias que puedan ayudar en la identificación de estos organismos. En la actualidad las técnicas más populares se basan en la “reacción en cadena de la polimerasa” (PCR).

La PCR permite obtener millones de copias de un fragmento dado de DNA siempre que se conozca la secuencia de los extremos que limitan dicho fragmento para poder diseñar los cebadores que iniciarán la síntesis. Para llevarla a cabo se necesita el DNA molde a amplificar, los cebadores o *primers* que se unirán a las secuencias de interés para su posterior amplificación, los nucleótidos y la enzima Taq polimerasa. Esta enzima fue aislada de la bacteria *Thermus aquaticus* y su diferencia respecto a otras polimerasas radica en que es capaz de permanecer estable y actuar a altas temperaturas.

El DNA amplificado por esta técnica es posteriormente cargado en geles de agarosa y sometido a electroforesis que separará bandas en el gel. Esta tecnología resulta especialmente útil para buscar secuencias génicas específicas que pueden marcar la diferencia entre especies distintas, o incluso entre cepas de una misma especie.

Los métodos más usuales basados en la PCR son:

- PCR con el empleo de cebadores específicos para las secuencias de interés (Gil-Serna et al., 2009, 2013; Mateo et al., 2011b). Una secuencia de interés puede estar o no involucrada en la síntesis de alguna micotoxina y puede albergar genes codificantes o regiones no codificantes como las regiones espaciadoras intergénicas (IGS, intergenic spacer region) o las regiones espaciadoras transcritas internas (ITS, internal transcribed spacer). Una de las regiones más empleadas para distinguir entre especies de hongos filamentosos es la del DNA ribosómico (rDNA). En esta técnica las regiones de DNA con mayor variación permiten la distinción entre especies muy cercanas evolutivamente, mientras que las regiones más conservadas son más apropiadas para comparar especies más alejadas.
- PCR asociada a la transcripción inversa (RT-PCR, reverse transcription-PCR) permite la detección de RNA mensajero (mRNA) gracias a la amplificación del DNA complementario

a este (cDNA), que es sintetizado por transcripción inversa a partir de dicho RNA. Las aplicaciones de esta técnica se centran en el estudio de la expresión de determinados genes de interés, especialmente de aquellos implicados en la síntesis de micotoxinas (Chen et al., 2019; Tanaka et al., 2019).

- PCR cuantitativa (qPCR), que se diferencia de la PCR convencional en que permite monitorizar la amplificación del DNA a tiempo real mediante el empleo de moléculas fluorescentes o de sondas (Nielsen et al., 2012; Rodríguez et al., 2012; Sardiñas et al., 2011). Esta técnica puede llevarse a cabo tanto con DNA genómico como con cDNA, pero si se lleva a cabo sobre el cDNA proporciona valores cuantitativos precisos de expresión génica. La qPCR es más rápida que la PCR convencional y la visualización de los resultados es digital, de modo que no requiere cargar el material genético en geles. Además, la qPCR también tiene un mayor rango de amplificación, y puede basarse en genes de copia única o en secuencias multicopia del rDNA, lo cual aumenta la sensibilidad del método.
- Técnica de polimorfismo para la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs, restriction fragment length polymorphism), que se basa en la amplificación de determinadas secuencias de DNA con cebadores específicos y en la posterior digestión con enzimas de restricción (Garmendia et al., 2018, Llorens et al., 2006a, 2006b; Nasri et al., 2015).
- Estudio de DNA polimórfico amplificado al azar (RAPDs, random amplified polymorphic DNA) (Giusiano et al., 2017; Khodadadi et al., 2011; Sartori et al., 2006). En esta técnica para la amplificación se utilizan cebadores cortos. No obstante, esta técnica presenta problemas como la falta de reproducibilidad y la presencia de reacciones cruzadas.

- Polimorfismo para la longitud de los fragmentos amplificados (AFLPs, amplified fragment length polymorphism) que permite detectar niveles elevados de polimorfismos y es más reproducible que la técnica de RAPDs (Perrone et al., 2006; Restrepo et al., 2018).

3.2. Nuevos métodos de identificación basados en voltamperometría de estado sólido

Los métodos moleculares han sido totalmente novedosos y de gran aplicabilidad. Sin embargo, requieren, a menudo, personal experto y el coste económico que implican no está al alcance de todos los laboratorios. Por ello, el diseño de nuevas técnicas de fácil y rápida aplicación y de bajo coste capaces de distinguir entre hongos, en particular entre las especies productoras de micotoxinas más relevantes, es un reto en el campo de la toxicología y seguridad alimentaria.

Una técnica que puede tener potencial en este campo es la conocida como voltamperometría de partículas inmovilizadas (VIMP, voltammetry of immobilized particles) (Doménech-Carbó et al., 2020; Scholz et al., 2015). Esta es una técnica electroanalítica que data de finales de la década de los años 80 del siglo pasado (Nitschke et al., 1989; Scholz et al., 1989a, 1989b, 1989c) basada en la medida de la corriente en una celda electroquímica en función del potencial aplicado a un electrodo. Ha sido aplicada a la identificación de especies de los hongos de los géneros *Aspergillus* y *Fusarium* por primera vez en la presente tesis con resultados muy satisfactorios. En concreto, en este trabajo se registran las señales eléctricas asociadas a la oxidación de compuestos polifenólicos de la superficie de las esporas fúngicas de especies muy relevantes, identificadas previamente mediante métodos microbiológicos convencionales y técnicas de PCR. Estas señales o perfiles voltamperométricos han permitido discriminar entre especies fúngicas y, por tanto, podrían permitir la detección de las mismas en

cultivos fúngicos derivados de muestras naturales. El proceso oxidativo conlleva una degradación de las esporas fúngicas, lo cual puede apreciarse mediante la visualización de preparaciones de las mismas en microscopía de emisión de campo (FESEM, field-emission microscopy) y en microscopía electrónica de barrido (SECM, scanning electrochemical microscopy).

Para desarrollar esta técnica es necesario disponer de una celda electroquímica de trabajo y distintos tipos de electrodos: un electrodo de trabajo de pasta de carbón vítreo (GCE, glassy carbon electrode) sobre el que se coloca la materia que se pretenda analizar, un electrolito auxiliar de alambre de platino y un electrolito de referencia o soporte que será la disolución de una determinada molaridad y pH incluida en la celda (Figura 1). Las dimensiones del electrodo de trabajo deben ser pequeñas para intensificar su tendencia a la polarización.

El fundamento de la técnica se centra en la aplicación de un voltaje en los modos lineal (LSV, linear potential scan), cíclico (CV, cyclic voltammetry) y por voltamperometría de onda cuadrada (SWV, square wave voltammetry) a unas muestras determinadas, que en la presente tesis fue micelio fúngico de especies de diversas secciones de los géneros *Aspergillus* y *Fusarium*, y de varias cepas de algunas de estas especies, con el objetivo de determinar el nivel de discriminación que podía alcanzar esta tecnología.

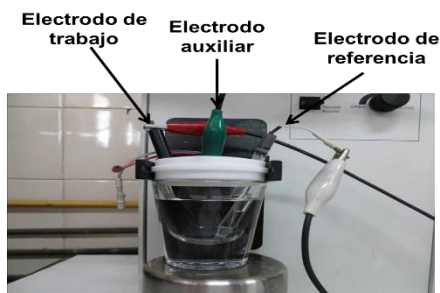


Figura 1. Celda electroquímica con los electrodos de trabajo, de referencia y auxiliar conectados.

Los análisis electroquímicos correlacionan potenciales de acción, intensidad de corriente u otros parámetros electroquímicos con la capacidad antioxidante (Bara et al., 2008). El potencial (E) se aplica siempre entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia y variará con el tiempo de manera distinta según el modo de aplicación del voltaje. La corriente de la celda electroquímica pasa entre el electrodo de trabajo y el electrodo auxiliar. Al registrar la intensidad de corriente en función del potencial entre los electrodos de trabajo y de referencia se obtienen voltamperogramas.

Las reacciones electroquímicas se dividen en catódicas o de reducción y anódicas o de oxidación, que son las empleadas en esta técnica identificativa. En ellas la respuesta voltamétrica puede ser debida a la liberación de ciertos componentes celulares o a posibles procesos transmembrana como ha sido descrito para diversos sistemas biológicos (Doménech-Carbó et al., 2016; Yu et al., 2014).

Dada la variedad de compuestos electroactivos presentes en la materia biológica y a su presencia en cantidades variables, las señales voltamperométricas consisten en una serie de picos superpuestos cuya intensidad se relaciona con la cantidad relativa de estos compuestos en la superficie de las esporas de las diferentes especies. Estudios en *A. niger* han mostrado que la cubierta de la pared de las esporas juega un papel fundamental en su naturaleza electrostática, ya que la desprotonación de grupos carboxilo unidos a melanina es muy probablemente la responsable de la liberación de pigmentos en condiciones ácidas (Wargenau et al., 2011). Estos picos se visualizan al representar en un gráfico la intensidad de la corriente en el eje de ordenadas frente al potencial en el eje de abscisas y pueden servir con fines identificativos.

A partir de mapas de colores e imágenes topográficas obtenidas por las técnicas SECM y FESEM es posible apreciar cambios en la región situada entre la materia a analizar, el electrodo de trabajo y el electrolito de referencia, y así se puede comprobar el efecto de los pulsos eléctricos sobre la materia.

La técnica VIMP también ha sido aplicada en la identificación de diversas variedades vegetales (Doménech-Carbó et al., 2015a; 2015b), en un estudio de recurrencia en cáncer de vejiga (Doménech-Carbó et al., 2018) e incluso en temas de ámbitos tan diversos como la identificación de monedas (Doménech-Carbó et al., 2017) o de obras de arte (Doménech-Carbó et al., 2019).

4. Género *Aspergillus*: Sección *Flavi*

El género *Aspergillus* está ampliamente distribuido en la naturaleza. Fue catalogado por primera vez por el biólogo italiano Pier Antonio Micheli que empleó dicho término haciendo referencia a la similitud morfológica de la cabeza conidial de estos hongos con el instrumento religioso empleado para dispersar agua bendita “*Aspergillum*” (Figura 2). La descripción que hizo Micheli de estos hongos quedó registrada en su obra *Nova Plantarum Genera*. En un principio, este género fue incluido en el antiguo filo de los *Deuteromicetes* debido a que no se conocía el estado teleomorfo de sus especies. Sin embargo, en la actualidad se ha observado que aproximadamente un tercio de las especies de *Aspergillus* posee un estado sexual (Geiser, 2008; Pitt y Hocking, 2009).



Figura 2. Morfología del instrumento “*Aspergillum*” (izquierda) y conidióforos de hongos del género *Aspergillus* (derecha).

Este género está incluido en el filo de los *Ascomycetes* y, dentro de este, en la clase *Eurotiomycetes*, subclase *Eurotiomycetidae*, orden *Eurotiales* y en la familia *Trichocomaceae*.

Estos hongos pueden ser saprofitos sobre materia orgánica en descomposición o comensales, cuando crecen en plantas en desarrollo sin afectar a su fisiología.

Las especies del género *Aspergillus* se han considerado principalmente hongos típicos de post-cosecha (Magan y Aldred, 2007; Pitt y Hocking, 2009) u hongos que se desarrollan en la última fase de maduración de los frutos como ocurre en el caso de *A. carbonarius* en la uva (Battilani et al., 2003; Medina et al., 2005; Varga et al., 2006). Sin embargo, dentro del género hay también especies oportunistas implicadas en patologías humanas como la aspergilosis pulmonar invasiva, las infecciones fúngicas en oídos (otomicosis) y uñas (onitomicosis) o la sinusitis alérgica. Entre las especies de *Aspergillus* de interés clínico son destacables *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. terreus*, *A. clavatus*, *A. flavus*, *A. niveus* y *A. ustus* (Kradin y Mark, 2008). El exceso de humedad en cavidades como el oído o las fosas nasales, o la retirada de un exceso de cera de los oídos están íntimamente ligados al desarrollo de infecciones fúngicas.

Para la identificación morfológica de los hongos del género *Aspergillus* el color es la principal característica a tener en cuenta. Así estos pueden mostrar distintos tonos de verde, pardo, amarillo, blanco, negro o gris. Sus hifas están tabicadas y en los cuerpos fructíferos o conidióforos a partir de las fiálides se desarrollan cadenas de conidios. La morfología de la cabeza conidial es también un criterio taxonómico, y estas pueden tener cuatro formas básicas: hemisférica, globosa, en columna o claviforme (Figura 3). En contacto con las fiálides están las células de soporte conocidas como métulas. Algunas especies presentan células de Hülle, que son apreciables al microscopio óptico y cuya función se desconoce. Como resultado del estudio de características macroscópicas y microscópicas se han podido agrupar las especies del género *Aspergillus* en diferentes secciones, como la

sección *Flavi*, cuyos principales representantes son hongos aflatoxigénicos (Klich y Pitt, 1992; Kozakiewicz, 1989; Peterson et al., 2000). Los representantes de la sección *Flavi* son hongos con cabezas conidiales globosas que desarrollan colonias con textura aterciopelada de una tonalidad que puede ir de verdosa-amarillenta a marrón en el anverso y de dorado a marrón o rojizo en el reverso (Hedayati et al., 2007).

La mayoría de especies de la sección *Flavi*, producen esclerocios de diferentes formas y tamaños de color marrón oscuro o negro. Las cepas de *A. flavus* producen esclerocios de globosos a subglobosos de un diámetro aproximado entre 400 y 700 μm , raramente sobrepasando 1 mm (Figura 4) (Raper y Fennell, 1965). Los representantes de la sección *Flavi*, como la especie *A. flavus*, se dividen en dos morfotipos: el morfotipo L, que produce esclerocios de un diámetro medio superior a 400 μm , y el morfotipo S que produce esclerocios cuyo diámetro medio es inferior a esta medida (Cotty, 1989). La mayoría de cepas de *A. flavus* conocidas hasta el momento pertenecen al morfotipo L. Además, las células de *A. flavus* son multinucleadas (Runa et al., 2015). Otro criterio de identificación atiende al crecimiento fúngico en medios de cultivo determinados. Las especies de la sección *Flavi* producen colonias transparentes de 35 a 50 mm de diámetro aproximadamente tras 7 días de crecimiento en medio CREA (agar creatina sacarosa), mientras que en los medios CYA (agar Czapek extracto de levadura), MEA (agar extracto de malta) y YES (agar extracto de levadura-sacarosa), a excepción de la especie *A. coremiiformis*, todas desarrollan un diámetro de más de 50 mm en el mismo periodo (Frisvad et al., 2019).

Algunos representantes de la sección *Flavi*, como *A. flavus*, son capaces de producir sinemas (grupos de conidióforos largos unidos en la base y separados en el ápice) en medio agar Czapek (Bartoli y Maggi, 1978; Danmek et al., 2014; McAlpin, 2001); otros, como *A. parasiticus*, *A. oryzae*, *A. nomius* o *A. pseudotamarii*, no lo son (Danmek et al., 2014). El desarrollo de esta estructura ha sido también descrito en especies aisladas en selvas tropicales, por lo que podría

ser un carácter ancestral dentro de la sección. Otro criterio identificativo es la temperatura a la que una especie es capaz de crecer sobre un determinado sustrato. La mayoría de especies del clado de *A. flavus* pueden crecer moderadamente bien a temperaturas de hasta 42 °C (Frisvad et al., 2019).

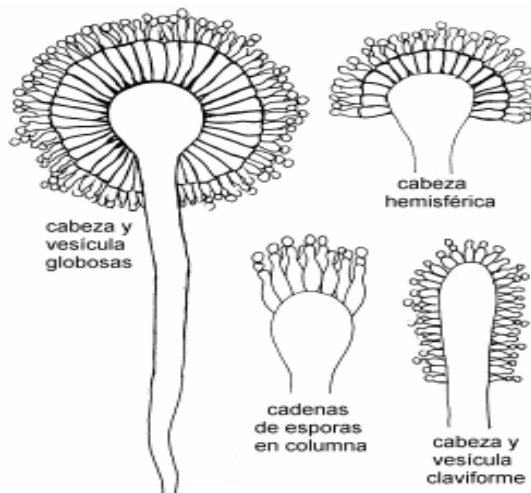


Figura 3. Morfología de la cabeza conidial de especies del género *Aspergillus* (Carrillo, 2003).

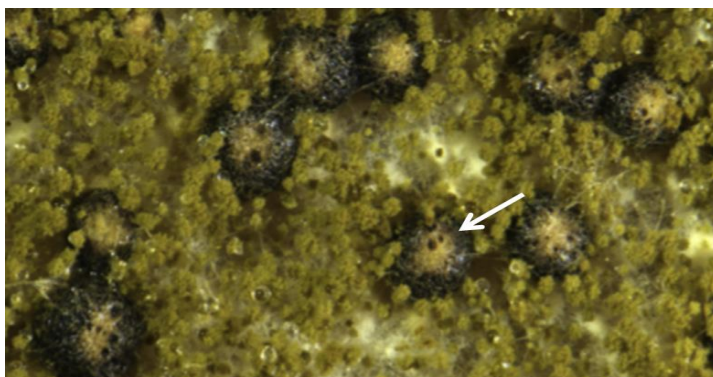


Figura 4. Esclerocios visibles en cultivo de *A. flavus* (Frisvad et al., 2019).

Las especies pertenecientes a la sección *Flavi* se encuentran muy extendidas en la naturaleza, especialmente en regiones de clima tropical y subtropical y se aíslan con frecuencia a partir de suelos, forrajes, cultivos agrícolas y materia orgánica en descomposición (Abbas et al., 2009; Pushvinder y Desai, 2006). Las especies más destacables dentro de la sección son *A. flavus* y *A. parasiticus* (Figuras 5 y 6). *A. flavus* es la que presenta mayor incidencia y la principal especie implicada en la producción de las aflatoxinas B1 (AFB1) y B2 (AFB2) en alimentos. Sin embargo, *A. parasiticus* es una especie mucho más productora de estas toxinas y, además, produce las aflatoxinas G1 (AFG1) y G2 (AFG2) (Schmidt-Heydt et al., 2010).

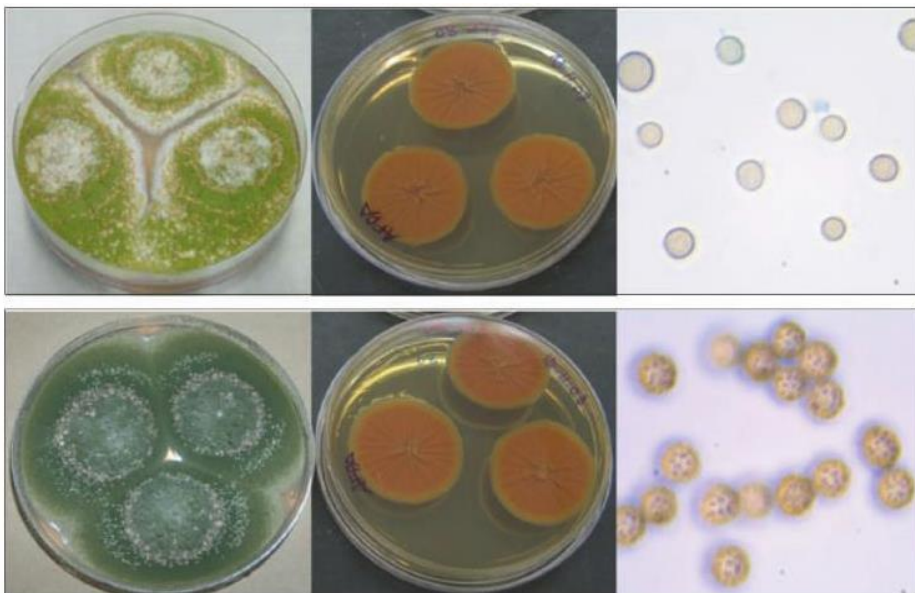


Figura 5. Características fenotípicas usadas para la diferenciación de morfotipos. (a) Morfotipo *A. flavus*; (b) Morfotipo *A. parasiticus*. De izquierda a derecha: color de la colonia en CYA (Czapek yeast autolysate); color del reverso de la colonia en AFPA (*A. flavus* y *A. parasiticus* agar) y ornamentación de los conidios (Rodriguez et al., 2011).

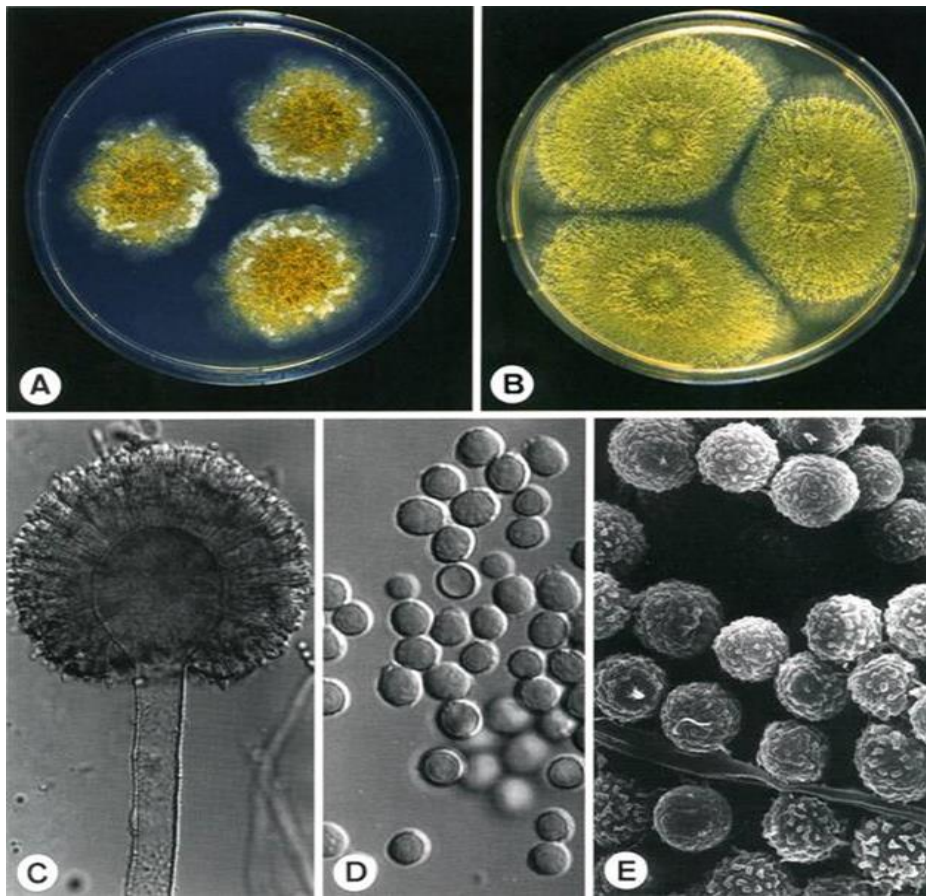


Figura 6. *A. flavus*. A) colonias en Agar Czapek incubadas durante 14 días a 25 °C, B) colonias en MEA incubadas durante 14 días a 25 °C, C) conidióforo (cuerpo fructífero) X530, D) conidios X1820, E) conidios X8655. C, D y E son imágenes obtenidas por SECM (Tzean et al. 1990).

A. flavus y *A. parasiticus* y, en menor medida, *A. nomius*, son especies aflatoxigénicas muy importantes en salud humana y animal. No obstante, la sección es amplia (Frisvad et al., 2019) y algunas especies de la misma pueden producir también otras micotoxinas como ocratoxina A (OTA), ácido tenuazónico, ácido ciclopiazónico o

ácido kójico (Frisvad et al., 2019). El estudio de especies de esta sección en maíz y avena española es uno de los objetivos de la presente tesis doctoral.

5. Género *Fusarium*: Sección *Sporotrichiella*

Fusarium es uno de los géneros fúngicos más importantes y muestra una amplia distribución en todo el mundo. Este género pertenece al filo *Ascomycota*, clase *Sordariomycetes*, subclase *Hypocreomycetidae*, orden *Hypocreales* y familia *Nectriaceae*.

Algunas especies de este género solo presentan un estado anamorfo o fase asexual; otras, además, pueden presentar un estado teleomorfo o fase sexual. Tradicionalmente para establecer la clasificación de las especies pertenecientes a este género se ha tenido en cuenta parámetros como el estudio de su morfología colonial, el hecho de poseer o no la capacidad de producir esporas asexuales (macroconidios, mesoconidios, microconidios y clamidosporas), su pigmentación, y la presencia o ausencia de peritecios, aunque desde los años 90, al igual que para la identificación de otras especies, estos métodos clásicos han sido complementados con metodologías de análisis basadas en el perfil de metabolitos que producen las especies y técnicas basadas en el DNA (Edwards et al., 2012; Gil-Serna et al., 2013). Los hongos pertenecientes al género *Fusarium* presentan una coloración muy variada (blanca, rosada, anaranjada, púrpura, celeste, verdosa o parda), especialmente en el reverso de las colonias. Sus fiálides son finas y en forma de botella. Estas pueden ser cortas o largas, simples o ramificadas y monofialídicas o polifialídicas (dependiendo de si las esporas emergen de un poro de la fiálide o de varios de ellos, respectivamente). Estas especies pueden producir diferentes tipos de esporas:

- **Macroconidios:** Son hialinos, septados y presentan forma de media luna (Figuras 8 y 9). Se utilizan como un criterio de

identificación. Para ello se observan parámetros como su longitud, anchura, curvatura, septos, capacidad para organizar esporodoquios (agrupaciones mucoides) y detalles de las células apical y basal o pie, situadas en los extremos del hongo.

- **Mesoconidios:** Son estructuras septadas y similares a los macroconidios, pero de menor tamaño y con ausencia de célula basal. Además, nunca forman esporodoquios. Solo están presentes en unas pocas especies de *Fusarium*.
- **Microconidios:** Poseen una morfología variable, con formas fusiformes, elipsoidales, claviformes u ovals y las agrupaciones conocidas como “falsas cabezas” distribuidas en cadenas de mayor o menor longitud (Figuras 8 y 9). Están ausentes en algunas especies.
- **Clamidosporas:** Se caracterizan por mostrar una doble pared gruesa que puede ser lisa o rugosa y una disposición que puede ser tanto aislada como en parejas o grupos. Estas esporas son las responsables de la persistencia de hongos del género *Fusarium* en suelos durante años.

Los representantes de este género fúngico se agrupan en varias secciones (Nelson et al., 1983); de entre ellas, una de las más relevantes es la sección *Sporotrichiella* por incluir especies productoras de importantes micotoxinas y por su frecuencia en diversos cultivos agrícolas. El estudio de especies de esta sección en maíz y avena de España es uno de los objetivos de la presente tesis doctoral.

Las principales micotoxinas producidas por los hongos de la sección *Sporotrichiella* son las toxinas T-2 y HT-2, ambas tricotecenos de tipo A. Las especies más relevantes implicadas en su producción son *F. sporotrichioides* y *F. langsethiae* (Thrane et al., 2004). Estas especies, además, producen otras toxinas como nivalenol (NIV), producido por la especie *F. poae* (Martin et al., 2018; Thrane et al., 2004), diacetoxyscirpenol (DAS) y neosolaniol (NEO) producidos por *F.*

langsethiae y *F. sporotrichioides* (Kokkonen et al., 2010), beauvericina (BEA) producida por *F. langsethiae*, fusarina C producida por *F. sporotrichioides* (Thrane et al., 2004) y otras, como escirpentriol, eniatinas, aurofusarina o culmorinas (Langseth et al., 1998; Thrane et al., 2004).

En la Figura 7 se muestran dos visualizaciones de una imagen multidimensional obtenida a partir de: estudio de secuencias de DNA de las regiones ITS (internal transcribed spacer regions), de secuencias parciales de la región IGS (intergenic spacer region), de secuencias de los genes de la β -tubulina y del factor de elongación alpha-1 (EF-1 α), del análisis de fragmentos de restricción (AFLP fingerprints), de los perfiles de metabolitos secundarios que presentan obtenidos por métodos cromatográficos y del estudio de la morfología microscópica y aspecto de las colonias en medios adecuados. En esa figura se observa claramente que existen tres agrupamientos de cepas bien definidos sin solapamientos entre sí que corresponden a cepas de las especies *F. sporotrichioides*, *F. langsethiae* y *F. poae* (Schmidt et al., 2004b). La morfología que presentan los conidios y conidióforos de *F. sporotrichioides* se muestra en la Figura 8; para *F. poae* y *F. langsethiae* se muestra en las Figuras 9 y 10, respectivamente.

Desde que se conoció la alta frecuencia de *F. langsethiae* en avena en el centro y norte de Europa se han llevado a cabo numerosos estudios en los que se han analizado cepas de esta especie para determinar su capacidad productora de las toxinas T-2 y HT-2 en diversas condiciones ambientales y bajo la presión de tratamientos con agentes antifúngicos (Mateo et al., 2011a, 2013; Medina y Magan, 2010, 2011). Previamente al descubrimiento de la especie *F. langsethiae*, la presencia de tricotecenos tipo A en cereales se correlacionaba con la especie *F. sporotrichioides*; de hecho, al igual que *F. poae*, su detección en cereales se ha descrito a nivel mundial (Glenn, 2007; Visconti et al., 1985), mientras que *F. langsethiae* se ha detectado principalmente en las zonas del centro y norte de Europa (Torp y Adler, 2004; Torp y Nirenberg, 2004) y diversos estudios

establecen una correlación entre esta especie y la presencia de las toxinas T-2 y HT-2 en avena procedente de países del norte de Europa (Edwards et al., 2012; Fredlund et al., 2013).

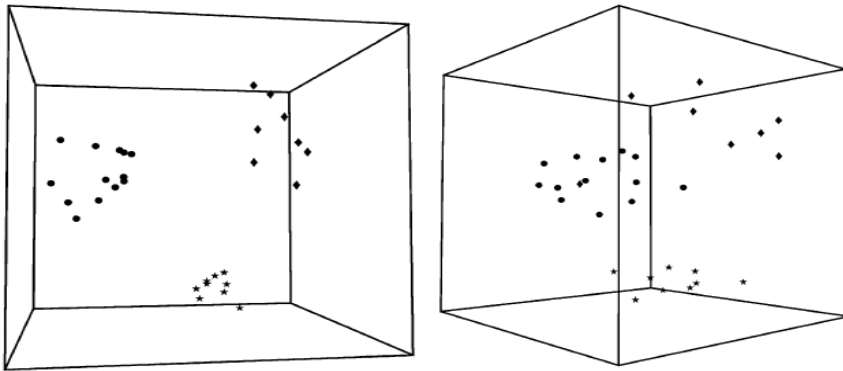


Figura 7. Dos visualizaciones de un gráfico de escalamiento multidimensional (multidimensional scaling, MDS graph) obtenido a partir de similitudes de secuencias de las regiones IGS e ITS, secuencias parciales del gen de la β -tubulina, producción de metabolitos (datos cromatográficos), AFLPs y datos fenotípicos de cepas de *F. poae* ●, *F. sporotrichioides* * y *F. langsethiae* ◆ (Schmidt et al., 2004b).

En Reino Unido, Edwards et al. (2012) encontraron DNA de *F. langsethiae* en casi todas las muestras de avena recogidas y analizadas entre 2002 y 2005, lo que indica la presencia de esta especie en el grano, independientemente de los posibles tratamientos a los que hubiera estado sometido previamente. De hecho, este estudio proporcionó una fuerte evidencia de que *F. langsethiae* era la principal, si no la única, especie responsable de la incidencia de las toxinas T-2 y HT-2 en avena del Reino Unido. *F. poae* se detectó en el 90% de las muestras analizadas. Sin embargo, no se halló DNA de *F. sporotrichioides* en ninguna de las muestras analizadas.

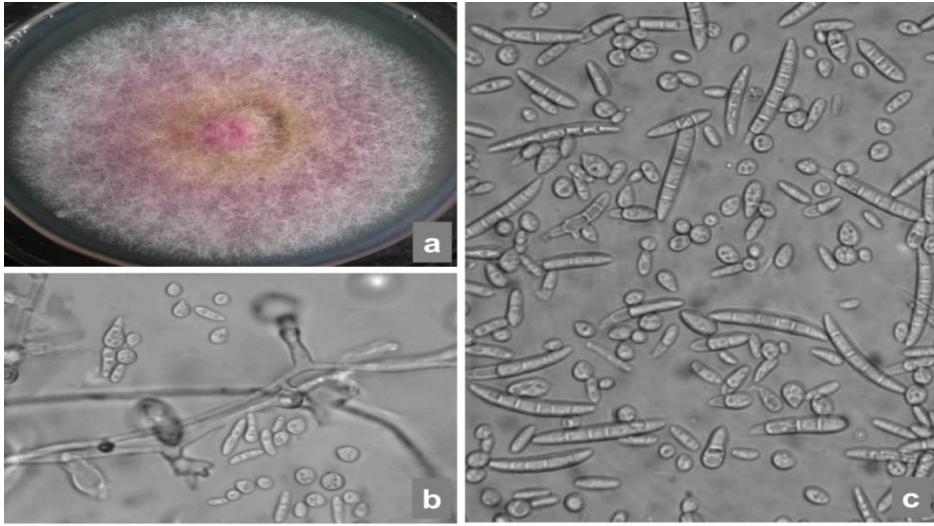


Figura 8. *F. sporotrichioides* a) cultivos de 7 días en PSA a 25 °C en oscuridad, b) conidióforos y micelio aéreo, c) macroconidios y microconidios (Gagkaeva, 2008).

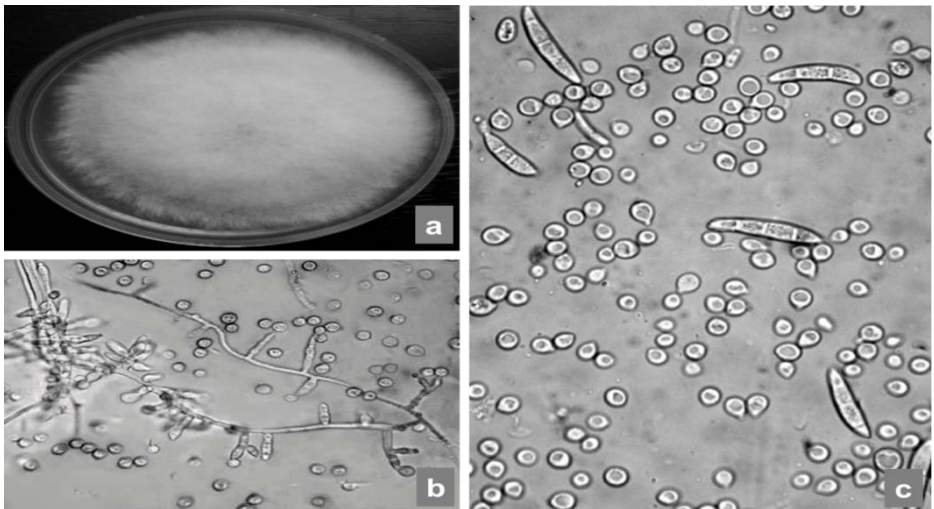


Figura 9. *F. poae* a) cultivos de 7 días en PSA a 25 °C en oscuridad, b) conidióforos y micelio aéreo, c) macroconidios y microconidios (Gagkaeva, 2008).

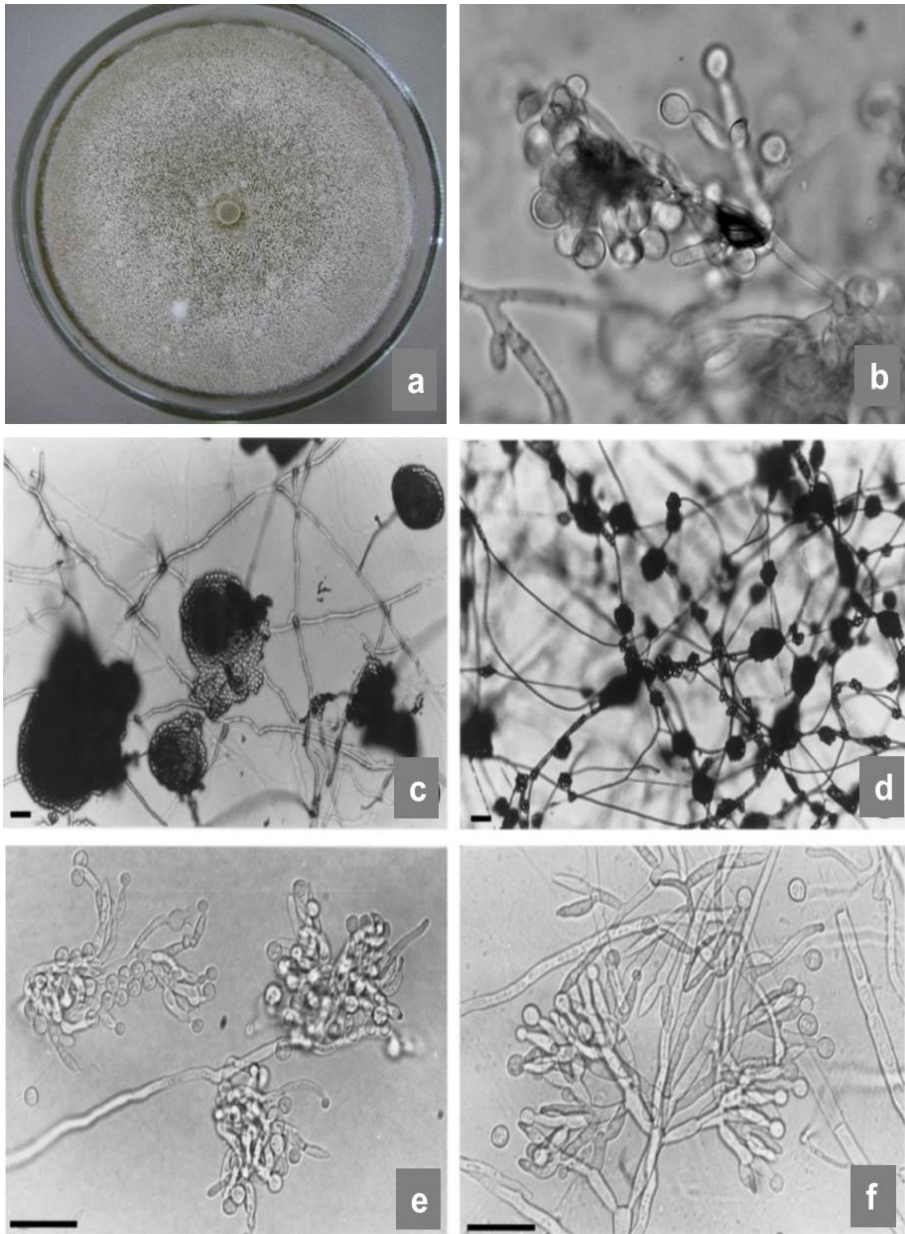


Figura 10. *F. langsethiae* a) cultivos de 7 días en PSA a 25 °C en oscuridad, b, c, d, e y f) cabezas conidiales, micelio aéreo y conidios de *F. langsethiae* (Gagkaeva, 2008).

F. poae es una especie con un perfil de producción de T-2 y HT-2 muy bajo, muy inferior al de *F. langsethiae* (Logrieco et al., 2003). Su desarrollo puede ocasionar una reducción en los niveles de T-2 y HT-2 en el grano, debido a que se produce una competitividad entre ambas especies cuando cohabitan en la misma semilla. Se ha encontrado también una alta correlación ($r = 0,77$, $p < 0,001$) entre la suma de la concentración de las toxinas T-2 y HT-2 y la presencia de *F. langsethiae* en muestras de avena recogidas entre 2010 y 2011 en diferentes regiones de Suecia (Fredlund et al., 2013).

Los problemas vinculados a especies del género *Fusarium* están relacionados con las enfermedades que causan, las micotoxinas que pueden producir y el impacto social que todo ello provoca (Summerell y Leslie, 2011). Las toxinas que producen estas especies se relacionan con una amplia variedad de efectos perjudiciales para la salud.

6. Micotoxinas en cereales

6.1. Aflatoxinas

La contaminación de alimentos con micotoxinas ocasiona importantes pérdidas económicas en todos los países. Se estima que cada año se destruye más de un 25% de los cultivos de todo el mundo debido a los niveles de micotoxinas que contienen (WHO, 2018). Las AF son los metabolitos secundarios fúngicos de mayor toxicidad por lo que constituyen un serio riesgo para la salud humana y animal. Las AF pueden presentarse en forma de cristales que van de color blanco a amarillo. Derivan de la difuranocumarina y se subdividen en dos grupos: difuro-cumaro-ciclo-pentanonas (AFB1, AFB2, AFB2A, AFM1, AFM2, AFM2A y aflatoxicol) y difuro-cumaro-lactonas (AFG1, AFG2, AFG2A, AFGM1, AFGM2, AFGM2A y AFB3) (Weidenborner, 2011). La nomenclatura de las aflatoxinas B y G hace referencia al color azul (“blue”) y verde (“green”) que presentan, respectivamente, cuando se observan bajo luz ultravioleta. Las aflatoxinas M1 (AFM1) y M2 (AFM2)

son derivados hidroxilados de AFB1 y AFB2, respectivamente, y se pueden encontrar en leche (“milk”) (de ahí su nomenclatura) de hembras de mamíferos tras el consumo de productos contaminados con AFB1 o AFB2 (Garrido et al., 2003), o en derivados lácteos como el queso (Carvajal-Moreno et al., 2019). Otras formas hidroxiladas son las aflatoxinas P1 (AFP1) y Q1 (AFQ1) (Carvajal-Moreno et al., 2019). En la Figura 11 se muestra la estructura química de AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, AFM1 y AFM2. Las cinco primeras son las que muestran una mayor incidencia en alimentos.

Las AF son insolubles en disolventes apolares, muy poco solubles en agua y ligeramente solubles en disolventes orgánicos moderadamente polares, como metanol, cloroformo o dimetilsulfóxido. Son muy inestables bajo luz ultravioleta, a pH <3 o >10 y en presencia de agentes oxidantes. En un entorno ácido, las AFB1 y AFG1 se transforman en AFB2 y AFG2, respectivamente, por la eliminación de un doble enlace en el anillo de furano (Bräse et al., 2013). En oscuridad son muy estables, incluso a temperaturas por encima de 100 °C.

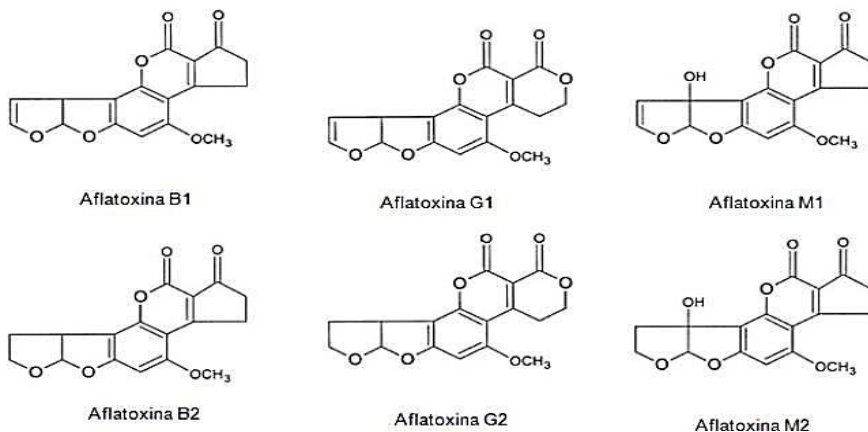


Figura 11. Estructura de las aflatoxinas B1, B2, G1, G2, M1 y M2.

El anillo de lactona que poseen proporciona reactividad frente al hipoclorito sódico, a la hidrólisis alcalina, o al amoníaco. En el organismo, las aflatoxinas, principalmente la AFB1, son biotransformadas en otros metabolitos, especialmente en AFB1-exo-8,9-epóxido (AFBO), que pueden activar y desactivar los mecanismos epigenéticos que conducen al desarrollo de varios tipos de cáncer (Bbosa et al., 2013; Wild y Turner, 2002).

6.1.1. Presencia

La contaminación con AF puede ocurrir tanto en pre-cosecha como en post-cosecha (Ghali et al., 2008, 2010; Moss, 2002) y se considera una amenaza para la agricultura y la alimentación, especialmente en el cultivo del maíz (Figura 12, Tabla 1) (Giorni et al., 2007; Mahuku et al., 2019; Mohale et al., 2013; Rushing y Selim, 2019; Viaro et al., 2017), ya que este es un cereal básico en muchos países y se cultiva en regiones que presentan una climatología que favorece el crecimiento de los hongos productores.

En algunos estudios, en particular en Croacia, Pakistán y la República Democrática del Congo, se han descrito niveles de AFB1 por encima de 1000 µg/kg, concretamente en Croacia se llegó a determinar concentraciones de hasta 2072 µg/kg, si bien se indica que estos altos niveles de toxina se relacionaban con cultivos del maíz durante una estación particularmente cálida y húmeda (Rushing y Selim, 2019). En otro estudio reciente llevado a cabo en la República Democrática del Congo (Kamika et al., 2016) se describe que la frecuencia y niveles de contaminación del maíz con AFB1 es muy diferente entre el maíz recién cosechado (32%) y las muestras de mercado (100%) que han sido previamente almacenadas, lo que parece indicar que durante el ensilado se producen cantidades significativas de AF que se acumulan en el grano. En la Tabla 1 se recogen los resultados de algunos estudios llevados a cabo en la última década sobre la incidencia de AFB1 en cosechas de maíz. La

Comisión Europea para cereales establece un máximo permitido de 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AFB1 y de 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para la suma de AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2. En el caso concreto del maíz, se establecen niveles máximos de 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para AFB1 y de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para la suma de las cuatro toxinas (European Commission, 2006b).



Figura 12. Granos y mazorca de maíz contaminados con *A. flavus* (<https://www.foodnewslatam.com/inocuidad/4568-las-aflatoxinas-provenientes-de-los-alimentos.html>).

Tabla 1. Datos de contaminación con AFB1 en muestras de cereales en diversos países en la última década. (Adaptado de Rushing y Selim, 2019).

Cereal	País	AF	Rango ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Referencia
Arroz	China	AFB1	0,03-20	Lai et al., 2015
Arroz	Pakistán	AFB1	0,04-21,3	Iqbal et al., 2016
Arroz	Suecia	AFB1	0,1-46,2	Fredlund et al., 2009
Arroz	India	AFB1	0,1-308	Reddy et al., 2009
Arroz	Malasia	AFB1	0,68-3,79	Reddy et al., 2011
Arroz	Irán	AFB1	0,1-6,3	Rahmani et al., 2011
Arroz	China	AFB1	0,1-136,8	Sun et al., 2011
Arroz	Canadá	AFB1	0,05-7,1	Bansal et al., 2011
Arroz	Brasil	AFB1	0,11-180,74	Almeida et al., 2012
Arroz	Ecuador	AFB1	4,9-47,4	Ortiz et al., 2013
Arroz	Pakistán	AFB1	1,07-24,65	Asghar et al., 2014

Tabla 1 (continuación)

Arroz	Pakistán	AFB1	1,1-32,9	Firdous et al., 2014
Arroz	Brasil	AFB1	63,32	Katsurayama et al., 2018
Cebada	Túnez	AFB1	0,4-0,5	Ghali et al., 2010
Cebada	España	AFB1, B2, G1 y G2	0.017-0.61	Mateo et al., 2011b
Maíz	Costa Rica	AFB1, B2, G1 y G2	24	Grannados-Chinchilla et al., 2017
Maíz	Zimbabwe	AFB1	0,75-26,6	Murashiki et al., 2017
Maíz	India	AFB1	48-383	Mudili et al., 2014
Maíz	Serbia	AFB1, B2, G1 y G2	1,01-86,10	Kos et al., 2013
Maíz	Vietnam	AFB1	1,0-34,80	Lee et al., 2017
Maíz	Túnez	AFB1	0,42	Ghali et al., 2010
Maíz	China	AFB1	1,0-50	Sun et al., 2011
Maíz	Burkina-Faso	AFB1	3,4-636	Warth et al., 2012
Maíz	Mozambique	AFB1	16,3-363	Warth et al., 2012
Maíz	Irán	AFB1	0,5-241,3	Karami-Osboo et al., 2012
Maíz	Croacia	AFB1	1,1-2072	Pleadin et al., 2014
Maíz	Pakistán	AFB1	2-1405,3	Firdous et al., 2014
Maíz	Tanzania	AFB1	0,53-364	Kirmanya et al., 2014
Maíz	Pakistán	AFB1	0,5-409,3	Iram et al., 2014
Maíz	Sudáfrica	AFB1	1-133	Mngqawa et al., 2016
Maíz	Etiopía	AFB1	513	Getachew et al., 2017
Maíz	Serbia	AFB1	1,3-88,8	Janić Hajnal et al., 2017
Maíz (cosecha)	República D. del Congo	AFB1	1,5-51,23	Kamika et al., 2016
Maíz (mercado)	República D. del Congo	AFB1	1,75-1401,45	Kamika et al., 2016
Maíz	Turquía	AFB1	0,041-1,12	Kara et al., 2015
Sorgo	Túnez	AFB1	0,4-25,1	Ghali et al., 2010
Sorgo	India	AFB1	0,01-263,9	Ratnavathi et al., 2012
Sorgo	Sudán	AFB1	0,06-12,29	Elbashir y Ali, 2014
Sorgo	Etiopía	AFB1	33,1	Taye et al., 2016
Trigo	Túnez	AFB1	0,12-18	Ghali et al., 2010
Trigo	China	AFB1	0,3-0,9	Sun et al., 2011
Trigo	Malasia	AFB1	0,55-5,07	Reddy et al., 2011
Trigo	China	AFB1	0,03-0,12	Zhao et al., 2018

Las AF también se presentan frecuentemente en otros cultivos, especialmente frutos secos, como cacahuete (Martins et al., 2017; Pildain et al., 2008; Pitt et al., 1993; Sultan y Magan, 2010), frutos de cáscara (Calderari et al., 2013; Rodrigues et al., 2012; Wu et al., 2019), cacao (Copetti, 2011), higos secos (Iamanaka et al., 2007), arroz (Katsurayama et al., 2018) o habas de soja (Lee et al., 2015), y los niveles máximos autorizados para cada uno de estos en los países comunitarios son también diferentes.

Además de las AF, no hay que olvidar los derivados hidroxilados de estas micotoxinas, como AFM1, de especial incidencia en leche y derivados de la leche obtenida de animales alimentados con cereales contaminados con AFB1. Recientemente el límite establecido para AFM1 en leche por la Comisión Europea cambió de 0,05 mg/kg a 0,5 mg/kg debido a las cantidades encontradas de esta toxina en muestras de leche comercial (Kos et al., 2014). En otro estudio llevado a cabo en España se analizó la presencia de contaminantes en yogures y, concretamente, la AFM1 fue detectada en el 33% de los yogures examinados, aunque las concentraciones encontradas fueron inferiores a los límites establecidos por la Unión Europea (Cano-Sancho et al., 2015).

6.1.2. Toxicidad

Este grupo de micotoxinas, especialmente la AFB1, destaca por su potente actividad carcinogénica. La AFB1 es considerada el carcinógeno más potente que existe en la naturaleza (Squire, 1981). Las AF fueron clasificadas como compuestos cancerígenos del grupo 2B (posibles cancerígenos) por la Agencia Internacional para la Investigación en el Cáncer (IARC, International Agency for Research on Cancer) en el año 1993 (IARC, 1993) y, posteriormente, reclasificados en el grupo I en el año 2002 (IARC, 2002).

Diversos estudios epidemiológicos han relacionado la exposición a las AF a través de la dieta como un factor de riesgo importante en el desarrollo de carcinoma hepatocelular, especialmente en individuos aquejados de hepatitis B (Li et al., 2001; Peers y Linsell, 1973). De hecho, la AFB1 es considerada como el principal compuesto que contribuye al desarrollo del hepatocarcinoma, estando esta enfermedad relacionada con la toxina en hasta el 28,2% de los casos (Liu y Wu, 2010). No obstante, además del cáncer de hígado vinculado con la ingestión de AF, otros tipos de cáncer también han sido relacionados con la exposición ocupacional a las mismas por contacto con vías respiratorias y por contacto dérmico en profesiones vinculadas con la agricultura, la ganadería o la industria textil entre otras (Ferri et al., 2017; Malik et al., 2014; Saad-Hussein et al., 2013; Viegas et al., 2012, 2015).

Por otra parte, se ha determinado que combinaciones binarias y terciarias de AFB1 con las toxinas zearalenona (ZEA) y el tricoteceno de tipo B deoxinivalenol (DON) suponen un efecto sinérgico o de suma de la toxicidad de estos metabolitos, salvo en el caso de la combinación de AFB1 con ZEA exclusivamente, que presenta un efecto antagonista (Zhou et al., 2017).

La toxicidad de las AF también se vincula a otras neoplasias extrahepáticas como los carcinomas pulmonares (Coulombe, 1994). Cualquier dosis de AF muestra efectos acumulativos con el tiempo y puede influir en el desarrollo de cáncer (Logrieco et al., 2003; Williams et al., 2004). Además, son mutagénicas y teratogénicas, interfieren en la absorción de micronutrientes (Obuseh et al., 2011; Tchana et al., 2010) y en el crecimiento (Walker et al., 2016), lo cual resulta especialmente grave cuando los niños son expuestos a las AF ya desde el periodo fetal por vía materna (Ghiasain y Maghsood, 2012; Mahdavi et al., 2010).

Otro efecto característico de las AF es la inmunomodulación. Yunus et al. (2011) demostraron que la respuesta inmunitaria humoral en pollos puede intensificarse o reducirse dependiendo del tiempo de

exposición a la AFB1 y de las dosis de la toxina. Pese a su toxicidad, existe una variabilidad en cuanto a los efectos de estas toxinas en los individuos dependiendo de su genética, edad, estado nutricional, incidencia de otras enfermedades y/o toxinas y a factores ambientales (EFSA, 2012).

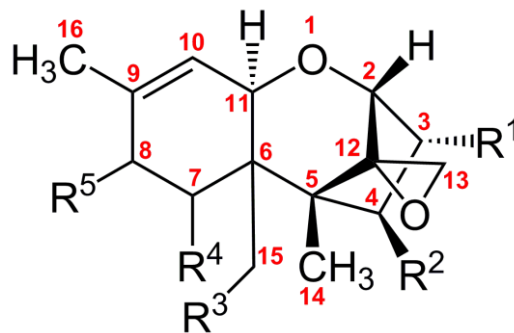
La biotransformación de las AF en el organismo tiene lugar principalmente en el hígado, aunque también ocurre en otras localizaciones como los riñones o el tracto intestinal. La mayoría de las investigaciones se han realizado sobre la transformación de la AFB1 por ser la más tóxica de todas.

Se ha comprobado que, a excepción del derivado AFB1-8,9-epóxido, el resto de productos de biotransformación son menos tóxicos que la propia AFB1. Sin embargo, dicho epóxido forma aductos con proteínas y con el DNA a nivel de la guanina en diversos sitios específicos, y uno de estos lugares es la tercera base nitrogenada del codón 249 del gen p53 (Hsu et al., 1991), por lo que podría actuar en contra de la función de este gen que es precisamente conocido como “el guardián del genoma” debido a que codifica una proteína supresora de tumores.

6.2. Tricotecenos: Las toxinas T-2 y HT-2

El grupo de los tricotecenos incluye en torno a 200 toxinas que tienen en común una estructura sesquiterpenoide con o sin un éster macrocíclico o un puente éster-éter entre los carbonos 4 y 5. Todas ellas tienen también en común un grupo 12,13-epoxitricotecen-9-eno responsable de su citotoxicidad y un doble enlace entre las posiciones 9 y 10 con varias sustituciones de cadena. Los tricotecenos son moléculas pequeñas con carácter anfipático que pueden desplazarse por difusión simple a través de las membranas celulares. Tradicionalmente han sido agrupados en los tipos A, B, C y D, en función del patrón de sustitución del grupo epoxi.

En la presente tesis se analizan tricotecenos no macrocíclicos en diversas muestras naturales de maíz y avena y, en concreto, los tricotecenos de tipo A, las toxinas T-2 y HT-2 (Figura 13). Estas dos toxinas son solubles en disolventes orgánicos como metanol, etanol, acetonitrilo o acetona (Yates et al., 1968), pero su solubilidad es menor en agua. Tienen un grupo funcional distinto a una cetona a nivel del carbono 8, y ambas se diferencian en que la toxina T-2 cuenta con un grupo acetilo en la posición C4 que la HT-2 pierde. Entre los tricotecenos de tipo B destacan NIV, fusarenona X y DON. Estos presentan una cetona en el carbono 8 y los producidos por el género *Fusarium* típicamente tienen un grupo hidroxilo en el carbono 7, pero esta característica no está presente en los tricotecenos producidos por especies de otros géneros. Los tricotecenos de tipo C cuentan con un segundo grupo epoxi en posición C7, C8 y C9, y los de tipo D con un anillo macrocíclico unido mediante enlaces éster entre las posiciones C4 y C5.



Nombre	Fórmula molecular	PM	R1	R2	R3	R4	R5
T-2	C ₂₄ H ₃₄ O ₉	466	OH	OAc	OAc	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
HT-2	C ₂₂ H ₃₂ O ₈	424	OH	OH	OAc	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂

Figura 13. Estructura de los tricotecenos. Toxinas T-2 y HT-2.

6.2.1. Presencia

La información de que se dispone muestra que las toxinas T-2 y HT-2 se encuentran principalmente en cereales como avena, trigo, cebada y maíz (Edwards et al., 2012; Pascale et al., 2012; Sampietro et al., 2011; Storm et al., 2008), asociándose especialmente a la avena (Bernhoft et al., 2010; Edwards et al., 2009a; Hofgaard et al., 2016; Opoku et al., 2013). Los tricotecenos T-2 y HT-2 se encuentran también en diversos productos alimenticios como pasta, productos de panadería, snacks, vegetales y derivados, bebidas alcohólicas, alimentos heterogéneos, alimentos infantiles o alimentos aptos para dietas especiales (EFSA, 2011a). En 2017 la EFSA elaboró un informe con datos sobre la incidencia de las toxinas T-2 y HT-2 en productos destinados a alimentación humana (EFSA, 2017b). Los datos se recogen en la Tabla 2.

Tabla 2. Niveles de toxina T-2, toxina HT-2 y la suma de ambas en diferentes granos de cereal no procesados. Algunos percentiles del 95% (P95) no se indican por no ser estadísticamente robustos al contar con menos de 60 resultados analíticos (EFSA, 2017b).

Producto	Nº	% LC	Rango de concentraciones (µg/kg)			
			Media	Mediana	P75	P95
Toxina T-2						
Granos en general	1	100	0,00-19,0	0-19,0	0-19,0	-
Trigo	85	98	0,32-19,8	0-25,0	0-25,0	0-25,0
Cebada	63	98	0,70-80,8	0-100	0-100	0-100
Maíz	17	76	8,92-20,3	0-6,40	0-24,6	-
Centeno	17	100	0,00-91,2	0-100	0-100	-

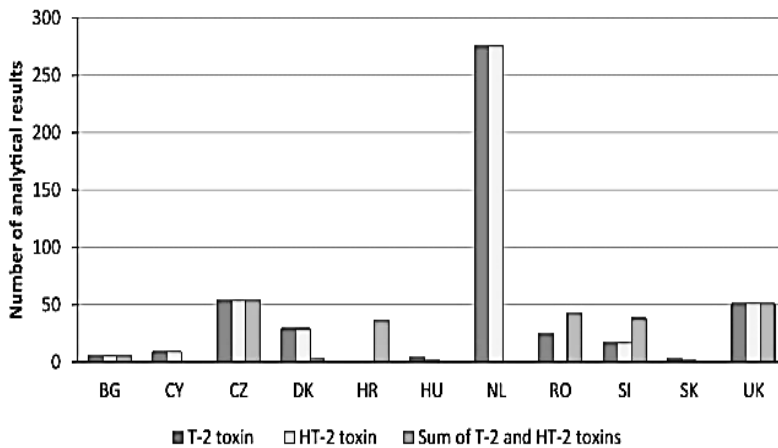
Tabla 2 (continuación)

Alforfón	4	100	0,00-87,5	0-100	0-100	-
Espelta	3	100	0,00-2,00	0-2,00	0-2,00	-
Mijo	2	100	0,00-75,0	0-75,0	0-100	-
Avena	91	87	1,52-33,7	0-50,0	0-50,0	10,4-150
Arroz	191	100	0,00-93,2	0-100	0-100	0-100
Toxina HT-2						
Granos en general	1	100	0,00-47,5	0-47,5	0-47,5	-
Trigo	68	100	0,13-20,2	0-25,0	0-25,0	0-25
Cebada	61	98	0,89-95,6	0-100	0-100	0-100
Maíz	7	100	0,00-8,29	0-7,60	0-10,0	-
Cebada	17	100	0,00-100	0-100	0-100	-
Espelta	3	100	0,00-0,00	0-0,00	0-0,00	-
Alforfón	4	100	0,00-100	0-100	0-100	-
Mijo	2	100	0,00-100	0-100	0-100	-
Avena	91	74	11,1-65,4	0-70,0	2,8-100	90-250
Arroz	191	100	0,00-100	0-100	0-100	0-100
Suma de las toxinas T-2 y HT-2						
Granos en general	1	100	0,00-19,0	0-19,0	0-19,0	-
Trigo	150	98	1,32-35,8	0-50,0	0-50,0	0-50,0
Cebada	14	100	0,00-113	0-22,8	0-75,0	-
Maíz	14	64	40,3-52,5	0-25,0	35,0-35,0	-
Espelta	3	100	0,00-0,00	0,0-0,0	0,0-0,0	-
Avena	49	90	13,4-109	0-75,0	0-75,0	-

En la Figura 14 se muestra la concentración de las toxinas en cada país del estudio y en la Figura 15 los cereales incluidos en el estudio (EFSA, 2017b). En este documento se indica que las mayores concentraciones de las toxinas T-2 y HT-2 se encuentran en avena y productos elaborados a base de avena. También se describe que la población más expuesta a estas toxinas son niños pequeños y bebés con una exposición máxima de 64,8 y 62,9 ng/kg de peso por día, respectivamente. En concreto, la exposición estimada de la población joven a estas toxinas fue 2-3 veces superior a la de las personas adultas y ancianas. Se indica también que los alimentos procesados que contienen mayor concentración de estas toxinas son los copos de cereales, el pan y otros productos de panadería, y que los suplementos dietéticos también implican una contribución importante en las personas ancianas. La exposición aguda media para la suma de las toxinas T-2 y HT-2 osciló entre un mínimo de 13,4 µg/kg de peso corporal por día estimado en ancianos hasta un máximo de 64,7 µg/kg de peso corporal por día estimado en niños pequeños. Todos los datos están recogidos en estudios realizados entre los años 2011 y 2016.

Hasta la fecha no existe una regulación que establezca unos límites aplicables en seguridad alimentaria; solo existe la recomendación de la Comisión Europea de 2013 (European Commission, 2013) que establece un límite de 1000 µg/kg para la suma de ambas toxinas en avena no procesada, y de 200 µg/kg en avena procesada y productos elaborados con la misma, y también de 200 µg/kg en maíz, y unos documentos de la EFSA que incluyen riesgos de ciertas micotoxinas, entre ellas los tricotecenos tipo A, y sus formas modificadas (EFSA, 2014, 2017a).

Respecto a la ingesta diaria tolerable (TDI, tolerable daily intake) de las toxinas HT-2 y T-2 en 2011 la EFSA estableció una TDI combinada de 0,1 µg/kg de peso corporal por día (EFSA, 2011a). En 2017, este dato se actualizó, fijándose una TDI de 0,02 µg/kg de peso corporal por día para las toxinas HT-2, T-2 y sus formas modificadas (EFSA, 2017a).



BG, Bulgaria; CY, Cyprus; CZ, the Czech Republic; DK, Denmark; HR, Croatia; HU, Hungary; NL, the Netherlands; RO, Romania; SI, Slovenia; SK, Slovakia; UK, the United Kingdom.

Figura 14. Distribución de los resultados analíticos relativos a la concentración de los tricotecenos T-2, HT-2 y la suma de ambos en granos de cereales de distintos países europeos entre los años 2011 y 2016 (EFSA, 2017b).

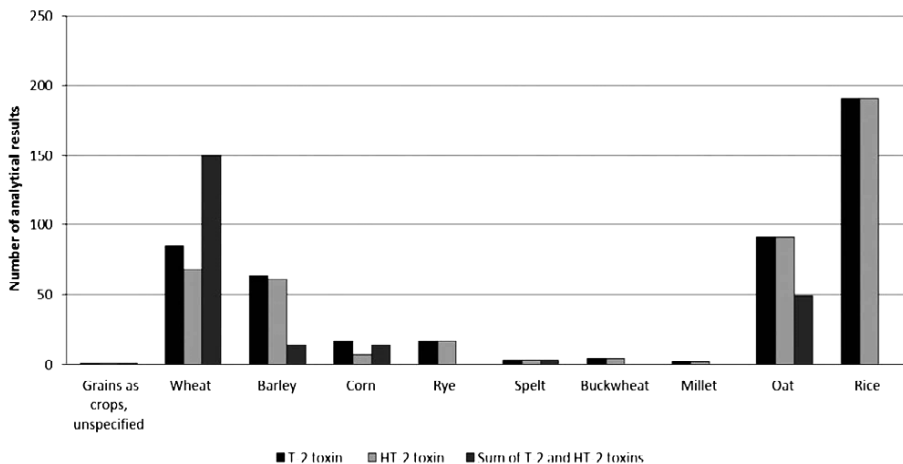


Figura 15. Distribución de los resultados analíticos relativos a la concentración de los tricotecenos T-2, HT-2 y la suma de ambos en diferentes cereales entre los años 2011 y 2016 (EFSA, 2017b).

En un estudio de muestras de avena procedentes del Reino Unido recogidas entre 2002 y 2008 se estudió la concentración de estos metabolitos junto a la de otras micotoxinas. Dependiendo de la anualidad, el porcentaje de las muestras de avena en las que la concentración de la suma de los tricotecenos T-2 y HT-2 fue superior al límite recomendado osciló entre el 1 y el 30% (Edwards, 2017). En los análisis de cereales sin procesar los mayores niveles de toxina T-2 se encontraron en los cultivos de maíz (concentración entre 8,92 y 20,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$) seguido de los de avena y cebada. Para la toxina HT-2 los mayores niveles se encontraron en los cultivos de avena (concentración entre 11,1 y 65,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$), seguido de los de cebada y trigo. Para la suma de ambas toxinas los valores medios máximos se encontraron en los cultivos de maíz (concentración entre 40,3 y 52,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

La prevalencia de las toxinas T-2 y HT-2 en derivados de cereales en España es muy baja. Aunque las publicaciones son muy escasas, en algunas de ellas se indica que estas toxinas se encuentran en un porcentaje bajo de las muestras analizadas y en niveles muy bajos que, en pocas ocasiones, llegan a superar el límite de cuantificación (LOQ) del método analítico (Cano-Sancho et al., 2011; González-Osnaya et al., 2011). Sin embargo, en estos dos trabajos no se incluyeron derivados de avena que es el cereal más contaminado con ambas toxinas. Por el contrario, en un amplio estudio de la EFSA (EFSA, 2017b) queda ampliamente demostrada la prevalencia de estas toxinas en avena cultivada en latitudes más altas (centro y norte de Europa). Así, por ejemplo, en trabajos llevados a cabo en muestras procedentes del Reino Unido (Edwards et al., 2009a) se analizaron 458 muestras de avena recolectadas entre el 2002 y el 2005 y se encontraron las toxinas T-2 y HT-2 en un 84% y 92% de las muestras analizadas, respectivamente. En otro trabajo (Scudamore et al., 2009) se estudiaron estas toxinas en muestras de avena, trigo y maíz recolectadas entre 2004 y 2007, y solo se encontraron valores importantes de estas toxinas en avena, principalmente en los granos que estaban provistos de cascarilla.

6.2.2. Toxicidad

Los tricotecenos pueden afectar a humanos, animales (Nielsen et al., 2009) y plantas (Desjardins y Hohn, 1997). En concreto, entre los tricotecenos de tipo A, la toxina T-2 es la más común, especialmente en cereales. Esta toxina se absorbe rápidamente por vía oral y por inhalación, siendo baja la absorción dérmica y, una vez absorbida, es distribuida por todo el organismo y parte de ella es rápidamente metabolizada a toxina HT-2 (forma desacetilada de la toxina T-2) y a otros metabolitos, como son los derivados glucosilados, por parte de animales, plantas y hongos (Dohnal et al., 2008; Königs et al., 2009; Lattanzio et al., 2009). Este proceso ocurre principalmente en el hígado, el intestino y el plasma sanguíneo en animales, y en él tiene una gran importancia la participación de enzimas carboxilesterasas. En plantas, como los cereales, ocurre debido a la acción de carboxilesterasas propias de los mismos. Mateo et al. (2013) encontraron que sobre granos de avena la producción de la toxina HT-2 por las cepas de *F. langsethiae* fue superior a la de la toxina T-2, al contrario de lo descrito en estudios previos (Mateo et al., 2011a; Medina y Magan, 2011) en medio extracto de avena lo que sugiere que esto se debe a dicha conversión.

La toxina HT-2 ha sido identificada como el principal metabolito de la toxina T-2, tanto *in vivo* como *in vitro*. La toxicidad aguda de ambas toxinas es similar y, por ello, sus efectos tóxicos en los organismos se consideran el resultado de la suma de ambas toxinas.

La toxicidad aguda de estas toxinas se ha determinado en modelos animales por diferentes vías de exposición como a nivel intravenoso o parenteral, intragástrico, subcutáneo, intraperitoneal e intratraqueal (Escriva et al., 2015). Producen efectos inespecíficos como pérdida de peso y daños en el hígado, actúan afectando a la síntesis de DNA y RNA (Ueno, 1985), y provocan desórdenes metabólicos que afectan a la cadena de transporte electrónico mitocondrial (Pace et al., 1983, 1988; Trusal y O'Brien, 1986), o a la integridad de la membrana plasmática (Suneja et al., 1989). También

están implicadas en la inhibición de la síntesis de proteínas (McLaughlin et al., 1977; Thompson et al., 1990).

Entre otros efectos se puede destacar mediación de la anorexia a partir de la toxina T-2, el neurotransmisor 5-hidroxitriptamina (5-HT) y otro neurotransmisor conocido como sustancia P (Sheng et al., 2019), ATA (Stack, 2003), apoptosis (Rachid et al., 2000; Wang et al., 2012), desórdenes del sistema inmune (Holladay et al., 1993; Qiu et al., 2016), retraso en el crecimiento, vómitos, rechazo de alimentos, disfunción reproductora e inhibición de la germinación y el crecimiento en plantas (Rocha et al., 2005) y efectos neurológicos asociados a la posibilidad de que estas toxinas atravesen la barrera hematoencefálica (Weidner et al., 2013), provocando con ello autofagia en el cerebro y otras lesiones en la glándula pituitaria (Guo et al., 2018).

7. Producción mundial de maíz y avena

En España, dadas las condiciones favorables debidas a un clima cálido y soleado, el sector primario siempre ha mantenido un gran auge y tradicionalmente ha estado a la cabeza en la producción de cereales y productos hortofrutícolas.

El cereal con mayor superficie de cultivo en España es la cebada. En el año 2016, España ocupó el séptimo lugar en producción de cebada a nivel mundial con una producción de 7979590 Tm (<https://blogagricultura.com/estadisticas-cebada-produccion>). Con todo, en relación con la avena y el maíz, aunque España tiene una buena y constante producción, no se sitúa en una posición tan alta a nivel mundial, si bien una superficie importante de campo español está destinada al cultivo de estos cereales. En las Figuras 16 y 17 se ilustra la producción de avena y maíz en 2018 en los diez países mayores productores a nivel mundial.



Figura 16. Toneladas métricas de maíz producidas en 2018 en los principales países productores a nivel mundial (<https://www.cotriza.cl/mercado/maíz/internacional/detalle.php>).

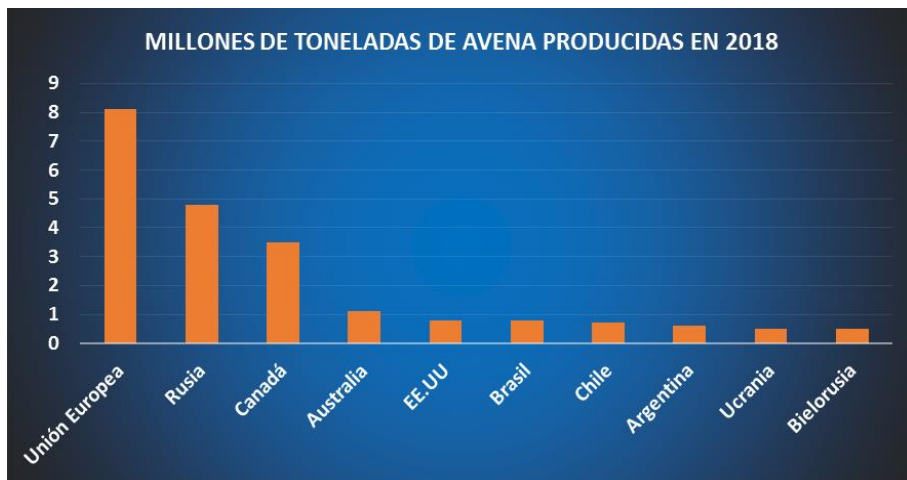


Figura 17. Toneladas métricas de avena producidas en 2018 en los principales países productores a nivel mundial (<https://www.cotriza.cl/mercado/avena/internacional/detalle.php>).

En la Figuras 18 y 19 se indica la superficie de campo destinada a ambos cultivos y la producción de estos cereales en España en 2017, según los datos definitivos de enero de 2019 de los informes de avances de superficie y producción facilitados por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación en su página web. En dicha anualidad se cultivaron un total de 333.628 ha de maíz y 558.767 ha de avena. Castilla y León fue la comunidad con una mayor superficie dedicada al cultivo del maíz (88.279 ha). La producción total de este cereal fue de 3.775.641 Tm siendo Aragón la comunidad más productiva con 1.077.904 Tm. Con respecto al cultivo de la avena, Castilla-La Mancha fue la comunidad con mayor superficie agraria dedicada a su cultivo (195.966 ha) y con mayor producción del mismo (298.888 Tm). La producción total de avena fue de 843.259 Tm.

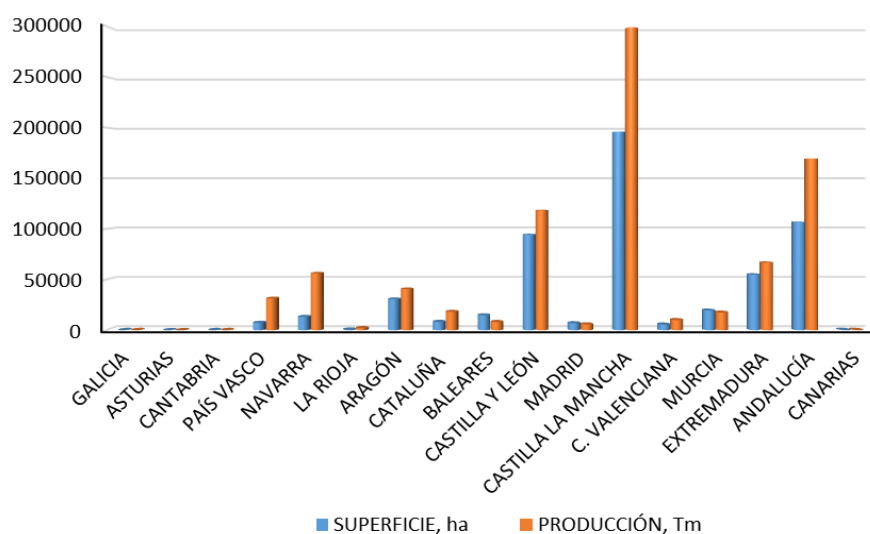


Figura 18. Superficie agrícola (ha) dedicada al cultivo de avena en España en 2017 (barras de color azul) y producción (Tm) (barras de color naranja). Datos tomados de la página web del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (<https://www.mapa.gob.es/es/>).

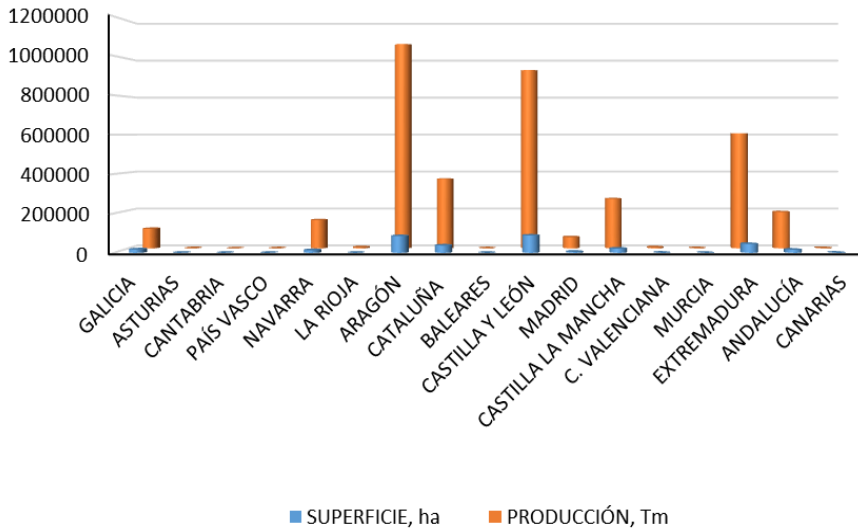


Figura 19. Superficie agrícola (ha) dedicada al cultivo de maíz en España en 2017 (barras de color azul) y producción (Tm) (barras de color naranja). Datos tomados de la página web del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (<https://www.mapa.gob.es/es/>).

8. Factores que afectan al desarrollo fúngico y a la producción de micotoxinas

Los factores que afectan al crecimiento fúngico y a la producción de micotoxinas son de dos tipos: a) factores abióticos, como la temperatura, la actividad de agua en equilibrio con la humedad relativa ambiental, el sustrato en el que se desarrollan, el pH, la concentración de gases de la atmósfera, el fotoperiodo y las prácticas agrícolas que se llevan a cabo, de entre las que destaca el empleo de agentes antifúngicos, y b) factores bióticos, principalmente, la variabilidad asociada a la propia especie y cepa fúngica, las interacciones entre

microorganismos y el efecto de insectos y otras plagas que producen lesiones que facilitan la colonización fúngica. En la naturaleza, las interacciones entre estos factores son las que determinan el desarrollo de los hongos y los niveles de producción de micotoxinas.

En la naturaleza, los factores ambientales como la temperatura o la humedad relativa no pueden ser modificados por el hombre. Sin embargo, es posible desarrollar modelos predictivos capaces de determinar el peligro potencial del desarrollo de hongos productores de micotoxinas y de que produzcan estos metabolitos en un determinado cultivo en función de las condiciones ambientales esperables. De este modo, es posible establecer medidas preventivas y de control de estos riesgos. Por tanto, la gestión adecuada de estos riesgos requiere un conocimiento profundo de los valores de temperatura y actividad de agua que favorecen, dificultan o inhiben el crecimiento de las diferentes especies fitopatógenas y la biosíntesis de micotoxinas. Así podrá establecerse un listado de buenas prácticas agrícolas, necesarias para la sostenibilidad de las cosechas agrícolas en pre- y post-cosecha y la calidad y seguridad de los alimentos derivados.

8.1. Temperatura

La temperatura es un factor que afecta tanto al crecimiento de los hongos como a la producción de micotoxinas. Cada especie fúngica, tiene un valor óptimo de temperatura para el crecimiento y para la producción de micotoxinas, y estos pueden no coincidir. De entre la amplia variedad de especies fúngicas conocidas las hay que pueden crecer a temperaturas desde -4 °C hasta 65 °C.

Las especies de *Aspergillus* están muy bien adaptadas a crecer en los trópicos, pues raramente se desarrollan a temperaturas por debajo de 10 °C y algunas tienen una temperatura óptima cercana a los 37 °C (Pitt y Hocking, 2009). En concreto se ha descrito que las especies del género *Aspergillus* de la sección *Flavi*, *A. flavus* y *A.*

parasiticus presentan una temperatura óptima de crecimiento entre 35 y 37 °C en medio YES (Schmidt-Heydt et al., 2009, 2010). Sin embargo, la temperatura óptima para la producción de AFB1 por *A. flavus* en el mismo medio de cultivo es 25 °C y por *A. parasiticus* la temperatura óptima es 37 °C. En cambio, la mayor producción de AFG1 por *A. parasiticus* ocurre a 20 °C.

En lo que se refiere a *Fusarium* spp. y, en concreto, a *F. langsethiae*, se ha descrito un buen crecimiento a temperaturas de entre 10 y 35 °C, siendo la franja de temperatura de 20-25 °C la que corresponde a su óptimo crecimiento (Medina y Magan, 2010), estando entre 20 y 30 °C la temperatura óptima para la producción de los tricotecenos T-2 y HT-2 (Medina y Magan, 2011). Estos autores también comprobaron que varias cepas de *F. langsethiae* pueden producir las toxinas *in vitro* a 5 °C tras largos periodos de incubación. Estos dos estudios fueron llevados a cabo en medio extracto de avena. La temperatura óptima para el desarrollo de *F. sporotrichioides* parece ser algo superior a la idónea para el desarrollo de *F. langsethiae*, pero existe menos acuerdo entre los diferentes autores. Nazari et al. (2016) indican que esta especie presenta una temperatura óptima de crecimiento en torno a 32,3 °C. Sin embargo, Torp y Nirenberg (2004) encontraron para las tres especies *F. sporotrichioides*, *F. langsethiae* y *F. poae* una temperatura óptima de crecimiento similar y la situaron en unos 25 °C (Figura 20).

Otros autores han encontrado que las variedades de avena de invierno tienen mayores concentraciones de las toxinas T-2 y HT-2 que las variedades de primavera (Edwards y Jennings, 2016; Edwards, 2017; Schöneberg et al., 2018), lo que apunta a una influencia estacional en la producción de estos metabolitos que, a su vez, está ligada a las condiciones climáticas, como la temperatura y la pluviometría.

De los resultados y antecedentes se deduce que podría existir una adaptación de *F. sporotrichioides* a la temperatura, dependiendo del origen de la cepa. Esta especie presenta una distribución

geográfica mucho más amplia que *F. langsethiae*. Al igual que ocurre con *F. langsethiae*, la temperatura óptima para la producción de micotoxinas por *F. sporotrichioides* es ligeramente menor a la óptima para el crecimiento y esporulación.

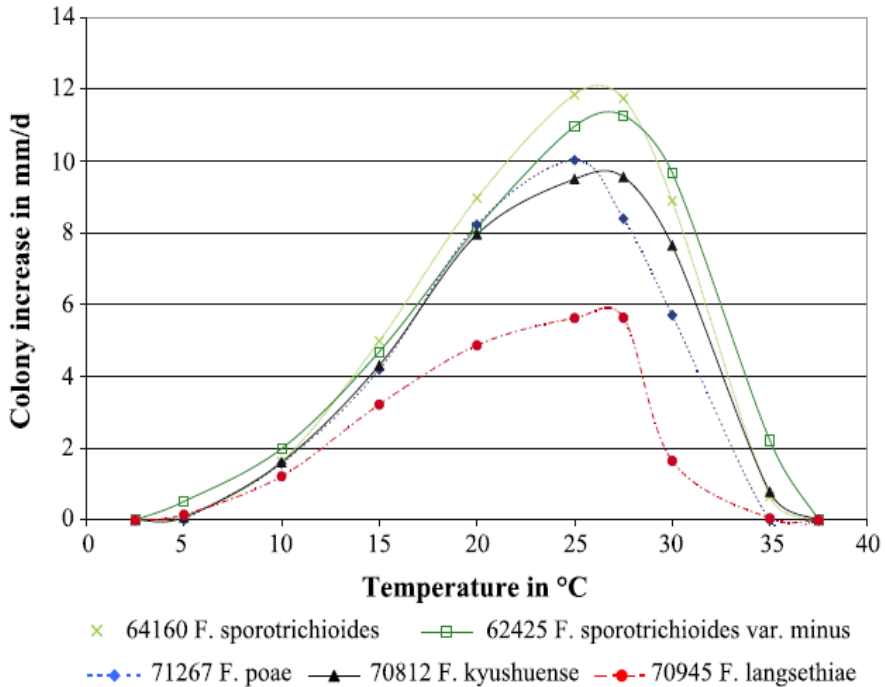


Figura 20. Perfiles de temperatura de crecimiento de cinco cepas de diferentes especies de *Fusarium* crecidas en PDA en oscuridad (Torp y Nirenberg, 2004).

Es importante resaltar que el efecto de la temperatura sobre el crecimiento fúngico y sobre la producción de micotoxinas por las distintas especies fúngicas va asociado a interacciones con otros factores abióticos y bióticos, por lo que los resultados obtenidos por los diferentes investigadores, tanto en condiciones naturales como *in vitro*, pueden variar.

8.2. Actividad de agua (a_w)

La actividad de agua (a_w) se define como el cociente entre la presión parcial de vapor de agua en un sustrato (P_s) y la presión parcial del vapor de agua pura en las mismas condiciones (P_0): $a_w = P_s/P_0$ a una determinada temperatura. Este término data del año 1957 (Scott, 1957) y es un concepto equivalente a la humedad relativa (HR). Sus valores se sitúan entre 0 y 1, aunque en la materia viva el valor de a_w siempre varía entre 0,6 y 1.

Este factor, junto con la temperatura, son los más relevantes en el comportamiento fúngico en cuanto a crecimiento y producción de micotoxinas. La disponibilidad de agua libre, en concreto, está relacionada con parámetros tales como la velocidad de crecimiento, la tasa respiratoria, la velocidad de germinación de esporas, la fase “lag”, o la producción de metabolitos secundarios, como las micotoxinas.

Determinadas especies fúngicas pueden desarrollarse a una a_w de 0,85 o inferior; por ejemplo, *Xeromyces bisporus* o *Eurotium halophilicum* pueden hacerlo a a_w realmente bajas (0,65-0,7) y, por ello, son consideradas especies xerófilas. Con todo, los hongos productores de micotoxinas requieren valores mucho más elevados. Los hongos del género *Aspergillus* y, en concreto, los de la sección *Flavi* pueden crecer por debajo de -35 MPa (equivalente a 0,77 a_w) (Klich, 2007) o entre a_w 0,73 y 0,85 (Sanchis y Magan, 2004), aunque su nivel óptimo está por encima de 0,95.

En especies del género *Fusarium* los niveles de a_w para la germinación de las esporas son superiores a 0,88 y para el crecimiento son del orden de 0,90 o superiores (Palmero et al., 2008; Ramírez et al., 2004, 2006). Por ejemplo, la mínima a_w requerida para que se produzca el crecimiento de *F. langsethiae* es de 0,92-0,93, y el mínimo valor requerido para la biosíntesis de las toxinas T-2 y HT-2 es 0,93. El valor óptimo de a_w para el crecimiento y la producción de las toxinas está entre 0,98 y 0,995 (Medina y Magan, 2010, 2011). Estos estudios se llevaron a cabo sobre medio extracto de avena. Además, se ha

determinado que condiciones estrictas de temperatura y a_w que propician sequedad en los meses de julio y agosto en campos de avena del Reino Unido inducen un aumento de la contaminación por los tricotecenos T-2 y HT-2 en estos cultivos (Edwards, 2017).

Xu et al. (2014) estudiaron la contaminación de avena procedente de más de 300 muestras recogidas en diferentes regiones del Reino Unido entre 2006 y 2008. La avena estuvo sometida a una estación cálida y húmeda en mayo, cuando los cultivos estaban en su fase inicial, y a una estación seca tras la floración. Los resultados mostraron que existía una fuerte correlación entre la acumulación de los tricotecenos T-2 y HT-2 y la alternancia de estas condiciones climáticas.

En otro estudio llevado a cabo en Noruega (Bernhoft et al., 2012) también se asoció un aumento en la concentración de la toxina HT-2 con una elevada humedad relativa previa a la cosecha.

Es importante destacar la idea general de que, al igual que ocurre con la temperatura, las diferentes especies fúngicas están evolutivamente adaptadas a tolerar diferentes valores de a_w . Esta diferencia puede ocurrir incluso entre cepas de una misma especie.

8.3. Sustrato

Al ser saprófitos, los hongos productores de micotoxinas pueden desarrollarse sobre multitud de sustratos, siempre que estos puedan proveer al hongo de una fuente de carbono, de nitrógeno, de otros elementos, como el azufre o el fósforo, de determinados minerales como potasio, magnesio, calcio y hierro y de factores de crecimiento como vitaminas, bases nitrogenadas, tanto púricas como pirimidínicas, ácidos grasos o nucleótidos (Pitt y Hooking, 2009). Es importante matizar que los diferentes géneros y especies pueden mostrar un mayor desarrollo y/o perfil de producción de micotoxinas en un sustrato determinado que en otros. Muchos estudios realizados con hongos

filamentosos se llevan a cabo sobre medios de laboratorio sintéticos, aunque también los hay sobre granos o extractos de cereales y estas se pueden considerar como una buena aproximación al desarrollo de los hongos sobre dichos sustratos en su ambiente natural (Bluma et al., 2008; Gil-Serna et al., 2015). Así, en un trabajo realizado por Mateo et al. (2011a) con *F. langsethiae*, en agar extracto de avena, se encontró mayor producción de toxina T-2 que de toxina HT-2. Sin embargo, cuando se cultivaron las mismas cepas en granos de avena (Mateo et al., 2013) se produjo mayor cantidad de toxina HT-2 que de T-2.

8.4. Concentración de iones H⁺ (pH)

Este es un factor muy importante en Microbiología, especialmente para bacterias y levaduras, ya que su crecimiento, salvo excepciones como es el caso de las bacterias del ácido láctico (LAB) o bacterias lácticas, se ve alterado a valores de pH por debajo de 5. Sin embargo, en hongos filamentosos, pese a que son organismos ligeramente acidófilos, por lo general no hay grandes diferencias en cuanto a su desarrollo en un margen de pH entre 4 y 7, aunque el pH óptimo para la mayoría de especies fitopatógenas es de 5,6, siempre teniendo en cuenta las posibles variaciones entre especies y cepas.

El pH del medio afecta al desarrollo del hongo debido, especialmente, al papel que desempeña en la estabilidad de su membrana. En un medio con pH de partida óptimo para un hongo, los productos ácidos o básicos que se generan como consecuencia de su metabolismo o de la microbiota acompañante pueden alterar este pH hasta el extremo de inhibir el desarrollo del hongo o afectar a su viabilidad. Cuando el pH es más extremo, el crecimiento fúngico se dificulta y se incrementa la producción de metabolitos secundarios.

En ambientes naturales se ha observado que, por lo general, el pH es un factor menos limitante para el crecimiento fúngico que la a_w ,

de forma que en medios con pH en torno a la neutralidad y con elevada a_w los hongos son muy poco competitivos en presencia de bacterias. Sin embargo, en medios con a_w en torno a 0,90 son los hongos los que claramente se imponen con independencia del pH del medio. En nichos en los que no prima la competencia bacteriana, ciertas especies de hongos de géneros como *Aspergillus*, *Fusarium* o *Penicillium* llegan a ser muy competitivas y pueden colonizar el sustrato, incluso con una elevada a_w y pH neutro (Wheeler et al., 1991).

8.5. Composición de gases de la atmósfera

Este es un factor muy determinante para los hongos productores de micotoxinas ya que son aerobios estrictos y, por tanto, no pueden desarrollarse ni tampoco producir micotoxinas en una atmósfera carente de oxígeno. Por lo general, la concentración óptima de oxígeno para los hongos está en torno al 21%, que es el porcentaje de oxígeno presente en la atmósfera terrestre y, de hecho, la mayoría de hongos productores de micotoxinas son sensibles a altas concentraciones de CO_2 (Pitt y Hocking, 2009); no obstante, hay cierta variación entre especies y cepas. Giorni et al. (2008) encontraron que en una atmósfera con un 25% de CO_2 se reduce el desarrollo de *A. flavus*, aunque es necesaria una atmósfera con al menos un 50% de CO_2 para lograr una reducción significativa de la síntesis de AF. Riudavets et al. (2018) también determinaron que atmósferas de envasado modificadas con una elevada concentración de CO_2 se relacionan con reducciones significativas en la producción de micotoxinas. Otros estudios han determinado que *A. flavus* es capaz de crecer sobre panes de trigo y arroz en una atmósfera con un 75% de CO_2 (Suhr y Nielsen, 2005).

Además del O_2 y el CO_2 , el N_2 también ha sido descrito como un gas cuya concentración tiene cierta trascendencia sobre el crecimiento de hongos y producción de micotoxinas (Pitt y Hocking, 2009). En concreto, niveles bajos de nitrógeno se relacionan con la síntesis de

micotoxinas (Snoeiijers et al., 2000). Teniendo esto en cuenta, el empleo de atmósferas con concentraciones controladas de estos gases puede ser una buena estrategia para la prevención del crecimiento fúngico en matrices alimentarias (Wambacq et al., 2016; Zhu et al., 2016).

8.6. Fotoperiodo

Se entiende como fotoperiodo el conjunto de procesos mediante los cuales las especies vegetales regulan sus funciones biológicas usando como parámetros la alternancia entre días y noches. Se calcula a partir de la duración del día en horas, a la cual se suma 0,9 horas, que es lo equivalente al tiempo en que están presentes las bajas intensidades de radiación que aparecen poco antes de la salida y de la puesta de sol.

Desde hace años numerosos estudios avalan la importancia del fotoperiodo para un buen desarrollo de las cosechas, debido a su implicación directa en el proceso fotosintético (McMaster et al., 2008; Warrington y Kanemasu, 1983). Aunque los hongos son organismos quimioheterótrofos y no realizan la fotosíntesis, algunos estudios han puesto de manifiesto que la presencia de luz o la alternancia entre luz y oscuridad en cultivos *in vitro* puede guardar relación con parámetros tales como la velocidad de crecimiento fúngico o la producción de micotoxinas. García-Cela et al. (2015) estudiaron la influencia de una serie de parámetros vinculados al fotoperiodo en *A. parasiticus*. Para ello sometieron los cultivos del hongo a irradiación con luz ultravioleta de diferentes longitudes de onda durante determinados periodos de tiempo. Encontraron que, dependiendo de las condiciones, la velocidad de crecimiento del hongo y el contenido en AF, sufría variaciones significativas, llegando incluso, en determinadas condiciones, a la producción de mayores niveles de aflatoxinas G que de aflatoxinas B.

Parece ser que la incidencia de luz de determinadas longitudes de onda podría inducir estrés en determinados hongos que estimula la tasa de crecimiento y la producción de micotoxinas. Fanelli et al. (2012a) y Fanelli et al. (2012b) determinaron que la incidencia de luz de determinadas longitudes de onda se relaciona con un incremento significativo de estos parámetros en *F. proliferatum* y *F. verticillioides*, respectivamente.

8.7. Interacciones microbianas

El conocimiento de las interacciones microbianas es importante desde un punto de vista básico y aplicado ya que puede ser utilizado en el control biológico de especies patógenas.

En los diferentes ecosistemas naturales pueden convivir hongos filamentosos, levaduras y bacterias, entre otros organismos, pudiendo desarrollar mecanismos de competencia por determinados nutrientes, sustratos y nichos ecológicos. Estas interacciones además se ven afectadas por el resto de factores bióticos y abióticos del ecosistema por lo que su conocimiento es muy complejo y difícil o imposible de reproducir *in vitro*. Xu et al. (2007), en hongos del género *Fusarium*, determinaron que, en caso de que en un mismo sustrato se encuentren varias especies, las más competitivas no obtienen ventaja de la presencia de otras más débiles. Sin embargo, en lo que respecta a la producción de micotoxinas, dependiendo de cuales sean las especies que interaccionan y de las condiciones ambientales, el nivel de micotoxinas producido por la especie dominante puede verse aumentado, disminuido o no mostrar un cambio significativo con respecto a los casos en que dicha especie se desarrolle sin competencia.

En la bibliografía existen varios estudios que relacionan, por ejemplo, la presencia de LAB con la reducción de la tasa de crecimiento de hongos productores de micotoxinas y con la biosíntesis

de distintas micotoxinas (Ahlberg et al., 2015; Mateo et al., 2010a, 2010b). Los resultados muestran que, debido a que estas bacterias presentan una velocidad de desarrollo superior a la de los hongos filamentosos, pueden competir con estos y lograr la reducción del crecimiento fúngico y de la producción de diversas micotoxinas.

Karlovsy (2011) también encontró que cepas de bacterias anaerobias del género *Eubacterium* adaptadas al ambiente gastrointestinal, que forman parte de la microbiota de diversos animales, pueden reducir o eliminar tricotecenos que haya ingerido el animal en su dieta. Estas cepas se desarrollan en el tracto digestivo de animales debido a una presión evolutiva ocasionada por la presencia de tricotecenos y, por tanto, estarán ausentes en animales que nunca hayan entrado en contacto con dichas toxinas a través de su dieta.

En otros estudios se demuestran interacciones entre hongos como *Trichoderma harzianum* y otras especies productoras de micotoxinas que resultan en la inhibición de la producción (Braun et al., 2018) o entre cepas no productoras de micotoxinas y cepas que sí lo son, resultando en la inhibición de la últimas (Kogaki et al., 2015); así, numerosos estudios ilustran la biocompetencia de cepas no aflatoxigénicas de *A. flavus* con cepas de la misma especie que lo son, lo que origina la reducción o inhibición de la producción de AF (Atehnkeng et al., 2014; Mehl et al., 2012).

En algunos casos la biocompetencia tiene como consecuencia la transformación de metabolitos muy tóxicos en otros de menor toxicidad; por ejemplo, en el estudio de Nakazato et al. (1990) se describe cómo cepas de algunas especies del género *Rhizopus*, cepas de *A. flavus* no toxigénicas, cepas de *A. niger* y cepas de *Eurotium herbariorum* muestran la capacidad de transformar la AFB1 en aflatoxicol.

8.8. Insectos

Otro factor vinculado a la contaminación fúngica de cereales es el daño ocasionado en los cultivos por prácticas agrarias o por diversas plagas, entre las que destacan las producidas por insectos. Estos últimos contribuyen al transporte de esporas fúngicas a estructuras en floración y a la introducción del inóculo fúngico en el interior de vegetales, semillas y frutos en maduración con el consecuente daño de tejidos y colonización fúngica. La actividad de los insectos se ve favorecida por altas temperaturas y humedad relativa baja. Dicha actividad puede generar en los vegetales un aumento de la temperatura ligado a la humedad que forma los denominados “lugares calientes” (“hot spots”) que constituyen un ambiente idóneo para el desarrollo fúngico.

Uno de los cereales más dañados por insectos es el maíz, y numerosos estudios avalan una correlación positiva entre el daño ocasionado por insectos en las plantas de maíz, la infección causada por *A. flavus* y la presencia de AF (Beti et al., 1995; Sinha y Sinha, 1992; Wilson et al., 1981).

Ante la ingente cantidad de plagas de insectos que afectan, en concreto, al cultivo del maíz se abordó el desarrollo de las plántulas Bt, plantas transgénicas denominadas así por poseer en su genoma un gen de la bacteria *Bacillus thuringiensis* implicado en el daño que ocasiona esta bacteria a nivel intestinal en diversos insectos (Hammond, 2016). *B. thuringiensis* es un parásito habitual de varios órdenes de insectos, como coleópteros, lepidópteros, hemípteros o dípteros, que sintetiza la proteína *cry*, que actúa a nivel de las membranas celulares del tubo digestivo de los insectos generando poros y lisando las células, con lo cual provoca la muerte del insecto.

La toxina *cry* actúa exclusivamente en estos insectos, y no implica ningún riesgo en humanos ya que no presentan los receptores de dicha molécula. Esto junto al interés de este tipo de plántulas, debido a que suponen una alternativa interesante a las plantas de maíz

no transgénico en las que, teóricamente, sería más necesario el empleo de fungicidas sintéticos, hizo que se popularizaran y se disparara su empleo hasta tal punto que hoy en día una gran parte del maíz cultivado en muchos países, entre ellos España, procede de plantas Bt. Esto ha constituido una gran ayuda en el control de las principales especies fúngicas productoras de micotoxinas de los géneros *Aspergillus* y *Fusarium* y, con ello, de diversas micotoxinas, de entre las que es importante destacar las AF. Sin embargo, pese a las ventajas que proporciona, esta tecnología cuenta con detractores que alegan la problemática sanitaria y medioambiental que, a su juicio, podría generar el cultivo y consumo de este producto. Una implicación sería el peligro de la contaminación genética de variedades naturales del maíz, aunque esto debe estar controlado por la infertilidad de las plantas transgénicas. Otro de los problemas que parece que pueden ocasionar estos cultivos es el daño, en términos ecológicos, ocasionado a las poblaciones de los insectos a los que afectan (Fahse et al., 2018); no obstante, también hay algunos estudios que lo niegan (Resende et al., 2016).

8.9. Prácticas agrícolas y de almacenamiento

El desarrollo de hongos fitopatógenos productores de micotoxinas en diversas cosechas no solo representa un grave problema de salud pública, sino que también resulta una seria amenaza para los agricultores a nivel económico, debido a la retirada, en ocasiones, de grandes cantidades de su producción del mercado por sobrepasar los límites establecidos por las legislaciones sobre el máximo contenido de diversos metabolitos tóxicos en productos alimenticios. Debido a ello, tradicionalmente se ha abordado una serie de prácticas agrícolas que, en muchos casos, van a favorecer una buena producción de las cosechas, pero que también van a ayudar a los agricultores a lidiar con el problema de los hongos.

Respecto a la labranza del terreno es interesante destacar los resultados obtenidos por diferentes autores, entre ellos Reddy et al. (2006), que defienden que la ausencia de labranza favorece la permanencia de residuos en los campos de maíz, lo cual aumenta la fertilidad de estos y reduce su erosión; posteriormente, estos mismos autores (Reddy et al., 2007) describen que estos campos sin labranza favorecen la colonización de la cosecha por la especie *A. flavus*. Schöneberg et al. (2018) también indican que la labranza es contraproducente ya que favorece la acumulación de las toxinas T-2, HT-2 y NIV, producidas por especies del género *Fusarium*, en campos de avena suizos. Sin embargo, Ahmad e Iram (2008) realizaron un estudio comparativo en campos de cultivo de arroz y trigo sometidos a labranza y en ausencia de ella y no se encontró una diferencia significativa en la microbiota del suelo entre ellos. Se puede concluir, por tanto, que no hay un consenso en la bibliografía y, por tanto, es muy importante la realización de estudios que puedan ayudar a obtener conclusiones claras, pues estos conocimientos son vitales para el cuidado de los campos de cultivo y el establecimiento de buenas prácticas agrícolas.

Por otro lado, una técnica muy sencilla e interesante es la rotación de cultivos. Consiste en cambiar periódicamente el uso agrícola que se concede a las parcelas; un ejemplo sería dedicar durante un año una parcela al cultivo del maíz después de que haya sido dedicada previamente al cultivo de la avena. Abbas et al. (2004) encontraron que la población de *A. flavus* se incrementa en suelos cultivados con cereales en primavera cuando el cultivo anterior ha sido maíz y, sin embargo, este incremento es notablemente menor cuando el cultivo anterior ha sido trigo o algodón. El conocimiento adecuado de esta práctica puede mejorar la calidad del suelo y el rendimiento de la tierra, así como reducir el empleo de fungicidas. No obstante, en determinados trabajos (Horn, 2005) se defiende la idea de que, pese a la evidencia de la dispersión de conidios durante las cosechas, la rotación de cultivos no tiene un efecto significativo a corto plazo en el desarrollo de especies fúngicas sobre el sustrato y que dicho

desarrollo depende en mayor medida de otros factores, como la lluvia o la susceptibilidad de los cultivos. Bernhoft et al. (2012) defienden que la rotación de los cultivos y otras técnicas de cosechado se vinculan con un aumento de la incidencia de especies del género *Fusarium* y de sus toxinas. Otros autores (Edwards, 2017; Schöneberg et al., 2018) también defienden esta postura.

Se ha demostrado que los suelos con mayor cantidad de materia orgánica y, por tanto, con mayor capacidad para absorber agua pueden ser más proclives al desarrollo fúngico, en concreto de *A. flavus* (Klich, 2002; Zablotowicz et al., 2007). Sin embargo, la lluvia no es un parámetro que pueda ser controlado como ocurre con la rotación de cultivos.

Con posterioridad a la cosecha, en el periodo en que los cultivos o cereales están almacenados en silos (etapa de post-cosecha) también hay un importante riesgo de contaminación fúngica y, por ello, es fundamental mantener un control de los diferentes factores tanto bióticos como abióticos mencionados. De entre estos parámetros, la temperatura y la humedad resultan especialmente interesantes. Si un alimento alcanza un nivel de a_w de 0,7 o inferior no tendrá riesgo de ser un sustrato para el crecimiento fúngico (Magan et al., 2003).

La etapa de post-cosecha de los cereales incluye el secado, almacenamiento, envasado y comercialización, siendo importante que los alimentos mantengan su calidad y seguridad para el consumidor. Del conjunto de prácticas de post-cosecha, las de limpieza, clasificación manual, descascarillado y molienda, son las más básicas, aunque no por ello dejan de ser efectivas; de hecho han demostrado reducciones en el contenido de micotoxinas de entre un 70 y un 99% (Matumba et al., 2015; van der Westhuizen et al., 2011), aunque su aplicación no es muy recurrente, ya que pese a ser efectivas resultan muy costosas y puede haber un alto grado de subjetividad entre los trabajadores que se encarguen de llevarlas a cabo. Así, Matumba et al. (2015) encontraron una pérdida del 14% de la masa recogida asociada a la limpieza manual de los granos, mientras que Tibola et al. (2016)

describen una pérdida de entre un 28,02 y un 32,91%. Además de estos métodos básicos en post-cosecha se emplean otras técnicas adicionales que se agrupan en métodos físicos, métodos químicos, empleo de aditivos alimentarios y agentes de unión a micotoxinas que puedan “secuestrarlas”, y también en el empleo de fungicidas (tanto los clásicos de composición orgánica e inorgánica como ecológicos).

Entre los métodos físicos se pueden citar los tratamientos con radiaciones. Se ha demostrado que diversas micotoxinas presentan sensibilidad a distintas radiaciones electromagnéticas. Por ejemplo, la AFB1 es altamente sensible a la radiación gamma (γ). Sin embargo, las toxinas DON y 3-acetil-deoxinivalenol (3-Ac-DON) requieren dosis de más de 50 kGY para ser destruidas, lo que es inviable en la práctica (O'Neill et al., 1993). Estos métodos implican un elevado coste, generan desconfianza en los consumidores (Calado et al., 2014), producen cambios nutricionales en matrices alimentarias (D'Ovidio et al., 2007), pueden generar derivados de micotoxinas con toxicidad desconocida que pueden pasar desapercibidos en muestras de alimentos. En este sentido, los tratamientos con radiaciones no parecen ser una alternativa interesante. El empleo de temperaturas elevadas, sin embargo, puede ser una opción (Bol et al., 2016; Numanoğlu et al., 2012). Así, por ejemplo, se ha comprobado que la cocina de extrusión a la temperatura de 150 °C implica una tasa de reducción de la AFB1 del $77,6 \pm 2,2\%$ en cacahuetes, especialmente en combinación con un elevado grado de humedad (Zheng et al., 2015). El método de extrusión combina la exposición de los alimentos (principalmente cereales y derivados) a elevada temperatura y elevada presión durante un tiempo muy corto (Peng et al., 2018). Este método no es igualmente efectivo sobre todas las micotoxinas; así, por ejemplo, se ha demostrado que es muy efectivo para la inactivación de DON, pero no afecta a la AFB1 (Cazzaniga et al., 2001) y, además, puede producir alteración del aroma y de los nutrientes de los alimentos. La eficiencia de este método puede mejorar con ciertos aditivos; así, se ha demostrado mayor eficacia en la reducción de la AFB1, la AFB1-8,9-dihidrodiol o la AFM1 cuando se realiza en

presencia de compuestos de lima y peróxido de hidrógeno (Elias-Orozco et al., 2002) o de AF de tipo B en presencia de ácidos cítrico y láctico (Méndez-Albores et al., 2008).

Sin embargo, el problema del empleo de aditivos está en los residuos que generan, pues estos pueden implicar consecuencias serias en la calidad de los alimentos y en la salud humana y animal. Otro método físico que ha resultado interesante es el empleo de carbón activo, que ha demostrado ser efectivo en la detoxificación de AFB1 en aves de corral (Khan y Zahoor, 2014).

Entre los métodos químicos destacan la aplicación de compuestos como el ozono o el amonio. Así se puede citar algunos ejemplos de la eficacia de estos tratamientos como el empleo de 20 y 40 ppm de ozono durante 20 minutos para conseguir unos porcentajes de reducción de AFB1 de 86,7% y 96,66%, respectivamente, en trigo contaminado con 20 µg/kg de la toxina (El-Desouky et al., 2012). Con la aplicación de dosis de 60 mg/kg en tiempos de exposición de 30, 60 y 120 minutos se han conseguido reducciones significativas de DON en granos de trigo, tanto en el pericarpo como en el endospermo, aunque la reducción en el endospermo fue menor (Savi et al., 2014), probablemente debido a que esta última es una estructura muy rica en lípidos. Con el empleo de estos gases se ha demostrado que se reduce el riesgo de aflatoxicosis en pollos (Allameh et al., 2005) y pavos (McKenzie et al., 1998) alimentados con maíz fortificado con AF. Ciertos estudios también demuestran la efectividad del tratamiento térmico, combinado con tratamientos con amonio, en la reducción del contenido de AFB1 en diversas matrices. El porcentaje de reducción llega a ser $\geq 99\%$ en determinadas condiciones (Gardner et al., 1971; Weng et al., 1994).

En 2009, la Comisión Europea extendió la definición de aditivos alimentarios para incluir materiales que supriman o reduzcan la absorción de micotoxinas, promuevan su excreción o modifiquen su modo de acción (European Commission, 2009a). Estos aditivos son menos agresivos con el medio ambiente y ayudan a preservar los

aromas y nutrientes de los alimentos. Pueden agruparse en tres tipos fundamentales: los que se unen a las micotoxinas y reducen su absorción gastrointestinal, los que las inactivan y los que modifican enzimas animales para que transformen micotoxinas en metabolitos de menor toxicidad o aumenten las defensas de los animales frente a las micotoxicosis.

Entre los aditivos inorgánicos destaca la bentonita (Bhatti et al., 2017) y otros como la tierra de diatomeas (Modirsanei et al., 2008) o el carbón activo con el que se ha conseguido, por ejemplo, reducir niveles de AFB1 (por fotocatalisis con un catalizador de TiO_2 en contacto con carbón activo) (Sun et al., 2019). Entre los orgánicos destaca el empleo de bacterias del ácido láctico (Shetty y Jespersen, 2006), de actinomicetos (Tejada-Castaneda et al., 2008), de bacterias del género *Mycobacterium* (Teniola et al., 2005), de levaduras integras (Stanley et al., 1993) o de la pared celular de levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* responsables de la adsorción de micotoxinas como la AFB1 (Fochesato et al., 2020). Además, se conoce que el glucomanano de la pared celular de levaduras decrece la severidad de daños hepáticos asociados a ciertas micotoxinas como son las AF o la toxina T-2 (Meissonnier et al., 2009), e induce un efecto protector frente a la inmunotoxicidad de estas toxinas. También se han llevado a cabo ensayos con enzimas como lacasas o peroxidasas extraídas de microorganismos u otras clases de organismos y purificadas; habiendo demostrado su eficacia en la destrucción de micotoxinas (Chitrangada et al., 2000; Loi et al., 2016). Sin embargo, cuentan con ciertas desventajas, como no haber sido probadas en alimentos, que requieren tiempos elevados para su aplicación y que no se han estudiado los productos de degradación de las micotoxinas (Rushing y Selim, 2019).

Debido a que la dinámica entre la aparición de micotoxinas, el clima y otros factores biológicos no está totalmente clara, aunque existen modelos predictivos sobre la incidencia de hongos y micotoxinas tanto en pre-cosecha como en post-cosecha, estos tienen

una cierta incertidumbre (Magan et al., 2011; Miller, 2008) que es necesario resolver.

9. Agentes antifúngicos

El objetivo del empleo de antifúngicos en agricultura es, principalmente, impedir el deterioro de los cultivos y la pérdida de las cosechas. El uso de antifúngicos como inhibidores del crecimiento de los hongos en general es una práctica agrícola muy común y se aplica en la producción de alimentos para humanos y animales. Hasta no hace mucho tiempo, apenas se había prestado atención al estudio de la eficacia de estos antifúngicos en el control del desarrollo de hongos toxigénicos y en el control de la biosíntesis de las diferentes micotoxinas. No obstante, los tratamientos con agentes antifúngicos no siempre son eficaces en el control de especies productoras de micotoxinas. Gracias a la investigación se han desarrollado antifúngicos de amplio espectro (benomilo, carbendazima, mancozeb, procloraz, tebuconazol, etc.) que se emplean en el control del crecimiento de diferentes especies que afectan a diversos cultivos, pero su efectividad con frecuencia es escasa y difiere entre especies de hongos (Arroyo et al., 2005; Bellí et al., 2006; Mateo et al., 2011a, 2011c, 2013; Medina et al., 2007a, 2007b).

Por otro lado, los tratamientos con antifúngicos afectan a la biosíntesis de micotoxinas de diferente forma de modo que su producción puede quedar totalmente inhibida, disminuir o aumentar dependiendo de la especie fúngica, el antifúngico y su dosis y las condiciones experimentales (Badii y Moss, 1988; Buchanan et al., 1987; El-Kady et al., 1993).

La preocupación por el hecho de que los fungicidas supongan un riesgo serio para la salud de los consumidores ha fomentado cada vez más la agricultura ecológica; no obstante, determinados trabajos defienden que, como consecuencia de una reducción del empleo de

fungicidas, se incrementan los niveles de micotoxinas en las cosechas (Finamore et al., 2004; Juan et al., 2008). Otros autores sostienen que la contaminación con micotoxinas es superior en cultivos tratados con antifúngicos convencionales que en cultivos de agricultura ecológica (Birzele et al., 2002; Edwards, 2009a, 2009b, 2009c). En general, el riesgo que implican los residuos de fungicidas para la salud de los consumidores es considerado inferior al riesgo asociado a la presencia de micotoxinas (Muri et al., 2009).

Conocer la sensibilidad de las especies micotoxigénicas a los diferentes fungicidas y la eficacia de estos, tanto sobre el desarrollo fúngico como sobre la producción de micotoxinas, deben ser objetivos prioritarios en materia de seguridad agroalimentaria. Es, además, muy interesante que estos estudios evalúen como se ven condicionadas las especies fúngicas en función de variables ecológicas asociadas al clima, como son la temperatura o la humedad relativa, con el fin de poder llegar a elaborar modelos predictivos del riesgo de incidencia de hongos y micotoxinas en diferentes regiones agroclimáticas, teniendo siempre presente el avance del cambio climático (Magan et al., 2011).

En la presente tesis se ha llevado a cabo el ensayo de diferentes agentes antifúngicos, en diferentes condiciones ambientales (temperatura y a_w), frente a especies fúngicas productoras de micotoxinas de gran impacto en microbiología de alimentos, seguridad alimentaria y salud pública como son *A. flavus*, *A. parasiticus* o *F. sporotrichioides*. Se han determinado, también, sus efectos en la producción de micotoxinas como AF y las toxinas T-2 y HT-2. Los agentes antifúngicos empleados han sido muy diversos: antifúngicos sintéticos, aceites esenciales, considerados compuestos GRAS y susceptibles de empleo en alimentación ecológica, films bioactivos, usando como principio activo aceites esenciales, empleando así uno de los conceptos más innovadores de envasado bioactivo y, finalmente, nanopartículas de plata (AgNPs), haciendo uso de la nanotecnología de gran auge en los últimos años en diversos campos como agricultura, alimentación o medicina.

9.1. Antifúngicos sintéticos

Esta categoría agrupa varios tipos de antifúngicos, tanto de naturaleza orgánica como inorgánica. Los de naturaleza orgánica tienen un amplio rango de aplicación y una buena efectividad en diversos cultivos agrícolas en pre- y post-cosecha, pero tienen el inconveniente de que presentan cierta toxicidad para los consumidores y posibles efectos perjudiciales sobre los ecosistemas. En este grupo se encuentran, por ejemplo, los azoles, como procloraz y tebuconazol, ditiocarbamatos, como mancozeb, y morfolinas, como fenpropimorf. Los compuestos de naturaleza inorgánica suelen mostrar una efectividad más limitada que la de los antifúngicos orgánicos, aunque también pueden ser eficaces frente a ciertas plagas fúngicas agrícolas. Entre estos destacan el azufre y el oxiclورو de cobre que, aunque no están exentos de toxicidad, esta es mucho menor que la de los fungicidas sintéticos y, de hecho, su empleo está admitido en agricultura ecológica.

De este grupo de antifúngicos, en la presente tesis se ensayan dos azoles y una formulación mixta de ambos. Se trata de moléculas sintéticas con anillos heteropentacíclicos en su estructura química, con dos átomos de nitrógeno, en el caso de los imidazoles, o tres, en el caso de los triazoles, unidos por átomos de carbono a otros anillos aromáticos. Los azoles son compuestos con actividad fungistática, concretamente actúan sobre las células de hongos filamentosos y levaduras impidiendo la síntesis de ergosterol, principal componente de la pared celular fúngica, al inhibir la enzima lanosterol 14 α -desmetilasa (CYP51A1) que es dependiente del citocromo P-450 (Darbre, 2015). La función normal de esta enzima es la síntesis de ergosterol a partir del lanosterol, al cual desmetila. Algunos de los azoles más representativos y, por ello ensayados en la presente tesis doctoral, son el procloraz y el tebuconazol; ambos difieren en su estructura, pero presentan básicamente el mismo modo de acción: interfieren en el metabolismo de patógenos fúngicos, principalmente mediante la inhibición de la vía de síntesis del ergosterol (Hewitt,

1998). Numerosos estudios han puesto de manifiesto la efectividad de estos compuestos. Entre sus aplicaciones agrarias destaca la protección de cereales como el maíz, la avena, la cebada o el trigo frente a diversos géneros fúngicos como *Fusarium* (mapa.gob.es). Mateo et al. (2011a) y Mateo et al. (2013) determinaron el impacto de los fungicidas tebuconazol, procloraz y fenpropimorf sobre la reducción del crecimiento de dos cepas de *F. langsethiae* y sobre la producción de tricotecenos de tipo A por las mismas en agar extracto de avena y en granos de avena, respectivamente. Müllenborn et al. (2008) también ensayaron el efecto de una serie de azoles sobre *F. graminearum* en medio preparado con trigo. En los estudios de Mateo et al. (2013) y Müllenborn et al. (2008) se comprobó que la eficacia de estos antifúngicos es menor sobre granos de avena y de trigo que sobre los medios de cultivo preparados con dichos cereales. Todo esto ilustra la importancia del efecto de la matriz y la importancia de la realización de este tipo de ensayos en los diferentes cultivos.

9.1.1. Procloraz

El procloraz es un imidazol muy utilizado en Europa, Asia, América del sur y Australia. Aunque no puede ser considerado como un fungicida sistémico muestra acción translaminar. Su nombre químico según la IUPAC es *N*-propyl-*N*-[2-(2,4,6-trichloro-phenoxy) ethyl] imidazole-1 carboxamide. Su masa molecular es 376,7 Da y su fórmula molecular es C₁₅H₁₆Cl₃N₃O₂. La estructura química del procloraz se muestra en la Figura 21a.

En estado puro es un sólido cristalino sin color ni olor. Su punto de fusión oscila entre los 46,5 y 49,3 °C. A 25 °C su presión de vapor es de 1,5 x 10⁻¹ mPa. A 25 °C su solubilidad en agua es de 34,4 mg/L (https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB0130169.htm) y, además, es soluble en los disolventes cloroformo, acetona, tolueno, dietil éter, xileno y queroseno. El calentamiento continuado del procloraz a temperaturas por encima de los 200 °C

implica su descomposición. Bajo condiciones básicas (pH 9) su vida media varía entre 61,7 y 78,9 días. Los principales productos de su degradación son 2,4,6 triclorofenol y N-propil-N-2-(2,4,6-triclorofenoxi) etilamina. (http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/Prochloraz_2009.pdf). A pH 5 y 7 su estabilidad mejora. En general, en condiciones naturales (en los campos donde se aplica), su vida media es de en torno a 5 días en suelos arcillosos y 37 días en suelos arenosos, pudiendo llegar a ser de más de 130 días en suelos ácidos con abundante cantidad de materia orgánica y en condiciones de oscuridad. Su degradación es también dependiente de la microbiota propia de cada tipo de suelo. En los sistemas terrestres la movilidad del procloraz es limitada, ya que se adsorbe muy bien a los coloides del suelo y no lixivia con facilidad.

Las formulaciones más frecuentes son en forma de suspensión acuosa, de concentrado emulsionable, o de polvo mojable. El procloraz puede emplearse también en combinación con otros antifúngicos. Como ejemplo destaca la formulación de procloraz + tebuconazol, que se emplea en simiente de trigo, centeno, avena, cebada y triticale. (<https://www.mapa.gob.es/agricultura/pags/fitos/registro/productos/pdf/25843.pdf>).

Como otros azoles, este compuesto actúa impidiendo la síntesis del ergosterol, componente esencial de la membrana celular, bloqueando con ello la desmetilación en la posición C₁₄.

Hasta la fecha no se conocía mucho sobre el efecto del procloraz en el control de hongos productores de micotoxinas ni en la producción de estos metabolitos tóxicos, por lo que en esta Tesis se aborda por primera vez el estudio de la efectividad de este agente antifúngico en el control del crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus* y en el control de la producción de AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂ en diferentes condiciones ambientales.

Pese a su efectividad, este fungicida muestra diversos aspectos negativos; por ejemplo, se ha demostrado que está implicado en la

generación de estrés oxidativo y en daño genotóxico en células humanas (Lundqvist et al., 2016); se ha determinado que actúa como un antagonista de los receptores de andrógenos y estrógenos y como un inhibidor de enzimas que participan en la vía de la esteroidogénesis, y se ha demostrado que produce malformaciones reproductivas en ratones, siendo considerado un disruptor endocrino (Darbre, 2015; Vinggaard et al., 2006). Además, está catalogado como un posible carcinógeno y es un compuesto muy tóxico para los organismos marinos, en los cuales puede inducir efectos duraderos.

9.1.2. Tebuconazol

El tebuconazol es un triazol utilizado en agricultura para tratar hongos patógenos de plantas.

Su nombre químico, según la IUPAC, es (RS)-1-p-chlorophenyl-4,4-dimethyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl) pentan-3-ol. Su masa molecular es de 307,8 Da y su estructura química se muestra en la Figura 21b. El tebuconazol es un polvo cristalino, incoloro, pero con un olor característico, con pH de 7,3 y con punto de fusión en 102-105 °C. Su presión de vapor es de $1,3 \times 10^{-3}$ mPa a 20 °C y su solubilidad en agua a la misma temperatura es de 0,036 g/kg.

Puede presentarse en emulsión (emulsión de aceite en agua o concentrado emulsionable), como gránulos que se dispersan en agua, como concentrado floable o como polvo mojable. Se emplea en gran medida para tratar semillas de cultivos como avena, trigo, centeno o cebada, y protegerlas así del ataque de diversos hongos que pueden transmitirse a partir de las semillas. También se emplea en arroz y otros cultivos distintos de los cereales, como albaricoque, ajo, berenjena, calabacín, cereza, ciruela, cebolla, manzana, vid, melocotón, judías, pimiento, tomate, pera, pepino y olivo. (<https://www.mapa.gob.es/agricultura/pags/fitos/registro/productos/pdf/24504.pdf>).

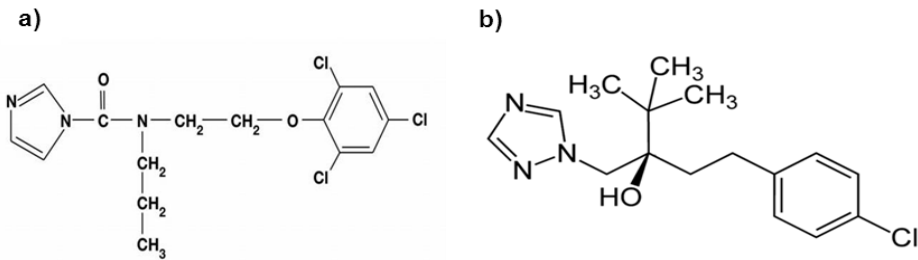


Figura 21. Fórmula estructural de los fungicidas: a) procloraz, b) tebuconazol.

El tebuconazol penetra por la cutícula y entra en las plantas una hora después de haber sido aplicado. Su modo de acción es tanto por contacto como por vía sistémica. Los depósitos de tebuconazol que quedan en la superficie de las plantas brindan una acción residual prolongada que dura unas semanas. Debido a su actividad sistémica, proporciona un buen control tanto de los hongos presentes en la superficie externa de las semillas como de los que se encuentran en el interior de estas.

En la planta se absorbe a nivel de las partes vegetativas y se transporta hacia los meristemos terminales en los que se acumula levemente (movimiento en sentido acropétalo). En concreto, la penetración a través de las raíces muestra una gran eficacia. En el suelo se degrada con rapidez y, por tanto, no llega a acumularse ni sufre lixiviación. La penetración a través de las raíces es muy efectiva; sin embargo, debido a su escasa movilidad en suelo los tratamientos se deben realizar en condiciones que favorezcan el contacto con la mayor parte del sistema radicular, para favorecer así una máxima absorción. Además, en el agua se hidroliza al sufrir fotólisis, siendo su vida media de en torno a 28 días. En condiciones naturales la degradación del tebuconazol es bastante rápida; en animales es metabolizado y los residuos resultantes son eliminados por completo después de tres días en forma de heces y orina, y en plantas como la vid, el cacahuete o el trigo, el metabolismo del vegetal propicia la

formación de compuestos de escasa toxicidad. La vida media del tebuconazol en el tejido de las plantas es de 12 días.

Tal y como hacen otros triazoles, el tebuconazol inhibe la biosíntesis del ergosterol, componente esencial de la membrana celular de los hongos, y responsable de su integridad física. Este componente es clave en procesos fisiológicos de los hongos como son el desarrollo o la esporulación. Su modo de acción consiste en impedir la desmetilación del C₁₄ del lanosterol, que propicia la acumulación de trimetilesteroles y, además, a diferencia de otros triazoles, en un paso posterior impide la deshidrogenación, con lo que se produce una acumulación de otros esteroides además del propio ergosterol. Esta es precisamente la razón por la que este fungicida está menos implicado con la aparición de fenómenos de resistencia que otros fungicidas de su mismo grupo.

En cereales el tebuconazol se emplea en el control de infecciones fúngicas como septoriosis, roya, oidio o tizón. Hasta hace poco, se conocía muy poco sobre su efecto en el control de hongos toxigénicos y sobre la producción de micotoxinas, y en esta Tesis se aborda por vez primera un estudio sobre la acción de este fungicida y de procloraz frente al desarrollo de las especies *A. flavus* y *A. parasiticus*, y frente a la producción de AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂ en diferentes condiciones ambientales.

Pese a que la Administración de Alimentos y Medicamentos de EEUU (FDA) considera que este fungicida es seguro para los humanos, aún puede suponer un riesgo. Además, la Agencia de Protección Ambiental de EEUU (EPA) ha estimado efectos adversos directos e indirectos de este fungicida sobre diversas formas de vida. Habitualmente se comercializa en combinación con otros compuestos, entre los que destacan el azufre y otros azoles, como protioconazol, bromuconazol o procloraz. Estas formulaciones pueden mostrar una toxicidad moderada, aunque algunas formulaciones son muy tóxicas, especialmente en ambientes acuáticos, y se sospecha que perjudican

a la fertilidad y que pueden provocar alergias e irritaciones oculares y de las vías respiratorias (mapa.gob.es).

La efectividad de los antifúngicos tradicionales está muy avalada. Sin embargo, es muy importante que el sector agrícola tenga en cuenta las posibles resistencias que pueden generar en determinadas especies fúngicas. Este es un problema que no se limita exclusivamente al campo, ya que ciertos antifúngicos, como los azoles, son la base para preparar formulaciones, tanto de aplicación agrícola como clínica, y eso puede implicar que hongos patógenos de plantas desarrollen resistencia cruzada a azoles de tratamiento médico, como ha ocurrido en el patógeno del maíz *Colletotrichum graminicola* (Serfling et al., 2007).

9.2. Antifúngicos naturales: aceites esenciales

Los aceites esenciales (AE) son mezclas de compuestos aromáticos obtenidos de materia vegetal (flores, semillas, hojas, ramas, brotes, cortezas, raíces, hierbas, madera y frutas) que no presentan efectos adversos contra el medio ambiente. Se encuentran en más de 17000 especies de plantas aromáticas pertenecientes a diversas familias de angiospermas (Regnault-Roger et al., 2012), que los sintetizan y almacenan en diversas estructuras secretoras como tricomas glandulares o conductos resiníferos. Estos AE pueden ser empleados en tecnología alimentaria, con lo que se consigue aumentar la seguridad y la duración de los alimentos. Su composición puede verse influida por diversos factores como el clima o la estacionalidad. Los compuestos fenólicos y pequeños terpenoides que contienen parecen ser los principales responsables de su acción antimicrobiana. El empleo de estos AE está admitido en agricultura ecológica, y la mayoría de ellos son clasificados como GRAS por la FDA (FDA, 2016). Por otra parte, cada vez es más frecuente la demanda de los consumidores y autoridades sanitarias de minimizar el uso de aditivos

de síntesis química en alimentos por considerarlos un riesgo potencial para la salud.

Hasta la fecha, se han ensayado AE de diferentes plantas y componentes puros de estos AE y los resultados indican que presentan diferentes niveles de eficacia tanto en el control del crecimiento fúngico como en el control de la biosíntesis de micotoxinas, dependiendo del AE o principio activo, dosis, especie fúngica y condiciones ambientales, por lo que constituyen una buena alternativa a los compuestos químicos en la conservación y tratamiento de alimentos (Hua et al., 2014; Shukla et al., 2009; 2012; 2013; Tian et al., 2011a; 2011b). La Comisión Europea ha registrado los principios activos cinamaldehído, carvacrol, carvona, citral, p-cimeno, eugenol, limoneno, mentol, linalol, vainillina y timol como compuestos aromáticos permitidos en alimentación, dada la ausencia de toxicidad en mamíferos y su acción preservativa (Prakash et al., 2015; Tajkarimi et al., 2010).

El modo de acción de los AE de plantas en la inhibición de la biosíntesis de micotoxinas no se conoce todavía perfectamente. Algunos autores postulan que este efecto puede ser debido a la interferencia en las rutas de biosíntesis de micotoxinas, sin ocasionar impacto alguno en el crecimiento fúngico, como encontraron Jayashree y Subramanyam (1999) en tratamientos de cultivos de *A. parasiticus* con dosis de hasta 0,75 mmol/L de eugenol. Para otros autores (Hu et al., 2017), los AE afectan tanto al crecimiento como a la producción de micotoxinas, como ha sido descrito para los aceites de *Curcuma longa* frente a *A. flavus* y frente a la producción de AF. En otros trabajos (Hua et al., 2014), se defiende que determinados principios activos de AE actúan como fuertes inhibidores del crecimiento fúngico al dañar la estructura de las células fúngicas, con lo que se consigue una drástica reducción de la producción de micotoxinas, como en el caso del cinamaldehído cuya principal diana es la inhibición de la biosíntesis de ergosterol, componente de la pared de las células fúngicas.

Debido a su naturaleza lipofílica, los AE pueden atravesar la pared celular o quedarse acumulados en ella, interaccionando con enzimas y demás proteínas, alterando la permeabilidad celular y provocando un flujo de protones hacia el exterior celular que implica la muerte de las células (Hua et al., 2014; Nogueira et al., 2010). Los AE empleados en los trabajos de la tesis han sido los de orégano y canela. También se han ensayado los compuestos puros carvacrol, cinamaldehído, isoeugenol, citral y linalol (Figura 22).

Recientemente se ha determinado que el orégano (*Origanum vulgare*) se considera un producto seguro en la alimentación del ganado vacuno y de otros tipos de animales en dosis de hasta 150 mg/kg de alimento (EFSA, 2019). Su principal componente es el carvacrol, que representa un 80% del mismo. El carvacrol interacciona con la membrana plasmática de los microorganismos produciendo su distorsión y desestabilización. El eugenol, al igual que el cinamaldehído, es un componente de AE que se encuentran en diversos vegetales, como la canela, ya sea en ramas o en hojas. El AE hierba limón, también conocido como citronela (*Cymbopogon citratus*) tiene como principal componente el citral, mezcla volátil de dos isómeros con dobles enlaces (neral en un 34,9% y geranial en un 41,8%, junto a otros componentes en cantidades inferiores) con un fuerte aroma a limón, y que muestra actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas, bacterias Gram negativas, levaduras y hongos. La información sobre la actividad de este compuesto cuando es incorporado en films es limitada (Tarazona et al., 2018; Wang et al., 2010).

Al igual que ocurre con otros tipos de agentes antifúngicos, ciertas dosis de AE pueden inducir la producción de micotoxinas, incluso cuando reducen el crecimiento fúngico. Así, Bluma et al. (2008) aprecian que determinadas concentraciones de ciertos AE, como los de eucalipto y tomillo, llegan a estimular la producción de AFB1 en hongos del género *Aspergillus* de la sección *Flavi*. Hope et al. (2005) detallaron que con una dosis de 500 µg/g de AE de canela, a 25 °C y una a_w de 0,955, la concentración de toxinas producidas por *F.*

graminearum y *F. culmorum* aumenta respecto a controles pese a que el crecimiento fúngico es significativamente inhibido. Aldred et al. (2008) ilustraron un caso de aumento de la producción de OTA por *A. westerdijkiae* con el empleo de una dosis de 50 µg/g de los AE de canela y clavo.

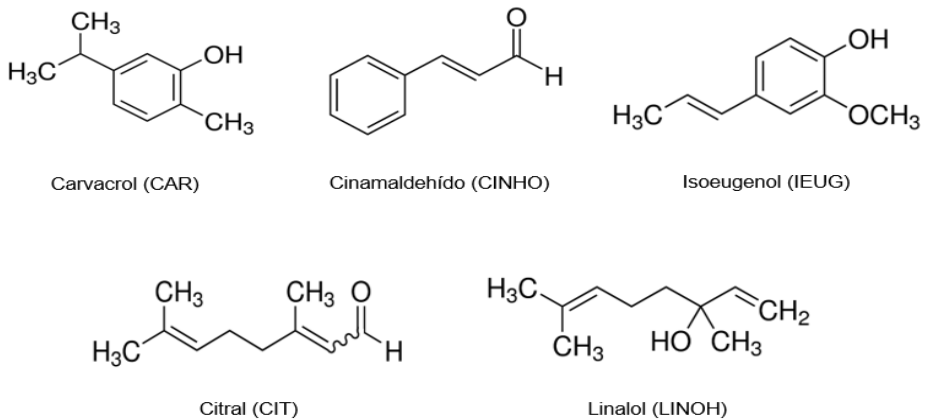


Figura 22. Fórmula estructural de los componentes puros de algunos aceites esenciales de plantas: carvacrol, cinamaldehído, isoeugenol, citral y linalol.

10. Films bioactivos y su posible aplicación en el control de hongos productores de aflatoxinas o de las toxinas T-2 y HT-2

Una estrategia muy novedosa en cuanto al control de la calidad de alimentos es la aplicación de compuestos antimicrobianos en fase vapor. Esta puede realizarse a partir de la inclusión de dispositivos independientes a los envases como pueden ser almohadillas o

etiquetas que contengan el agente antimicrobiano separado del producto alimenticio. En este caso, la liberación del compuesto activo depende de la humedad generada por el producto en función de su a_w o del aumento de otros factores como la temperatura de almacenamiento o el pH. Sin embargo, esta técnica implica que el dispositivo pueda ser ingerido accidentalmente o confundido con un juguete u otro tipo de objeto, por lo que ha sido optimizada para incluir los compuestos antimicrobianos en films de envasado bioactivo. Estos incluyen compuestos antimicrobianos, como AE, para controlar el desarrollo de hongos (Muriel-Galet, 2014; Nguyen Van Long et al., 2016). Cualquier agente antimicrobiano agregado a un sistema de envasado debe mostrar actividad antimicrobiana, ser compatible con el sistema de envasado al cual se pretende incorporar y, por supuesto, no debe ser tóxico para la salud humana. Varios estudios analizan el efecto antifúngico del empaquetado activo, pero en pocos casos se ha considerado el estudio de su efecto en la biosíntesis de micotoxinas (Manso et al., 2013; 2014; Passone et al., 2013).

Algunos de los principales polímeros usados en diferentes sistemas de envasado son LDPE (polietileno de baja densidad, "low-density polyethylene"), PET (tereftalato de polietileno, "polyethylene terephthalate"), PP (polipropileno) o EVOH (etileno-alcohol vinílico, "ethylene-vinyl alcohol").

Los materiales de copolímero de EVOH se han utilizado como matrices para el desarrollo de sistemas de envasado activo, donde el polímero protege a los agentes activos durante el almacenamiento y aumenta su actividad en exposición a la humedad (López-de-Dicastillo et al., 2010a, 2010b, 2011; Muriel-Galet et al., 2012, 2013). El EVOH está compuesto por dos cadenas de segmentos: una, olefínica e hidrófoba, proviene del etileno y la otra, con un sustituyente hidroxilo, presenta un comportamiento hidrofílico, y su síntesis es por polimerización de etileno y acetato de vinilo seguida de un proceso de hidrólisis. Es un material de empaque que se usa para proporcionar una alta permeabilidad al oxígeno y su naturaleza hidrófila lo hace muy sensible al agua (Aucejo et al., 2000); de hecho, debido a que estos

films absorben gran cantidad de agua en presencia de humedad, comúnmente son emplazados entre dos capas de materiales hidrofóbicos con el propósito de evitar la plastificación del polímero y la consecuente pérdida de sus propiedades de barrera. Estos sistemas son muy resistentes a la difusión de gases y disolventes debido a su morfología de materiales semicristalinos con regiones de estructura altamente ordenada interespaciadas con regiones amorfas desordenadas y a la elevada cohesión entre cadenas, causada por puentes de hidrógeno. Además, estos films son termoplásticos y constituyen, por tanto, una excelente barrera con propiedades térmicas, incluida la capacidad de sellado. Estas propiedades, combinadas con compuestos antimicrobianos como AE o sus constituyentes individuales, hacen que los films de EVOH bioactivo sean una estrategia efectiva y sostenible en la gestión de riesgos asociados a la presencia de hongos toxigénicos y micotoxinas en alimentos y piensos.

La ventaja de los AE es su alta volatilidad. Esta característica los hace atractivos en tratamientos por fumigación de productos almacenados y como ingredientes activos en envases de alimentos, ya que pueden actuar en fase gaseosa y ser liberados de forma controlada a partir del envase durante el transporte y/o almacenamiento, aumentando así la calidad y vida útil del producto sin necesidad de contacto directo del envase con el alimento envasado en su interior. Esto reduce la posibilidad del desarrollo de sabor indeseable en los alimentos a causa de los AE y mejora su efectividad (Ribeiro-Santos et al., 2017). La actividad antifúngica de los AE está relacionada principalmente con su estructura química, concentración e interacciones con la matriz, el sustrato y las condiciones ambientales. Existen varias técnicas para incorporar agentes antimicrobianos en un sistema de envasado. Estas son:

- **Adición de agentes antimicrobianos destinados a ser liberados:** En estos sistemas el compuesto antimicrobiano es liberado desde el polímero hacia la superficie alimentaria o el espacio de cabeza del envase. Esta estrategia puede ser llevada a

cabo mediante compuestos volátiles y compuestos no volátiles; en ambos casos mezclando el compuesto en la solución de formación del film o mezclando el compuesto por fusión durante los procedimientos de extrusión. El uso de agentes antimicrobianos volátiles es especialmente recomendable para alimentos cuya morfología impide que puedan ser envasados al vacío, debido a que no es posible un buen contacto entre el alimento y el material de envasado. Entre los compuestos volátiles que pueden ser utilizados destacan los AE o el SO₂. La volatilidad del compuesto y su solubilidad en el sistema alimentario y las paredes del paquete determinan el cálculo de su concentración en el alimento, que debería ser más alta que la concentración mínima inhibitoria o concentración más baja requerida para producir una inhibición visible del crecimiento microbiano. Para el caso de los compuestos no volátiles es necesario, obviamente, un contacto directo entre el film activo con el compuesto y la matriz alimentaria para que el compuesto pueda ser liberado y realizar su efecto. El empleo de films con compuestos no volátiles es adecuado en matrices de alimento semisólido o líquido que proporcionan un buen contacto entre el alimento y el envase, por lo cual el efecto antimicrobiano puede darse perfectamente. Entre los compuestos antimicrobianos no volátiles aplicables en sistemas de envasado cabe citar el antifúngico natamicina que ha sido incorporado en varios biopolímeros (Balaguer et al., 2014), o la nisina, un polipéptido producido por la bacteria *Lactococcus lactis* (Guo et al., 2014).

- **Inmovilización de agentes antimicrobianos en la pared del paquete:** Cuando se aplica este modelo, dichos agentes ejercen su actividad antimicrobiana por contacto directo con la matriz del producto, protegiéndolo de la degradación microbiana. En esta modalidad los agentes no pueden migrar, por lo que su actividad depende del contacto entre el envase y el alimento, siendo por ello los alimentos líquidos los más idóneos para la aplicación de este tipo de envasado. Para el caso de alimentos sólidos o semisólidos, si se aplica esta tecnología debe ser restringida al área de

contacto entre el envase y el alimento, por lo que dicha aplicación es limitada a sistemas como el envasado al vacío. Los principales compuestos empleados en la implementación de estos sistemas son péptidos antimicrobianos, especialmente bacteriocinas y determinadas enzimas.

Actualmente existe una legislación para evitar riesgos al consumidor por sustancias que puedan migrar desde estos envases hacia los alimentos. Los requerimientos generales para todos los materiales destinados a entrar en contacto con alimentos son regulados a nivel europeo mediante la regulación EC 450/2009 (European Commission, 2009b). Esta establece requerimientos específicos para el uso y autorización de todo tipo de material que pueda entrar en contacto con matrices alimentarias y, además, fija una lista de sustancias que pueden ser usadas en la fabricación de dichos materiales. De acuerdo con esta regulación, los conocidos como envases activos e inteligentes solo pueden comercializarse si son apropiados y efectivos para su uso previsto y deben de ir acompañados de una declaración de conformidad e incluir información para el consumidor en la fase de venta al por menor, tal como se establece en el artículo 3 del Reglamento EC 1935/2004 (European Commission, 2004).

Considerando la escasez de investigaciones previas sobre el efecto de films bioactivos en el control del crecimiento de hongos productores de micotoxinas y en el control de la biosíntesis de micotoxinas, en esta Tesis doctoral se utilizan films bioactivos compuestos por el copolímero EVOH-29 al que se incorporan diferentes AE y algunos de sus principios activos. Una vez fabricados los films, se ha ensayado su actividad en el control del crecimiento de especies fúngicas muy relevantes como *A. flavus*, *A. parasiticus* y *F. sporotrichioides*, y se ha estudiado su efecto en la reducción o inhibición de la producción de AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2 y de las toxinas T-2 y HT-2 en diferentes condiciones ambientales.

11. Nanopartículas de plata (AgNPs) y su posible aplicación en el control de hongos productores de aflatoxinas o de las toxinas T-2 y HT-2

Las propiedades antimicrobianas de las AgNPs son conocidas desde hace mucho tiempo, pero el máximo interés en esta investigación se ha alcanzado en el presente siglo. La capacidad antimicrobiana de las AgNPs es superior a la de la plata metálica debido a la gran superficie de contacto que establece la nanopartícula con el microorganismo (Carbone et al., 2016; Hannon et al., 2015). Además de su clara acción antimicrobiana, las AgNPs cuentan con ventajas en cuanto a su aplicación como una excelente estabilidad térmica y una baja volatilidad.

Las AgNPs actúan como agentes antifúngicos (Jogee et al., 2017; Kim et al., 2012) y antibacterianos (Ahmad et al., 2017; da Silva-Ferreira et al., 2017); son también eficaces frente a virus (Dos-Santos et al., 2014; Huy et al., 2017), eucariotas, como protozoos, ácaros, algas, plantas, larvas de insectos, piojos e incluso frente a células tumorales (Al-Bahrani et al., 2018; Khan et al., 2016; Nayak et al., 2016; Rai et al., 2014). Precisamente, el interés en el empleo de este tipo de compuestos en terapias frente a células cancerosas se debe a la acción de la plata (Wei et al., 2015); así, se han ensayado como terapia frente a la angiogénesis (Gurunathan et al., 2009; Sriram et al., 2010), leucemia (Guo et al., 2013, 2014), cáncer de pecho (Franco-Molina et al., 2010; Gurunathan et al., 2013a, 2013b), hepatocarcinoma (Faedmaleki et al., 2014; Sahu et al., 2014), cáncer de pulmón (Foldbjerg et al., 2011; Nazir et al., 2011) cáncer de piel y de boca (Austin et al., 2011; Nazir et al., 2011). Debido a todo ello, en los últimos años han atraído la atención en diversos campos de la ciencia como Microbiología, Medicina, Agricultura, Alimentos, Farmacología,

etc. (Baker et al., 2017; Hofmann-Antenbrink et al., 2015; Rai et al., 2018).

El mayor número de investigaciones sobre la acción antimicrobiana de estos compuestos se ha centrado en su efecto sobre bacterias. Su acción antibacteriana es dependiente del tamaño y de la dosis, siendo más efectivas las nanopartículas de menor tamaño y su eficacia aumenta a medida que aumenta la dosis (Agnihotri et al., 2014). Aunque existe cierta controversia sobre su mecanismo de acción, los diferentes autores coinciden en que básicamente se debe a la liberación gradual de iones de plata que inhiben la producción de adenosín trifosfato (ATP) y la replicación del DNA bacteriano, además de generar un daño en la membrana celular y especies reactivas de oxígeno (ROS) que desencadenan estrés oxidativo y conducen a la muerte celular (de Azeredo et al., 2013; Le Ouay et al., 2015; Liu et al., 2015; Novo et al., 2015; Salem et al., 2015).

La actividad antifúngica de las AgNPs y su efecto sobre la acumulación de micotoxinas en cereales, en condiciones de pre- y post-cosecha, han sido menos estudiadas, pero se pueden citar algunos trabajos. Así, Al-Othman et al. (2014) describieron que las AgNPs afectan a las funciones celulares de los hongos y causan impactos en las hifas fúngicas, tales como malformación, hipertrofia o reducción del número de esporas producidas. Kandile et al. (2010) estudiaron la actividad antifúngica de nanopartículas en combinación con diferentes compuestos heterocíclicos como derivados de tiazolidina, ftalazina, pirazolo, tetrazolo, hidrazida y piridazina sobre *A. flavus* y *Candida albicans*, y encontraron que el tratamiento combinado es significativamente más efectivo. Savithramma et al. (2011) emplearon extractos orgánicos de diferentes plantas (*Boswellia ovalifoliolata*, *Shorea tumbuggaia* y *Svensonia hyderabadensis*) en la síntesis de las AgNPs y evaluaron su actividad contra diversos hongos, entre ellos *A. flavus* y varias especies del género *Fusarium*. Estos autores encontraron que todas las nanopartículas presentaban un significativo efecto antifúngico, especialmente, las sintetizadas a partir de *Svensonia hyderabadensis*. Xu et al. (2013) evaluaron el efecto de

las AgNPs y de la natamicina contra una colección de aislados fúngicos, entre los que se encontraban especies de los géneros *Aspergillus* y *Fusarium*, y encontraron que las nanopartículas presentaban mayor efecto antifúngico que la natamicina.

Muchos estudios recientes sobre AgNPs inciden en la necesidad del desarrollo de métodos de síntesis que den como resultado nanopartículas con alto efecto antifúngico al tiempo que sus posibles efectos tóxicos sobre las células del hospedador sean mínimos. Ello sería posible si actúan sobre dianas fúngicas específicas, bien mediante tratamientos con AgNPs en solitario o en combinación con otros agentes antifúngicos, lo cual puede a su vez resolver el problema de la toxicidad de la plata y prevenir posibles resistencias. En el trabajo de Lima et al. (2012) se determinó que las células humanas eran más resistentes que las de otros organismos a los efectos de las nanopartículas.

Otra posibilidad de empleo de las AgNPs es como principio activo en films, revestimientos y otros materiales usados en envases bioactivos. Ante el posible riesgo de migración de las AgNPs desde los diferentes envases a los alimentos, en la legislación actual existe una recomendación respecto a los límites máximos de migración de iones plata en envases (EFSA, 2011b). Estos son de 0,05 mg/L en agua y de 0,05 mg/kg en alimentos. En el caso concreto del sector agroalimentario, las AgNPs pueden aplicarse en la limpieza de silos de almacenamiento del grano, como ingredientes activos en pinturas de envases, en films y en otros sistemas de envasado.

12. Métodos para la determinación de micotoxinas en granos de cereales

El estudio de la contaminación con micotoxinas en cosechas agrícolas requiere en primer lugar fijar el tipo de cultivo, el área de

recogida de las muestras y el método para su recogida. Los cereales, como el resto de cultivos, pueden sufrir contaminación fúngica en pre- y post-cosecha. La microbiota presente en estos periodos puede ser similar, pero, generalmente, sufre cambios drásticos dependiendo de otros factores tanto abióticos como bióticos, entre los que destaca el tipo de prácticas agrícolas, especialmente el tratamiento con agentes antifúngicos.

El análisis de la microbiota presente en la muestra suele ser un buen indicador de las posibles micotoxinas que se pueden encontrar en ella, aunque a veces no existe una buena correlación entre ambos factores, lo que obedece, bien a que el cereal ha sido almacenado en condiciones adecuadas inhibitorias de la producción de micotoxinas, o bien a que ha sido tratado con antifúngicos posteriormente a la producción de micotoxinas por los hongos presentes en el grano. Esta práctica destruye al hongo, pero no afecta a las micotoxinas que permanecerán en el cereal, por lo que en el análisis correspondiente no se detectarán los hongos, pero sí las micotoxinas.

El estudio de hongos en muestras naturales, como los cereales, requiere el empleo de medios de cultivo apropiados a los que se añade un inhibidor del crecimiento de bacterias, levaduras y hongos filamentosos de rápido crecimiento que puedan interferir con el crecimiento de los hongos productores de micotoxinas de interés. El medio empleado generalmente es agar patata glucosa (PDA) o agar extracto de malta (MEA) con pH entre 5 y 5,5, suplementado con inhibidores de crecimiento de microorganismos no deseados, como diclorán o cloranfenicol, y los cultivos suelen ser incubados a una temperatura entre 25 y 30 °C durante un periodo de 5 a 7 días.

Como consecuencia de la gran heterogeneidad en la distribución de micotoxinas en lotes de cereales y otros productos alimenticios ha sido necesario el establecimiento de criterios en la toma de muestras previa a los análisis de control (Whitaker, 2006) que garanticen la representatividad de los lotes, sublotos y, finalmente, de las muestras de laboratorio. La Unión Europea y la FDA incluyen estos criterios en

sus respectivas legislaciones (Spanjer, 2006) y, concretamente, en los países de la Unión Europea la toma de muestras debe adecuarse a las instrucciones fijadas en el Reglamento N° 401/2006 de la Comisión Europea (European Commission, 2006a). En los criterios aplicables a la preparación de las muestras y los métodos de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios, establecidos en el Reglamento N° 401/2006 de la Comisión Europea, se indica que las muestras deben ser procesadas correctamente para lograr una distribución homogénea de las micotoxinas. Previamente al análisis de micotoxinas como AF conviene evitar en la medida de lo posible la incidencia de luz solar durante la operación, ya que la luz ultravioleta influye en su descomposición.

Existe una amplia gama de técnicas analíticas que permiten determinar la presencia de toxinas fúngicas en matrices alimentarias. Algunas de estas técnicas simplemente son cualitativas y, por tanto, pueden permitir conocer si en una muestra está presente un determinado metabolito o no. Entre estas técnicas se puede citar la cromatografía de capa fina (TLC, thin-layer chromatography), que, aunque tiene una cierta antigüedad, cuenta con las ventajas de implicar un coste bajo, ser rápida y estar al alcance de cualquier laboratorio; además, se ha podido incluso optimizar para poder ser empleada en análisis semicuantitativos de micotoxinas (Lin et al., 1998). Sin embargo, en la actualidad las técnicas que se emplean son cuantitativas, es decir, permiten cuantificar la concentración de micotoxinas en la muestra. Entre estas se pueden citar la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, high-performance liquid chromatography) y la cromatografía líquida de ultra alta resolución (UPLC o UHPLC, ultra-high performance liquid chromatography).

El primer paso para la determinación de micotoxinas es la extracción de las mismas del material que se pretende analizar. Para ello, se emplean combinaciones de diferentes disolventes en función de la solubilidad y polaridad de las micotoxinas y del tipo de purificación que se lleva a cabo posteriormente. Los disolventes más

usados son metanol, acetonitrilo, agua, cloroformo o acetona. Es también habitual adicionar a estas mezclas cantidades pequeñas de compuestos modificadores, como ácidos débiles o sales que pueden optimizar el rendimiento extractivo, y de disolventes no polares, como hexano, que favorecen la eliminación de lípidos de las matrices (Rahmani et al., 2009).

Algunas técnicas extractivas específicas son la extracción acelerada con disolventes (ASE, accelerated solvent extraction) (Royer et al., 2004; Sheibani y Ghaziaskar, 2009), la extracción asistida por microondas (MAE, microwave-assisted extraction) (Krska et al., 2008; Pallaroni et al., 2002) y la extracción con fluidos supercríticos (SFE, supercritical fluid extraction) (Zougagh y Ríos, 2008). Las ventajas de estas técnicas son que permiten una automatización de los protocolos, así como un ahorro en cuanto al volumen de disolventes y al tiempo de análisis. Sin embargo, su uso no está ampliamente generalizado debido al elevado coste de los equipos, al mantenimiento que estos requieren y a problemas asociados a la selectividad de algunas micotoxinas en matrices complejas (Cigić y Prosen, 2009).

A la fase de extracción de las micotoxinas le sigue la fase de purificación del extracto obtenido. Los objetivos de esta fase son, por un lado, concentrar los analitos y por otro lado, eliminar posibles interferencias en el análisis. Como sistemas de purificación destacan los cartuchos convencionales de extracción en fase sólida (SPE, solid-phase extraction), los cartuchos Mycosep®, las columnas de inmunoafinidad (IAC, immunoaffinity columns) y los cartuchos de polímeros de impronta molecular (MISPE, molecularly imprinted solid phase extraction) (Cigić y Prosen, 2009; Krska, 1998; Krska et al., 2007; Rodríguez-Mozaz et al., 2007; Valle-Algarra et al., 2005; Zöllner y Mayer-Helm, 2006). Los cartuchos SPE cuentan con diferentes adsorbentes que les confieren especificidad para distintas micotoxinas, aunque son menos específicos que otros sistemas de purificación. Las IAC cuentan con anticuerpos en su fase estacionaria que se unen a micotoxinas de manera muy específica, con lo que se consigue minimizar la cantidad de interferentes en el posterior análisis

cromatográfico, así como mejorar la sensibilidad de estos métodos y la relación señal/ruido. Las desventajas de las IAC son su alto precio y la posibilidad de que los anticuerpos puedan desnaturalizarse en presencia de ciertos disolventes orgánicos (Scott y Trucksess, 1997; Senyuva y Gilbert, 2010).

Los MISPE se diseñan específicamente para cada metabolito y cuentan con lugares de unión específicos para determinados analitos. Estos sistemas de purificación cuentan con una menor afinidad que las columnas IAC, aunque tienen una mayor estabilidad química; además, debido a que pueden ser producidos a gran escala y en diferentes formatos resultan más económicos que las IAC (Baggiani et al., 2007; Urraca et al., 2008).

A la fase de purificación le sigue la de análisis. En ella las muestras son inyectadas en un sistema cromatográfico mediante un inyector automático o bien manualmente y desplazadas por la fase móvil consistente en una mezcla de disolventes impulsada por una bomba hasta una columna rellena con una determinada fase estacionaria, como la fase inversa C18, constituida por finas partículas de sílice recubiertas con octadecilsilano químicamente ligado a las mismas. En la columna los analitos serán eluidos con diferente velocidad en función del flujo de fase móvil y de su interacción con las fases móvil y estacionaria condicionada por sus propiedades fisicoquímicas para dirigirse al detector o a los detectores que se hayan acoplado para el análisis.

La elección del detector dependerá de las características moleculares del analito; así, por ejemplo, ciertas micotoxinas como las AF son fluorescentes y, por tanto, es apropiado para las mismas un detector de fluorescencia (FLD, fluorescence detector) en el que se programan las longitudes de onda de excitación y emisión apropiadas. Este tipo de detector cuenta, además, con la gran ventaja de poseer una gran sensibilidad. Ciertas toxinas como los tricotecenos de tipo A (toxinas T-2 y HT-2) no son fluorescentes. Sin embargo, pueden ser derivatizadas con determinados compuestos con ayuda de

catalizadores de reacción, y así aportarles grupos fluorescentes que permitan su identificación y cuantificación mediante el empleo de este detector. Otro ejemplo de detector útil para el análisis de determinadas micotoxinas es el detector de fila de diodos (DAD, diode array detector), pero no es específico y su sensibilidad no es muy alta.

En cualquier caso, cuando el metabolito en cuestión es detectado y mientras atraviesa la celda del detector se emite una señal eléctrica variable en función del tiempo que queda reflejada mediante la formación de un pico en el cromatograma. El tiempo de retención de cada toxina en un cromatograma corresponde al máximo del pico cromatográfico que origina y puede variar en función de la polaridad de la toxina, de la naturaleza y flujo de la fase móvil o de otros parámetros, como la temperatura de la columna durante el análisis. Para minimizar el efecto de la posible variación de la temperatura el equipo está provisto con un regulador de temperatura de la columna. El área correspondiente a ese pico cromatográfico es normalmente utilizada para propósitos cuantitativos mediante interpolación en una curva de calibrado realizada con patrones en las mismas condiciones cromatográficas. Otro tipo de técnica que se ha utilizado para determinar ciertas micotoxinas que se pueden derivatizar para originar compuestos volátiles termoestables (como pueden ser ciertos tricotecenos) es la cromatografía de gases (GC, gas chromatography), que suele emplearse combinada con detectores de ionización de llama (FID, flame ionization detector) o de captura de electrones (ECD, electron capture detector) (Valle-Algarra et al., 2005, 2011).

Tanto las técnicas de cromatografía de líquidos como las de gases ofrecen una buena selectividad del analito en cuestión y una buena sensibilidad. Sin embargo, es muy importante tener en cuenta que para un correcto análisis de muestras que proporcione resultados precisos se requiere de una buena separación cromatográfica, por lo que las muestras deben tener unos niveles muy bajos de compuestos interferentes. Para conseguirlo, se suele utilizar la centrifugación de los extractos de las muestras previamente al análisis, su purificación mediante técnicas selectivas como es el empleo de IAC (Krska et al.,

2005; Mateo et al., 2011b; Zhou et al., 2002), la evaporación mediante corriente de N₂ y redisolución del soluto resultante o la filtración mediante el empleo de filtros de 0,22 o 0,45 µm.

Entre las técnicas de cromatografía de líquidos, la UPLC es muy reciente y se basa en el empleo de columnas cromatográficas de menor longitud, con un tamaño de partícula menor que el del sistema HPLC (<2 µm) y el uso de presiones superiores a 1300 bares. Esta tecnología aporta mejoras con respecto a la HPLC convencional como son una eficacia superior, una sensibilidad y resolución más altas, un flujo inferior con menor consumo de disolventes y una reducción del tiempo, lo que implica menor coste del análisis de cada muestra y una mejora de la calidad de los resultados. Pese a esto, la tecnología HPLC también aporta una buena resolución y precisión en los análisis; por ello, y por el coste que implica la adquisición de un equipo UPLC, muchos laboratorios de análisis siguen empleando esta tecnología.

En los últimos años se ha impulsado notablemente el desarrollo de la técnica de análisis por espectrometría de masas (MS, mass spectrometry), altamente selectiva y frecuentemente acoplada a sistemas cromatográficos, como GC, HPLC o UPLC. Una ventaja muy importante de la aplicación de esta tecnología es que requiere el empleo de procedimientos previos de extracción y purificación sencillos y poco selectivos, con lo cual se facilita el trabajo y se reduce el tiempo de análisis. Además, esto supone poder determinar varias toxinas en un mismo análisis y alcanzar límites de cuantificación y detección por debajo de los establecidos por la legislación en alimentos. La tecnología utilizada en la presente tesis para llevar a cabo la determinación de micotoxinas en muestras de avena y maíz se basa en el acoplamiento de un sistema UPLC con detector de masas en tándem (MS/MS) con triple cuadrupolo usando una interfase de ionización mediante electronebulización (electrospray) (UPLC-ESI-MS/MS) que le confiere una elevada sensibilidad y selectividad.

Además de todo esto, existen las metodologías de cribado rápido de micotoxinas, que son sencillas, accesibles desde un punto de vista

económico, muy sensibles, específicas y rápidas ya que no requieren purificación previa de las muestras. Su principal inconveniente es la posible presencia de reacciones cruzadas (Krska et al., 2008), por lo que es interesante confirmar los resultados obtenidos como positivos por métodos cuantitativos selectivos. Entre las metodologías de cribado rápido destacan los inmunoensayos entre antígenos (como son las micotoxinas) y anticuerpos, utilizando un compuesto marcador que proporcione una señal característica e indicadora de que se ha producido la interacción antígeno-anticuerpo. Los principales inmunoensayos son:

- 1) Radioinmunoensayos, en los que se emplean marcadores radiactivos.
- 2) Inmunoensayos ligados a enzimas (ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay) en los que el marcador es un compuesto cromogénico.
- 3) Inmunoensayos de fluorescencia (FIA, fluorescence immunoassay), en los que dicho marcador es una molécula fluorescente.

De entre estos sistemas, los test ELISA son los más utilizados, aunque, como complemento y/o alternativa a dichos tests, existen biosensores cuyo funcionamiento se basa en interacciones inmunoquímicas (Maragos, 2004; Selvaraj et al., 2015; Wang y Wang, 2008).

13. El cambio climático y su efecto en el crecimiento de hongos y en la producción de micotoxinas

El clima de la Tierra está sufriendo un cambio progresivo con aumento generalizado de la temperatura, especialmente desde mediados del siglo XX. Este fenómeno es lo que conocemos como calentamiento global. Sus consecuencias más inmediatas son el

aumento de la temperatura media del aire y de los océanos, cambios en el patrón general del ciclo del agua, reducciones de los niveles de nieve y hielo, y aumento medio del nivel del mar (IPCC, 2014). El CO₂, el CH₄ o el N₂O son algunos de los conocidos como gases de efecto invernadero, que están íntimamente relacionados con el calentamiento del planeta y que son producidos en gran medida como consecuencia de actividades humanas. En relación con este cambio climático está previsto que las precipitaciones aumenten en zonas de elevada latitud, en muchas zonas húmedas de latitudes medias y en el área del Pacífico ecuatorial, y que desciendan en algunas regiones de latitudes medias y en regiones secas subtropicales, induciendo un aumento de la frecuencia de sequías en dichas zonas (Medina et al., 2017).

En materia de seguridad alimentaria es necesario elucidar los posibles escenarios esperables en el marco del cambio climático y en qué medida estas condiciones de estrés hídrico y térmico pueden afectar al desarrollo de hongos productores de micotoxinas y a la biosíntesis de micotoxinas en alimentos. Durante muchos años la investigación en este área se ha centrado en el diseño de modelos mayoritariamente *in vitro*, aunque también *in vivo*, que se han aplicado al estudio de la efectividad de diferentes tratamientos antifúngicos en diferentes condiciones ambientales, considerando fundamentalmente la temperatura y el nivel de a_w (Battilani et al., 2016), aunque varios estudios han incluido además la valoración del efecto de los niveles de CO₂ atmosférico (Akbar et al., 2016; Magan y Medina, 2016; Vary et al., 2015), lo cual resulta de interés, dado que hay evidencias de que su concentración en el planeta se incrementará en años sucesivos. Este aumento tendrá una implicación directa sobre diversos cultivos, las plagas que les afectan, la presencia de hongos y los niveles de micotoxinas (Borisade y Magan, 2015). En estos nuevos escenarios, dentro del campo de las toxinas fúngicas las AF representan una gran preocupación, debido a la adaptación de hongos aflatoxigénicos como *A. flavus* y *A. parasiticus* a altas temperaturas (Battilani et al., 2012), adaptación por la cual estas especies pueden llegar a representar un riesgo mayor al actual en las regiones mediterráneas y otras regiones

de clima templado. Así, según datos publicados por la EFSA (EFSA, 2007) se ha detectado un aumento en los niveles de AF en cultivos de maíz, pistacho y almendras en áreas del sur de Europa en consonancia con las condiciones climatológicas de tipo subtropical de las últimas anualidades.

En la bibliografía se pueden encontrar abundantes ejemplos que ilustran la influencia que está teniendo el cambio climático en el desarrollo de hongos productores de micotoxinas y, en consecuencia, en la producción de estos metabolitos. Así, por ejemplo, Richard et al. (1992), en maíz procedente de Hungría, de 32 aislados de *A. flavus* que estudiaron no encontraron ninguno que fuera productor de AF; sin embargo, en estudios más recientes en diferentes regiones de Europa central (Dobolyi et al., 2013; Kos et al., 2013; Tóth et al., 2013) es muy frecuente la presencia de aislados productores. Por su parte, Kos et al. (2013) en cultivos de maíz en Serbia en 2012 encontraron que, después de una estación seca, el 68,5% de las muestras analizadas estaban contaminadas con AF; no obstante, en las cosechas comprendidas entre 2009 y 2011 con una climatología habitual esto no ocurrió. Estos estudios avalan un aumento en los niveles de AF asociado a altas temperaturas y sequías, condiciones que desencadenan estrés en los hongos contaminantes de los cultivos y facilitan la colonización por las especies mejor adaptadas, como es el caso de *A. flavus* (Marasas et al., 2008).

Medina et al. (2015) estudiaron el crecimiento de *A. flavus* sobre medio extracto de maíz y granos de maíz a 34 y 37 °C, a a_w 0,91, 0,95 y 0,97 en atmósferas con niveles de CO₂ de 350, 650 o 1000 ppm. En todas esas condiciones, estos autores estudiaron el crecimiento del hongo, la expresión de genes implicados en la síntesis de AF (*afID* y *afIR*) y la producción de AFB1. Los resultados mostraron que el crecimiento apenas se vio afectado por los parámetros del estudio, salvo por la a_w , pero la producción de AFB1 sí estuvo afectada. A 34 °C, en combinación con 350 ppm de CO₂ (concentración presente en el aire atmosférico), se detectó la máxima expresión relativa de *afID*, la cual se redujo con el aumento de concentración de CO₂ y del estrés

hídrico, y se detectó también un incremento significativo de la expresión del gen *afIR* en la misma temperatura, pero solo con una atmósfera de 650 ppm de CO₂ y una a_w de 0,92. A 37 °C se detectó un incremento en la expresión de ambos genes con a_w 0,95 y 0,92, y en atmósferas con 650 y 1000 ppm de CO₂. Los resultados de este estudio ilustran que la concentración de CO₂ puede tener un efecto significativo sobre la regulación de la ruta de producción de AFB1.

Ciertos estudios han demostrado que diferentes cepas de una misma especie pueden responder de forma diferente a cambios climatológicos. Estas diferencias en el grado de adaptación también indican que este es otro factor que puede influir en la selección de las cepas mejor adaptadas. Battilani et al. (2016) indicaron que, en países europeos como Rumanía, Francia, Hungría y noreste de Italia, donde el cultivo de maíz es común, en 2013 se obtuvo el 60% de la producción total de maíz de los 28 estados miembros de la Unión Europea. Estos autores indican que, en este caso, el peligro de que se produzcan AF (AFI, aflatoxin hazard index) es bajo, ya que el área de mayor riesgo con posible producción de AF está situada a 45 ° de latitud norte y *A. flavus*, principal productor de AF en cosechas, no se desarrolla bien en las condiciones climatológicas de esa zona.

En un escenario en el que la temperatura aumentara 2 °C en los próximos cien años aumentaría el riesgo en esas regiones. Battilani et al. (2016) realizan una predicción para un posible escenario futuro en el que se produjera un aumento generalizado de la temperatura del orden de 5 °C en cien años, aunque el escenario que implica un aumento de 2 °C es el más probable. En la actualidad, el mayor riesgo se ubica en las zonas del sudeste europeo como Grecia, sudeste de Italia, Bulgaria y Albania. Aunque la producción de maíz a gran escala no es dominante en estos países, el riesgo sí es importante en esas zonas debido al elevado consumo local del maíz. Moretti et al. (2019) también defienden un aumento en el riesgo de la contaminación de maíz con AF en regiones del sur y del centro de Europa en los próximos treinta años debido al continuo cambio de las condiciones climáticas que cada vez son más apropiadas para el desarrollo de *A.*

flavus. Los países del norte de Europa, por el momento, constituyen áreas seguras respecto al riesgo derivado de la presencia de AF en cereales, en especial en maíz, aunque el cambio climático puede alterar esto, ya que la distribución geográfica de especies productoras como *A. flavus* podría verse alterada.

Los elevados niveles de CO₂ y su aumento generalizado también tienen relación con el desarrollo de especies del género *Fusarium* y con la producción de micotoxinas como los tricotecenos T-2 y HT-2. En concreto, la avena es un cultivo proclive a la contaminación por especies como *F. langsethiae* y *F. sporotrichioides* y que, por tanto, puede albergar las toxinas T-2 y HT-2, incluso sin que se aprecie visualmente la colonización por dichos hongos (Imathiu et al., 2017). En el estudio de Verheecke-Vaessen et al. (2019) se ilustra la implicación que puede tener el cambio climático sobre el crecimiento y la producción de las toxinas T-2 y HT-2 por *F. langsethiae*. En dicho trabajo se ensayó el desarrollo de *F. langsethiae* inoculado sobre avena y sobre agar extracto de avena e incubado a temperaturas de 20, 25 y 30 °C, con a_w de 0,98 y 0,995 y en atmósferas de 400 y 1000 ppm de CO₂. En estos cultivos se encontró que el mayor crecimiento del hongo se produce a 25 °C y con una a_w elevada. En cambio, el crecimiento se reduce significativamente bajo la combinación de 30 °C, una a_w de 0,98 y una atmósfera con 1000 ppm de CO₂. Además, la concentración de las toxinas fue superior en los granos de avena que en el medio preparado con dicho cereal. La temperatura óptima para la producción de las toxinas fue 25 °C, aunque en los ensayos en granos de avena el valor de a_w de 0,98 junto con atmósferas ricas en CO₂ se relacionaron fuertemente con un aumento significativo en la producción de las toxinas, especialmente a 30 °C. En este trabajo, en general, las atmósferas ricas en CO₂ también se asociaron con una sobreexpresión de los genes vinculados a la producción de las toxinas T-2 y HT-2.

Se puede concluir que los estudios realizados hasta la fecha demuestran una clara influencia del cambio climático en los patrones de distribución de las especies productoras de micotoxinas y en la biosíntesis de estos metabolitos. Sin duda, estas investigaciones

deben proseguir y establecer modelos predictivos que ayuden a prevenir y controlar los riesgos de hongos y micotoxinas en alimentos. Para ello, la cooperación internacional y multidisciplinar entre investigadores es fundamental.

14. Legislación de micotoxinas en alimentos en la UE

Debido al conocimiento de la importancia sanitaria de las micotoxinas, en las últimas décadas muchos países han fijado reglamentos para su control. Los objetivos de esto han sido proteger la salud humana y animal, y el interés económico de productores y comerciantes. Para evaluar el riesgo asociado a la ingesta de micotoxinas es importante conocer la toxicidad, biodisponibilidad y concentración de las micotoxinas en los alimentos, los posibles efectos sinérgicos entre estas, la cantidad de alimento consumido y su frecuencia, así como la edad, peso y estado de salud de los individuos que han entrado en contacto con las toxinas. El origen de la preocupación por la presencia de micotoxinas en alimentos data de la década de 1960, cuando surgió la conocida, en un principio, como “enfermedad X de los pavos” en granjas de pavos de Reino Unido. Este episodio dio pie a que se fijaran los primeros límites admisibles para estas micotoxinas a finales de esa misma década.

Los principios generales de la legislación sobre contaminantes en alimentos se fijaron en el año 1993 (European Commission, 1993). Esta legislación ya incluía niveles máximos (MLs) admisibles de contaminantes tóxicos en alimentos. El siguiente paso de la Comisión Europea fue establecer los niveles máximos para las micotoxinas AF, OTA y patulina en alimentos en 2001 (European Commission, 2001). Esta reglamentación fue modificándose en los sucesivos años, y en 2006 se fijó un reglamento que establecía los MLs de AF, OTA, patulina, DON, ZEA y fumonisinas en alimentos (European

Commission, 2006b). En lo que se refiere a AF, en la Tabla 3 se indican los MLs permitidos en la actualidad. Para estas micotoxinas se ha consensado una concentración límite máxima de 4 µg/kg para la suma de AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2 y de 2 µg/kg para la AFB1 en cereales y derivados, salvo para el caso del maíz, cereal al que se ha asignado un ML de 10 µg/kg para la suma de AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2 y de 5 µg/kg para AFB1. También en 2006 fue publicado otro reglamento que especificaba los métodos de muestreo en productos alimentarios (European Commission, 2006a). En el año 2007, la Comisión Europea actualizó los MLs de las toxinas producidas por hongos del género *Fusarium* en maíz y en productos derivados de maíz (European Commission, 2007). Más tarde, en 2010 se actualizaron los MLs admisibles de OTA (European Commission, 2010a) y AF (European Commission, 2010b) en diferentes alimentos. En 2012, se volvieron a establecer regulaciones para la OTA (European Commission, 2012a) y con respecto a la importación de alimentos procedentes de países del tercer mundo por riesgo de AF (European Commission, 2012b); también se publicaron recomendaciones respecto a los MLs admisibles de alcaloides del ergot (European Commission, 2012c) y para AF en higos secos (European Commission, 2012d). En 2013, la Comisión fijó recomendaciones para los tricotecenos T-2 y HT-2 en cereales y productos derivados (European Commission, 2013). En estas recomendaciones el límite establecido para la suma de ambas toxinas varía desde 15 µg/kg en alimentos derivados de cereales para lactantes, pasando por 1000 µg/kg para avena, hasta 2000 µg/kg en productos derivados de la molienda de la avena (cáscara). Posteriormente a estas recomendaciones, no se ha establecido una reglamentación sobre las concentraciones máximas admisibles de las toxinas T-2 y HT-2. Finalmente, en 2014 se estableció el ML para citrinina (micotoxina asociada al cultivo del arroz) en complementos alimenticios preparados a base de arroz fermentado con la levadura roja *Monascus purpureus* en 2000 µg/kg (European Commission, 2014).

Tabla 3. Niveles máximos ($\mu\text{g}/\text{kg}$) de aflatoxinas en alimentos autorizados en la UE.

Aflatoxinas	Suma		
	AFB1	AFB1, B2, G1 y G2	AFM1
- Cacahuets y otras semillas oleaginosas que se sometan a un proceso de selección u otro tratamiento físico antes del consumo humano directo o de su utilización como ingredientes de productos alimenticios, con la excepción de los cacahuets y otras semillas oleaginosas que vayan a molerse para la producción de aceite vegetal refinado	8,0	15,0	—
- Almendras, pistachos y huesos de albaricoque que se sometan a selección, u otro tratamiento físico, antes del consumo humano directo o de su utilización como ingredientes de productos alimenticios	12,0	15,0	—
- Avellanas y nueces del Brasil que vayan a someterse a un proceso de selección u otro tratamiento físico antes del consumo humano directo o de su utilización como ingredientes de productos alimenticios	8,0	15,0	—
- Frutos de cáscara arbóreos que vayan a someterse a un proceso de selección u otro tratamiento físico antes del consumo humano directo o de su utilización como ingredientes de productos alimenticios	5,0	10,0	—

Tabla 3 (continuación)

-Cacahuetes y otras semillas oleaginosas y sus productos transformados destinados al consumo humano directo o a utilizarse como ingredientes en los productos alimenticios, con la excepción de aceites vegetales crudos destinados a ser refinados y de aceites vegetales refinados	2,0	4,0	—
-Almendras, pistachos y huesos de albaricoque destinados al consumo humano directo o como ingredientes de productos alimenticios	8,0	10,0	—
-Avellanas y nueces del Brasil destinadas al consumo humano directo o a utilizarse como ingredientes de productos alimenticios	5,0	10,0	—
-Frutos de cáscara arbóreos, no especificados en los apartados previos, y sus productos transformados destinados al consumo humano directo o a utilizarse como ingredientes de productos alimenticios	2,0	4,0	—
-Frutas desecadas, distintas de los higos secos, destinadas a ser sometidas a un proceso de selección u otro tratamiento físico, antes del consumo humano o de su uso como ingredientes de productos alimenticios	5,0	10,0	—

Tabla 3 (continuación)

-Frutas desecadas, distintas de los higos secos, y productos derivados de su transformación, destinados al consumo humano directo o a ser usados como ingredientes en los productos alimenticios	2,0	4,0	—
-Todos los cereales y los productos a base de cereales, salvo: <ul style="list-style-type: none"> • Maíz y arroz que vayan a someterse a un proceso de selección u otro tratamiento físico antes del consumo humano directo o de su utilización como ingredientes de productos alimenticios • Alimentos a base de cereales transformados y alimentos para lactantes y niños de corta edad • Alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales dirigidos específicamente a los lactantes 	2,0	4,0	—
-Maíz y arroz que vayan a someterse a un proceso de selección u otro tratamiento físico antes del consumo humano directo o de su utilización como ingredientes de productos alimenticios	5,0	10,0	—
-Leche cruda, leche tratada térmicamente y leche para la fabricación de productos lácteos	—	—	0,050

Tabla 3 (continuación)

-Los siguientes tipos de especias: <i>Capsicum</i> spp. (frutas pasas de dicho género, enteras o molidas, con inclusión de los chiles, el chile en polvo, la cayena y el pimentón), <i>Piper</i> spp. (frutos de dicho género, con inclusión de la pimienta blanca y negra), <i>Myristica fragrans</i> (nuez moscada), <i>Zingiber officinale</i> (jengibre), <i>Curcuma longa</i> (cúrcuma) y mezclas de especias que contengan una o varias de estas especias	5,0	10,0	—
-Alimentos a base de cereales transformados, y alimentos para lactantes y niños de corta edad	0,10	—	—
-Preparados para lactantes y preparados de continuación, incluidas la leche para lactantes y la leche de continuación	—	—	0,025
-Alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales dirigidos específicamente a los lactantes	0,10	—	0,025
-Higos secos	6,0	10,0	—

Tabla 4. Niveles máximos recomendados de T-2 + HT-2 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en alimentos en la UE.

Cereales no transformados	
- Cebada (incluida la cebada cervecera) y maíz	200
- Avena (con cáscara)	1000
- Trigo, centeno y otros cereales	100
Granos de cereales para consumo humano directo	
- Avena	200
- Maíz	100
- Otros cereales	50
Productos a base de cereales para el consumo humano	
- Salvado de avena y copos de avena	200
- Salvado de cereales (excepto salvado de avena), productos de la molienda de avena (excepto salvado y copos de avena) y productos de la molienda del maíz	100
- Otros productos de la molienda de cereales	50
- Cereales para el desayuno, incluidos copos de cereales	75
- Pan (productos de panadería), pasteles, galletas, aperitivos de cereales y pasta	25
- Alimentos elaborados a base de cereales para lactantes y niños de corta edad	15
Productos a base de cereales en los piensos y los piensos compuestos	
- Productos de la molienda de avena (cáscaras)	2000
- Otros productos a base de cereales	500
- Piensos compuestos, excepto los piensos para gatos	250

II. OBJETIVOS

Los objetivos de la investigación desarrollada en esta Tesis Doctoral fueron los siguientes:

- 1.** Evaluación de la incidencia de *Aspergillus* spp. aflatoxigénicas y de *Fusarium* spp. productoras de las toxinas T-2 y HT-2 en maíz y avena consumidos en España en el periodo 2015-2019: Nuevos métodos de identificación fúngica.
- 2.** Determinación de los niveles de contaminación con aflatoxinas (B1, B2, G1 y G2) y tricotecenos tipo A (toxinas T-2 y HT-2) en todas las muestras de maíz y avena estudiadas en el objetivo 1.
- 3.** Estudio de tratamientos basados en antifúngicos sintéticos, así como AE (compuestos GRAS) y sus principios activos mayoritarios en el control del crecimiento y la producción de micotoxinas por las principales especies aisladas.
- 4.** Diseño de nuevas estrategias basadas en films bioactivos de EVOH con AE y de nanopartículas de plata para la prevención y control de la biosíntesis de AF o de las toxinas T-2 y HT-2 y del crecimiento de las especies productoras.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL

1.1. Reactivos, disolventes, patrones de micotoxinas y pequeño material

1.1.1. Reactivos

- Agar (Panreac, Montcada i Reixac, Barcelona, España).
- Agarosa (Sigma-Aldrich, Alcobendas, Madrid, España).
- Borohidruro sódico (NaBH_4 , >99,9% pureza) (Panreac, Montcada i Reixac, Barcelona, España).
- Carbón activo (Panreac, Montcada i Reixac, Barcelona, España).
- C18 (Panreac, Montcada i Reixac, Barcelona, España).
- Citrato trisódico (99,9% de pureza) (Panreac, Montcada i Reixac,

Barcelona, España).

- Copolímero de etilen-vinil alcohol al 295 (EVOH-29 Ethylene-vinil-alcohol) (The Nippon Synthetic Chemical Industry Co., Ltd., Osaka, Japón).
- Componentes para PCR (Tampón de PCR 10x, MgCl₂, dNTPs, Taq polimerasa) (Biotools, Madrid, España).
- Diclorán (Sigma-Aldrich, Barcelona, España).
- DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, España).
- Extracto de levadura (Panreac, Montcada i Reixac, Barcelona, España).
- Glicerol (Panreac, Montcada i Reixac, Barcelona, España).
- Glucosa (Panreac, Montcada i Reixac, Barcelona, España).
- Glutaraldehído (Panreac, Montcada i Reixac, Barcelona, España).
- Hidróxido sódico (NaOH) (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Isopropanol (Sigma-Aldrich, Barcelona, España).
- Kit de purificación de DNA NZYGelpure (Nzytech, Lisboa, Portugal).
- Marcador molecular (escala de 100 pb) (MBI Fermentas, Vilnius, Lituania).
- NaCl (Panreac, Montcada i Reixac, Barcelona, España).
- Nanopartículas de oro de 50 nm (concentración de $3,51 \times 10^{10}$ nanopartículas/mL) (Sigma-Aldrich, Barcelona, España).
- Nitrato de plata (AgNO₃, >99% de pureza) (Sigma-Aldrich, Alcobendas, Madrid, España).
- Nitrógeno gaseoso (pureza 99,9) (Alphagaz™, Madrid, España).
- Oro (Sigma-Aldrich, Alcobendas, Madrid, España).
- Óxido de aluminio (Merck, Darmstadt, Alemania).

- Paladio (Sigma-Aldrich, Alcobendas, Madrid, España).
- Paraformaldehído (Panreac, Montcada i Reixac, Barcelona, España).
- Parafilm M® (Sigma-Aldrich, Alcobendas, Madrid, España).
- Patrón certificado de plata de alta pureza de 1000 mg/L en HNO₃ 2% para ICP (HPS, Charleston, SC, EEUU).
- Peptona (Panreac, Montcada i Reixac, Barcelona, España).
- Sacarosa (Panreac, Montcada i Reixac, Barcelona, España).
- Disolución de amoniaco (25%) (Panreac, Montcada i Reixac, Barcelona, España).
- Sulfato de magnesio heptahidratado (Sigma-Aldrich, Alcobendas, Madrid, España).
- Sulfato de sodio (Sigma-Aldrich, Alcobendas, Madrid, España).
- Tampón fosfato 50 mM, pH 6,8 (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Tampón TAE 1x (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1,0 mM) (Sigma-Aldrich, Alcobendas, Madrid, España).
- Tetraóxido de osmio (Sigma-Aldrich, Alcobendas, Madrid, España).
- Tween 80 (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Yodo (Sigma-Aldrich, Barcelona, España).
- 1-Propanol (Sigma-Aldrich, Barcelona, España).

1.1.2. Disolventes

- Acetona (Panreac, Castellar del Vallés, España).
- Acetonitrilo (J.T. Baker, Deventer, Países Bajos).
- Acetato potásico 5 M (Merck, Madrid, España).
- Acetato sódico (Merck, Madrid, España).

- Ácido acético (Panreac, Castellar del Vallés, España).
- Ácido fórmico (Panreac, Castellar del Vallés, España).
- Agua destilada.
- Agua pura procedente de un aparato Milli-Q (Millipore, Billerica, MA, EEUU).
- Cloroformo (Lab-Scan Analytical Sciences (Gliwice, Polonia).
- Etanol (grado LC) (J.T. Baker, Deventer, Países Bajos).
- Formiato amónico (Panreac, Castellar del Vallés, España).
- Metanol (J.T. Baker, Deventer, Países Bajos).

1.1.3. Patrones de micotoxinas

- Aflatoxinas B1, B2, G1 y G2
- Toxinas T-2 y HT-2
- Nivalenol (NIV)

Todos ellos fueron suministrados por (Sigma-Aldrich, Alcobendas, Madrid, España).

1.1.4. Pequeño material

- Cámara de recuento Thoma, modelo Brand TM 718005 (Thermo Fisher Scientific, Reino Unido).
- Columnas de inmunoafinidad para purificación de aflatoxinas (Afla Test WB, Vicam, Milford, MA, EEUU).
- Filtros PVDF y de PTFE de 0,22 µm (Thermo Fisher Scientific, Reino Unido).
- Filtros Whatman nº 4 (Whatman, Reino Unido).
- Material de vidrio (tubos, matraces Erlenmeyer, jeringas, varillas,

etc.)

- Acetato potásico 5 M (Merck, Madrid, España).
- Material desechable (tubos, guantes, mascarillas, frascos para toma de muestras, etc.).
- Placas Petri de 92 x 16 mm (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania).
- Tubos cónicos para centrifuga Falcon™ de 50 mL (Thermo Fisher Scientific, Reino Unido).
- Varillas magnéticas para homogeneización de medios (Insulab, Valencia, España).

1.2. Medios de cultivo y disoluciones

Los medios de cultivo empleados para la realización de la investigación han sido los que se indican a continuación.

- **Caldo Sabouraud-cloranfenicol** (Pronadisa (Conda), Madrid, España).

Para su preparación se pesa la cantidad correspondiente al volumen de medio que se desea preparar, se añade agua pura Milli-Q hasta el volumen final, se dispensa en matraces Erlenmeyer o tubos y se esteriliza en autoclave siguiendo las especificaciones del fabricante.

- **Caldo extracto de levadura-peptona-glucosa (YEPD)** (yeast extract peptone dextrose).

Composición:

Extracto de levadura, 10 g

Peptona, 20 g

Glucosa, 20 g

Agua pura Milli-Q, 1 L

pH final 5,5-6

Para su preparación se pesan los ingredientes correspondientes al volumen de medio que se desea preparar, se añade agua pura hasta completar el volumen final, se dispensa en tubos o matraces Erlenmeyer y se esteriliza en autoclave (1/2 atmósfera, 115 °C, 30 min).

- **Agar extracto de coco** (CAM, coconut agar medium).

Composición:

Coco, 500 g

Agar-agar, 20 g

Agua pura Milli-Q, 1 L

pH final 5,5-6

Para su preparación se corta el coco en pequeños trozos (0,5 cm) en la cantidad adecuada al volumen de medio que se desea preparar y se hierven en agua pura a 100 °C durante 5 minutos. Posteriormente, se filtra y al filtrado resultante se le adiciona agua pura y agar hasta completar el volumen final y a continuación se esteriliza en autoclave (1/2 atmósfera, 115 °C, 30 min) y se dispensa en placas Petri (20 mL/placa).

- **Medio extracto de maíz** (MEM) (maize extract medium).

Composición:

Maíz finamente molido, 30 g

Agar-agar, 20 g

Agua pura Milli-Q, 1 L

pH final 5,5-6

Para su preparación se pesan los ingredientes en la cantidad adecuada al volumen de medio que se desea preparar y se añade agua pura hasta alcanzar el volumen final, se ajusta el nivel de a_w mediante la adición de glicerol estéril (cuando el experimento lo requiera) y se esteriliza el medio en autoclave (1 atmósfera, 121 °C, 20 min). Tras la esterilización se chequea la a_w (en controles preparados para este fin) para comprobar posibles variaciones y, si es el caso, se ajusta nuevamente con glicerol estéril al valor de a_w deseado. A continuación, se dispensa en placas Petri (20 mL/placa).

– **Agar patata glucosa (PDA)** (potato dextrose agar)

Composición:

Patata pelada y partida en trozos pequeños (1 cm), 300 g

Glucosa, 20 g

Agar-agar, 20 g

Agua pura Milli-Q, 1 L

pH final 5,5-6

Para su preparación se corta la patata en trozos pequeños (1 cm) en la cantidad adecuada según el volumen de medio que se desea preparar y se hierva durante 90 minutos en agua pura. Tras ello se filtra, se recoge el filtrado se añade la cantidad de agar correspondiente y se completa con agua pura hasta el volumen final. En el caso de que el medio se vaya a dispensar en tubos con medio inclinado, la mezcla preparada se funde hasta la completa disolución del agar, se dispensa en tubos, se esterilizan en autoclave (1/2 atmósfera, 115 °C, 30 min) y se dejan enfriar hasta temperatura ambiente en posición inclinada. En el caso de que el medio se vaya a dispensar en placa, los ingredientes suspendidos en agua pura se esterilizan en

autoclave (1/2 atmósfera, 115 °C, 30 min) y, posteriormente, se dispensa en placas Petri (20 mL/placa).

- **Agar patata glucosa-diclorán (PDA-D)** (potato dextrose agar-dicloran)

Composición:

La misma que el PDA, pero en este caso se adiciona 0,02 g de diclorán por litro de medio.

El modo de preparación también es el mismo que en el caso del PDA; sin embargo, en este caso, una vez esterilizado el medio y enfriado hasta 45-50 °C, se añade dicloran (1 mL/L de medio) disuelto en etanol puro (grado LC) al 0,2 % (p/v), se homogeneiza y se dispensa en placas Petri (20 mL/placa).

- **Agar extracto de levadura (YES)** (yeast extract sucrose agar)

Composición:

Extracto de levadura, 20 g

Sacarosa, 300 g

MgSO₄ – 7H₂O, 1 g

Agar-agar, 20 g

Agua pura Milli-Q, 1 L

pH final 5,5-6

Para su preparación se adicionan todos los componentes en la proporción adecuada acorde al volumen de medio que se desea preparar y se añade agua pura hasta el volumen final. A continuación, se esteriliza en autoclave (1/2 atmósfera, 115 °C, 30 min) y se dispensa en placas Petri (20 mL/placa).

- **Agar extracto de malta-cloranfenicol (MEC)** (malt extract cloranfenicol agar)

Extracto de malta, 30 g

Peptona de soja, 3 g

Cloranfenicol, 0,1 g

Agar-agar, 20 g

pH final: 5,4-5,7

Para su preparación se adicionan todos los componentes en la proporción adecuada (excepto el cloranfenicol) acorde al volumen de medio que se desea preparar y se adiciona agua pura hasta el volumen final. A continuación, se esteriliza en autoclave (1/2 atmósfera, 115 °C, 30 min), se deja enfriar hasta 45-50 °C, se adiciona cloranfenicol (0,10 g/L de medio) y se dispensa en placas Petri (20 mL/placa).

- **Disolución salina**

0,9 g de NaCl

50 µL de Tween 80

100 mL de agua Milli-Q

Para su preparación se homogeneizan los ingredientes en un matraz o vaso de precipitados, se dispensa la disolución en tubos de ensayo y se esterilizan en autoclave (1/2 atmósfera, 115 °C, 30 min).

1.3. Agentes antifúngicos

1.3.1. Agentes antifúngicos sintéticos

- Procloraz (Dogma® 400 g/L, Industrias Afrasa, S.A., Paterna, Valencia, España).

- Tebuconazol (Folicur 250 EW® 250 g/L, Bayer CropScience, S.L., Paterna, Valencia, España).

1.3.2. Aceites esenciales

- Canela (*Cinnamomum zeylanicum*) de corteza (66,5% cinamaldehído) (Jarpil, Almeria, España).
- Carvacrol (Sigma-Aldrich, Barcelona, España).
- Cinamaldehído (Sigma-Aldrich, Barcelona, España).
- Citral (Sigma-Aldrich, Barcelona, España).
- Isoeugenol (Sigma-Aldrich, Barcelona, España).
- Linalol (Sigma-Aldrich, Barcelona, España).
- Orégano (*Origanum vulgare*) (Jarpil, Almeria, España).

1.4. Equipos

- Agitador magnético STIH-C12-001 (Insulab, Valencia, España).
- Agitador orbital (Infors-HT Aerotron, Bottminghen, Suiza).
- Balanza de precisión SI 114 (Denver Instrument SI 114, Colorado, EEUU).
- Cámara de siembra (Telstar AH-100, Terrassa, Barcelona, España).
- Campana de extracción de gases (Burdinola ST 1500, Amoroto, Bizkaia, España).
- Celda electroquímica CH I660 (Cambria Scientific, Llwynhendy, Llanelli, Wales, Reino Unido).
- Centrífuga Eppendorf Centrifuge 5417-R (Hamburgo, Alemania).
- Centrífuga Heraeus Multifuge 1 S-R (Thermo Fisher Scientific,

Reino Unido).

- Equipo de cromatografía de gases de desorción térmica (TD-GC). Compuesto por: Tubo de desorción térmica 890 (Dynatherm Analytical Instruments, Inc. Kelton, PA, EEUU) conectado en serie a un sistema de cromatografía de gases HP 5890 Series II Plus (Agilent Technologies, Barcelona, España) equipado con un detector de ionización de llama (FID, Flame Ionization Detector) y una columna semicapilar Agilent HP-1 (30 m de longitud, 0,53 mm de diámetro interno y 2,65 μm de espesor de film) (Teknokroma S.C.L., Barcelona, España).
- Equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) compuesto por: bomba cuaternaria Waters 600 E, detector de fluorescencia FLD 470 (Waters Co., Milford, MA., EEUU), un sistema inyector de muestras Waters 717 Plus (Waters Co.), una columna de fase inversa Phenomenex Luna (150 \times 4,6 mm, 5 μm de tamaño de partícula) (Phenomenex, Torrance, California, EEUU) y un módulo post-columna (Waters Co.). Para el análisis de tricotecnos se empleó un detector de fila de fotodiodos Waters 996 (DAD) y una columna C18 Zorbax Eclipse Plus (150 \times 4,6 mm, 3,5 μm de tamaño de partícula) (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) con una precolumna del mismo material.
- Equipo de cromatografía de líquidos de ultra alta resolución (UPLC) ACQUITY UPLC™ equipado con columna C18 (50 mm capacidad de 2,1 mm, 1,7 μm de tamaño de partícula), espectrómetro de masas con triple cuadrupolo en tándem ACQUITY e interfaz ESI (ionización por electronebulización) (Waters, Manchester, Reino Unido).
- Equipo de medida de a_w Novasina RTD-502 (Novasina, GmbH, Pfäffikon, Suiza).
- Espectrofotómetro Nanodrop® ND-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, EEUU).
- Espectrofotómetro Agilent 8453 DAD (Agilent Headquarters, EEUU).

- Espectrómetro de masas por plasma acoplado inductivamente (ICP-MS 7900) (Agilent Headquarters, EEUU).
- Estufa de laboratorio (J.P. Selecta S.A., Abrera, Barcelona, España).
- Masterciclador “Mastercycler Nexus” (Eppendorf, Hamburgo, Alemania).
- Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (SECM) Modelo S-4800 (Hitachi Ltd., Tokio, Japón).
- Microscopio electrónico de transmisión (TEM) Modelo JEOL JEM-1010 (JEOL Co., Ltd., Tokio, Japón).
- Microscopio electroquímico de barrido (SECM) Equipo CH 920c (IJ Cambria Scientific Ltd., Reino Unido).
- Noria FALC F200 (Treviglio, Italia).
- pHmetro (Hanna Instruments, Guipúzcoa, España).
- Stomacher® 400 EVO (Seward, Reino Unido).
- Vortex (Heidolph Waltersdorfer, Alemania).

1.5. Software

- ChromasPro (Technelysium, South Brisbane, Australia).
- Masslynx 4.1™ (Waters, Manchester, Reino Unido).
- Millennium 32 (Waters Co., Milford, MA., EEUU).
- SPSS Statistics (versión 22.00 para Windows) (IBM Corp., Armonk, Nueva York).
- Statgraphics Centurion XV (versión 15.1.02) (Statpoint Inc., Herndon, VA, EEUU).

2. MÉTODOS

2.1. Análisis de especies productoras de aflatoxinas o de las toxinas T-2 y HT-2 en las muestras de maíz y avena

2.1.1. Toma de muestras de maíz y avena

Las muestras de maíz y avena fueron recogidas tras la cosecha en las campañas comprendidas entre 2015 y 2019 en cooperativas, almacenes y silos ubicados en diferentes regiones productoras españolas según la normativa vigente (Commission Regulation EC No 401/2006) (European Commission, 2006a). Las muestras de maíz se recogieron en los meses de septiembre y octubre y las de avena en julio y agosto.

Las muestras de maíz (98 muestras) se tomaron en las siguientes Comunidades Autónomas: Castilla y León (13 muestras), Valenciana (20 muestras), Extremadura (6 muestras), Galicia (14 muestras), Aragón (14 muestras), Madrid (14 muestras), Castilla la Mancha (12 muestras), País Vasco (2 muestras), y Cataluña (3 muestras).

Las muestras de avena (100 muestras) se tomaron en las siguientes Comunidades Autónomas: Castilla y León (39 muestras), Valenciana (7 muestras), Extremadura (1 muestra), Aragón (4 muestras), Madrid (11 muestras), Castilla la Mancha (27 muestras), Andalucía (5 muestras), y Navarra (6 muestras).

Se tomaron muestras de diferentes lotes hasta aproximadamente 10 kg de cereal, se homogeneizaron y de ahí se tomaron muestras de 1 kg en bolsas de papel de un solo uso que se cerraron y llevaron al laboratorio. Tras una nueva homogeneización, se tomaron muestras de

200 g y se molieron finamente. De ellas, 100 g fueron colocados en tubos de plástico estériles de un solo uso, con tapón de rosca, para el análisis micológico que se realizó en las 48 h siguientes a la recogida de la muestra y el resto (100 g) fueron colocados también en este tipo de tubos y almacenadas a -20 °C hasta el posterior análisis para determinar micotoxinas.

2.1.2. Recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) de posibles especies productoras de aflatoxinas o de las toxinas T-2 y HT-2

Se tomaron 10 g de cereal molido y se llevaron a matraces que contenían 90 mL de disolución salina estéril; tras homogeneización, a partir de esa suspensión se prepararon diluciones decimales seriadas (10^{-1} a 10^{-6}) en tubos que contenían 9 mL de disolución salina estéril, previa homogeneización de cada dilución usando un vórtex. A continuación, se inocularon 200 μ L de cada dilución en placas que contenían 20 mL de los medios PDA-D, MEC y YES por triplicado en cada uno de ellos (9 réplicas). El volumen inoculado se extendió homogéneamente por la superficie del medio empleando para ello el asa de Digrafsky estéril. La función del diclorán y del cloranfenicol es la inhibición del desarrollo de hongos de crecimiento rápido, como *Rhizopus* spp, y de bacterias.

Las placas se incubaron en oscuridad en estufa a 28 °C durante 5-7 días. Tras el periodo de incubación se seleccionaron las placas que contenían entre 20 y 200 colonias y a partir de ellas se obtuvo la media de UFC de hongos de la sección *Flavi* (posibles productores de AF) y de hongos de la sección *Sporotrichiella* (posibles productores de las toxinas T-2 y HT-2) por gramo de muestra. Para su selección y registro se atendió a las características macroscópicas y microscópicas de las colonias en los tres medios de cultivo.

2.1.3. Confirmación de la identificación de las especies fúngicas por métodos basados en el DNA

La confirmación de la identificación de las especies fúngicas detectadas en los recuentos de UFC/g en las muestras de avena y maíz, que se emplearon posteriormente en los ensayos con antifúngicos, fue llevada a cabo mediante métodos de PCR específicos de especie. Esta metodología fue puesta a punto y desarrollada por el grupo de "Hongos y Levaduras de Interés Agroalimentario" de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid (Gil-Serna et al., 2009a, 2009b, 2013; González-Salgado et al., 2008; Jurado et al., 2005; Sardiñas et al., 2010, 2011) y consistió básicamente en lo siguiente:

a) Extracción de DNA

La extracción del DNA del hongo fue llevada a cabo según el protocolo descrito por Querol et al. (1992). Los aislados seleccionados se pusieron en tubos con 5 mL de caldo YEPD. Seguidamente, los cultivos fueron centrifugados y el sedimento fue suspendido en 0,5 mL de una mezcla sorbitol 1 M - EDTA 0,1 M (pH 7,5); tras ello, las esporas fueron puestas en contacto con 0,02 mL de una disolución de zimolasa 60 (2,5 mg/mL), necesaria para lisar las paredes celulares. Los tubos se incubaron a 37 °C de 30 a 60 minutos para poder obtener esferoplastos. Estos fueron centrifugados durante 1 minuto y suspendidos en 0,5 mL de Tris-HCl 50 mM - EDTA 20 mM (pH 7,4), se añadieron 0,05 mL de sulfato de sodio (10%) y la mezcla se incubó a 65 °C durante 30 minutos. Tras esta incubación se añadieron a la mezcla 0,2 mL de acetato potásico 5 M y los tubos se colocaron en hielo durante 30 minutos. Tras retirar los tubos del hielo se centrifugaron durante 5 minutos a máxima velocidad. Los sobrenadantes fueron separados en nuevos tubos y el DNA se precipitó mediante la adición de isopropanol. Después, los tubos fueron incubados a temperatura ambiente durante 5 minutos y, posteriormente, fueron centrifugados durante 10 minutos. El DNA se

lavó con etanol 70%, los extractos se secaron en un sistema de vacío y se suspendieron en 50 µL de tampón de elución (Tris-HCl 10mM, EDTA 1 mM, pH 7,5).

b) Detección específica por PCR

Las especies *A. flavus* y *A. parasiticus*, productoras de AF fueron identificadas mediante los protocolos específicos de PCR de González-Salgado et al. (2008) y Sardiñas et al. (2010), respectivamente, mientras que la especie *F. sporotrichioides* fue identificada siguiendo el protocolo de Jurado et al. (2005). Los *primers* empleados para la identificación fueron:

<i>A. flavus</i>	FLA1 (5'-GTAGGGTTCCTAGCGAGCC-3') y FLA2 (5'-GGAAAAAGATTGATTTGCGTTC-3')
<i>A. parasiticus</i>	PAR1 (5'-GTCATGGCCGCGGGGGCGTC-3') y PAR2 (5'-CCTGGAAAAAATGGTTGTTTTGCG-3')
<i>F. sporotrichioides</i>	Fsp-F (5'-CGCACGTATAGATGGACAAG-3') y Fsp-R (5'-GTCAGAAGAGACGCATCCGCC-3')

Los *primers* empleados para la identificación de *A. flavus* y *A. parasiticus* amplifican un segmento de la región ITS (Internal Transcribed Spacer) (ITS1-5,8S-ITS2) (Henry et al., 2000), y los empleados para la identificación de *F. sporotrichioides* amplifican un segmento de la región IGS (Intergenic Spacer).

Las reacciones de amplificación se realizaron en volúmenes de 25 µL con entre 10 pg y 10 ng del DNA sonda en 3 µL para el caso de *A. flavus*, entre 10 y 80 ng en 2 µL para el caso de *A. parasiticus*, y con 25 ng en 3 µL para el caso de *F. sporotrichioides*, además de 1,25 µL de cada cebador (20 µM) (1 µL en el caso de *A. parasiticus*), 2,5 µL de un tampón de PCR 10x, 1 µL de MgCl₂ (50 mM), 0,25 µL de dNTPs

(100 mM) (0,2 μL en el caso de *A. parasiticus*) y 0,2 μL de Taq-polimerasa (5 U/ μL) (0,15 μL en el caso de *A. parasiticus*).

El protocolo de amplificación para *A. flavus* consistió en 1 ciclo de 5 minutos a 95 °C, 26 ciclos de 30 s a 95 °C (desnaturalización), 30 s a 58 °C (anillamiento), 45 s a 72 °C (extensión) y, finalmente, 1 ciclo de 5 minutos a 72 °C. Para *A. parasiticus* el protocolo fue muy similar, pero el anillamiento se dio a los 69,3 °C y el proceso de extensión duró 30 segundos. Para *F. sporotrichioides* el protocolo de amplificación consistió en 1 ciclo de 85 s a 94 °C, 25 ciclos de 35 s a 95 °C (desnaturalización), 30 s a 61 °C (anillamiento), 30 s a 72 °C (extensión) y 1 ciclo de 5 minutos a 72 °C.

Los productos de PCR fueron detectados en geles de agarosa (1%) en tampón TAE 1x (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1,0 mM) teñidos con bromuro de etidio. A continuación, fueron purificados y posteriormente secuenciados por la empresa MacroGen. La limpieza y corrección de las secuencias se realizó con el programa ChromasPro. Como marcador molecular del estudio se empleó una escala de 100 pares de bases (bp) (MBI Fermentas, Vilnius, Lituania). Todos los análisis fueron realizados por triplicado.

2.1.4. Análisis estadístico

Los datos de los recuentos (UFC/g) fueron sometidos a análisis estadístico para determinar cuáles de las variables ensayadas pueden influir en la incidencia de las especies fúngicas de interés en las muestras de maíz y avena.

Mediante el test de Kolmogorov-Smirnov se determinó que los recuentos de UFC/g de especies de *Aspergillus* de la sección *Flavi* y de *Fusarium* de la sección *Sporotrichiella* no seguían una distribución normal ($p > 0,05$), por lo que no se llevó a cabo un análisis de la varianza (ANOVA). En su lugar, se analizó la influencia de los factores

cereal, año de recogida y comunidad autónoma de origen mediante el test de Kruskal-Wallis (prueba no paramétrica).

El software empleado para la interpretación de los datos fue SPSS Statistics (versión 22.00 para Windows).

2.2. Aplicación de métodos de identificación fúngica basados en voltamperometría de estado sólido

Para el diseño y ensayo de la nueva metodología basada en voltamperometría para la caracterización e identificación de los hongos, se usaron aislados representativos de las principales especies productoras de micotoxinas que habían sido aislados previamente. Estos aislados fueron identificados por métodos microbiológicos clásicos según se indica en el apartado 2.1.2 y métodos de PCR específicos de especie como se describe en el apartado 2.1.3. Además, del empleo de métodos de identificación morfológica, y de PCR, se ensayó la capacidad productora de micotoxinas de los aislados en medio YES y en granos de cereales *in vitro* mediante HPLC con detectores de fluorescencia y fila de diodos, dependiendo de la micotoxina.

Una vez seleccionadas y quimioidentificadas las cepas productoras de micotoxinas de las diferentes especies fúngicas se prepararon cultivos frescos de todas ellas en medio YES. Para ello, se inocularon 3 μL de una suspensión de esporas del hongo de 1×10^6 esporas/mL en el centro de las placas de medio YES y se incubaron durante 5-7 días a 28 °C. A continuación, se tomaron muestras de las colonias crecidas en estos cultivos frescos y se sometieron al análisis por voltamperometría como se indica seguidamente.

2.2.1. Mediciones electroquímicas

Para llevar a cabo las mediciones electroquímicas se emplearon soluciones tampón de ácido acético/acetato sódico (HAc/NaAc) 0,25 M y pH 4,75 como electrolito de soporte. Las mediciones electroquímicas se efectuaron en una celda electroquímica CH I660 (Cambria Scientific, Llwynhendy, Llanelli, Wales, Reino Unido) a una temperatura de 298 ± 1 K. El estudio se llevó a cabo en un dispositivo convencional de tres electrodos: un electrodo de carbón vítreo BAS MF2012 (GCE, glassy carbon electrode) con un área de $0,071 \text{ cm}^2$, un electrodo auxiliar de alambre de platino y un electrodo de referencia Ag/AgCl (3 M NaCl).

Por un lado, para las medidas voltamperométricas se transfirió aproximadamente 0,1 mg de la colonia fúngica de un cultivo fresco (crecida durante 5-7 días a $28 \text{ }^\circ\text{C}$) a la superficie del electrodo GCE. Por otro lado, se empleó el método de extracción descrito por Doménech-Carbo et al. (2015a) y Martini et al. (2015). Para ello, se tomó 1 mg de la colonia de un cultivo fresco al que se añadió 0,5 mL de etanol y se molió en un mortero durante 2 minutos. A continuación, se tomaron 50 μL de la suspensión resultante y se colocaron en la superficie del electrodo GCE durante el tiempo suficiente hasta completar la evaporación del disolvente. Una vez evaporado, se insertó el electrodo en la celda electroquímica y se llevó a cabo el análisis voltamperométrico con diversos modos de detección: voltametría de barrido lineal (LSV, linear potential scan), cíclico (CV, cyclic voltammetry) y de onda cuadrada (SWV, square wave voltammetry). Para el análisis mediante microscopía electroquímica de barrido (SECM, scanning electrochemical microscopy) se empleó un equipo CH 920c (Figura 23). El electrodo de prueba fue de tipo microdisco de platino (CH 49, diámetro $20 \mu\text{m}$). Como electrodo soporte se utilizó un disco de platino (área geométrica de $0,018 \text{ cm}^2$) siendo el electrodo de referencia AgCl (NaCl, 3 M)/Ag.

Se utilizó el modo de biopotenciostato para aplicar potenciales al electrodo de prueba (E_T) y al electrodo sustrato (E_S). La velocidad de

barrido del electrodo de prueba sobre el electrodo soporte fue de 20 $\mu\text{m/s}$ para todas las mediciones, siendo la distancia entre ambos del orden del radio del electrodo de prueba.

Una masa de aproximadamente 0,5 mg de la colonia de cada especie fúngica se fijó en un lecho de pasta de carbono (50% m/m de polvo de grafito y aceite de Nujol) formando una capa fina sobre un electrodo de sustrato de platino. Se usó una disolución de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 2,0 mM en una mezcla de HAc/NaAc 0,25 M a pH 4,75 como sonda redox.

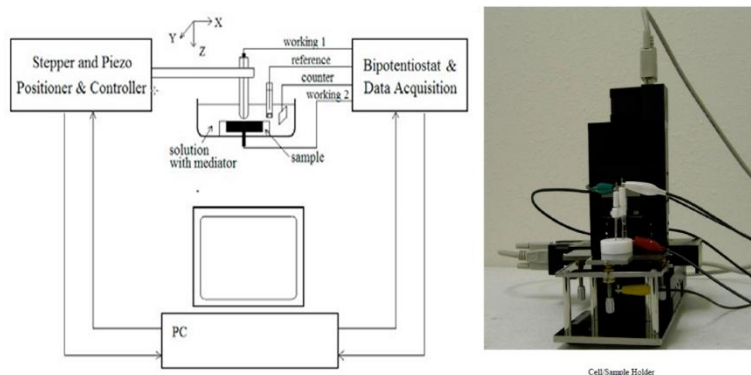


Figura 23. Diagrama del microscopio electroquímico de barrido CH 920C (izquierda); Soporte de la celda/muestra (derecha).

2.2.2. Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM, Field emission scanning electron microscopy)

La microestructura de los aislados de las diferentes especies fúngicas seleccionadas se observó utilizando un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM) (Modelo S-4800, Hitachi Ltd., Tokyo, Japón) operando a 20 kV. Las muestras tomadas de las colonias fúngicas se fijaron primero con el método Karnosky (glutaraldehído 0,5% (v/v) y paraformaldehído 2,5% (v/v) en tampón

fosfato 50 mM (pH 6,8) durante 8-10 horas a 4 °C). A continuación, se mantuvieron en el mismo tampón durante 3 horas. Posteriormente, las muestras de las colonias fúngicas se fijaron con tetraóxido de osmio al 1% (p/v) en el mismo tampón durante 2 horas a 4 °C y, después de deshidratación durante 24 horas con etapas dobles de 10 minutos con etanol de varios grados (30, 50, 70, 90 y 100) a temperatura ambiente, se secaron en punto crítico, se montaron sobre rejillas (superficies para su evaluación microscópica) y se recubrieron por pulverización con una combinación de paladio-oro.

2.3. Determinación de aflatoxinas y de las toxinas T-2 y HT-2 en las muestras de maíz y avena

2.3.1. Disoluciones estándar de las micotoxinas

Las disoluciones estándar de cada micotoxina fueron preparadas en diferentes concentraciones usando como disolvente una mezcla de acetonitrilo:agua (75:25, v/v). En concreto, las concentraciones de las cuatro AF fueron de 0,25, 0,5, 1, 2 y 5 ng/mL y las de las toxinas T-2 y HT-2 de 3,125, 6,25, 12,5, 25 y 62,5 ng/mL. Estas disoluciones fueron almacenadas en oscuridad a la temperatura de -20 °C durante 3 meses.

2.3.2. Extracción y análisis de las micotoxinas

Durante un periodo de cinco años (2015-2019) se recogieron ciento noventa y ocho muestras de los cereales avena (n=100) y maíz (n=98) en diferentes cooperativas, almacenes y silos en España. Todas las muestras recolectadas fueron almacenadas a -20 °C protegidas de la luz y la humedad en envases cerrados herméticamente.

Previamente a la extracción, las muestras se homogeneizaron y molieron finamente. Para la extracción de las toxinas se tomaron 2 g de harina de cada muestra y se les adicionaron 8 mL de una mezcla compuesta por acetonitrilo:agua:ácido fórmico (80:19:1, v/v/v); posteriormente, se mantuvieron durante 90 minutos en agitación en tubos Falcon y en un agitador orbital (Noria FALC F200, Treviglio, Italia); a continuación, los extractos se centrifugaron a 5500 rpm durante 5 minutos y se tomaron 2 mL del sobrenadante de cada extracto que fueron filtrados a través de filtros de jeringa (0,22 µm, PTFE) e inyectados en el sistema cromatográfico.

Se empleó el sistema UPLC-ESI-MS/MS (ACQUITY UPLC™) equipado con un interfaz de ionización por electronebulización (ESI) en modo positivo. Se empleó una columna C18 (50 mm × 2,1 mm, 1,7 µm de tamaño de partícula). La columna se mantuvo a 25 °C mientras que la temperatura del inyector automático se fijó en 15 °C. El volumen de inyección fue de 30 µL. La fase móvil empleada consistió en una combinación de agua con formiato amónico (0,15 mmol/L) y ácido fórmico (0,1%) (eluyente A), y metanol (eluyente B). El flujo fue de 0,35 mL/min y el gradiente de elución fue programado del siguiente modo: de 0 a 2 min la proporción de eluyente B fue incrementada de un 5% a un 20%. Luego, la proporción del eluyente B fue aumentada hasta el 100% en 11 minutos y entonces se mantuvo constante durante 2 minutos. Antes de cada inyección la columna fue equilibrada con un 5% del eluyente B. El tiempo entre dos inyecciones consecutivas fue de 17 minutos. La adición de ácido fórmico y formiato amónico aumentó la eficacia de la ionización y mejoró las formas de los picos cromatográficos.

La detección MS/MS fue llevada a cabo usando un espectrómetro de masas con triple cuadrupolo (ACQUITY). La interfaz ESI fue empleada en modo ion positivo (ESI+) con temperatura de desolvatación 300 °C, temperatura del bloque de la fuente 120 °C, voltaje del capilar 3 kV, flujo de gas por el cono 15 mL/min y flujo de gas de desolvatación 35 L/h. La energía de colisión y el voltaje de cono fueron optimizados para cada transición, y se monitorizaron un ion

cuantificador y un ion cualificador para cada micotoxina. Los datos fueron adquiridos y procesados mediante el software Masslynx 4.1™ (Waters, Manchester, Reino Unido).

2.3.3. Validación del método UPLC-ESI-MS/MS

El procedimiento de calibración empleado fue ajustado a cada matriz (“matrix-matched calibration”) (maíz o avena). Las disoluciones patrón de las micotoxinas se prepararon por adición de disoluciones estándar de las micotoxinas a extractos de muestras blanco extraídas como se indica en el apartado 2.3.2. Las muestras blanco fueron una de maíz y otra de avena previamente analizadas y en las que no se detectaron las micotoxinas objeto del estudio. Con este procedimiento, muy utilizado en métodos cromatográfico con detección por espectrometría de masas, se compensa en gran parte el efecto supresor que proporciona la matriz de la muestra sobre la señal analítica en comparación con una disolución patrón preparada solo con disolvente y sin matriz (Krska et al., 2008; Sulyok et al., 2006). Para cada micotoxina, la curva de calibración se obtuvo por regresión lineal ponderada (factor de ponderación=1/x, siendo x la concentración) entre las áreas del pico cromatográfico correspondiente al ion cuantificador y las concentraciones de los patrones correspondientes. La linealidad se asumió cuando $R^2 > 0,99$ y los residuos fueron inferiores al 20% (SANTE, 2015).

Para la validación del método las muestras blanco molidas y homogeneizadas se fortificaron con diferentes niveles de patrones de micotoxinas, dentro del intervalo de calibración, para determinar la recuperación y repetibilidad del método. Todos los ensayos fueron realizados por quintuplicado.

Para las experiencias de fortificación se tomaron 2 g de estas muestras (blancos) de maíz y avena y se les adicionaron volúmenes variables de disoluciones estándar de micotoxinas de modo que las

concentraciones de las mismas coincidiesen aproximadamente con el límite de cuantificación (LOQ) y con tres concentraciones por encima de los LOQ (2 x LOQ, 5 x LOQ y 10 x LOQ). Luego se dejó evaporar el disolvente durante 24 h a 40 °C y se extrajeron las micotoxinas como se ha indicado en el apartado 2.3.2.

Los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) fueron estimados para cada micotoxina a partir de la recta de calibración usando patrones con concentraciones bajas (cerca del LOD y del LOQ). El LOD se calculó como $3,3 \times s/b$ siendo s el error estándar residual y b la pendiente de la recta de calibración usando puntos próximos al LOD/LOQ (Desimoni y Brunetti, 2015; ICH, 2005). El LOQ fue estimado como $10 \times s/b$. La relación de dilución fue considerada para calcular el LOD y el LOQ del método.

La precisión del método y la exactitud para cada micotoxina se estimaron mediante la repetibilidad (RSD, desviación estándar relativa media) y el porcentaje de recuperación, respectivamente. La veracidad se basó en los valores de recuperación. Los porcentajes de recuperación fueron elevados (entre el 90 y el 110%), lo cual otorga confianza al método.

2.3.4. Tratamiento de datos

Para determinar la posible influencia de los diferentes factores (cereal, año de recogida y comunidad autónoma de origen de la muestra) sobre los niveles de micotoxinas, los datos se sometieron al test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov, el cual determinó que no seguían una distribución normal. Por ello, se recurrió al test no paramétrico de Kruskal-Wallis. También se determinaron los coeficientes de correlación de Spearman entre la suma de AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2 y el recuento de *Aspergillus* spp. de la sección *Flavi*, y entre la suma de las toxinas T-2 y HT-2 y el recuento de *Fusarium* spp. de la sección *Sporotrichiella*. El software empleado para

el análisis estadístico de los datos fue SPSS Statistics (versión 22.00 para Windows).

2.4. Ensayos con agentes antifúngicos incluidos en el medio de cultivo

2.4.1. Efecto de procloraz y tebuconazol en el crecimiento fúngico

a) Preparación de las disoluciones de procloraz y tebuconazol

Los patrones de los antifúngicos procloraz y tebuconazol se disolvieron en acetona. A partir de estas disoluciones stock se prepararon las concentraciones requeridas para cada ensayo. Estas disoluciones fueron empleadas inmediatamente tras su preparación. Antes de elegir las concentraciones de antifúngicos a ensayar se realizaron experiencias previas para determinar el rango de concentraciones de interés para el estudio que se pretendía realizar. Estas concentraciones debían ser, por un lado, lo más bajas posible ya que estos antifúngicos presentan cierta toxicidad para humanos y otros organismos, y por otro, debían ser efectivas para reducir y, en la medida de lo posible, inhibir totalmente el crecimiento de *A. flavus*. Los ensayos se realizaron en medio YES por ser un medio muy favorable para el crecimiento de *A. flavus* y para la producción de AF, y en granos de maíz por ser el cereal más contaminado con AF y, por tanto, en principio, más susceptible a la contaminación con estos metabolitos. En función de los resultados de estos experimentos preliminares se optó por elegir y ensayar los siguientes tratamientos: procloraz a dosis 0,01, 0,1 y 2,0 mg/L, tebuconazol a dosis 0,5, 5,0 y 10,0 mg/L y tres formulaciones mixtas de procloraz+tebuconazol a dosis 0,01+0,005, 0,1+0,05 y 2,0+1,0 mg/L.

b) Selección de la cepa de *A. flavus* productora de aflatoxinas

Para la selección de la cepa de *A. flavus*, se sembraron 50 aislados de *A. flavus* obtenidos de las muestras de maíz y 50 aislados de *A. flavus* obtenidos de las muestras de avena en agar extracto de coco (CAM) en placas Petri de vidrio previamente esterilizadas en horno Pasteur a 160 °C durante 2 h, envueltas en papel de aluminio. Tras 7 días de incubación a 25 °C en oscuridad, los cultivos de los aislados de *A. flavus* fueron expuestos por el reverso a luz UV de 366 nm. En este medio de cultivo y bajo radiación de esta longitud de onda las colonias de las cepas de *A. flavus* productoras de AF presentan fluorescencia verde-azulada muy intensa y fácilmente visible. En función de la intensidad de esta fluorescencia fue elegida la cepa de *A. flavus* M34 aislada de maíz (se conserva liofilizada y en glicerol al 40% en la colección de hongos del grupo ubicada en el Departamento de Microbiología y Ecología de la Universitat de València). Previamente al inicio de los ensayos con los antifúngicos, se prepararon cultivos frescos de la cepa de *A. flavus* seleccionada en medio YES incubados durante 5-7 días a 28 °C. Con ellos se preparó una suspensión de 10^6 esporas/mL en SSE al 0,9% adicionada con Tween 80 al 0,005%. El Tween 80 es un surfactante apolar que facilita el mantenimiento de una suspensión homogénea de esporas (Kvítek et al., 2008).

c) Preparación de los medios de cultivo con diferentes niveles de a_w y de antifúngicos

Tanto el medio YES como los granos de maíz se prepararon con a_w 0,99 y 0,95. En el caso del medio YES, la a_w se ajustó mediante la adición de glicerol, y en el caso de los granos de maíz, mediante la adición de agua Milli-Q usando en ambos casos curvas de adsorción obtenidas previamente para cada uno de los medios. Los medios fueron esterilizados a 1/2 atmósfera y 115 °C durante 30 minutos. Tras la esterilización y enfriado se chequeó la a_w en matraces control para confirmar su valor. Cuando los medios se encontraron a 45-50 °C se

adicionaron las correspondientes disoluciones de fungicidas y se homogeneizaron para conseguir las concentraciones indicadas en el apartado 2.4.1a. A continuación, el medio YES se dispensó en placas Petri (20 mL/placa) y los granos de maíz se mantuvieron 48 h y a 4 °C con agitación manual periódica para homogeneizar el valor de a_w y la concentración de los fungicidas. Después, los granos de maíz se dispusieron en placas Petri (15 g/placa) formando una capa homogénea con superficie plana para lo cual se utilizó una espátula estéril. Todas las placas, tanto con medio YES como con granos de maíz, se inocularon en el centro con 5 μ L de una suspensión de esporas de *A. flavus* (1×10^6 esporas/mL). Las placas con el mismo nivel de a_w se agruparon en bolsas de plástico provistas de frascos con disoluciones de glicerol:agua con la misma a_w que la del medio de cultivo con el fin de mantener en su interior una humedad relativa adecuada en equilibrio con la a_w de los cultivos contenidos en cada bolsa. Tanto controles como tratamientos fueron incubados a las temperaturas de 25 °C y 37 °C durante 12 días. Todos los experimentos se repitieron dos veces y en cada vez se realizaron tres réplicas (6 réplicas en total).

d) Medición y seguimiento del crecimiento del hongo

Durante los 12 días de incubación se midió el crecimiento fúngico en los cultivos control y en los diferentes tratamientos y condiciones de temperatura y a_w ensayadas. Para ello, se trazaron dos líneas perpendiculares en ángulo recto por el reverso de la placa Petri formando una cruz con el punto de cruce coincidiendo con el centro de la colonia. Diariamente se midieron ambos diámetros perpendiculares de la colonia con ayuda de una lupa. La velocidad o tasa de crecimiento de la colonia en mm/día fue calculada como la pendiente de la recta obtenida por regresión lineal del diámetro medio de las colonias en cada condición frente al tiempo. Las dosis efectivas para la inhibición del crecimiento del hongo en un 50 % y en un 90 % (DE_{50} y DE_{90}) fueron calculadas a partir de las gráficas resultantes de la representación de la tasa decrecimiento frente a la dosis. Una vez

finalizado el periodo de incubación, los cultivos en granos de maíz se secaron en estufa a 50 °C durante 24 h y se molieron finamente. Seguidamente, las harinas resultantes de la molienda de los cultivos en granos de maíz y los cultivos en medio YES se congelaron a -20 °C hasta su posterior análisis para la determinación de las AF.

2.4.2. Efecto de procloraz y tebuconazol en la producción de micotoxinas

a) Disoluciones estándar de aflatoxinas

Los patrones de AFB1 y AFB2 se disolvieron en cloroformo (concentración: 500 µg/mL). A partir de estas disoluciones se prepararon otras de concentraciones 0,05–6 ng de AFB1 y AFB2/mL en metanol:agua (80:20, v/v) para obtener las rectas de calibrado. Las disoluciones stock fueron almacenadas a -20 °C en viales ámbar cerrados con tapón de rosca. Estos viales se equilibraron a la temperatura ambiente y se pesaron previamente a su uso para descartar cualquier posible variación (método gravimétrico). Después, se inyectaron 50 µL de cada disolución patrón en el sistema cromatográfico.

b) Extracción de aflatoxinas en los cultivos en medio YES

Para la extracción de AF del medio YES se tomó la totalidad del cultivo procedente de cada placa Petri, se homogeneizó con ayuda de un Stomacher[®], y a partir del homogeneizado, se tomó 1 g que se llevó a un pequeño vaso de vidrio al que se añadieron 5 mL de cloroformo. Los vasos se taparon con tapón de rosca y se sometieron a agitación orbital durante 1 h. Posteriormente, se filtró el contenido de cada uno de ellos a través de cartuchos provistos de 0,5 g de alúmina, empleando para ello un sistema de vacío (Manifold). Los cartuchos se

lavarón a continuación con 2 mL de cloroformo y el filtrado se combinó con el filtrado previo y se evaporó, a continuación, a sequedad, en una placa a 45 °C, bajo corriente de N₂. El residuo se resuspendió en 500 µL de metanol:agua (80:20, v/v), se centrifugó durante 10 min. a 14000 rpm. A continuación, se transfirió el sobrenadante a un vial de color ámbar y se inyectaron 50 µL en el sistema cromatográfico.

c) Extracción de aflatoxinas de los cultivos en granos de maíz

Al finalizar el periodo de incubación la totalidad del cultivo en granos de maíz de cada placa Petri se secaron en estufa a 45-50 °C durante 24 h. Los cultivos secos se molieron hasta polvo fino y se tomaron 2 g que se llevaron a un pequeño matraz de vidrio al que se añadieron 20 mL de una mezcla de acetona:agua (60:40, v/v). Los matraces se taparon con tapón de rosca y se mantuvieron en agitación orbital durante 1 h para extraer las AF (Bertuzzi et al., 2012). A continuación, el contenido de cada matraz se filtró; se tomaron 5 mL de cada filtrado que se mezclaron con 45 mL de agua pura Milli-Q. La mezcla se introdujo en una columna de inmunoafinidad (IAC) (Afla Test WB, Vicam, Milford, MA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante, y el líquido recogido se desechó. A continuación, la IAC se lavó con 5 mL de agua Milli-Q e, igualmente, el líquido del lavado se desechó. Finalmente, las AF fueron eluidas con 3 mL de metanol y el líquido eluido se recogió en un pequeño vial. El disolvente se evaporó hasta sequedad bajo corriente de N₂ y el residuo seco se suspendió con 500 µL de metanol:agua (80:20, v/v) y se centrifugó a 14000 rpm. Se transfirió el sobrenadante a un vial de color ámbar y se inyectaron 50 µL en el cromatógrafo de líquidos (HPLC).

d) Análisis cromatográfico de las aflatoxinas

Para la cuantificación de las AF en los cultivos fue necesaria la obtención de rectas de calibrado para cada una de las AF a analizar. Para ello, se prepararon disoluciones de patrones de AFB1 y AFB2 de entre 0,05 y 6 ng/mL en metanol:agua (80:20, v/v), y se inyectaron 50

μL de cada una de ellas en el sistema HPLC obteniendo así las rectas de calibrado.

Las AF se analizaron en un sistema HPLC (Mateo et al., 2011b) dotado de una bomba cuaternaria Waters 600E con inyector automático, un detector de fluorescencia, un módulo post-columna Waters (Waters Co., Milford, MA., USA) con longitud de onda de excitación 362 nm y longitud de onda de emisión 450 nm, y una columna de fase inversa (Phenomenex Luna 150 \times 4.6 mm, diámetro de partícula 5 μm). El sistema fue controlado mediante el software Waters Millennium 32.

Los extractos de las muestras con niveles de AF que excedieron los límites de linealidad fueron apropiadamente diluidos en metanol:agua (80:20, v/v) antes de su inyección en el sistema cromatográfico. La fase móvil se compuso de una mezcla de agua (A), acetonitrilo (B) y metanol (C), programada con el siguiente gradiente: 0.00 min: 70% A, 10% B, 20% C (1 min); 1,01 min: 60% A, 10% B, 30% C; 16,01–19,50 min: 30% A, 25% B, 45% C; 19,51–28,00 min: 70% A, 10% B, 20% C. El flujo durante el análisis fue de 1 mL/minuto. Para optimizar la detección y cuantificación de la AFB1. Se realizó su derivatización post-columna, que fue llevada a cabo usando una disolución recién preparada de yodo (300 mg de I_2/L disueltos en metanol:agua 90:10, v/v) a un flujo de 0,5 mL/min. La fase móvil y el reactivo para la derivatización post-columna se filtraron a través de un filtro de 0,45 μm y se desgasificaron previamente a su uso. La temperatura del reactor post-columna fue 70 $^\circ\text{C}$.

e) Análisis estadístico

Se realizó un ANOVA y un test Duncan de agrupamientos múltiples de los datos mediante el programa Statgraphics Centurion XV, version 15.1.02 (StatPoint, Inc., Herndon, VA, USA). Se tomó un nivel de confianza del 95% para determinar la influencia tanto de factores principales como su interacción.

2.4.3. Efecto de los aceites esenciales en el crecimiento fúngico

En este estudio se ensayó el efecto de diferentes AE adicionados a MEM en el crecimiento de *A. flavus* (AfM45) y *A. parasiticus* (ApM16) y en la producción de AF en diferentes condiciones ambientales.

a) Aceites esenciales

Se ensayaron los AE del orégano, cuyo componente mayoritario fue carvacrol (86%) y el de corteza de canela, cuyo componente mayoritario fue cinamaldehído (66,5%), y también los principios activos puros carvacrol y cinamaldehído, individualmente.

b) Preparación de los inóculos fúngicos

Los aislados de *A. flavus* (AfM45) y *A. parasiticus* (ApM16) obtenidos de las muestras de maíz y caracterizados previamente siguiendo los protocolos de González-Salgado et al. (2008) y Sardiñas et al. (2010), respectivamente, se conservaron en la colección del grupo de “Micología y Micotoxinas” en el Departamento de Microbiología y Ecología de la UV. Antes de su uso, se prepararon cultivos frescos de estos aislados de 5-7 días en MEM (3% w/v de granos de maíz molidos + 2% w/v agar en agua pura Milli-Q) incubados a 28 °C en oscuridad. A partir de estos cultivos frescos se prepararon suspensiones de esporas en SSE (1×10^6 esporas/mL) que se emplearon para inocular los medios (controles y tratamientos) en los ensayos posteriores con AE.

c) Preparación del medio de cultivo con diferentes niveles de a_w y diferentes aceites esenciales

Los ensayos se llevaron a cabo en MEM. El nivel de a_w del medio se ajustó a 0,96 y 0,99 con glicerol. La a_w del medio se midió con un equipo Novasina RTD 502 calibrado usando controles de a_w conocida suministrados por el fabricante. Tras ello, los medios se autoclavaron a

115 °C durante 30 minutos; después, se atemperaron hasta llegar a una temperatura aproximada de 45-50 °C y, entonces, se adicionaron los volúmenes necesarios de las disoluciones de AE o de los compuestos puros de los AE para conseguir las concentraciones de 10, 100, 250, 500 y 1000 mg/L de cada uno de ellos (orégano, canela, carvacrol o cinamaldehído). Con este fin, los medios se homogeneizaron mediante agitación manual vigorosa para asegurar la perfecta dispersión de los aceites y se dispensaron en placas Petri de 9 cm (20 mL/placa). Para la selección de estas concentraciones se realizaron experimentos previos con el objetivo de usar dosis en un rango que asegurase la reducción o total inhibición del crecimiento del hongo, pero sin llegar a niveles elevados que pudiesen alterar el aroma o sabor del sustrato en caso de aplicación en un alimento. Además, se prepararon placas de control carentes del compuesto activo. El empleo de niveles muy elevados de AE, aunque sean efectivos para el control del crecimiento fúngico y de la producción de micotoxinas, pueden tener poca utilidad en el sector productivo y empresarial si producen alteraciones en las características organolépticas del alimento. Todas las placas (controles y tratamientos) fueron inoculadas en el centro con 5 µL de una suspensión de esporas de *A. flavus* o de *A. parasiticus* de $1,0 \times 10^6$ esporas/mL. Las placas de control y las placas con idéntico tratamiento y la misma a_w se agruparon en bolsas de plástico provistas de frascos con disoluciones de glicerol:agua con la misma a_w que la del medio de cultivo con el fin de mantener en su interior una humedad relativa adecuada en equilibrio con la a_w de los cultivos contenidos en cada bolsa. Tanto controles como tratamientos fueron incubados a las temperaturas de 25 y 37 °C durante 12 días. Todos los experimentos se repitieron dos veces y en cada vez se realizaron tres réplicas (6 réplicas en total).

d) Medición y seguimiento del crecimiento del hongo

El crecimiento de las colonias de ambas especies fue registrado diariamente durante todo el periodo de incubación (12 días). La monitorización y seguimiento de este crecimiento se llevó a cabo

siguiendo la metodología descrita previamente (apartado 2.4.1.d) para el estudio de la eficacia de fungicidas sintéticos en el control del crecimiento de *A. flavus* M34. La media del radio de la colonia fue representada frente al tiempo para obtener la velocidad de crecimiento (mm/día) como la pendiente de la recta. La velocidad de crecimiento fue representada frente a la dosis y a partir de las curvas resultantes se determinaron por interpolación las dosis efectivas para la reducción del crecimiento fúngico en un 50% (DE₅₀) y en un 90% (DE₉₀) con respecto a los controles en las diferentes condiciones de temperatura y a_w ensayadas.

2.4.4. Efecto de los aceites esenciales en la producción de micotoxinas

a) Determinación de aflatoxinas en los cultivos

La metodología empleada en las etapas de extracción, purificación y análisis cromatográfico de AF en los cultivos de *A. flavus* (AfM45) y *A. parasiticus* (ApM16) en MEM fue la misma que la usada para la determinación de AF en los cultivos de la cepa de *A. flavus* M34 en medio YES en el ensayo con procloraz y tebuconazol descrito en el apartado 2.4.2b. Sin embargo, los niveles de AF en las disoluciones para la obtención de las rectas de calibrado fueron distintas ya que los aislados de *A. flavus* y *A. parasiticus* usados en los ensayos con AE producían cantidades de AF muy superiores a las producidas por el aislado de *A. flavus* M34.

En concreto, para construir las rectas de calibrado en los ensayos con AE se usaron disoluciones de AFB1 en el rango 0,2-4,0 ng/mL, de AFB2 en el rango 0,06-2,0 ng/mL, de AFG1 en el rango 0,1-3,0 ng/mL y de AFG2 en el rango 0,06-2,0 ng/mL. Para determinar los límites de detección (LOD) y los límites de cuantificación (LOQ) del método se prepararon e inyectaron en el sistema cromatográfico disoluciones estándar más diluidas.

b) Análisis estadístico

Al igual que en los ensayos con procloraz y tebuconazol se realizó un ANOVA y un test *post-hoc* de Duncan mediante el programa Statgraphics Centurion XV, versión 15.1.02. Para determinar la influencia tanto de los factores individuales como de las interacciones entre factores se tomó un nivel de confianza del 95%.

2.5. Ensayos con films bioactivos

2.5.1. Efecto de los films bioactivos en el crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus* y en la producción de aflatoxinas

Crecimiento fúngico

a) Preparación de los films

Los films ensayados en este estudio se prepararon a partir de un copolímero de etileno-alcohol vinílico al 29% (EVOH-29) al que se incorporaron como principios activos los AE de orégano (*Origanum vulgare*) (ORE) o canela (*Cinnamomum zeylanicum*), (CIN) o sus componentes mayoritarios puros, carvacrol (CAR) o cinamaldehído (CINHO). Los films resultantes se nombran con los acrónimos EVOH-ORE, EVOH-CIN, EVOH-CAR y EVOH-CINHO, respectivamente. Además, se emplearon films carentes de AE como controles. Todos los films se obtuvieron por fundición en un horno a 75 °C durante 15 minutos. Con este objetivo, se disolvieron 13 g de EVOH-29 en 100 mL de una mezcla 1:1 de 1-propanol:agua destilada (v/v) con calor a 75 °C a reflujo. Cuando el copolímero estuvo completamente disuelto se añadió el compuesto activo a la solución (10% w/w peso de polímero seco). La mezcla se agitó y se mantuvo a 40 °C durante 30 minutos. Posteriormente, se extendió en una placa de vidrio cubierto de teflón

usando un revestidor de barra en espiral de 200 μm . Los films preparados tuvieron un grosor de $0,013 \pm 0,002$ mm. Para comprobar el contenido final de los compuestos activos en los films se analizaron tres réplicas de cada film por cromatografía de gases de desorción térmica (TD-GC) usando un tubo de desorción térmica 890 conectado en serie a un equipo de cromatografía de gases HP 5890 Series II Plus equipado con un detector de ionización de llama (FID) y una columna semicapilar Agilent HP-1 de 30 metros de longitud, 0,53 mm de diámetro interno y 2,65 μm de espesor de película (Cerisuelo et al., 2012).

Una porción de aproximadamente 20 mg de cada film se colocó en la celda de desorción y se calentó a 210 °C durante 7 minutos. Una corriente de gas helio (He) llevó los compuestos gaseosos desorbidos al cromatógrafo de gases a través de una línea de transferencia calentada a 230 °C. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: El He fue el gas portador, la temperatura del detector fue de 260 °C, el gradiente de temperatura del horno se inició con 7 minutos a 45 °C, continuó con un ascenso de 18 °C/min hasta alcanzar los 220 °C, y, finalmente, se mantuvo 12 minutos más a 220 °C. Al final del proceso de desorción se comprobó el peso de las muestras usando una balanza de precisión. Un segundo proceso de desorción demostró que todos los compuestos volátiles habían sido desorbidos en el primer proceso. La respuesta del cromatógrafo de gases fue calibrada usando polietileno y PP con cantidades conocidas de CAR y CINHO. El contenido de principio activo se expresó como porcentaje de peso del compuesto con respecto al peso del polímero seco.

b) Preparación de los inóculos

Para la preparación de los inóculos se empleó una cepa de *A. flavus* y otra de *A. parasiticus* aisladas de maíz y caracterizadas siguiendo los protocolos de PCR específicos de González-Salgado et al. (2008) y Sardiñas et al. (2010), respectivamente. Se prepararon suspensiones de ambas cepas, se inocularon en el centro de placas (9 cm de diámetro) con MEM y tras, un periodo de 5 días de incubación a

30 °C, a partir de esos cultivos frescos, se prepararon las suspensiones de esporas necesarias para los experimentos posteriores.

c) Preparación de los medios de cultivo con los diferentes films bioactivos y niveles de a_w

Los ensayos con los films EVOH con AE o sus principios activos se llevaron a cabo sobre granos de maíz (*Zea mays* L.). Para ello, se tomaron 25 g de granos de maíz, previamente analizados para determinar que no presentaban contaminación con AF a niveles detectables, y se depositaron en matraces Erlenmeyer. Los matraces se autoclavaron a 121 °C durante 20 min. La a_w en los granos fue ajustada a 0,96 y 0,99 mediante adición de agua estéril, usando para ello matraces control y una curva de adsorción para maíz autoclavado construida previamente. Los matraces con los granos se mantuvieron a 4 °C durante 48 h y en agitación periódica, con el fin de que la a_w fuera homogénea en todos ellos. A continuación, los granos de maíz hidratados se dispusieron en placas Petri (9 cm de diámetro) de manera homogénea, con un espacio mínimo entre granos, con ayuda de una espátula estéril. En la cara superior interna de la tapa de cada placa Petri se pegaron piezas cuadradas de cada film EVOH-ORE, EVOH-CIN o EVOH-CINHO de 2, 4, y 5 cm² y piezas circulares de 4,5 cm de radio con cinta adhesiva de celofán de doble cara. En el caso del film EVOH-CAR, las piezas fueron de 1,6, 3,2, 4 y 6,4 cm². El gramaje de los films fue de $1,77 \pm 0,01$ mg/cm². Por tanto, teniendo en cuenta el porcentaje de los AE y principios activos contenidos en los diferentes films, las concentraciones ensayadas fueron de 0,25, 1,0, 1,5 y 4,0 mg/placa Petri o mg/25 g de granos de maíz.

d) Condiciones de incubación y análisis del crecimiento radial de las colonias

En el centro de la capa de granos de maíz de cada placa se colocaron 15 µL de una suspensión de esporas ($1,0 \times 10^6$ esporas/mL)

de cultivos frescos de *A. flavus* o *A. parasiticus*, aprovechando para ello la porción plana de un grano central y rápidamente las placas fueron selladas con Parafilm M® para minimizar las pérdidas de los AE o principios activos por evaporación. Todas las placas se incubaron durante 12 días a 25 o 37 °C en oscuridad. Durante el periodo de incubación se tomaron diariamente medidas de dos diámetros perpendiculares de las colonias con ayuda de una lupa y con ellas se determinó la tasa de crecimiento como se indica en el apartado 2.4.3d. A continuación, se representó la tasa de crecimiento de cada especie frente a las dosis en las diferentes condiciones de a_w y temperatura ensayadas. A partir de estas curvas se determinaron las DE_{50} y DE_{90} para cada uno de los films bioactivos. Las tres réplicas de los cultivos con el mismo tratamiento (a_w , tipo y tamaño del film bioactivo) se introdujeron en contenedores de plástico provistos de frascos con disoluciones de glicerol:agua con la misma a_w que los cultivos, para mantener constante la humedad relativa en equilibrio con la a_w del medio de cultivo en el interior de cada contenedor.

Producción de aflatoxinas

a) Extracción

Al finalizar el periodo de incubación (12 días) la extracción de las AF se llevó a cabo siguiendo la metodología de extracción descrita previamente en la experiencia sobre el efecto de antifúngicos sintéticos (azoles) en la producción de AF por *A. flavus* (cepa M34) en maíz (apartado 2.4.2b).

b) Calibración

Los patrones de AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2 se disolvieron en cloroformo (1 mg/mL), y a partir de estas disoluciones stock se prepararon otras a concentraciones en el rango de 0,2-4,0 ng AFB1/mL, 0,1-3,0 ng AFG1/mL y 0,06-2,0 ng AFB2 y AFG2/mL en metanol:agua (v/v). De cada una de estas disoluciones se inyectaron 50 μ L en el sistema cromatográfico y, a partir de las áreas obtenidas,

se establecieron las rectas de calibrado para cada AF. Se prepararon, además, disoluciones más diluidas de cada una de las cuatro AF para determinar los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) del método. Las experiencias se hicieron por quintuplicado (n=5).

c) Análisis cromatográfico

El análisis cromatográfico de AF en los controles y en los tratamientos en las diferentes condiciones ensayadas se realizó como se describe para la determinación de AF en granos de maíz en las experiencias con antifúngicos sintéticos (apartado 2.4.2d).

d) Validación del método

Para la validación de la metodología se usaron granos de maíz finamente molidos y previamente analizados para confirmar la ausencia de AF a niveles detectables y se les adicionaron 0,15, 0,5, 1,0, 5,0, 50 y 100 ng AFB1/g, y 0,15, 0,3, 0,6, 3,0, 10 y 50 ng/g para cada una de las restantes AF (AFB2, AFG1 o AFG2). Las experiencias se hicieron por quintuplicado (n=5). Los granos de maíz se mantuvieron en oscuridad durante dos horas, previamente a su análisis, y se mantuvieron bajo corriente de N₂ para evaporar el disolvente añadido en la fortificación. Los LOD y LOQ fueron, respectivamente, 3,3 y 10 veces la ratio entre el error estándar de la estimación (residual) y la pendiente (obtenidos por regresión lineal). El LOD del método (ng/g) fue 0,033 para AFB1, 0,030 para AFB2, y 0,040 para AFG1 y AFG2. El LOQ del método (ng/g) fue 0,10 para AFB1, 0,09 para AFB2, y 0,12 para AFG1 y AFG2.

e) Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante ANOVA y el test *post-hoc* de Duncan de agrupamientos múltiples de los datos mediante el programa Statgraphics Centurion (versión XV.II). Para el cálculo de las concentraciones, los niveles detectables de las toxinas que se hallaban por debajo de los LOQ se estimaron como el 50% de este límite, y los

niveles no detectados se asumieron como cero. El nivel de confianza del análisis estadístico fue del 95%.

2.5.2. Efecto de los films bioactivos en el crecimiento de *F. sporotrichioides* y en la producción de las toxinas T-2 y HT-2

La metodología para el ensayo de los films bioactivos de EVOH-29% con AE frente al crecimiento de *F. sporotrichioides* y frente a la producción de las toxinas T-2 y HT-2, fue similar a la metodología empleada en el ensayo de films bioactivos frente al crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus* y frente a la producción de AF, ambos descritos en el apartado 2.5.1, aunque con algunas diferencias que se indican a continuación

- El medio de cultivo empleado para *F. sporotrichioides* fue grano de avena.
- Los compuestos activos incluidos en los diferentes films EVOH-29% fueron componentes individuales de AE. Estos compuestos fueron cinamaldehído (CINHO), isoeugenol (IEG), citral (CIT) y linalol (LIN), y las dosis ensayadas de los mismos fueron 0, 333, 666, 1665 y 3330 µg de compuesto en fase vapor/placa Petri (25 g de avena).
- Las temperaturas ensayadas fueron 15, 20 y 28 °C.
- El tiempo de incubación fue de 30 días.
- Para determinar la tasa de crecimiento en las diferentes condiciones se seleccionó la pendiente correspondiente a la cinética de crecimiento fúngico en el tramo de los primeros días a partir del inicio del crecimiento, mientras este todavía presentaba una tendencia lineal.
- La masa de avena molida de cada condición fue de 2 g y el disolvente de extracción fue 8 mL de acetonitrilo:agua:ácido

fórmico (80:19:1, v/v/v). La mezcla se dispuso en tubos Falcon y fue sometida a agitación orbital (Infors-HT Aerotron, Bottminghen, Suiza) durante 90 minutos. Pasado este tiempo, los extractos fueron centrifugados a 5500 rpm durante 5 minutos y, finalmente, se filtraron 2 mL de cada sobrenadante por filtros de 0,22 μm de PTFE, previamente a ser inyectados en el sistema UPLC-ESI-MS/MS. El volumen de inyección fue de 30 μL .

- Las condiciones cromatográficas fueron las mismas que se describen para el análisis de micotoxinas en maíz y avena (apartado 2.3) y la validación del método también fue igual. Los valores de LOD y LOQ fueron de 4 y 12 ng/g para la toxina T-2 y de 1,5 y 4,5 ng/g para la toxina HT-2. Para establecer las rectas de calibrado de las toxinas T-2 y HT-2 se prepararon disoluciones comprendidas entre 0.0031 y 5 $\mu\text{g/mL}$.

2.6. Ensayos con nanopartículas de plata (AgNPs)

A continuación, se describe la metodología para la realización de los ensayos con nanopartículas de plata (AgNPs) y el estudio de su efecto en el crecimiento de las especies *A. flavus* y *A. parasiticus* y en la producción de AF, en el crecimiento de las especies *F. sporotrichioides* y *F. langsethiae*, y en la producción de las toxinas T-2 y HT-2, y en el crecimiento de *F. poae* y producción de nivalenol. Todos los ensayos se realizaron en diferentes condiciones ambientales.

2.6.1. Preparación de las AgNPs

Se fabricaron AgNPs con un diámetro medio de 30 nm usando básicamente el protocolo de Agnihotri et al. (2014). Para ello, como

reductores y estabilizantes se emplearon NaBH_4 (como primer reductor) y citrato trisódico (como segundo reductor). Se añadieron ambos compuestos a 180 mL de agua Milli-Q hasta alcanzar concentraciones de NaBH_4 de 0,0055 M y de citrato trisódico de 0,001 M. El citrato trisódico fue añadido en primer lugar, pues proporciona un pH inicial alcalino como consecuencia de su hidrólisis. Esta disolución se calentó con vigorosa agitación en oscuridad hasta que alcanzó la temperatura de 60 °C y se mantuvo a esa temperatura en agitación durante 30 minutos. Pasado este tiempo se añadieron gota a gota 20 mL de una disolución 0,004 M de AgNO_3 , y se elevó la temperatura hasta 90 °C. Cuando la disolución alcanzó dicha temperatura el pH se ajustó a un valor de 10,5 mediante la adición de NaOH 0,1 M. Cuando se alcanzó este valor, se mantuvo la temperatura de 90 °C durante 20 minutos. Durante el proceso la disolución se oscureció progresivamente. A continuación, se dejó enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente, entonces se centrifugó a 14000 g y 4 °C durante 20 minutos.

El sobrenadante fue descartado tras la centrifugación y las AgNPs depositadas en el sedimento fueron resuspendidas en agua pura Milli-Q y centrifugadas de nuevo, descartando el sobrenadante. Este proceso de lavado se repitió seis veces sucesivas bajo las mismas condiciones. Finalmente, el residuo fue suspendido en agua pura Milli-Q y almacenado a 4 °C.

El pH fue de $6,6 \pm 0,1$. En los lavados sucesivos se eliminaron de la suspensión la mayor parte de los reactivos y productos diferentes de las AgNPs cubiertas por citrato (H_2 producido por oxidación o hidrólisis de BH_4 , ácido bórico, nitrato o exceso de citrato).

Además, la concentración de Ag^+ no fue detectable (falta de turbidez) por mezcla del líquido sobrenadante con una disolución acuosa de NaCl 5,12 M en una ratio 4:1 v/v. De este modo, no es de esperar la presencia de ningún producto distinto de las AgNPs a concentraciones a las que pudieran ser tóxicos para las esporas

fúngicas. A partir de esta suspensión se tomó una alícuota para llevar a cabo la caracterización de las AgNPs mediante SP-ICP-MS y TEM.

2.6.2. Caracterización de las AgNPs

a) Mediante SP-ICP-MS

Para obtener la distribución de tamaños de las AgNPs sintetizadas se empleó la técnica de espectroscopía de emisión por plasma acoplado inductivamente y detección por espectrometría de masas en modo de partícula única (“single particle”) (SP-ICP-MS). Para ello se utilizó un patrón certificado de elevada pureza de Ag de 1000 mg/L (Charleston, SC, USA) y otro de nanopartículas de oro (AuNPs) de 50 nm de diámetro y una concentración de $3,51 \times 10^{10}$ AuNPs/mL (Sigma-Aldrich). A partir del patrón inicial de Ag, se preparó otro patrón de 1 mg Ag/L mediante diluciones sucesivas. También se prepararon varios patrones a partir de diluciones sucesivas del patrón inicial de AuNPs. Todos estos patrones fueron sometidos a ultrasonidos durante 10 minutos.

Las muestras se prepararon como los patrones de AuNPs. Luego se introdujeron en el equipo de ICP-MS Agilent 7900 en modo “single particle” en las siguientes condiciones: nebulizador concéntrico tipo Micromist; cámara de nebulización tipo Scott; interfase cónica de Pt; doble lente fuera de eje; cuadrupolo hiperbólico como filtro de masas y octopolo como celda de colisión/reacción usando He y H₂, respectivamente; flujo de gas del plasma 15 L/min; flujo de gas auxiliar 1,0 L/min; potencia de RF 1550 W; “RF matching” 1,80 V; profundidad de muestreo 8,0 mm; bomba del nebulizador 0,1 rps; gas portador 1,07 L/min; velocidad de toma de muestra 0,35 mL/min; modo del plasma: matriz baja, temperatura de la cámara de nebulización 2,0 °C. Los factores de integración fueron: modo de adquisición “Time Resolved Analysis” (TRA), tiempo de adquisición 0,0030s. Los parámetros de la celda fueron: isótopo monitorizado ¹⁰⁷Ag; gas He en celda 4,0 mL/min; energía de discriminación 2,0 V; RF del octopolo 200 V.

b) Mediante TEM

La suspensión de AgNPs fue examinada mediante TEM a fin de obtener la distribución de tamaños mediante un método complementario. Se utilizó un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1010 de voltaje desde 40 a 100 kV, equipado con cámara digital AMT RX80. Una gota de la suspensión de AgNPs homogeneizada se colocó sobre una película de Formvar/carbón de 300 mallas en una rejilla de cobre para colocación de muestras. Se dejó secar completamente antes de incluirla en el dispositivo de muestras del TEM a través de un muestreador estanco para evitar la entrada de aire en el microscopio.

c) Mediante medida del espectro de absorción de la suspensión de AgNPs

Por otra parte, para observar la estabilidad de la suspensión de AgNPs durante el periodo de exposición de las esporas a las mismas, se monitorizó el espectro UV-visible de una suspensión de AgNPs diluida 10 veces en agua suplementada con Tween 80 (0,005%) en cubeta de cuarzo. Se registró el espectro en el intervalo de 300 a 800 nm en los tiempos 0, 2, 4, 20 y 30 horas, correspondientes a los tiempos de exposición de las esporas en el estudio realizado. El equipo utilizado fue un espectrofotómetro de fila de diodos Agilent 6453.

2.6.3. Efecto de las AgNPs en el crecimiento de los hongos

a) Preparación de los inóculos fúngicos

Antes de iniciar los ensayos con AgNPs, las cepas de las especies seleccionadas para estos ensayos (*A. flavus*, *A. parasiticus*, *F. sporotrichioides*, *F. langsethiae* y *F. poae*) se cultivaron en placas Petri con medio YES y a_w 0,99 (ajustada mediante adición de una

disolución de glicerol/agua estéril usando la correspondiente curva para medio YES obtenida previamente) y se incubaron a 28 °C durante 7 días. A partir de estos cultivos frescos se preparó una suspensión de esporas de 1.0×10^5 esporas/mL de cada especie con las que se inocularon los medios para abordar el estudio del efecto de las AgNPs en el crecimiento de los hongos y en la producción de micotoxinas en diferentes condiciones ambientales.

b) Preparación del medio de cultivo

El medio de cultivo en el que se llevaron a cabo los ensayos con AgNPs fue medio extracto de maíz (3% w/v de granos de maíz molido + 2% w/v agar en agua pura Milli-Q) (MEM) con a_w 0,99 (ajustada mediante adición de una disolución de glicerol:agua estéril usando la correspondiente curva de adsorción para medio MEM obtenida previamente). Antes de la preparación del medio de cultivo se comprobó que la harina de maíz que se adicionó al medio no contenía niveles detectables de ninguna de las toxinas objeto de estudio. El medio se dispensó en placas Petri, a razón de 25 mL en cada placa.

c) Tratamientos: ensayos de contacto entre esporas fúngicas y AgNPs

La experiencia se inició con ensayos de contacto entre las esporas fúngicas de cada una de las especies estudiadas y las AgNPs. Para ello, se prepararon tubos con 5 mL de agua pura Milli-Q estéril y Tween 80 (0,005%) sin AgNPs (tubos control) y tubos suplementados con las concentraciones de 2, 5, 10, 15, 30 y 45 μg de AgNPs/mL. Todos los tubos se inocularon con 1×10^5 esporas/mL del cultivo fresco (7 días) del hongo y se agitaron durante 30 segundos para obtener una suspensión homogénea. A continuación, los tubos control y los tubos con AgNPs se colocaron en un agitador orbital y se agitaron a 60 rpm, a 25 °C durante 30 h en oscuridad. El Tween 80 mejora la estabilidad y el mantenimiento de las AgNPs en suspensión evitando su agregación y sedimentación en el fondo de los tubos (Kvítek et al., 2008) y, en

consecuencia, facilita el contacto entre las esporas fúngicas y las AgNPs.

d) Evaluación de la viabilidad de las esporas fúngicas tras los tratamientos

Para evaluar el número de esporas fúngicas viables tras los tratamientos, se tomó una alícuota de 500 μL de cada tubo a las 0, 2, 4, 20 y 30 horas de exposición y se transfirieron a tubos que contenían 4,5 mL de solución salina estéril obteniéndose la dilución 10^{-1} . Esta dilución fue homogeneizada y a partir de ella se prepararon sucesivas diluciones (10^{-2} - 10^{-5}). Un volumen de 100 μL de cada dilución fue extendido homogéneamente en placas de MEM mediante el empleo de un asa de Digralsky previamente esterilizada. Las placas se incubaron en oscuridad durante un periodo de 5 días, en contenedores cerrados provistos de frascos con una disolución de glicerol:agua con a_w igual a la del medio de cultivo para asegurar que la a_w del mismo se mantuviese en 0,99. La temperatura de incubación para los cultivos de *A. flavus* y *A. parasiticus* fue de 37 °C (Gómez et al., 2018), para *F. sporotrichioides* y *F. poae* fue de 28 °C y para *F. langsethiae* fue de 25 °C (Mateo et al., 2011a; 2013). Tras el periodo de incubación, se determinó el número de UFC/mL de las especies y las dosis efectivas de AgNPs para reducir el número de esporas viables en un 50% (DE_{50}), 90% (DE_{90}) y 100% (DE_{100}) con respecto a los cultivos control. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado y repetidos dos veces (6 réplicas).

e) Evaluación del crecimiento de las colonias fúngicas tras los tratamientos

Para monitorizar el efecto de los tratamientos en la velocidad de crecimiento de las colonias de las diferentes especies ensayadas, se tomaron 3 μL tanto de los tubos control como de los tubos con AgNPs a las 0, 2, 4, 20 y 30 horas de exposición y se inocularon en el centro de placas Petri (9 cm de diámetro) con medio de cultivo MEM. Al igual

que en el apartado anterior, las placas se incubaron durante 10 días en oscuridad a 37 °C (*A. flavus* y *A. parasiticus*), 28 °C (*F. sporotrichioides* y *F. poae*) y 25 °C (*F. langsethiae*) en contenedores cerrados para mantener la a_w del medio a 0,99. Las placas se observaron diariamente y se consideró como fase lag el tiempo transcurrido (en días) desde la inoculación hasta que las colonias alcanzaron 5 mm de diámetro. A partir de ese momento se realizaron medidas de dos diámetros perpendiculares de la colonia (tomados en ángulo recto), se calculó el radio y la velocidad de crecimiento radial (mm/día), en cada una de las condiciones ensayadas, como la pendiente de la línea obtenida por regresión lineal del radio medio *versus* el tiempo.

También se obtuvieron las dosis efectivas de AgNPs ($\mu\text{g/mL}$) necesarias para inhibir el crecimiento de la colonia fúngica en un 50% (DE_{50}), en un 90% (DE_{90}) y en un 100% (DE_{100}) (cuando ello fue posible) mediante representación de las velocidades de crecimiento radial frente a las dosis de AgNPs en todas las condiciones ensayadas. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se repitieron dos veces.

2.6.4. Efecto de las AgNPs en la producción de micotoxinas

Para determinar la concentración de micotoxinas producidas en los cultivos en MEM se utilizaron las mismas placas en las que se había estado monitorizando el crecimiento de las colonias (apartado 2.6.3.e). Por tanto, al final del periodo de incubación (10 días), independientemente del diámetro alcanzado por la colonia en ese tiempo, la totalidad del cultivo contenido en la placa Petri (medio + colonia fúngica) se cortó en pequeños trozos, se pesó y se homogeneizó en un Stomacher, determinándose las micotoxinas presentes en ellos. La extracción, centrifugación y filtración se realizaron siguiendo la metodología ya descrita para la determinación de micotoxinas en las muestras de maíz y avena (apartado 2.3) con

algunas modificaciones requeridas por la naturaleza de la matriz (calibración, estudio de la recuperación y tipo y niveles de micotoxinas), que se indican a continuación:

a) Calibración

Los patrones de AF fueron disueltos en cloroformo y los de las toxinas T-2, HT-2 y NIV en acetonitrilo. Posteriormente, todos fueron diluidos en acetonitrilo:agua:ácido fórmico (80:19:1, v/v/v) a fin de obtener los intervalos de concentraciones adecuados para la calibración de cada micotoxina. La calibración se llevó a cabo por adición de volúmenes variables de las disoluciones de cada micotoxina a extractos de MEM obtenidos aplicando el protocolo de extracción de micotoxinas a MEM fresco no inoculado con ningún hongo. En concreto, se mezclaron 2 g de MEM con 8 mL de acetonitrilo:agua:ácido fórmico (80:19:1, v/v/v) en tubos Falcon, y se mantuvieron en agitación orbital durante 1 h. Posteriormente, se centrifugaron a 4260 g (5500 rpm) durante 5 minutos y 2 mL del sobrenadante se llevaron a sequedad bajo una corriente de N₂, se les adicionaron los volúmenes apropiados de las disoluciones de micotoxinas y se diluyeron con acetonitrilo:agua:ácido fórmico (80:19:1, v/v/v) para obtener las concentraciones deseadas. Las disoluciones de micotoxinas se filtraron por filtros PTFE de 0,22 µm previamente a su inyección en el sistema UPLC-ESI-MS/MS. Las rectas de calibrado se obtuvieron por regresión lineal ponderada (1/x) del área de los picos de cada analito frente a la concentración de micotoxina.

b) Estudios de recuperación

Para determinar los niveles de micotoxinas en los cultivos en MEM, el método usado fue validado previamente mediante análisis de blancos de MEM fortificados con cada una de las micotoxinas objeto del estudio a diferentes niveles (n = 5). Para ello, se adicionaron volúmenes variables de las disoluciones de cada una de las micotoxinas a matraces Erlenmeyer que contenían MEM estéril

previamente autoclavado a 115 °C durante 30 min y enfriado hasta la temperatura de 45 °C.

Para el estudio de recuperación de AF se usaron 25 g de MEM y para los tricotecenos T-2 y HT-2 y NIV se usaron 10 g de MEM. Los rangos de concentraciones de las AF adicionadas al MEM en los estudios de recuperación oscilaron entre 5 y 300 ng/g, los de las toxinas T-2 y HT-2 entre 100 y 250 ng/g. y los del NIV entre 100 y 800 ng/g. Tras la adición de las disoluciones de micotoxinas, el medio de cultivo (atemperado a 45 °C) fue homogeneizado y dispensado en placas Petri (9 cm de diámetro). Una vez que el medio solidificó, se cortaron pequeñas piezas, se mezclaron en un “Stomacher” y se tomaron 2 g que se colocaron en tubos Falcon a los que se adicionaron 8 mL de acetonitrilo:agua:ácido fórmico (80:19:1, v/v/v). Los tubos se sometieron a agitación orbital durante 1 h seguida de centrifugación (4260 g, 5 min). A continuación, se tomaron 2 mL de sobrenadante y se filtraron a través de filtros PTFE de 0,22 µm antes de su inyección en el sistema UPLC-ESI-MS/MS.

c) Determinación de micotoxinas en los cultivos en MEM

Cuando los niveles de micotoxinas producidas en los cultivos realizados en MEM fueron demasiado elevados con respecto al intervalo de concentraciones usadas para la calibración, los extractos obtenidos tras la extracción de micotoxinas en los cultivos realizados en MEM se diluyeron en acetonitrilo:agua:ácido fórmico (80:19:1, v/v/v)) previamente a su inyección en el sistema UPLC-ESI-MS/MS. Las condiciones de separación cromatográfica y espectrometría de masas fueron las descritas para la determinación de micotoxinas en las muestras de maíz y avena (apartado 2.3).

d) Análisis estadístico

Los datos obtenidos, en relación a la influencia de las AgNPs sobre los recuentos de esporas viables, la tasa de crecimiento, la fase

lag y la concentración de micotoxinas, se sometieron a análisis de varianza multifactorial (ANOVA) y de regresión lineal usando para ello el paquete estadístico Statgraphics Centurion. Cuando se obtuvieron diferencias significativas mediante el ANOVA, se aplicó el test *post-hoc* de Duncan ($\alpha = 0,05$) para encontrar grupos homogéneos. Para el tratamiento de los datos, cuando no se detectaron toxinas el valor se consideró como 0.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Contaminación de las muestras de maíz y avena con posibles hongos productores de aflatoxinas o de las toxinas T-2 y HT-2

En España se dispone de escasa información sobre la contaminación natural del maíz y de ninguna información sobre la contaminación natural de la avena, con especies productoras de AF o de las toxinas T-2 y HT-2. Además de ello, en ninguno de los estudios previos realizados en maíz se contempla un periodo de tiempo tan amplio como en la presente Tesis Doctoral (2015-2019) y un muestreo que abarque toda la geografía española. Todo ello convierte al presente estudio en una fuente de información actualizada y muy representativa del estado de estos cereales, que se producen o consumen en nuestro país, en cuanto a especies productoras de AF y de las toxinas T-2 y HT-2.

En las figuras 24 y 25 se muestra la incidencia de las principales especies productoras de AF (*A. flavus* y *A. parasiticus*) y de las toxinas

T-2 y HT-2 (*F. sporotrichioides*) en las muestras de maíz y avena estudiadas. Además de ello, también se consideran las especies productoras de nivalenol (*F. poae*).

En el caso del maíz, de las 98 muestras estudiadas, se encontraron *Aspergillus* spp. de la sección *Flavi* en 85 de ellas (86,7%). Los niveles de contaminación más bajos y más altos fueron 1×10^1 UFC/g y $7,8 \times 10^5$ UFC/g, respectivamente. En el 16,3%, 45,9%, 16,3%, 4,1% y 4,1% de las muestras los niveles (en UFC/g) se situaron en los intervalos $1 \times 10^1 - 1 \times 10^2$, $1 \times 10^2 - 1 \times 10^3$, $1 \times 10^3 - 1 \times 10^4$, $1 \times 10^4 - 1 \times 10^5$ y $1 \times 10^5 - 1 \times 10^6$, respectivamente. La especie mayoritaria fue *A. flavus*. En el 13,3 % de las muestras de maíz no se encontraron especies de la sección *Flavi* (Figura 24a).

De las 98 muestras de maíz estudiadas, se registraron *Fusarium* spp. de la sección *Sporotrichiella* en 36 muestras (36,7%). Los niveles de contaminación más altos y más bajos fueron 1×10^1 UFC/g y $7,1 \times 10^4$ UFC/g, respectivamente. Las especies más frecuentes fueron *F. sporotrichioides* y *F. poae*. *F. langsethiae* no se detectó en ninguna de las muestras de maíz analizadas. En el 25,5%, 5,1%, 4,1% y 2,0% de las muestras los niveles de contaminación (en UFC/g) estuvieron en los intervalos $1 \times 10^1 - 1 \times 10^2$, $1 \times 10^2 - 1 \times 10^3$, $1 \times 10^3 - 1 \times 10^4$ y $1 \times 10^4 - 1 \times 10^5$, respectivamente. En el 63,3% de las muestras no se detectaron especies de la sección *Sporotrichiella* (Figura 24b).

En el caso de la avena, de las 100 muestras estudiadas se encontraron *Aspergillus* spp. de la sección *Flavi* en 79 de ellas (79%). Los niveles de contaminación más altos y más bajos fueron 2×10^1 UFC/g y $1,7 \times 10^4$ UFC/g. En el 46%, 18%, 13% y 2% de las muestras los niveles de contaminación (en UFC/g) se situaron en los intervalos $1 \times 10^1 - 1 \times 10^2$, $1 \times 10^2 - 1 \times 10^3$, $1 \times 10^3 - 1 \times 10^4$ y $1 \times 10^4 - 1 \times 10^5$, respectivamente. La especie mayoritaria fue *A. flavus*. No se detectaron especies de la sección *Flavi* en el 21% de las muestras de avena (Figura 25a).

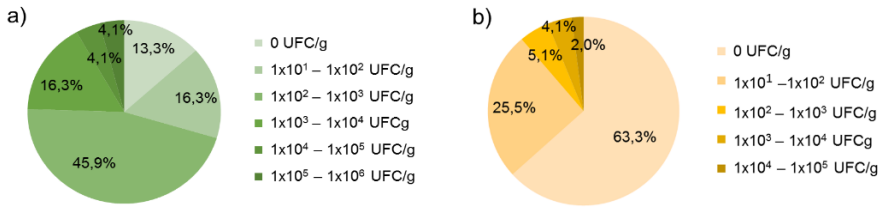


Figura 24. Porcentaje de muestras de maíz contaminadas con *Aspergillus* spp. de la sección *Flavi* (a) y con *Fusarium* spp. de la sección *Sporotrichiella* (b) y niveles de contaminación en UFC/g de maíz en ambos casos.

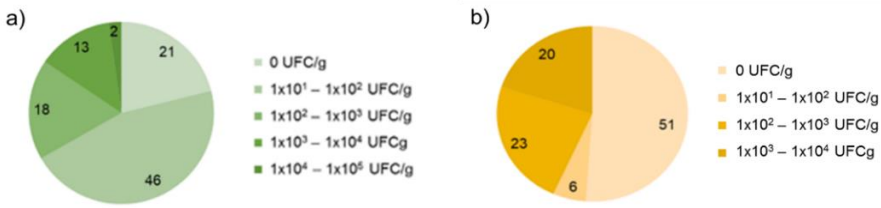


Figura 25. Porcentaje de muestras de avena contaminadas con *Aspergillus* spp. de la sección *Flavi* (a) y con *Fusarium* spp. de la sección *Sporotrichiella* (b) y niveles de contaminación en UFC/g de avena en ambos casos.

De las 100 muestras de avena estudiadas, se determinaron *Fusarium* spp. de la sección *Sporotrichiella* en 49 muestras (49%), y concretamente, en el 6%, 23% y 20% de las muestras, los niveles de contaminación (en UFC/g) se situaron en los intervalos $1 \times 10^1 - 1 \times 10^2$, $1 \times 10^2 - 1 \times 10^3$, y $1 \times 10^3 - 1 \times 10^4$, respectivamente. La única especie aislada productora de las toxinas T-2 y HT-2 fue *F. sporotrichioides*. Ninguna de las cepas de *F. poae* ensayadas fue productora de estas toxinas. No se detectaron especies de la sección *Sporotrichiella* en el 51% de las muestras de avena (Figura 25b).

Entre los cereales, el maíz se ha descrito como el más susceptible y mejor sustrato para el crecimiento de especies aflatoxigénicas, especialmente, *A. flavus* (Battilani et al., 2012). En el trabajo de revisión realizado por Storm et al. (2008) se destaca la presencia de *A. flavus* y *A. parasiticus*, junto a otras especies como *F. sporotrichioides* y *F. poae*, en muestras de maíz en pre-cosecha y, además, se detecta AFB1, AFB2 y la toxina HT-2 en las muestras contaminadas con dichas especies. En esta línea se pueden citar, entre otros, algunos trabajos efectuados en diferentes países del mundo como Francia, Etiopía, Brasil o Suiza.

En Francia, Bailly et al. (2018) analizaron un total de 118 muestras de maíz francés procedentes de diferentes campos y 81 muestras procedentes de diferentes silos. En todas las muestras contaminadas con AF y casi en el 40% de las muestras en las que no se encontraron las toxinas se aislaron cepas de especies de *Aspergillus* de la sección *Flavi*. *A. flavus* fue la especie con mayor incidencia, aunque *A. parasiticus* también contó con una representación importante, en concreto el 69% de las cepas aisladas fueron de *A. flavus* y el 28% de *A. parasiticus*.

Getachew et al. (2017) estudiaron la presencia de especies de los géneros *Penicillium*, *Aspergillus* y *Fusarium* en 100 muestras de maíz precedentes del sur y del sudeste de Etiopía. Encontraron que el porcentaje de aislados pertenecientes a cada uno de estos géneros era del 80%, 75% y 60%, respectivamente. Además, en el 33% de los granos aislaron especies de los géneros *Alternaria*, *Epicoccum* y *Rhizopus*. En España se han efectuado recuentos de las principales especies fúngicas en 30 muestras de harina de maíz y en 30 muestras de “palomitas” de maíz y los niveles oscilaron entre 10 y $8,4 \times 10^4$ UFC/g (Alborch et al., 2012). En las harinas predominaron especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, y en las “palomitas” especies de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*, además de otras del orden *Mucorales*. *A. flavus* se encontró en el 43,3% y 96,7% de las muestras de harinas de maíz y “palomitas” de maíz, respectivamente. En ambos casos, *A. parasiticus* se encontró solo en el 3,3% de las

muestras y el porcentaje de granos contaminados fue muy bajo (0,02%). No se detectaron especies productoras de las toxinas T-2 y HT-2.

En Brasil, Keller et al. (2013) analizaron 464 muestras de maíz recolectadas en 58 silos, ubicados en los estados de São Paulo y Río de Janeiro, en el periodo 2007-2008. Encontraron altos niveles de especies de los géneros *Aspergillus* y *Fusarium*, pero los porcentajes de cada especie dependieron del tiempo en que se realizó el análisis (previo al ensilaje o posterior al mismo, cuando se ha producido el desarrollo de LAB y la acidificación del grano). Una de las especies dominantes fue *A. flavus* y sus niveles aumentaron tras el ensilaje; por el contrario, los niveles de *A. parasiticus* y *Aspergillus* spp. del agregado *Niger* disminuyeron tras dicha etapa.

En Suiza, Eckard et al. (2011) destacaron la presencia de especies del género *Fusarium* y de sus metabolitos en maíz almacenado en silos. Entre las especies dominantes se encontraron *F. sporotrichioides* (16,3% del total de especies aisladas) y, en menor medida, *F. poae*. La primera especie se encontró en 16 y la segunda en 11 de las 17 muestras que se analizaron. Estos resultados no coinciden con los obtenidos por otros autores (Dorn et al., 2009; Görtz et al., 2010; Scauflaire et al., 2011) que, aunque detectaron la especie *F. sporotrichioides* en maíz, el nivel de contaminación del grano fue bajo. Así, por ejemplo, Görtz et al. (2010), en un estudio de 84 muestras de maíz, recogidas en Alemania en el periodo 2006-2007, encontraron *F. sporotrichioides* en más del 30% de las mismas. Sin embargo, el hongo fue aislado en menos del 1% de los granos.

En avena también se han detectado con frecuencia especies productoras de AF como *A. flavus* (Sacchi et al., 2009) y AF (Kuzdralinski et al., 2013). Sin embargo, las especies aflatoxigénicas están más asociadas al maíz. En el trabajo de revisión realizado por Storm et al. (2008) o en el trabajo de Eckard et al. (2011) también se llega a la conclusión de la mayor frecuencia de las infecciones de hongos aflatoxigénicos en maíz. Los resultados de los análisis llevados

a cabo en esta tesis respaldan esta conclusión y también demuestran que en España existe mayor frecuencia de la especie *F. sporotrichioides* en avena que en maíz ($p < 0,03$).

En Reino Unido, en un estudio llevado a cabo por Edwards et al. (2012), se encontró una significativa incidencia de las especies *F. langsethiae* y *F. poae* en muestras de avena producida en ese país entre los años 2002 y 2005, con una fuerte correlación entre la presencia de DNA de *F. langsethiae* en el cereal y las toxinas T-2 y HT-2, concluyendo que esta especie era la principal implicada en la producción de estas toxinas en avena inglesa. Sin embargo, la especie *F. sporotrichioides* está mejor adaptada y muestra mayor esporulación a temperaturas más elevadas que *F. langsethiae*, por lo que es más frecuente en regiones más cálidas. Fredlund et al. (2013), también analizaron la incidencia de determinadas especies de hongos del género *Fusarium* en muestras de avena recogidas en diferentes regiones de Suecia en los años 2010 y 2011, y encontraron una correlación positiva significativa entre la especie *F. langsethiae* y la suma de las toxinas T-2 y HT-2 ($r = 0,77$, $p < 0,001$).

En Noruega, Bernhoft et al. (2010) analizaron 602 muestras de cereales (avena, cebada y trigo), todas ellas cultivadas en ese país entre los años 2002 y 2004, y se determinó que la incidencia de estas toxinas era superior en avena que en cebada, mientras que en las muestras de trigo no se detectaron. Estos resultados diferían de los publicados un año antes por Edwards en avena (Edwards, 2009a), trigo (Edwards, 2009b) y cebada (Edwards, 2009c) procedentes de Reino Unido, de los que se concluye que la concentración de estas toxinas en dichos cereales seguía el orden avena > trigo > cebada, con diferencias muy significativas del primer cereal con respecto a los otros dos.

Tanto en los trabajos citados de Edwards, realizados en Reino Unido, como en el del grupo de Bernhoft, realizado en Noruega, se analiza la influencia del tipo de cultivo (orgánico o convencional) sobre la incidencia de las toxinas T-2 y HT-2 y de especies de *Fusarium*.

Aunque se encontraron diferencias entre ambos cultivos, los resultados no fueron concluyentes para todas las micotoxinas y cereales considerados, pues no se encontró una diferencia significativa entre cultivo orgánico y convencional respecto al contenido de DON o ZEA en trigo (Edwards, 2009b), ni respecto al contenido de DON o de las toxinas T-2 y HT-2 en cebada (Edwards, 2009c).

1.1. Confirmación de la identificación de las especies por métodos basados en el DNA

La metodología de González-Salgado et al. (2008), Sardiñas et al. (2010) y Jurado et al. (2005), descrita en el apartado 2.1.3, se empleó para la confirmación de la identificación de los aislados que más tarde se emplearon en los ensayos con antifúngicos. Además, se incluyeron otras especies como *F. langsethiae*, asociada a la presencia de las toxinas T-2 y HT-2 en avena en el centro y norte de Europa y *F. poae*, productora de NIV, de la misma sección que la anterior. Una vez identificados y quimirotipados los aislados seleccionados de las diferentes especies, se ensayó su sensibilidad a diferentes agentes antifúngicos, tanto en lo que se refiere a control del crecimiento de estos hongos, como en lo relativo al control de la producción de las micotoxinas (apartado 3 de Resultados y discusión).

1.2. Discriminación entre especies fúngicas productoras de micotoxinas por métodos de voltamperometría de estado sólido

Los perfiles de producción de micotoxinas de *A. flavus*, *A. parasiticus*, *F. sporotrichioides*, *F. poae*, *F. langsethiae* y *F. oxysporum*, junto a los de otras especies de *Aspergillus* y de *Fusarium*, que fue necesario incluir para poder determinar la capacidad discriminante del

método electroquímico empleado, son los que se muestran en la Tabla 5. Se obtuvieron voltamperogramas de micromuestras “en seco”, transferidas directamente sobre un electrodo de carbón vitrificado (glassy carbon electrode, GCE) en contacto con HAc/NaAc 0,25 M, pH 4,75. Se registraron picos de oxidación a diferentes potenciales entre -1,1 y +1,4 V vs. Ag/AgCl y se analizó si los picos definían un perfil que pudiera ser característico para cada sección/género/especie.

Las Figuras 26 y 27 muestran los perfiles voltamperométricos de onda cuadrada (SWV) para las especies *A. flavus*, *A. parasiticus*, *F. sporotrichioides*, *F. poae* y *F. langsethiae*. Las estructuras de las micotoxinas no sugieren en general la posibilidad de procesos de oxidación electroquímica a potenciales moderados. Las señales electroquímicas observadas pueden obedecer a la oxidación de otros metabolitos presentes en el hongo. Esto puede deducirse por comparación con la voltamperometría de diferentes compuestos polifenólicos previamente descritos (Doménech-Carbó et al., 2015a; 2015b; Martini et al., 2015; Ortiz-Miranda et al., 2016). Así, las diferencias en los perfiles pueden deberse principalmente a la oxidación electroquímica de compuestos polifenólicos de los hongos, por ejemplo, la oxidación de *o*-catecoles a *o*-quinonas, de modo que los picos voltamperométricos correspondan a señales procedentes de varios procesos electroquímicos.

Con el fin de comparar los voltamperogramas correspondientes a diferentes especies las señales se agrupan en base a potenciales de pico que difieren al menos entre 50 y 100 mV. Los perfiles voltamperométricos exhibieron diferencias significativas entre las distintas especies fúngicas.

Los resultados de los ensayos de repetibilidad, con diferentes muestras tomadas de la colonia de cada especie crecidas en cultivos frescos colocadas sobre el GCE, dieron variaciones en el potencial de pico menores de ± 20 mV y variaciones en la corriente relativa de pico por debajo del 15% para los diferentes pares de señales.

Tabla 5. Perfiles de producción de micotoxinas ($\mu\text{g/g}$) ($n = 3$) de los diferentes aislados de *Aspergillus* spp. y *Fusarium* spp. en cultivos *in vitro* incubados a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y a_w 0,98.

Especie	Sección	Toxina	Medio Cultivo	Media \pm SD ($\mu\text{g/g}$)
<i>A. flavus</i>	<i>Flavi</i>	AFB ₁	YES	6,10 \pm 0,10
		AFB ₂		0,210 \pm 0,011
<i>A. parasiticus</i>		AFB ₁		18,02 \pm 0,19
		AFB ₂		0,650 \pm 0,020
		AFG ₁		3,01 \pm 0,06
		AFG ₂		0,159 \pm 0,009
<i>A. carbonarius</i>	<i>Nigri</i>	OTA	YES	0,564 \pm 0,018
<i>A. niger</i>		OTA		0,098 \pm 0,005
<i>A. niger</i>		OTA		0,077 \pm 0,004
<i>A. tubingensis</i>		OTA		0,110 \pm 0,006
<i>A. tubingensis</i>		OTA		0,200 \pm 0,010
<i>A. ochraceus</i>	<i>Circumdati</i>	OTA	YES	3,10 \pm 0,06
<i>A. westerdijkiae</i>		OTA		2,82 \pm 0,04
<i>A. steynii</i>		OTA		4,22 \pm 0,08
<i>A. steynii</i>		OTA		5,12 \pm 0,08
<i>F. sporotrichioides</i>	<i>Sporotrichiella</i>	T-2	Avena	0,243 \pm 0,009
		HT-2		0,696 \pm 0,016
<i>F. poae</i>		T-2		0,032 \pm 0,003
		HT-2		0,211 \pm 0,007
<i>F. langsethiae</i>		T-2		11,50 \pm 1,1
		HT-2		39,1 \pm 2,5
<i>F. proliferatum</i>	<i>Liseola</i>	FB1	Arroz	468 \pm 3
		FB2		169,0 \pm 1,7
<i>F. subglutinans</i>		FB1		34,9 \pm 0,5
		FB2		12,33 \pm 0,08
<i>F. verticillioides</i>		FB1		16,88 \pm 0,25
		FB2		6,45 \pm 0,15
<i>F. culmorum</i>	<i>Discolor</i>	DON	Maíz	1,62 \pm 0,06
		3AcDON		0,28 \pm 0,03
<i>F. graminearum</i>		ZEA		0,060 \pm 0,005
		DON		1,31 \pm 0,06
		3AcDON		0,280 \pm 0,009
		ZEA		3,40 \pm 0,08
<i>F. oxysporum</i>	<i>Elegans</i>	BEA	Arroz	3,57 \pm 0,06
		ENs		0,660 \pm 0,005

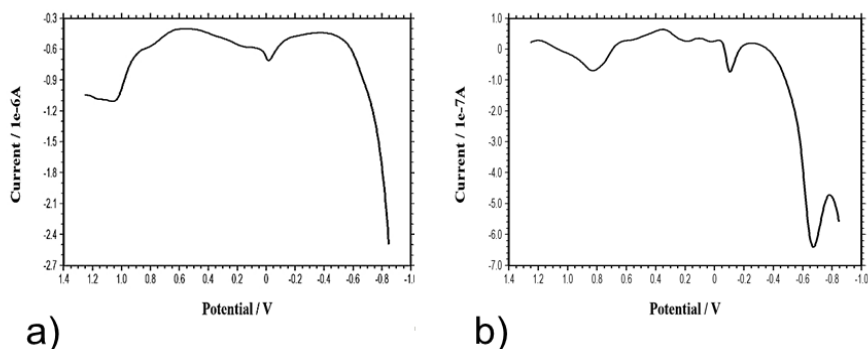


Figura 26. Perfil voltamperométrico de onda cuadrada (SWV) de muestras de colonias de cultivos de 7 días de *A. flavus* (a) y *A. parasiticus* (b) adheridas a un GCE en contacto con una disolución acuosa de HAC/NaAc 0,25 M a pH 4,75. El potencial de barrido se inició a -0,85 V en dirección positiva. Los incrementos de potencial fueron de 4 mV; la amplitud de onda cuadrada fue de 25 mV; la frecuencia fue de 5 Hz.

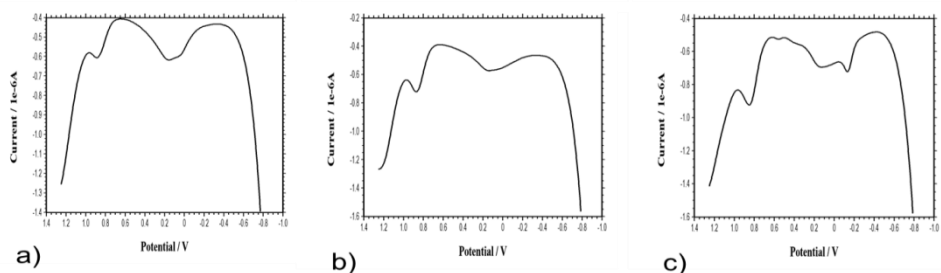


Figura 27. Perfil voltamperométrico de onda cuadrada (SWV) de micromuestras de colonias de cultivos de 7 días de *F. sporotrichioides* (a), *F. poae* (b) y *F. langsethiae* (c) adheridas a un GCE en contacto con una disolución acuosa de HAC/NaAc 0,25 M a pH 4,75. Las condiciones de barrido son las mismas que las que se indican en la Figura 26.

Se debe tener en cuenta que la cantidad de muestra transferida al electrodo no puede ser controlada con precisión. Por ello, los valores absolutos de las corrientes del pico pueden variar significativamente de un electrodo modificado a otro y, por tanto, solo las relaciones entre las corrientes son utilizables para definir los parámetros que dependen de la forma. Puesto que el perfil de metabolitos estaría en último término definido por la genética de las diferentes especies, a efectos de discriminación de cepas sería indiferente cuales fueran los compuestos que proporcionaran respuesta electroquímica.

Los perfiles voltamperométricos (Figuras 29, 30 y 31) sugieren una clara semejanza entre *A. parasiticus* y *A. flavus*, que se separan de las especies *F. sporotrichioides*, *F. poae* y *F. langsethiae* y del resto de especies usadas con fines comparativos. Los voltamperogramas de las especies de *Fusarium* muestran también claras semejanzas, pero difieren del patrón de *Aspergillus*.

Las respuestas voltamperométricas obtenidas sugieren que existe una serie de metabolitos comunes en todas las cepas, pero en proporciones que difieren significativamente de unas a otras. Estos datos pueden tomarse como base para la aplicación de métodos quimiométricos de discriminación. En muchos casos es posible definir criterios singularizados de identificación. Por ejemplo, *A. parasiticus* es el único que presenta un pico bien definido a -0,90 V. Podemos igualmente definir métodos de coincidencia (matching) para comparar los voltamperogramas de dos cepas dadas.

1.2.1. Ruta electroquímica

La respuesta voltamperométrica de las muestras de las colonias fúngicas directamente adheridas a la superficie del electrodo puede ser debida bien a componentes procedentes del contenido celular como consecuencia de las condiciones moderadamente abrasivas del acondicionamiento del electrodo o a procesos electroquímicos

transmembrana como se ha observado en diferentes sistemas biológicos (Domenech-Carbó et al., 2016; Yu et al., 2014). Entre la variedad de metabolitos secundarios fúngicos descritos (Vishwanath et al., 2009), hay una serie de compuestos que contienen grupos funcionales oxidables, entre los que se pueden incluir pigmentos antraquinónicos y naftaquinónicos que contienen unidades de *o*- y *p*-difenoles. Dada la variedad de compuestos electroactivos y a su presencia en cantidades variables dependiendo de la especie fúngica, la respuesta voltamperométrica consiste en una serie de picos superpuestos cuya intensidad relativa es sensible a las cantidades relativas de las distintas especies electroactivas.

Para comprobar la posibilidad de que la pared de las esporas fúngicas sea permeable con la aplicación de los flujos electroquímicos se llevaron a cabo experimentos en SECM a partir de micromuestras de los hongos fijadas en un sustrato de pasta de carbón en contacto con una disolución de $K_4Fe(CN)_6$ 2,0 mM + HAc/NaAc 0,25 M a pH 4,75. Las imágenes SECM se registraron fijando el potencial de punta (E_T) a un valor de +0,45 V al cual tiene lugar la oxidación de $Fe(CN)_6^{4-}$ bajo condiciones controladas. Cuando no se aplicaron potenciales al sustrato las regiones de la base del electrodo expuestas mostraron una respuesta positiva consistente con su naturaleza aislante. En estas condiciones la corriente de punta refleja la topografía de la superficie fúngica combinando crestas irregulares y regiones planas correspondientes al lecho de la pasta de carbón. Cuando se aplicó al sustrato un potencial suficientemente elevado (+0,80 V) para promover la oxidación de los compuestos fúngicos, la imagen topográfica mostró cambios significativos y especialmente abruptos entre el hongo, la base del electrodo y el electrolito. Estas características pueden interpretarse en términos de la existencia de regiones localizadas donde el daño celular facilita la liberación de sustancias electroactivas, sin descartar por ello la posibilidad de cierto grado de electroquímica transmembrana.

El examen de las esporas fúngicas mediante FESEM durante el proceso electroquímico resultó consistente con las consideraciones

expuestas anteriormente. En la Figura 28 se ilustra la morfología de una espora de *A. flavus* obtenida por FESEM antes (Figura 28e) y después (Figura 28f) de ser sometida al potencial oxidativo.

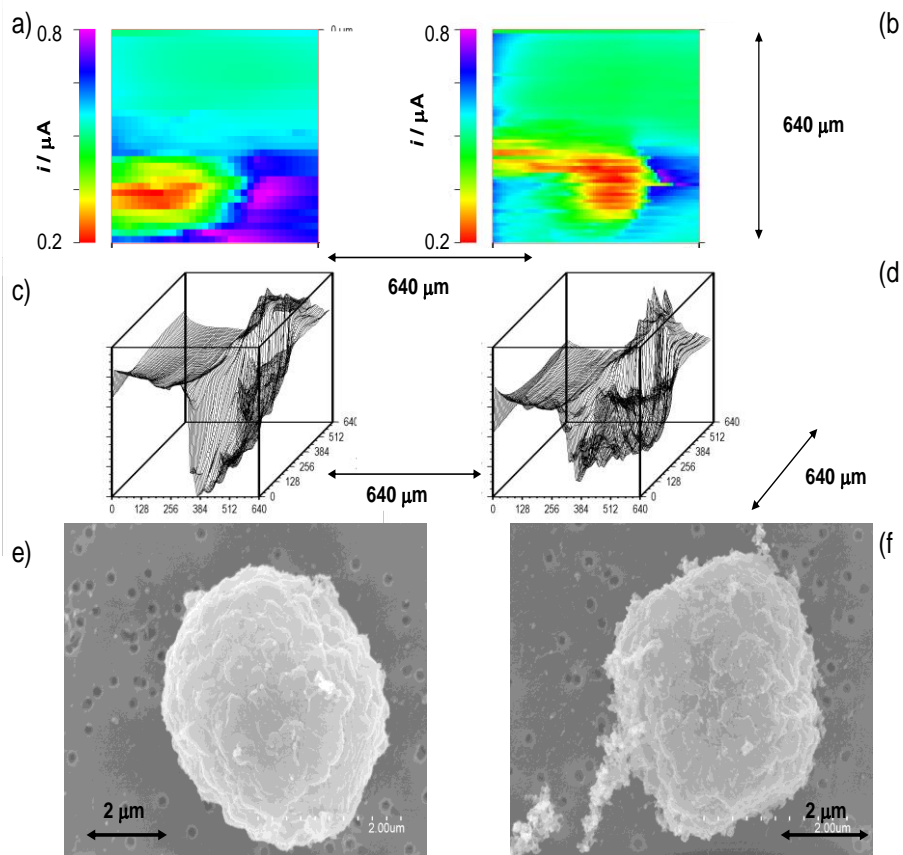


Figura 28. SECM a, b) mapa en color; c, d) imágenes topográficas de una micromuestra de una colonia de *A. carbonarius* depositada sobre un sustrato de pasta de carbón inmerso en una disolución de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 2,0 mM y HAc/NaAc 0,25 M, pH 4,75. $E_T = +0,45$ V; a, c) $E_S = 0,00$ V; b, d) $E_S = +0,80$ V; e, f) Imágenes obtenidas mediante FESEM de una espora de *A. flavus*, e) antes y f) después de la aplicación de un potencial oxidativo de +0,80 V durante 5 min a una muestra de la colonia del hongo adherida al electrodo de grafito en contacto con una disolución tampón de HAc/NaAc 0,25 M, pH 4,75.

Los conidios eran globulares o subglobulares con ornamentación delicadamente espinosa. Tras la aplicación de un potencial suficientemente elevado (+0,80 V) para promover los procesos electroquímicos de oxidación se advirtieron cambios morfológicos sutiles, pero significativos, en la imagen.

La ornamentación se retuvo o se suavizó ligeramente pero el tamaño se redujo aparentemente y la forma cambió de redondeada a cúbica. Estos cambios pueden ser interpretados en términos de adelgazamiento de la pared del conidio favorecido por la desprotonación de grupos carboxilo unidos a la melanina acompañados por la liberación de componentes internos.

El examen de los conidios por FESEM y la SECM tras las etapas oxidativas apoyan la idea de que existe una respuesta electroquímica localizada asociada a los experimentos voltamperométricos en los electrodos modificados con el hongo con implicación de permeabilización de la pared de los conidios y liberación de compuestos electroactivos.

1.2.2. Discriminación de especies

Para la discriminación de especies fúngicas se consideraron dos enfoques sucesivos. El primero se realizó en función de la presencia o ausencia de picos voltamperométricos bien definidos a los potenciales seleccionados. En la Figura 29 se muestra un diagrama que resume los picos voltamperométricos que aparecen a intervalos de potenciales bien definidos (separación mínima de 100 mV) para los diferentes aislados incluidos en el estudio. Se observa una clara discriminación entre los géneros *Fusarium* y *Aspergillus*.

El género *Fusarium* se caracteriza por la presencia de una señal voltamperométrica a +0,90 V que no aparece en el género *Aspergillus* (Mateo et al., 2018a). Dentro de este último género las secciones *Flavi*

y *Circumdati* se caracterizaron por la presencia común de una señal a -0,60 V que no aparece en el caso de especies de la sección *Nigri*. A su vez, la sección *Flavi* se distingue de la sección *Circumdati* por la aparición de una señal a +0,50 V. En segundo lugar, usando el mismo criterio de presencia/ausencia de picos voltamperométricos las diferentes secciones del género *Fusarium* estudiadas también se caracterizaron mediante las señales a +0,6 V, -0,1 V y +0,4 V.

Tabla 6. Picos voltamperométricos que aparecen a intervalos de potencial bien definidos (separación mínima de 100 mV) en SWV de micromuestras de colonias fúngicas de las especies ensayadas.

Species (isolate)	Potential (V)												
	+1.1	+1.0	+0.9	+0.8	+0.7	+0.6	+0.5	+0.4	+0.2	+0.0	-0.1	-0.4	-0.6
<i>A. flavus</i> (Af22c)		●		●			●		●	●	●		●
<i>A. parasiticus</i> (Ap31c)		●		●			●		●	●	●		●
<i>A. carbonarius</i> (Ac1102g)	●				●				●	●	●		
<i>A. niger</i> (An27g)	●				●				●	●	●		
<i>A. niger</i> (An20g)	●				●				●	●	●		
<i>A. tubingensis</i> (AtBo56c)	●				●				●	●	●		
<i>A. tubingensis</i> (AtBo66c)	●				●				●	●	●		
<i>A. ochraceus</i> (Ao37c)		●			●	●			●	●			●
<i>A. westerdijkiae</i> (Aw29c)		●			●	●			●	●			●
<i>A. steynii</i> (As20c)		●				●			●	●			●
<i>A. steynii</i> (As11c)		●		●		●			●	●		●	●
<i>F. sporotrichioides</i> (Fs1c)			●						●	●			
<i>F. poae</i> (Fp12c)			●						●	●			
<i>F. langsethiae</i> (Fl25c)			●					●	●	●			
<i>F. proliferatum</i> (Fp38c)			●						●	●	●		
<i>F. subglutinans</i> (Fs90c)			●					●	●	●	●		
<i>F. verticillioides</i> (Fv1c)			●				●		●	●	●		
<i>F. culmorum</i> (Fc4c)			●			●			●	●			
<i>F. graminearum</i> (Fg10c)			●			●		●	●	●			
<i>F. oxysporum</i> (Fo18c)	●		●					●	●	●	●		

En la Figura 29 se muestra el esquema en cascada (Doménech-Carbó et al., 2010) para la discriminación secuencial de los hongos estudiados a los niveles de género y sección. Se puede observar que, usando el criterio de presencia/ausencia de picos voltamperométricos,

es posible diferenciar, en muchos casos, entre diferentes especies dentro de la misma sección. Por ejemplo, *A. steynii* produce una señal de oxidación principal compuesta por picos superpuestos a +0,80 y +1,0 V precediendo ondas anódicas débiles a 0,2, 0,0, -0,1, -0,4 y -0,6 V, mientras que *A. ochraceus* y *A. westerdijkiae* proporcionan un perfil de tipo escalera, con picos a 0,0, +0,2, +0,6, +0,7 y 1,0 V, acompañados por un hombro mal definido cerca de -0,6 V.

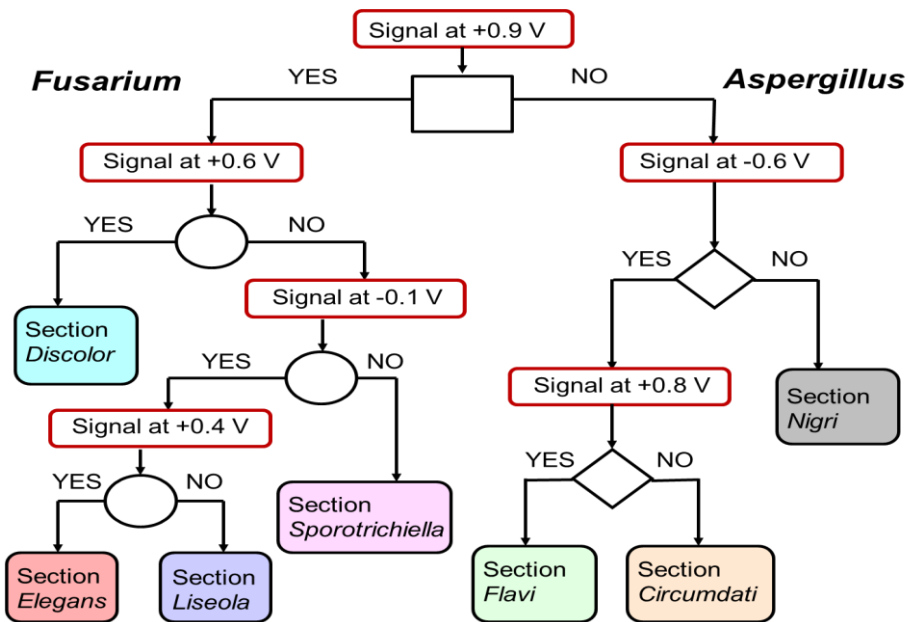


Figura 29. Esquema en cascada que ilustra la discriminación electroquímica de diferentes secciones de *Aspergillus* spp. y *Fusarium* spp. productoras de micotoxinas basada en la presencia o ausencia de picos voltamperométricos.

Un segundo enfoque que puede aplicarse para mejorar la diferenciación electroquímica a nivel de especie consiste en el uso de las estrategias de reconocimiento de patrones. En esta técnica se

emplearon los voltamperogramas normalizados, obtenidos como la ratio entre la corriente a un potencial dado, $I(E)$, y la corriente máxima en el voltamperograma, $I(\text{máx})$, como se describe en la bibliografía (Doménech-Carbó et al., 2015a; Doménech-Carbó et al., 2015b; Scampicchio et al., 2005). Ello puede observarse en la Figura 30, que muestra un diagrama bidimensional de las ratios promedio $I(-450)/I(\text{máx})$ vs $I(+700)/I(\text{máx})$ para las especies de *Aspergillus*.

Considerando las desviaciones estándar de las ratios en las réplicas de los experimentos, puede apreciarse que las especies de las diferentes secciones (*Flavi*, *Nigri* y *Circumdati*) se sitúan en regiones separadas del diagrama y que, con las excepciones de *A. ochraceus* y *A. westerdijkiae*, cada especie es ubicada en una región claramente separada del resto de especies de su misma sección.

Para las especies de *Fusarium* se obtuvieron resultados similares a los obtenidos para *Aspergillus*. La Figura 31 muestra la representación de $I(-150)/I(+900)$ vs $I(+200)/I(+900)$ en la que se puede apreciar que las diferentes secciones (*Liseola*, *Sporotrichiella*, *Elegans* y *Discolor*) están claramente separadas y que las diferentes especies también pueden ser discriminadas.

En los casos en que se ensayaron dos aislados de la misma especie (*A. niger*, *A. tubingensis* y *A. steynii*), los correspondientes puntos en el diagrama se localizaron cerca unos de otros. Solo en el caso de *A. steynii*, los dos aislados estudiados fueron distinguibles en el diagrama, lo que sugiere que, en casos favorables, puede ser posible un acceso electroquímico al estudio de la variabilidad de cepa dentro de la misma especie.

Los datos electroquímicos obtenidos tomando los voltamperogramas normalizados ($I(E)/I(\text{máx})$), se usaron para determinar relaciones de similitud mediante el análisis jerárquico de clusters (Doménech-Carbó et al., 2015a; Doménech-Carbó et al., 2015b). La taxonomía de las especies de *Aspergillus* ha cambiado regularmente a lo largo del tiempo. Desde 1985 (Gams et al., 1985) los

grupos han tenido estatus en la jerarquía taxonómica como secciones, pero la resolución de especies y secciones a menudo es problemática (Rokas y Carroll, 2005).

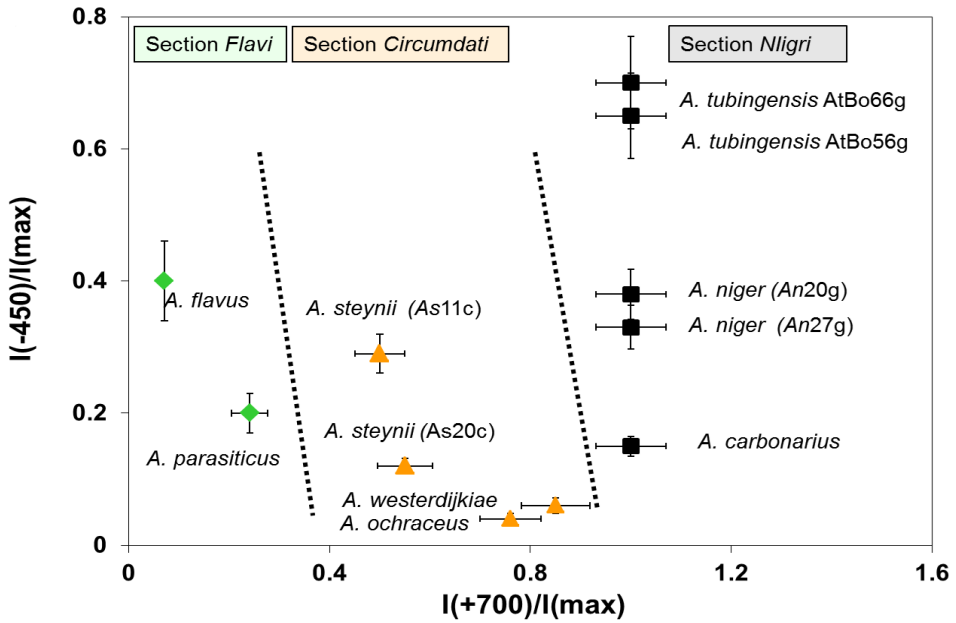


Figura 30. Diagrama bidimensional de las relaciones de intensidades de corriente para pares seleccionados de potenciales (en mV) registrados en los voltamperogramas de onda cuadrada. Representación de $I(-450)/I(\text{máx})$ vs. $I(+700)/I(\text{máx})$ para *Aspergillus* spp. Las barras de error corresponden a los valores extremos obtenidos en tres réplicas independientes para cada hongo (Mateo et al., 2018a).

Los datos voltamperométricos proporcionaron un dendrograma que refleja la similitud de los SWV normalizados (en términos de $I(E)/I(\text{máx})$ versus datos del potencial aplicado) de las especies de *Aspergillus* estudiadas de acuerdo con el árbol filogenético derivado de las secuencias de DNA determinadas para la β -tubulina (BT2), la

calmodulina (CF), regiones ITS y su de rDNA (ID) y la RNA polimerasa II (RPB2) en aislados de *Aspergillus* (Peterson, 2008), ilustrando así la capacidad de la metodología voltamperométrica para ofrecer información que pueda ser correlacionada con datos filogenéticos.

La discusión de los resultados con otros datos previos obtenidos por diferentes autores no ha sido posible ya que esta metodología aplicada a la distinción de hongos asociados a la producción de micotoxinas en alimentos se realiza por vez primera en este trabajo.

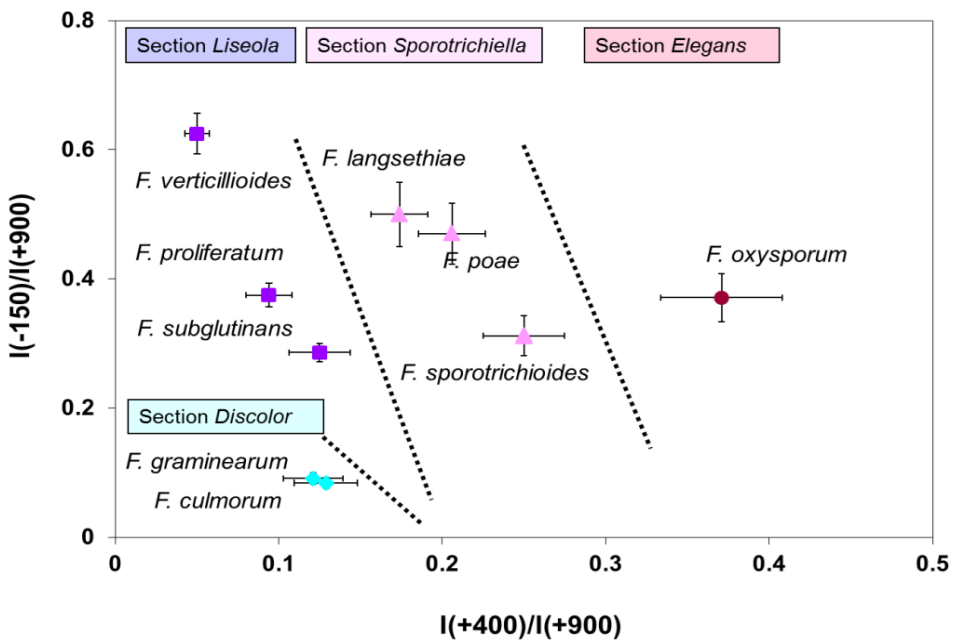


Figura 31. Diagrama bidimensional de las relaciones de intensidades de corriente para pares seleccionados de potenciales (en mV) registrados en los voltamperogramas de onda cuadrada. Representación de $I(-150)/I(+900)$ vs. $I(+400)/I(+900)$ para *Fusarium* spp. Las barras de error corresponden a los valores extremos obtenidos en tres réplicas independientes para cada hongo. (Mateo et al. 2018a).

2. Aflatoxinas y tricotecenos de tipo A (toxinas T-2 y HT-2) en las muestras de maíz y avena

2.1. Validación del método

En la Tabla 7 se indican los parámetros optimizados del método cromatográfico UPLC-ESI-MS/MS empleado para el análisis de las muestras de maíz y avena. La recuperación media de las toxinas en maíz estuvo en el rango de 94,4 a 103,4%, y las RSDr de las recuperaciones variaron entre 5,4 y 7,9% (Tabla 8). La recuperación media de las toxinas en avena estuvo en el rango de 94,6 y 101,4%, y las RSDr de las recuperaciones variaron entre 4,7 y 8,6% (Tabla 9). Se consideraron aceptables y cumplieron los criterios de desempeño establecidos en SANTE (2017). Los valores LOQ están por debajo de los límites regulatorios de la UE en maíz y avena para todos los analitos bajo el estudio. Los residuos en las curvas de calibración obtenidas mediante regresión lineal ponderada fueron $< 2,5\%$ y se asumió linealidad ya que los valores de R^2 fueron $> 0,99$. El método se validó internamente en base a los siguientes criterios: a) la tasa de recuperación de muestras control a las que se adicionaron las concentraciones indicadas para cada analito, y b) la desviación estándar relativa (RSD) de las concentraciones de micotoxinas obtenidas en muestras fortificadas en condiciones de repetibilidad (RSDr).

En las Figuras 32 y 33 se muestran los cromatogramas obtenidos en modo de monitorización de reacciones múltiples (MRM, multiple reaction monitoring) mediante el equipo UPLC-(ESI+)-MS/MS de los patrones de micotoxinas que se añadieron a diferentes niveles a muestras de maíz libres de micotoxinas a niveles detectables (blancos). Los niveles se refieren a la disolución inyectada.

Tabla 7. Parámetros optimizados del método cromatográfico UPLC-ESI-MS/MS operando en modo ESI+. El valor de R^2 fue $> 0,99$ para todas las micotoxinas.

Propiedades	Micotoxinas					
	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2	T-2	HT-2
Fórmula molecular	$C_{17}H_{12}O_6$	$C_{17}H_{14}O_6$	$C_{17}H_{12}O_7$	$C_{17}H_{14}O_7$	$C_{24}H_{34}O_9$	$C_{22}H_{32}O_8$
Masa Molecular (Da)	312,063	314,079	328,058	330,074	466,50	424,21
Ion precursor (m/z) (Da)	313,0	315,0	329,0	331,0	484,0	442,0
Tiempo de retención (min)	6,0	5,7	5,5	5,2	7,8	7,1
Iones producto (m/z) (Da)	[M+H] ⁺ 285 ^a 241 ^b	[M+H] ⁺ 287 ^a 259 ^b	[M+H] ⁺ 243 ^a 283 ^b	[M+H] ⁺ 257 ^a 285 ^b	M+NH ₄ ⁺ 305.4 ^a 245.2 ^b	[M+NH ₄] ⁺ 263 ^a 215 ^b
Voltaje del cono (V)	70 70	70 70	70 70	70 70	20 20	20 20
Energía de colisión (eV)	25 ^c 35 ^d	30 ^c 25 ^d	25 ^c 25 ^d	30 ^c 30 ^d	15 ^c 15 ^d	15 ^c 15 ^d

^a Ion cuantificador; ^b Ion cualificador; ^c Energía de colisión para el ion cuantificador; ^d Energía de colisión para el ion cualificador.

Tabla 8. Límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ), porcentaje de recuperación media y desviación estándar relativa media para micotoxinas adicionadas a granos de maíz blancos a cuatro niveles y analizadas mediante UPLC-(ESI+)-MS/MS.

Micotoxina	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)	Recuperación media (%)	RSD _r media (%)
AFB1	0,28	0,84	98,30	6,20
AFB2	0,10	0,30	103,40	6,50
AFG1	1,20	3,60	102,40	5,40
AFG2	0,70	2,10	95,20	7,50
Toxina T-2	1,70	5,10	96,80	7,90
Toxina HT-2	2,20	6,60	94,40	5,80

Tabla 9. Límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ), porcentaje de recuperación media y desviación estándar relativa media para micotoxinas adicionadas a granos de avena blancos a cuatro niveles y analizadas mediante UPLC-(ESI+)-MS/MS.

Micotoxina	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)	Recuperación media (%)	RSD _r media (%)
AFB1	0,30	0,90	98,20	6,60
AFB2	0,20	0,60	101,40	5,50
AFG1	0,70	3,60	94,60	7,30
AFG2	1,00	2,10	98,00	6,50
Toxina T-2	4,00	12,00	95,80	8,60
Toxina HT-2	1,50	4,60	97,40	4,70

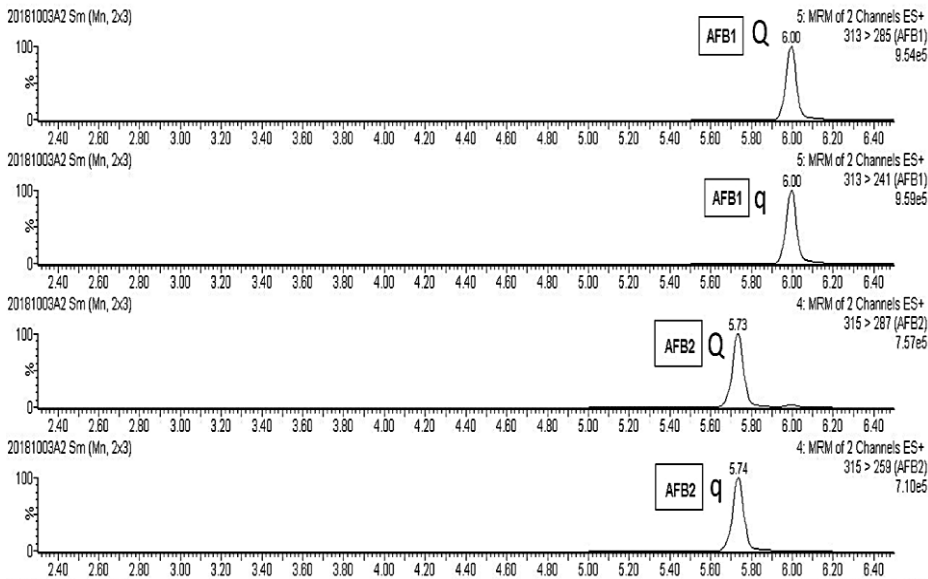


Figura 32. Cromatogramas de patrones de micotoxinas adicionados al extracto de una muestra de maíz blanco obtenidos mediante el modo MRM en el sistema UPLC-(ESI+)-MS/MS. AFB1, 2 ng/mL; AFB2, 2 ng/mL. Q: ion cuantificador; q: ion cualificador.

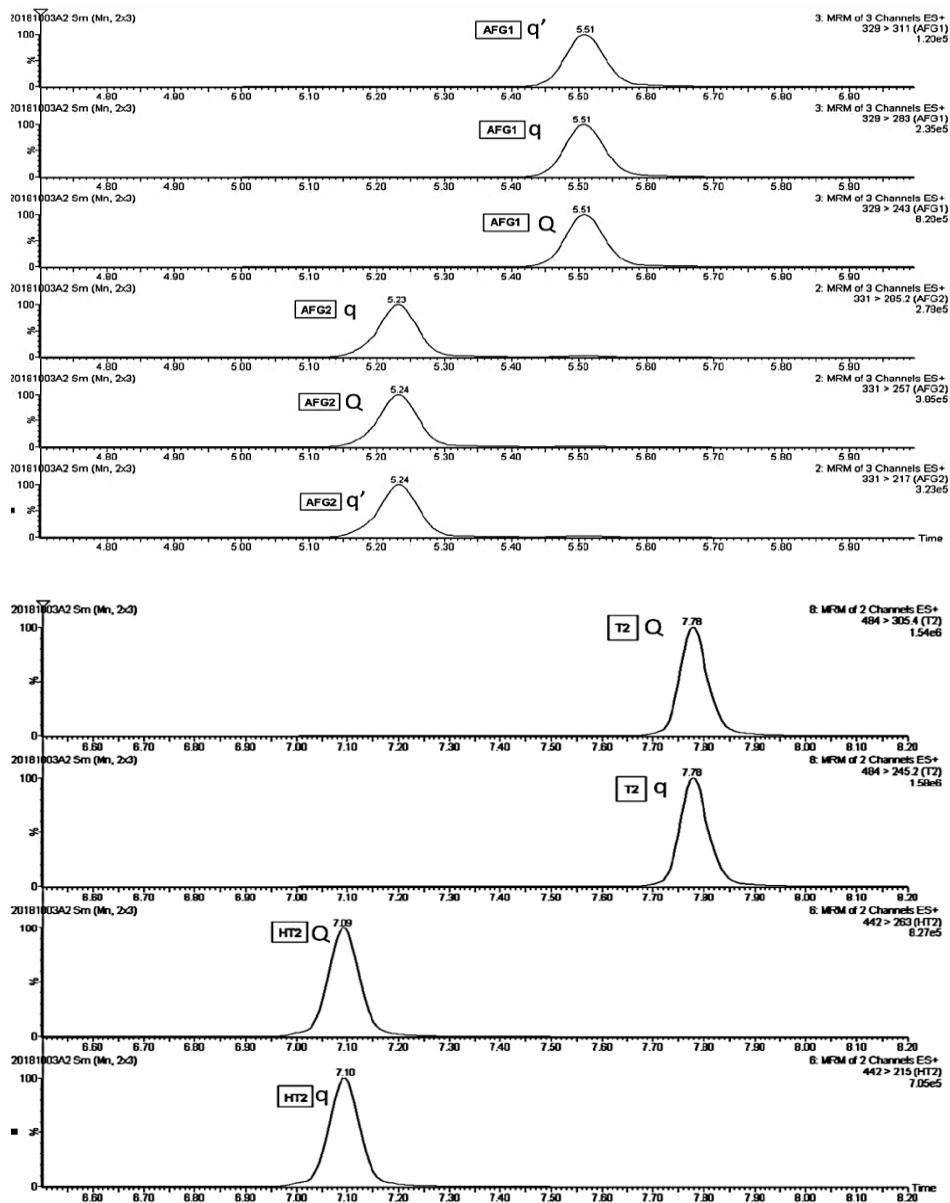


Figura 33. Cromatogramas de patrones de micotoxinas adicionados al extracto de una muestra de maíz blanco obtenidos mediante el modo MRM en el sistema UPLC-(ESI+)-MS/MS. T-2, 25 ng/mL; HT-2, 25 ng/mL; AFG1, 2 ng/mL; AFG2, 2 ng/mL. Q: ion cuantificador; q: ion cualificador; q': ion cualificador alternativo (no usado normalmente).

2.2. Determinación de micotoxinas en las muestras de maíz y avena

Los resultados de los análisis de AF y de las toxinas T-2 y HT-2 en las muestras de maíz y avena en el periodo 2015-2019 usando el método validado se muestran en las Tablas 10, 11, 12 y 13. De las 98 muestras de maíz estudiadas en 9 se encontraron AFB₁ y/o AFB₂ y en otras 2 se encontró AFG₂ a niveles iguales o superiores al LOQ. En 3 muestras los niveles de AFB₁ excedieron el límite máximo contemplado en la legislación vigente en la Unión Europea (EU) para AFB₁ en este cereal (Tabla 10).

Tabla 10. Presencia de aflatoxinas y de las toxinas T-2 y HT-2 en granos de maíz consumido en España en el periodo 2015-2019 (n = 98).

Micotoxinas	Nº de muestras ND	Nº de muestras LOD-LOQ	Nº y % de muestras > LOQ	Rango de los niveles de micotoxinas en muestras > LOQ	Media / mediana ^a (ng/g)	Niveles máximos en la EU (ng/g)	Nº y % de muestras niveles > EU
AFB ₁	51	38	9 (9,2%)	0,87–124,1	26 / 1,55	5	3 (3%)
AFB ₂	79	10	9 (9,2%)	0,31–8,85	1,29 / 0,33	–	–
AFG ₁	94	4	–	–	–	–	–
AFG ₂	88	6	2 (2%)	4,5–5,6	5,05 / 5,05	–	–
Suma AFs	–	–	–	0,31–133	–	10	3 (3%)
T-2	73	20	5 (5,1%)	5,8–13,8	9,5 / 8,6	–	–
HT-2	75	18	5 (5,1%)	7,1–24,3	13 / 11,7	–	–
T-2+HT-2	–	–	–	12,9–26,8	21 / 20,3	200	–

ND: toxina no detectada. ^a Media y mediana a niveles \geq LOQ.

Tabla 11. Variación anual de aflatoxinas y de las toxinas T-2 y HT-2 en grano de maíz consumido en España entre 2015 y 2019. La AFG1 se ha omitido porque los niveles hallados fueron inferiores al LOQ (concentraciones en ng/g).

Micotoxinas	Año				
	2015 (N ^a = 10)	2016 (N = 22)	2017 (N = 26)	2018 (N = 21)	2019 (N = 19)
	n ^b / Media / Rango ^c	n / Media / Rango	n / Media / Rango	n / Media / Rango	n / Media / Rango
AFB₁	1 / 0,93	3 / 1,62 / 1,42–1,90	2 / 73,0 / 22,0–124,1	2 / 40,6 / 0,87–80,4	1 / 0,91
AFB₂	1 / 0,35	3 / 0,40 / 0,31–0,49	2 / 4,6 / 0,33–8,85	2 / 0,315 / 0,31–0,32	1 / 0,33
AFG₂	–	–	–	1 / 5,58	1 / 4,8
Suma AFs	1 / 1,28	5 / 0,31 / 0,31–1,90	3 / 77,5 / 0,33–133	4 / 40,6 / 0,31–80,4	3 / 3,00 / 1,24–4,8
T-2	–	–	–	3 / 8,39 / 5,84–12,1	2 / 11,2 / 8,62–13,8
HT-2	–	–	1 / 24,3	2 / 7,87 / 7,08–8,65	2 / 12,35 / 11,7–13,0
T-2+HT-2	–	–	1 / 24,3	3 / 13,6 / 12,1–15,9	2 / 23,5 / 20,3–26,8

^a: N^o de muestras analizadas. ^b: N^o de muestras con niveles de micotoxinas \geq LOQ. ^c: Media / Rango de niveles de micotoxinas \geq LOQ.

Las concentraciones de AFB1 fueron 22,0 y 124,1 ng/g en 2 muestras tomadas en 2017 y 80,4 ng/g en una tomada en 2018. La muestra de maíz con mayores niveles de AFB1 (124,1 ng/g) se recogió en el Valle del Ebro (Zaragoza), región con veranos muy calurosos y secos (30–35 °C). La AFG1 se detectó en 4 muestras y siempre a niveles <LOQ. En la Tabla 11 se muestran los niveles de las toxinas en las muestras de maíz en cada uno de los años estudiados y en la

Figura 34 se puede observar algunos cromatogramas resultantes de la determinación de AFB1 y AFB2 y de las toxinas T-2 y HT-2 en muestras de maíz. En los años 2017 y 2018 los niveles medios de AF fueron mayores que en 2016 y 2019. En cambio, las muestras de 2019 presentaron mayores niveles de las toxinas T-2 y HT-2. Hay que destacar que, en general, tanto las AF como las toxinas T-2 y HT-2 se encuentran a niveles muy bajos.

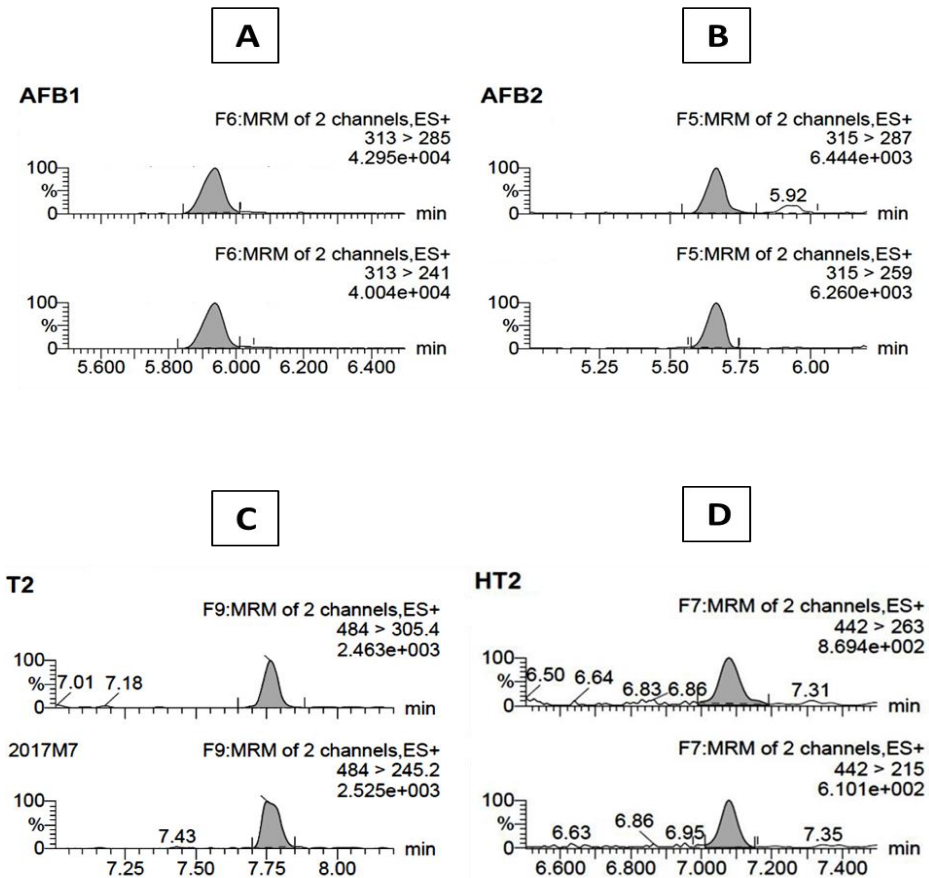


Figura 34. Cromatogramas de muestras de maíz contaminado naturalmente obtenidos en modo MRM mediante UPLC-(ESI+)-MS/MS conteniendo a) 184 ng AFB1/g; b) 8,85 ng AFB2/g; c) 12,1 ng de toxina T-2/g; d) 11,7 ng de toxina HT-2/g.

Pese a que algún estudio indica la ausencia de AF en muestras procedentes de silos de maíz (Driehuis et al., 2008; Panasiuk et al., 2019) o en ocasiones las toxinas aparecen en pocos silos y a una concentración baja (Schmidt et al., 2015), lo cierto es que la mayor parte de los estudios indican que este es actualmente el cereal con mayor contaminación por AF (Giorni et al., 2007; Kos et al., 2013; Piva et al., 2006).

Se ha descrito la presencia de AF en maíz en países del sur de Europa, aunque los niveles encontrados han sido muy diferentes dependiendo de las condiciones climatológicas. Así, en Italia Pietri et al. (2004) analizaron 503 muestras de maíz en el periodo 1995–1999 y encontraron niveles medios de AFB1 en el rango 0,3-4,10 ng/g. Battilani et al. (2013) entre 2005 y 2011, analizaron AFB1 en maíz en pre-cosecha y post-cosecha y, dependiendo del año, encontraron entre 10 y 41% de muestras positivas con una media en el rango de 7-42 ng/g, y niveles mínimos y máximos de <LOD hasta 560 ng/g.

En Croacia, se estudiaron 972 muestras de maíz y el 31,4% de ellas contenían AFB1 (la media fue de 38,46 ng/g y el valor máximo, 2072 ng/g) (Pleadin et al., 2015). En Grecia, entre 2010 y 2013 se encontró AF en el 17,5% de muestras de maíz a niveles >10 ng/g (rango 0,6-45,2 ng/g) (Manouras y Malissiova, 2018). En Serbia, Kos et al. (2018), dependiendo del año de la cosecha, detectaron AF en el 5,0-72,3% de 3000 muestras de maíz recogidas durante 2012-2016. Gruber-Dorninger et al. (2019) realizaron una revisión sobre la contaminación del maíz con micotoxinas en el periodo 2008-2017 en muestras de cien países y encontraron que en las regiones de África sub-sahariana, y del sur y sudeste de Asia una fracción considerable de las muestras excedieron los MLs de concentración de AFB1 de acuerdo con los estándares de la Unión Europea. En China, Sun et al. (2011) encontraron AFB1 en el 100% de muestras de maíz estudiadas (rango 0,4-136,8 ng/g).

En el sur de Europa, con un clima caracterizado por altas temperaturas y alta humedad que favorece el crecimiento de *A. flavus*

y *A. parasiticus* así como la producción de AF, Giorni et al. (2007) encontraron crecimiento óptimo de estos hongos a 25-30 °C y a una a_w de 0,99 y máxima producción de AF en torno a 25 °C y a 0,99 a_w . Posteriormente, Abdel-Hadi et al. (2012) determinaron una mayor tasa de crecimiento de *A. flavus* a 30-35 °C y una máxima producción de AF a 25-35 °C, lo que apunta a una posible adaptación de esta especie a nuevas condiciones climatológicas.

En lo que se refiere a las toxinas T-2 y HT-2 en maíz, se detectaron en 20 y 18 muestras de maíz, respectivamente (Tabla 10). Ambas se encontraron a niveles por encima del LOQ en 5 muestras (de los años 2017, 2018 y 2019) (Tabla 11) aunque el nivel máximo (26,8 ng/g) se situó por debajo del nivel máximo recomendado por la Unión Europea para estas toxinas (European Commission, 2013).

Los resultados previos obtenidos en otros trabajos son muy escasos. Cano-Sancho et al. (2011), Marín et al. (2012) y Park et al. (2018) confirman la baja cantidad de estas toxinas en el maíz. De acuerdo con la revisión de Gruber-Dorninger et al. (2019), que reúne los resultados de 74821 muestras procedentes de cereales recogidos en cien países de todo el mundo entre 2008 y 2017, el 12% de las muestras de maíz analizadas presentaron niveles detectables de la toxina T-2 (con un valor medio de 25 ng/g y un máximo de 978 ng/g). De todo lo expuesto, se puede asumir que, actualmente, estas toxinas no constituyen una preocupación en granos de maíz procedentes de España.

Existen modelos predictivos que indican que el cambio climático afectará al riesgo de contaminación del maíz con AF. En Europa en los próximos 30 años parece que se producirá un aumento de +2 °C y ello favorecerá el crecimiento de *A. flavus* y la producción de AF (Battilani et al., 2016; Moretti et al., 2019). En el trabajo de Panasiuk et al. (2019) se indica que la concentración de determinadas micotoxinas como las AF se reduce durante el almacenamiento en silos, debido a que en estos lugares se limita la concentración de oxígeno y la humedad. Sin embargo, en otros trabajos (Keller et al., 2013) se indica que se

produce un aumento de la concentración de la AFB1 durante el almacenamiento. Si se comparan los resultados obtenidos en la presente Tesis con los obtenidos en otros países de nuestro entorno (sur de Europa) se puede concluir que actualmente las AF en maíz consumido en España no parecen constituir un riesgo para la salud de los consumidores. Sin embargo, serán necesarios nuevos estudios en el futuro ya que los cambios climatológicos en pre- y post-cosecha afectan significativamente al contenido de AF en maíz.

Los resultados sobre la incidencia de AF y toxinas T-2 y HT-2 en las muestras de avena en todo el periodo estudiado se muestran en la Tabla 12 y los resultados sobre la incidencia anual de las toxinas en avena en cada año del periodo se observa en la Tabla 13. En 2 de las muestras (2%), la suma de la concentración de AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2 excedió el ML de 4 µg/kg (European Commission, 2006b). En general, el nivel de contaminación es extraordinariamente bajo.

En trabajos previos, como el de Sacchi et al. (2009), se analizaron 23 muestras de avena en la provincia de Entre Ríos en Argentina, en el año 2006 para diferentes micotoxinas, entre ellas, AF. A pesar de la alta incidencia de *A. flavus*, en ninguna muestra se detectaron AF. Vidal et al. (2013) estudiaron 67 muestras de cereales procedentes de las provincias de Lérida y Valencia; 30 de las muestras fueron de avena y 37 de trigo, todas ellas se recolectaron en diferentes tiendas en el año 2012. En ninguna de ellas se detectaron AF. Blankson et al. (2019) analizaron 50 muestras de alimentos para lactantes y niños de corta edad elaborados con arroz, maíz, trigo, avena, mijo, legumbres o mezcla de granos, recolectados en dos regiones de Ghana en 2016. Es importante destacar que dicho estudio solo contó con dos muestras elaboradas con avena, pero en ninguna de ellas se detectaron AF; sin embargo, las AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2 se detectaron en 9 de las 10 muestras de productos derivados del maíz a niveles de 0,40-15,16, 0,08-2,26, 0,55-6,18 y 0,66-0,98 µg/kg, respectivamente. Los resultados generales de este estudio muestran que el 96% de las muestras contenían niveles de AFB1 superiores al ML de 0,1 µg/kg permitido por la Unión Europea para alimentos

procesados destinados a niños, mientras que el 52% excedían los MLs de 2 µg/kg para la AFB₁ y de 4 µg/kg para la suma de AF establecidos por la Unión Europea. En lo que respecta a las toxinas T-2 y HT-2 en avena, la media, mediana y rango de concentraciones para la suma de ambas toxinas en la totalidad de las muestras positivas (>LOQ) fueron 51.8, 29.8 y 4.98–760 ng/g, respectivamente.

Tabla 12. Presencia y niveles de aflatoxinas y de toxinas T-2 y HT-2 en muestras de grano de avena comercializadas en España en el periodo 2015-2019 (n = 100).

Micotoxinas	Nº de muestras ND	Nº de muestras LOD-LOQ	Nº y % de muestras > LOQ	Niveles de micotoxinas en muestras > LOQ (ng/g)	Media / mediana ^a (ng/g)	Niveles máximos en la EU (ng/g)	Nº y % de muestras niveles > EU
AFB ₁	86	9	5	1,06–1,70	1,34 / 1,28	2	0
AFB ₂	86	13	1	0,61	0,61 / 0,61	–	–
AFG ₁	100	0	0	–	–	–	–
AFG ₂	89	9	2	4,50–4,68	4,59 / 4,59	–	–
Suma AFs	–	–	–	0,61–4,70	2,3 / 1,70	4	2
T-2	74	14	12	12,3–321	49,9 / 16,3	–	–
HT-2	53	11	36	4,98–439	37,1 / 25,6	–	–
T-2+HT-2	–	–	–	4,98–760	51,8 / 29,8	1000	–

ND: toxina no detectada. ^a Media y mediana a niveles ≥ LOQ.

Tomando los datos de cada toxina individualmente, para el caso de la toxina T-2 la media, la mediana y el rango de concentraciones (>LOQ) fueron 49.9, 19,3 y 12,3-321 ng/g, respectivamente, y para el caso de la toxina HT-2, estos valores fueron 37,1, 25,6 y 4,98-439 ng/g, respectivamente. Las toxinas T-2 y HT-2 a niveles ≥ LOQ se encontraron en el 20% y el 30% de las muestras de avena,

respectivamente. Ninguna de las muestras contó con un nivel de 1000 µg/kg o superior para la suma de ambas toxinas (nivel máximo recomendado por la Comisión Europea (European Commission, 2013)).

Tabla 13. Variación anual de los niveles cuantificables de aflatoxinas y de las toxinas T-2 y HT-2 (ng/g) en muestras de avena comercializadas en España entre 2015 y 2019. La AFG1 se ha omitido porque los niveles encontrados fueron siempre inferiores al LOQ.

Micotoxinas	Año				
	2015 (N ^a = 10)	2016 (N = 33)	2017 (N = 31)	2018 (N = 16)	2019 (N = 10)
	n ^b / Media / Rango ^c	n / Media / Rango	n / Media / Rango	n / Media / Rango	n / Media / Rango
AFB₁	–	–	2 / 1,49 / 1,28–1,70	2 / 1,30 / 1,06–1,54	1 / 1,12
AFB₂	–	–	1 / 0,61 / 0,61	–	–
AFG₂	–	–	2 / 4,59 / 4,50–4,68	–	–
Suma AFs	–	–	4 / 3,2 / 1,7–4,68	2 / 1,30 / 1,06–1,54	1 / 1,12
T-2	–	3 / 13,85 / 12,3–16,31	4 / 103 / 13,6–321	3 / 15,5 / 12,9–18,7	2 / 15,36 / 12,42–18,31
HT-2	1 / 13,5	9 / 23,3 / 10,51–34,8	11 / 74,0 / 5,15–439	8 / 26,1 / 5,45–40,8	7 / 14,8 / 4,98–29,26
T-2+HT-2	1 / 13,5	9 / 26,5 / 10,5–42,3	11 / 111 / 5,15–760	8 / 31,9 / 5,45–59,45	7 / 19,2 / 4,98–43,39

a: N^o de muestras analizadas. b: N^o de muestras con niveles de micotoxinas ≥ LOQ. c: Media / Rango de niveles de micotoxinas ≥ LOQ.

En la actualidad el interés de la toxinas T-2 y HT-2 en cereales y derivados de cereales radica en la elevada frecuencia y concentración con que se han hallado en avena, especialmente, en países del centro y norte de Europa (Bernhoft et al., 2010; Edwards, 2009a; Hietaniemi et al., 2016; Langseth et al., 1998; Opoku et al., 2013, 2017), donde se relacionan con la presencia de la especie *F. langsethiae* (Torp y Adler, 2004; Torp y Nirenberg, 2004), mientras que la especie *F. sporotrichioides*, también productora de estas toxinas, parece que se encuentra en latitudes más bajas.

En un informe de la EFSA (EFSA, 2011) se muestran los resultados analíticos para la suma de las toxinas T-2 y HT-2 de 20519 muestras de cereales o sus derivados (alimentos, piensos y granos no procesados) tomadas en 22 países europeos. Las muestras se recogieron entre 2005 y 2010. Los cereales analizados fueron trigo, avena, cebada, maíz y, en menor cantidad, arroz y otros granos. Más tarde, en otro informe de la EFSA (EFSA, 2017b), se recogieron un total de 25916 resultados analíticos; de ellos 19505 fueron de alimentos y 6411 de piensos. Las muestras procedieron de 20 países europeos, la mayor parte de Alemania (50%). La conclusión de ambos trabajos, sin ningún tipo de discordancia, fue la elevada incidencia de las toxinas T-2 y HT-2 en avena y en los productos elaborados a partir de dicho cereal.

En otros trabajos, como los de Bernhoft et al. (2010), se analizaron 602 muestras de cereales (avena, cebada y trigo), todas ellas cultivadas en Noruega entre los años 2002 y 2005, observándose que los niveles de T-2 y HT-2 eran muy superiores en avena que en cebada, mientras que en las muestras de trigo no se detectaron. La media de la concentración de las toxinas HT-2 y T-2 fue de 80 y 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en avena orgánica y de 117 y 43 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en avena convencional, respectivamente, y la mediana fue <20 y <30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en avena orgánica y de 62 y <30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en avena convencional, respectivamente.

En los trabajos de Edwards en cereales (entre 2001 y 2005) en Reino Unido en los que se analizaron 458 muestras de avena

(Edwards, 2009a), 1624 muestras de trigo (Edwards, 2009b) y 446 muestras de cebada (Edwards, 2009c), las toxinas se encontraron en los tres cereales, aunque su concentración fue mucho más elevada en avena que en cebada y trigo. La toxina T-2 se encontró en el 84%, 16% y 12% de las muestras de avena, trigo y cebada, respectivamente. En avena, las concentraciones media, máxima y la mediana de la toxina T-2 fueron 140, 2406 y 58 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente. La toxina HT-2 se detectó en el 92%, 31% y 36% de las muestras de avena, trigo y cebada, respectivamente, y sus concentraciones media, máxima y la mediana fueron 430, 7584 y 151 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente.

Más recientemente, este mismo autor (Edwards, 2017) estudió las toxinas T-2 y HT-2 en 303 muestras de avena inglesa recolectadas entre 2006 y 2008. La concentración media de toxina T-2, toxina HT-2 y de la suma de ambas fue de 132, 318 y 450 $\mu\text{g}/\text{kg}$, y las medianas de las concentraciones de las toxinas T-2, HT-2 y de la suma de ambas fueron 45, 111 y 162 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente.

Los resultados obtenidos en ambos periodos (2002-2005 y 2006-2008) se compararon (Edwards, 2017) para determinar la posible influencia del clima y de las prácticas agrícolas sobre la concentración de las toxinas en el cereal. Se encontró que entre 2002 y 2005 hubo una elevada incidencia y altas concentraciones medias de las toxinas T-2 y HT-2, que se continuaron en el verano seco del año 2006. En cambio, los años 2007 y 2008 contaron con veranos más húmedos, hecho que se relacionó con una caída en los niveles de las toxinas. Entre el 1% y el 30% de las muestras recolectadas en cada una de las anualidades comprendidas entre 2002 y 2008 tenían niveles para la suma de las toxinas T-2 y HT-2 superiores al límite de 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ recomendado como máximo en avena por la Comisión Europea (European Commission, 2013), lo que representa aproximadamente el 16% de las muestras totales del estudio. Hay que destacar que se encontraron diferencias significativas en la incidencia de las toxinas T-2 y HT-2 en las muestras de avena en función del año y de la región de la cosecha. Además, se determinó una gran diferencia en la

concentración media de la suma de ambas toxinas, que en concreto fue del orden de cinco veces menor en muestras de cultivos orgánicos que en muestras de cultivos convencionales. También encontraron mayores niveles de ambas toxinas en las variedades de avena de invierno que en las de primavera (Edwards y Jennings, 2016; Edwards, 2017).

En Reino Unido, Opoku et al. (2013) estudiaron muestras de diferentes cereales (avena, trigo, cebada y triticale) y para la suma de las toxinas HT-2 y T-2 en avena, que fue el cereal más contaminado, encontraron concentraciones en el rango de 1232-10777, 75-2905 y 425-2598 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en las muestras recogidas en 2009, 2010 y 2011 (media 4300, 1505 y 1229 $\mu\text{g}/\text{kg}$), respectivamente. Años después en otro trabajo del mismo grupo (Opoku et al., 2017) se describe que la media de la suma de ambas toxinas en las variedades de avena de invierno Gerald, Mascani y Dalguise era de 1956, 841 y 237 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente, y en las variedades de primavera Firth, Atego y Husky era de 433, 141 y 117 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente, confirmando resultados de otros autores, y concluyendo que la diferencia en la producción de las toxinas es más bien consecuencia de las diferencias genéticas entre variedades que de las técnicas agrícolas aplicadas en cada cultivo. También en Reino Unido, Xu et al. (2014) analizaron 303 muestras en los años comprendidos entre 2006 y 2008. En las muestras de los años 2006, 2007 y 2008 la media de la concentración de la toxina T-2 fue de 251, 104 y 41 $\mu\text{g}/\text{kg}$, y la de la toxina HT-2 fue de 544, 331 y 79 $\mu\text{g}/\text{kg}$. La toxina T-2 estuvo presente en el 95%, 77% y 65% de las muestras, correspondientes a los años 2006, 2007 y 2008, respectivamente, y la toxina HT-2 estuvo presente en el 97%, 88% y 68% de las muestras correspondientes a dichos años, respectivamente.

Scudamore et al. (2009) estudiaron los niveles de las toxinas T-2 y HT-2 en muestras de cereales procedentes de diversos países (60 muestras de trigo procedentes de Reino Unido, 27 muestras de avena, 21 procedentes de Irlanda y Reino Unido y 6 procedentes de Escandinavia, y 86 muestras de maíz procedentes de Francia y

Argentina), recolectadas entre 2004 y 2007, y encontraron la toxina T-2 en todas las muestras de avena analizadas en una concentración entre 20 y 1610 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en las muestras procedentes de Reino Unido e Irlanda y entre 5 y 499 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en las procedentes de Escandinavia. La toxina HT-2 se detectó en 18 de las 21 muestras de avena procedentes de Irlanda y Reino Unido en un rango de concentraciones entre 50 y 3570 $\mu\text{g}/\text{kg}$, y en las 6 muestras procedentes de Escandinavia, en un rango de concentraciones entre 50 y 999 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

En Alemania, en un estudio en 10 regiones del país y diferentes variedades de avena crecidas en 2007 (Schwake-Anduschus et al., 2010) las concentraciones de la suma de estas toxinas se encontraron entre 9 y 623 $\mu\text{g}/\text{kg}$. El valor medio de concentración de la suma de ambas toxinas fue 102 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y la mediana de 48 $\mu\text{g}/\text{kg}$, ambos valores en torno a cinco veces más bajos que en el trabajo de Edwards, 2009a.

En otro trabajo realizado también en muestras alemanas (Gottschalk et al., 2007) se analizaron 70 muestras de avena del año 2005. Las toxinas T-2 y HT-2 estuvieron presentes en todas las muestras y la concentración media de la suma de ambas fue de $17 \pm 18 \mu\text{g}/\text{kg}$. Encontraron también diferencias en el contenido de las toxinas T-2 y HT-2 en avena en función del modelo agrícola (orgánico o convencional) aunque no tan acusadas como en Reino Unido (Edwards, 2009a). Dos años después, este mismo grupo (Gottschalk et al., 2009) analizó 130 muestras de derivados del trigo, 61 de derivados de centeno y 98 de derivados de avena del periodo 2005-2006. Las muestras de avena procedieron de copos de avena, granos de avena, salvado de avena y alimentos infantiles. La suma de la concentración de ambas toxinas en las muestras osciló entre 0,04 y 85 $\mu\text{g}/\text{kg}$. El porcentaje de muestras contaminadas con la toxina T-2 fue del 100%, y el porcentaje de muestras contaminadas con la toxina HT-2 fue del 99%. El valor medio y la mediana de las concentraciones de toxina T-2 fueron 4,2 y 2,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente; para la toxina HT-2 estos valores fueron 10 y 6,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente.

En Polonia, Twarużek et al. (2013) analizaron 98 muestras de avena y productos derivados recolectados entre los años 2009 y 2011. La concentración de las toxinas T-2 y HT-2 se encontró entre niveles mínimos <LOQ y niveles máximos de 110 y 121 µg/kg, respectivamente. Además, la concentración fue menor en las muestras procedentes de cultivo orgánico que en las procedentes de cultivo convencional. Kuzdraliński et al. (2013) analizaron 58 muestras de avena procedentes de dos provincias de Polonia de los años comprendidos entre 2006 y 2008. Para la toxina T-2, el intervalo de concentraciones, la media y la mediana del total de las muestras, fueron 32-311, 107 ± 56 y 104 µg/kg; para la toxina HT-2, fueron 30-651, 206 ± 194 y 120 µg/kg.

En Noruega, Hofgaard et al. (2016) estudiaron las especies del género *Fusarium* y sus toxinas en avena (289 muestras) y trigo (178) procedentes del sudeste de Noruega recolectadas entre 2004 y 2009. Entre sus conclusiones cabe destacar que las concentraciones máximas de las toxinas HT-2 y T-2 en las muestras de avena fueron 2040 y 864 µg/kg, respectivamente, que la toxina HT-2 se detectó en el 67% de los granos de avena analizados, mientras que la toxina T-2 se detectó en el 88% de estos. También observaron que la concentración media anual de la suma de ambas toxinas varió entre 170 y 229 µg/kg, que la suma de ambas toxinas fue de 100 µg/kg o superior en el 38% de las muestras de avena y que el 6% de las muestras de avena contaron con una concentración superior a 1000 µg/kg de la suma de ambas toxinas. También en Noruega Hjelkrem et al. (2018) estudiaron estas toxinas en granos de avena procedente de las cosechas comprendidas entre los años 2004 y 2013. En 188 muestras el nivel máximo de la suma de ambas toxinas fue 2998 µg/kg, la mediana fue de 199 µg/kg, la media de 372 µg/kg, y la desviación estándar de la media de 468 µg/kg. El 9% de las muestras contuvieron una concentración de la suma de las toxinas superior al valor máximo de 1000 µg/kg recomendado por la Comisión Europea.

Schöneberg et al. (2018) estudiaron 325 muestras de avena procedentes de Suiza, entre 2013 y 2015. Las concentraciones medias

de la toxina T-2 y de la toxina HT-2 en las muestras de 2013 fueron $60,2 \pm 17,6$ y $181,1 \pm 63,8$ $\mu\text{g}/\text{kg}$; en las muestras del 2014 fueron de $36,8 \pm 12,3$ y $140,8 \pm 47,5$ $\mu\text{g}/\text{kg}$, y en las de 2015, de $69,3 \pm 19,9$ y $225,5 \pm 76,5$ $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente. El valor máximo de la toxina T-2 fue de 453, 237 y 1091 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en los años 2013, 2014 y 2015, respectivamente, y el valor máximo de la toxina HT-2 fue de 1715, 962 y 3789 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente. En Suiza no está permitida la aplicación de fungicidas contra especies de *Fusarium* en avena (Hochstrasser, 2016).

La climatología de la región parece que está íntimamente asociada a la presencia de estas toxinas en avena. Xu et al. (2014) encontraron que la elevada incidencia de la suma de las toxinas T-2 y HT-2 en avena se puede asociar positivamente con el clima cálido y húmedo de principios de mayo (previo a la floración de la avena) y con el clima seco de finales de mayo en adelante. También Bernhoft et al. (2012) indican que una elevada humedad previa a la cosecha de avena en Noruega aumentó las concentraciones de las toxinas en el cereal. Estos resultados son confirmados por Hjelkrem et al. (2018), que también afirman que una elevada humedad en situación de pre-cosecha junto a condiciones de sequedad en las etapas de crecimiento, incrementa el riesgo de la presencia de estas toxinas en avena.

Respecto a la rotación de cultivos, la agricultura orgánica tiende a minimizar esta práctica rotativa y en ella no se emplean fertilizantes minerales ni pesticidas, como fungicidas, herbicidas o insecticidas. No se ha encontrado ningún efecto significativo asociado al empleo de fertilizantes nitrogenados o reguladores del crecimiento de la planta (Edwards y Anderson, 2011) en los niveles de T-2 o HT-2 en el cereal. Se ha encontrado que la mayor cantidad de T-2 y HT-2 se produce en avena procedente de campos de cultivo con labranza reducida en contraposición con campos arados (Schönerberg et al., 2018), y en campos en los que el cultivo previo ha sido cereal el nivel de las toxinas T-2 y HT-2 también fue superior que cuando el cultivo previo es pasto. Todos estos resultados permiten concluir que la incidencia de

las toxinas T-2 y HT-2 en cereales depende de diferentes factores, principalmente del cereal, de las prácticas agrícolas y de la climatología de la región.

Por tanto, en general, en las muestras de maíz y avena consumidas en España analizadas en la presente tesis, la incidencia de AF y de las toxinas T-2 y HT-2 es muy baja en comparación con la encontrada en otros países de nuestro entorno o más alejados. En los casos en los que se han detectado estas micotoxinas, por lo general, se ha encontrado una mediana correlación entre las especies fúngicas aisladas y las toxinas determinadas por UPLC-ESI-MS/MS, de modo que se ha podido asociar la presencia de AF con la incidencia de especies del género *Aspergillus* de la sección *Flavi*, lo que coincide con los resultados obtenidos por El-Shanawany et al. (2005) y Richard et al. (2007) y la presencia de las toxinas T-2 y HT-2 con la incidencia de especies del género *Fusarium* de la sección *Sporotrichiella* que coincide con los resultados obtenidos por Edwards et al. (2012) y Fredlund et al. (2013). En nuestro estudio la suma de AF (AFB1+AFB2+ AFG1+AFG2) y el recuento de UFC/g de *Aspergillus* spp. de la sección *Flavi* muestran un coeficiente de correlación de Spearman de 0,65, y para la suma de las toxinas T-2 + HT-2 y el recuento de UFC/g de *Fusarium* de la sección *Sporotrichiella* dicho coeficiente es de 0,73.

3. Ensayos con agentes antifúngicos

3.1. Eficacia de los azoles en el control del crecimiento de *A. flavus* y en el control de la producción de aflatoxinas

La tasa de crecimiento de *A. flavus* en medio YES, en los cultivos control y en los tratamientos con procloraz, tebuconazol o con la

mezcla de procloraz + tebuconazol en las diferentes condiciones estudiadas se muestra en las Figuras 35 y 36, respectivamente. Los datos representados en estas figuras son la media de los datos obtenidos en los ensayos, realizados por triplicado.

El ANOVA mostró que la a_w no influye significativamente en la tasa de crecimiento ($p > 0,05$) de *A. flavus*, pero la temperatura y el tipo de tratamiento sí afectan ($p < 0,0001$) a la velocidad de crecimiento del hongo. También se encontró que existen interacciones estadísticamente significativas entre la temperatura y el tipo de tratamiento, y entre la temperatura y la a_w ($p < 0,05$) que afectan a la tasa de crecimiento del hongo. Esta tasa de crecimiento fue siempre superior a 37 °C que a 25 °C con independencia del tratamiento, el medio de cultivo y el nivel de a_w ensayado. Para la cepa ensayada el crecimiento óptimo se registró en los controles incubados a 37 °C.

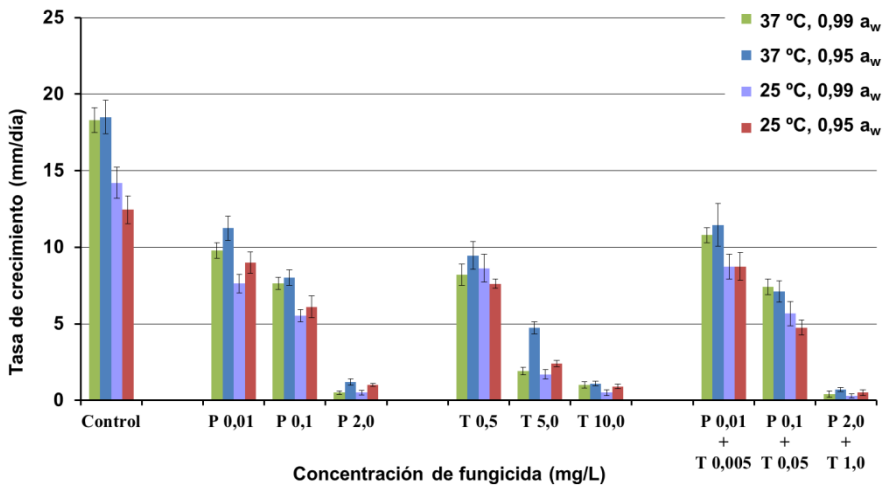
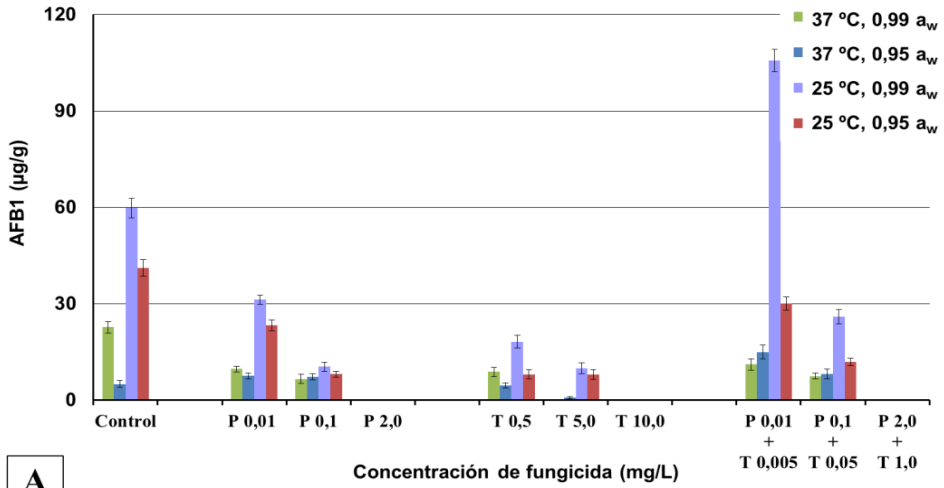
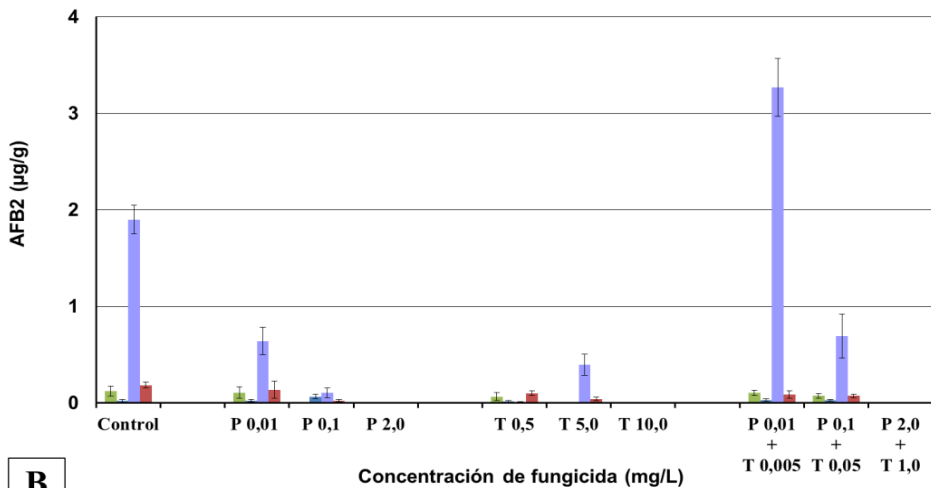


Figura 35. Comparación de la tasa de crecimiento (mm/día) de la cepa M34 de *A. flavus* sobre medio de cultivo YES bajo diferentes condiciones de temperatura, a_w y dosis de antifúngicos. P: procloraz; T: tebuconazol. Las barras verticales representan las desviaciones estándar.



A



B

Figura 36. Comparación de los niveles de AFB1 (A) y AFB2 (B) producidos por la cepa M34 de *A. flavus* sobre medio YES bajo diferentes condiciones de temperatura, a_w y dosis de antifúngicos. P: procloraz; T: tebuconazol. Las barras verticales representan las desviaciones estándar.

En los tratamientos, como cabía esperar, la tasa de crecimiento se redujo a medida que aumentó la dosis de fungicida, con

independencia del nivel de a_w y la temperatura. El test de Duncan encontró cuatro grupos sin solapamientos en función del tipo de tratamiento. La mayor reducción del crecimiento de *A. flavus* (que implicó una velocidad media de crecimiento de 1 mm/día o inferior) se dio en los cultivos suplementados con las dosis más elevadas de los fungicidas que fueron 2,0, 10,0 y 3,0 (2,0+1,0) mg/L de procloraz, tebuconazol, y la mezcla de procloraz + tebuconazol en proporción 2:1, respectivamente, seguida de los cultivos tratados con 5 mg/L de tebuconazol (Figura 35).

Las dosis efectivas de los fungicidas para la reducción del crecimiento de *A. flavus* en un 50% (DE_{50}) (mg/L) se hallaron entre 0,02 y 0,10 en los tratamientos con procloraz, entre 0,05 y 0,10 en los tratamientos con tebuconazol, y entre 0,3 y 1,7 en los tratamientos con la mezcla de procloraz + tebuconazol (2:1). Las dosis efectivas de los fungicidas para la reducción del crecimiento de *A. flavus* en un 90% (DE_{90}) (mg/L) estuvieron entre 0,5 y 1,8 en los tratamientos con procloraz, entre 0,6 y 2,0 en los tratamientos con tebuconazol, y entre 5,0 y 9,2 en los tratamientos con la mezcla de procloraz + tebuconazol (2:1) (Tabla 14).

En general, los tratamientos fueron más efectivos ($p < 0,05$) a 37 que a 25 °C, y a a_w 0,99 que a a_w 0,95, en estos cultivos las DE_{50} y/o DE_{90} fueron menores. En los tratamientos con procloraz y con la mezcla de ambos azoles las DE fueron menores que cuando se usó tebuconazol, lo que confirma que procloraz ejerce mayor acción antifúngica contra *A. flavus* que tebuconazol.

En los cultivos tratados con las dosis más altas de los fungicidas, que fueron 2,0, 10,0, y 3,0 (2,0+1,0) mg/L de procloraz, tebuconazol, y la mezcla 2:1 de ambos fungicidas, respectivamente, no se detectaron AF (Figura 36). El ANOVA indicó que la temperatura de incubación y el tipo de tratamiento influyen significativamente en la producción de AFB1 ($p < 0,01$ y $p < 0,05$, respectivamente). Sin embargo, la a_w no afectó significativamente al nivel alcanzado por la toxina en el medio. La concentración de AFB1 fue siempre superior en los cultivos

incubados a 25 °C que en los incubados a 37 °C, y su nivel se redujo progresivamente a medida que aumentó la dosis del agente antifúngico, con independencia del tipo de fungicida ensayado. En los cultivos incubados a 37 °C, en general, se detectaron niveles bajos de ambas toxinas. Los valores más bajos se registraron en los tratamientos con 5,0 mg/L de tebuconazol o 0,1 mg/L de procloraz incubados a esta temperatura. La aplicación del test de Duncan indicó que los tratamientos con 5 mg/L de tebuconazol y 0,1 mg/L de procloraz produjeron niveles bajos o indetectables de AFB1 y se agruparon juntos; los tratamientos con 0,5 mg/L de tebuconazol, 0,01 mg/L de procloraz y 0,1+0,05 mg/L de procloraz + tebuconazol formaron otro grupo homogéneo y los tratamientos con la mezcla 0,01+0,005 mg/L de procloraz + tebuconazol junto a los controles se agruparon en un tercer grupo (Figura 36). La producción de AFB2, en general, siguió un patrón similar al mostrado por la AFB1, aunque las concentraciones fueron mucho más bajas.

Tabla 14. DE₅₀ y DE₉₀ (mg/L) de los antifúngicos procloraz, tebuconazol y de la mezcla de ambos frente a *A. flavus* en medio YES bajo diferentes condiciones de incubación.

Temp. (°C)	a _w	Fungicida					
		Procloraz		Tebuconazol		Procloraz + tebuconazol (2:1)	
		DE ₅₀	DE ₉₀	DE ₅₀	DE ₉₀	DE ₅₀	DE ₉₀
37	0,99	0,02	0,50	0,30	5,00	0,05	0,60
	0,95	0,05	1,50	0,70	6,30	0,07	1,70
25	0,99	0,02	0,70	1,30	5,70	0,06	0,80
	0,95	0,10	1,80	1,70	9,20	0,10	2,00

Bajo ciertas combinaciones particulares de a_w , temperatura y niveles bajos de procloraz + tebuconazol, se registraron niveles de AF que superaron a los niveles alcanzados en los controles carentes de fungicida. La mayor inducción de la producción de AFB1 y AFB2 se detectó en los cultivos tratados con la mezcla de procloraz + tebuconazol (0,01 + 0,005 mg/L) con a_w 0,99 e incubados a 25 °C (Figura 36). El nivel de AFB1 encontrado en estos cultivos (105,7 µg/g) fue 1,7 veces superior al encontrado en los cultivos control (60 µg/g) y el nivel de AFB2 (3,3 µg/g) fue 1,4 veces superior al encontrado en los controles (1,9 µg/g) bajo las mismas condiciones.

En granos de maíz, la tasa de crecimiento de *A. flavus* y la acumulación de AFB1 y AFB2 en los cultivos control y en los cultivos tratados se muestran en las Figuras 37 y 38, respectivamente. En los cultivos control la máxima tasa de crecimiento fue de 11,4 mm/día, y se registró en los que tenían una a_w de 0,99 y se incubaron a 37 °C. A 25 °C y con a_w 0,99 la tasa de crecimiento del hongo se redujo hasta aproximadamente 10,8 mm/día. En los cultivos con a_w 0,95 incubados a 37 °C no se detectó crecimiento fúngico en el periodo de 12 días que duró el experimento. La tasa de crecimiento fúngico fue más baja en los cultivos tratados que en los controles bajo las mismas condiciones. En los tratamientos con procloraz solo a las dosis más bajas (0,01 mg/kg) se apreció crecimiento del hongo.

En los cultivos tratados con tebuconazol el hongo creció muy lentamente, incluso con la dosis de 5 mg/kg. El crecimiento de *A. flavus* fue totalmente inhibido en los cultivos con a_w 0,95 incubados a 37 °C tanto en los controles como en los cultivos tratados. En general, la velocidad de crecimiento de *A. flavus* fue más lenta en granos de maíz (Figura 37) que en medio YES (Figura 35) bajo las mismas condiciones. La tasa de crecimiento en los granos de maíz se vio significativamente afectada por la temperatura, el nivel de a_w y el tipo de tratamiento ($p < 0,05$). Según el tipo de tratamiento, el test de Duncan permitió establecer dos grupos homogéneos con solapamiento.

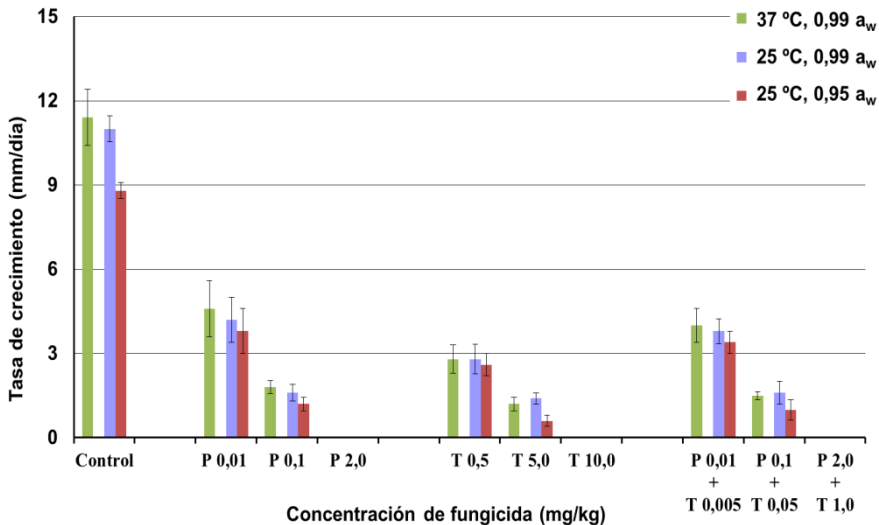
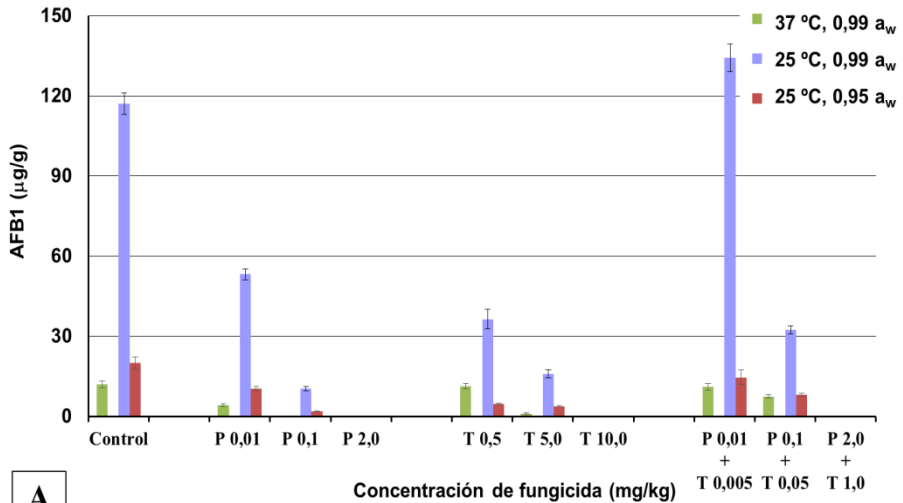


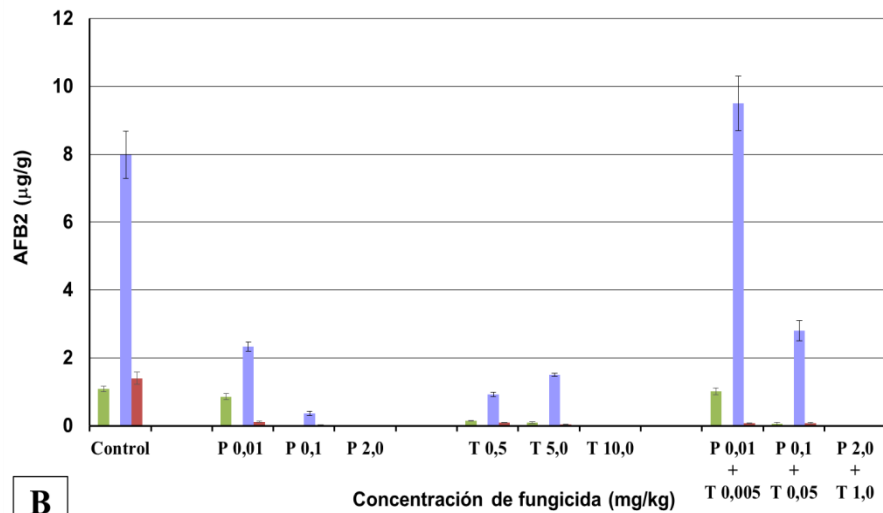
Figura 37. Comparación de la tasa de crecimiento (mm/día) de la cepa M34 de *A. flavus* sobre granos de maíz bajo diferentes condiciones de temperatura, a_w y dosis de tratamientos antifúngicos. P: procloraz; T: tebuconazol. Las barras verticales representan las desviaciones estándar.

Las DE_{50} y DE_{90} de los fungicidas ensayados frente a *A. flavus* cuando se cultivó directamente en granos de maíz se indican en la Tabla 15. Estos valores fueron usualmente más bajos que los que se registraron en los cultivos en medio YES (Tabla 14). Debido a que el hongo no creció en los granos de maíz con a_w 0,95 incubados a 37 °C, las dosis efectivas no pudieron ser determinadas, como se indica en la Tabla 15.

Los rangos de DE_{50} y DE_{90} en los tratamientos con procloraz fueron 0,008-0,009 y 0,51-0,60 mg/kg, respectivamente; en los tratamientos con tebuconazol fueron 0,32-0,33 y 2,60-5,40 mg/kg, respectivamente, y en los tratamientos con procloraz+tebuconazol (2:1) fueron 0,007-0,009 y 0,20-0,70 mg/kg, respectivamente, dependiendo del resto de condiciones estudiadas.



A



B

Figura 38. Comparación de los niveles de AFB1 (A) y AFB2 (B) producidos por la cepa M34 de *A. flavus* sobre granos de maíz bajo diferentes condiciones de temperatura, a_w y dosis de tratamientos antifúngicos. P: procloraz; T: tebuconazol. Las barras verticales representan las desviaciones estándar.

Tabla 15. DE₅₀ y DE₉₀ (mg/kg) de los antifúngicos procloraz, tebuconazol y de la mezcla de ambos frente a *A. flavus* en granos de maíz bajo diferentes condiciones de incubación.

Temp. (°C)	a _w	Fungicida					
		Procloraz		Tebuconazol		Procloraz + tebuconazol (2:1)	
		DE ₅₀	DE ₉₀	DE ₅₀	DE ₉₀	DE ₅₀	DE ₉₀
37	0,99	0,008	0,60	0,32	5,40	0,007	0,50
	0,95	-	-	-	-	-	-
25	0,99	0,008	0,51	0,32	2,60	0,007	0,70
	0,95	0,009	0,55	0,33	4,30	0,009	0,20

Las concentraciones de AFB1 y AFB2 en los cultivos de *A. flavus* sobre granos de maíz pueden observarse en la Figura 38. En los cultivos en los que no se produjo crecimiento del hongo, bien por las condiciones físico-químicas (37 °C/a_w de 0,95) o por el tipo de tratamiento (2 mg/kg de procloraz, 10 mg/kg de tebuconazol y 2 mg/kg + 1 mg/kg de la mezcla de ambos fungicidas), no se detectaron AF. Sin embargo, es importante destacar que en granos de maíz con a_w 0,99 almacenados a 25 °C la producción de AF por *A. flavus* se favorece significativamente hasta el punto de que los niveles de AF en granos de maíz bajo estas condiciones fueron mayores que los niveles alcanzados en medio YES, medio muy favorable para la producción de micotoxinas. La combinación de procloraz + tebuconazol (0,01 + 0,005 mg/kg) parece aumentar la producción de ambas toxinas, ya que los niveles alcanzados en estos tratamientos sobrepasaron a los detectados en los controles en las mismas condiciones. En granos de maíz el ANOVA reveló que la temperatura y la a_w afectan significativamente a la producción de AF.

Los azoles son compuestos antifúngicos extensamente usados en agricultura para controlar patógenos fúngicos en cereales y otros cultivos. La efectividad de algunos azoles en la reducción del crecimiento de otras especies fúngicas distintas a *A. flavus*, especialmente especies de *Fusarium*, ha sido ensayada *in vitro* y en estudios de campo (Edwards y Godley, 2010; García-Cela et al., 2012; Haidukowski et al., 2005; Iqbal et al., 2005; Mateo et al., 2011b, 2013; Müllenborn et al., 2008; Ramírez et al., 2004). En estos estudios se observó reducción en el crecimiento fúngico y variaciones en la eficacia de los fungicidas en diferentes formas, dependiendo de las especies fúngicas y de las condiciones ambientales. Todas las especies mostraron una respuesta particular. El presente estudio, además de mostrar la respuesta de *A. flavus* a la presencia de azoles en el medio de cultivo, revela que existen importantes diferencias entre los resultados obtenidos en los cultivos en medio YES y, directamente, en granos de maíz, lo que es interesante conocer en orden a establecer tratamientos adecuados.

En los cultivos de control llevados a cabo en medio YES, la tasa de crecimiento de *A. flavus* fue siempre superior a 37 °C que a 25 °C, y no se encontraron diferencias significativas relacionadas con la a_w (Figura 35). La tasa de crecimiento máxima sobre los granos de maíz fue también observada a 37 °C, en combinación con una a_w de 0,99 (Figura 37). Sin embargo, a diferencia del medio YES, en los cultivos en granos de maíz se observó una diferencia significativa en el crecimiento de *A. flavus* en función de la a_w .

En los últimos años, en algunos estudios se ha descrito el efecto de la temperatura sobre el crecimiento de *A. flavus*, y aunque las cepas de *A. flavus* utilizadas son diferentes, los resultados del presente estudio están de acuerdo con los de estos trabajos (Astoreca et al., 2012; Schmidt-Heydt et al., 2009). Las tasas de crecimiento de *A. flavus* en cultivos control desarrollados sobre granos de maíz (Figura 37) fueron más bajas que las observadas en medio YES, y no se registró crecimiento en la combinación de 37 °C/ a_w 0,95, en contraste con lo que ocurrió en medio YES.

Por tanto, se puede deducir que el medio YES es más favorable para la germinación de esporas de *A. flavus* que los granos de maíz. Este es un resultado notable que puede ser debido a un secado rápido del inóculo fúngico (que es de 5 μ L) a 37 °C, lo cual puede prevenir la germinación de esporas y evitar la colonización de granos de maíz normales. Este hallazgo sugiere que en cultivos de maíz la germinación de esporas de *A. flavus* y el crecimiento de hifas en condiciones de temperatura muy elevada (37 °C) y baja humedad relativa (95%) puede requerir otros factores como la lluvia, el daño ocasionado por insectos en los granos, el agua condensada en contacto con las mazorcas, los granos colonizados por el hongo que se encuentren en contacto con granos sanos en una misma mazorca, o varios de estos factores simultáneamente.

De los tratamientos ensayados, procloraz ha demostrado ser el agente activo que produce una mayor reducción del crecimiento de *A. flavus*, tanto en medio YES como en granos de maíz, mientras que en el caso de tebuconazol son necesarias dosis relativamente altas para conseguir resultados similares. La combinación de procloraz + tebuconazol produce en *A. flavus* una respuesta similar a la que ocurre con procloraz en solitario, aunque la mezcla fue algo menos eficiente. Otros autores (Ivić et al., 2012) han encontrado que procloraz es más efectivo que tebuconazol, carbendazima, metconazol o flutriafol en el control de hongos toxigénicos como *F. graminearum*, *F. verticillioides* y *F. avenaceum* cultivados en medio PDA.

Hasta donde conocemos, no hay estudios previos a este sobre los valores de DE₅₀ y DE₉₀ de los fungicidas ensayados frente a *A. flavus* o frente a otras especies de *Aspergillus* cultivadas en medio YES, granos de maíz u otros sustratos, lo que dificulta la discusión de los resultados. Sin embargo, en estudios previos llevados a cabo con diferentes cepas de *F. langsethiae* (Mateo et al., 2011a; 2013) productoras de las toxinas T-2 y HT-2, y con *F. verticillioides* y *F. proliferatum* (Marín et al., 2013), productoras de fumonisinas, se ha encontrado un comportamiento similar de los diferentes hongos en lo referente a las DE₅₀ y DE₉₀ para procloraz y tebuconazol. Por tanto, el

conjunto de resultados sugiere que estos fungicidas a dosis bajas pueden ser una herramienta eficaz en el control de las especies toxigénicas más importantes en cereales y otros cultivos.

Se ha encontrado que los azoles son menos efectivos en el control del crecimiento de especies toxigénicas del género *Fusarium* en granos de cereales que en medios de cultivo. Esto ha sido demostrado, por ejemplo, en estudios llevados a cabo con *F. langsethiae* en medio de agar extracto de avena (Mateo et al., 2011a) y directamente en granos de avena (Mateo et al., 2013) o en estudios llevados a cabo con *F. graminearum* en granos de trigo y en medio agar extracto de trigo (Ramírez et al., 2004). No obstante, en el presente estudio, los valores DE₅₀ y DE₉₀ de los azoles en granos de maíz fueron usualmente más bajos que los encontrados en medio YES (Tablas 14 y 15) en las mismas condiciones, lo cual significa que estos fungicidas pueden ofrecer un control eficaz del crecimiento de *A. flavus* en maíz. Por otra parte, hay que destacar que la DE₅₀ de procloraz (solo o en combinación con tebuconazol) en granos de maíz aproximadamente coincide con el MRL (Maximum residue limit) (0,05 mg/kg) previsto para este compuesto activo en la base de datos de pesticidas de la Unión Europea. Las dosis DE₅₀ y DE₉₀ para el tebuconazol fueron comparables o menores en granos de maíz que en medio YES, pero sobrepasaron el MRL (0,02 mg/kg). Otros agentes antifúngicos, como mancozeb o fungicidas no selectivos autorizados en agricultura ecológica como azufre u oxiclóruo de cobre son menos efectivos que los azoles frente a especies de *Aspergillus* como *A. carbonarius* y *A. ochraceus* (Mateo et al., 2011c).

La prevención del crecimiento de hongos productores de micotoxinas es la estrategia más efectiva para controlar la presencia de hongos y micotoxinas en cereales, y la Comisión del Codex Alimentarius (2003) incluye la aplicación de fungicidas entre las buenas prácticas agrícolas para reducir la contaminación en cereales (CAP/RCP 51). Algunos estudios han mostrado que ciertos agentes antifúngicos son más efectivos *in vitro* que en condiciones de campo (Edwards y Godley, 2010; García-Cela et al., 2012; Haidukowski et al.,

2005; loos et al., 2005; Müllenborn et al., 2008). Por lo tanto, puede llegar a ser necesario el empleo de dosis superiores a las mostradas en la Tabla 15 para el control de *A. flavus* en granos de maíz en campo o a las usualmente recomendadas por los fabricantes, especialmente bajo condiciones climáticas anormales de agua o estrés térmico (Subhani et al., 2011). En campo, determinadas variables como la respuesta de los cultivos al tratamiento, la persistencia de los fungicidas en los órganos de las plantas, la sensibilidad de las esporas fúngicas a los compuestos antifúngicos, los efectos curativos, o la dinámica y el grado de translocación de diferentes compuestos fungicidas sistémicos, entre otras variables, pueden condicionar la eficacia de los fungicidas (Ivić et al., 2012). Por ello, varios estudios complementarios apuntan a que deberían optimizarse las dosis de azoles para su aplicación en la práctica.

En el presente estudio, los niveles de AF encontrados en los cultivos control en medio YES y en granos de maíz fueron significativamente mayores a 25 °C que a 37 °C, al contrario de lo observado para la tasa de crecimiento. Parece que el estrés térmico induce la producción de AF por *A. flavus*. Un modelo predictivo propuesto por Chauhan et al. (2015) ha sugerido 32,5 °C como temperatura óptima para el crecimiento de *A. flavus* y la producción de AF, aunque la humedad (de gran relevancia) no fue considerada para elaborar dicho modelo. Con respecto al efecto de la temperatura en la producción de AF, varios estudios previos con otras cepas de *A. flavus* (Abdel-Hadi et al., 2012; Astoreca et al., 2014; Giorni et al., 2007, 2011; Klich, 2007; Mousa et al., 2011; Schmidt-Heydt et al., 2009) coinciden con los resultados obtenidos en nuestro estudio, con algunas variaciones. Sin embargo, con respecto a la a_w , los resultados entre autores son contradictorios. En la investigación desarrollada en esta tesis no se han encontrado diferencias significativas entre la producción de AF en medio YES con a_w 0,99 o 0,95, lo que coincide con los resultados descritos por Schmidt-Heydt et al. (2009). Sin embargo, en los cultivos en granos de maíz se observaron diferencias significativas en la producción de AF dependiendo del nivel de a_w .

En otros estudios solo se han observado diferencias significativas en la producción de AF por *A. flavus* cuando se han ensayado rangos más amplios de temperatura y a_w (Astoreca et al., 2014). Ello coincide con los resultados obtenidos en el presente estudio en granos de maíz. Por lo tanto, estos antecedentes y los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que la presencia de *A. flavus* y de AF en cereales pueden implicar riesgos para humanos y animales en países particulares con clima tropical y subtropical, pero podrían suponer también un riesgo emergente en Europa asociado a temperaturas medias-altas y humedad relativa variable inherente a cada región agroclimática o al efecto del cambio climático (Battilani et al., 2008, 2012; Giorni et al., 2007).

En los cultivos tratados con la dosis más baja de la mezcla de procloraz y tebuconazol (0,01 + 0,005 mg/L), a_w 0,99 e incubados a 25 °C se observó la inducción de la producción de AFB1 y AFB2. La estimulación de la producción de AFB1 por *A. flavus* bajo condiciones de ligero estrés hídrico o térmico y en ausencia de fungicidas ha sido descrita por Schmidt-Heydt et al. (2009), y la inducción de la producción de otras toxinas en cultivos de diferentes especies productoras de micotoxinas en respuesta a la presencia de dosis sub-inhedoras de fungicidas también ha sido observada en otros estudios (Marín et al., 2013; Mateo et al., 2011b, 2011c, 2013; Medina et al., 2007a, 2007b; Ramírez et al., 2004), pero la respuesta de *A. flavus* a dosis sub-inhedoras de azoles y a un ligero estrés hídrico o térmico ha sido estudiada por primera vez en nuestro trabajo.

Diferentes autores han descrito que la ruta de biosíntesis de AF puede ser inhibida o estimulada (Abbas et al., 2009; Georgiana y Payne, 2009; Schmidt-Heydt et al., 2009; Yu et al., 2004) en función de factores externos como temperatura, a_w o tratamientos con fungicidas. Parece que bajo condiciones de ligero estrés se incrementan la actividad de enzimas fúngicas implicadas en la biosíntesis de micotoxinas (Edwards y Godley, 2010). En nuestro estudio, se ha observado que determinadas combinaciones de estos parámetros conducen a un aumento en la producción de AF por lo que es muy

necesario conocer los tratamientos y condiciones que inhiben o estimulan la biosíntesis de AF en los cultivos.

En resumen, *A. flavus* presenta una elevada velocidad de crecimiento a temperaturas altas y una producción óptima de AF a temperaturas moderadas en un amplio rango de niveles de a_w . Los tratamientos con procloraz, tebuconazol y las combinaciones de ambos antifúngicos son muy efectivos en el control del crecimiento y la producción de AFB1 y AFB2 por *A. flavus* en medio YES y en granos de maíz *in vitro*. La cepa ensayada no pudo crecer en granos de maíz bajo la combinación de la temperatura de 37 °C y el nivel de a_w de 0,95. Ciertas combinaciones de temperatura, a_w , y bajas dosis de antifúngicos estimulan la producción de AF. Por lo tanto, las interacciones entre condiciones ambientales y tratamientos con azoles deberían ser cuidadosamente consideradas antes de su aplicación en la práctica para evitar un indeseable incremento de la incidencia de *A. flavus* y de los niveles de AF en los cultivos. Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que *A. flavus* puede ser una especie altamente competitiva en cereales en escenarios presentes y futuros asociados al cambio climático.

3.2. Efecto de diferentes aceites esenciales y de componentes de los mismos en el crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus* y en la producción de aflatoxinas

3.2.1. Efecto en el crecimiento

En esta investigación se usaron los AE de plantas CIN y ORE y sus componentes mayoritarios CINHO y CAR incluidos en el medio de cultivo y se estudió su efectividad en el control del crecimiento de *A.*

flavus y producción de AFB1 y AFB2 y en el control del crecimiento de *A. parasiticus* y producción de AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2 en diferentes condiciones ambientales. Las tasas de crecimiento en mm/día de ambas especies en MEM bajo las diferentes condiciones ensayadas se muestran en las Figuras 39 y 40. Los valores representados en estas figuras son la media de tres réplicas. El ANOVA multifactorial mostró que todos los factores individuales ensayados y algunas interacciones de dos o tres factores influyeron significativamente en la velocidad de crecimiento de ambas especies. La tasa de crecimiento de *A. flavus* fue superior a la de *A. parasiticus* ($p < 0,0001$) bajo las mismas condiciones, pero dependió de la interacción de las variables a_w , temperatura y dosis de CINHO o CAR.

En los cultivos tratados, la tasa de crecimiento se redujo significativamente a medida que aumentó la dosis de los AE o de sus principales componentes activos, con independencia del resto de factores. El test de Duncan colocó cada dosis en un grupo homogéneo sin solapamiento con ningún otro. En general, los componentes individuales de los AE, el CINHO seguido del CAR, fueron los inhibidores del crecimiento fúngico más efectivos, mientras que los menos efectivos fueron los AE CIN y ORE ($p < 0,0001$). La tasa de crecimiento, bajo todas las condiciones, fue significativamente mayor a 37 que a 25 °C (con independencia del nivel de a_w) y mayor a a_w 0,99 que a a_w 0,96 (con independencia de la temperatura) ($p < 0,0001$).

Como se indica en la Tabla 16, en los cultivos de *A. flavus* la DE_{50} (mg/L) para ORE, CAR, CIN, y CINHO estuvo comprendida en los rangos 152-505, 98-145, 295-560, y 49-52,6, respectivamente. La DE_{90} (mg/L) fue mayor que 10^3 para ORE y se situó en los rangos 770-860, 820->1000 y 89,7-90,5 para CAR, CIN y CINHO, respectivamente. En los cultivos de *A. parasiticus* (Tabla 17) la DE_{50} (mg/L) para ORE, CAR, CIN y CINHO de situó en los rangos 260-425, 101-175, 490-675 y 46-55,5, respectivamente. La DE_{90} (mg/L) fue mayor que 10^3 para ORE, y estuvo en los rangos 855->1000, 900->1000 y 89,9-91 para CAR, CIN y CINHO, respectivamente.

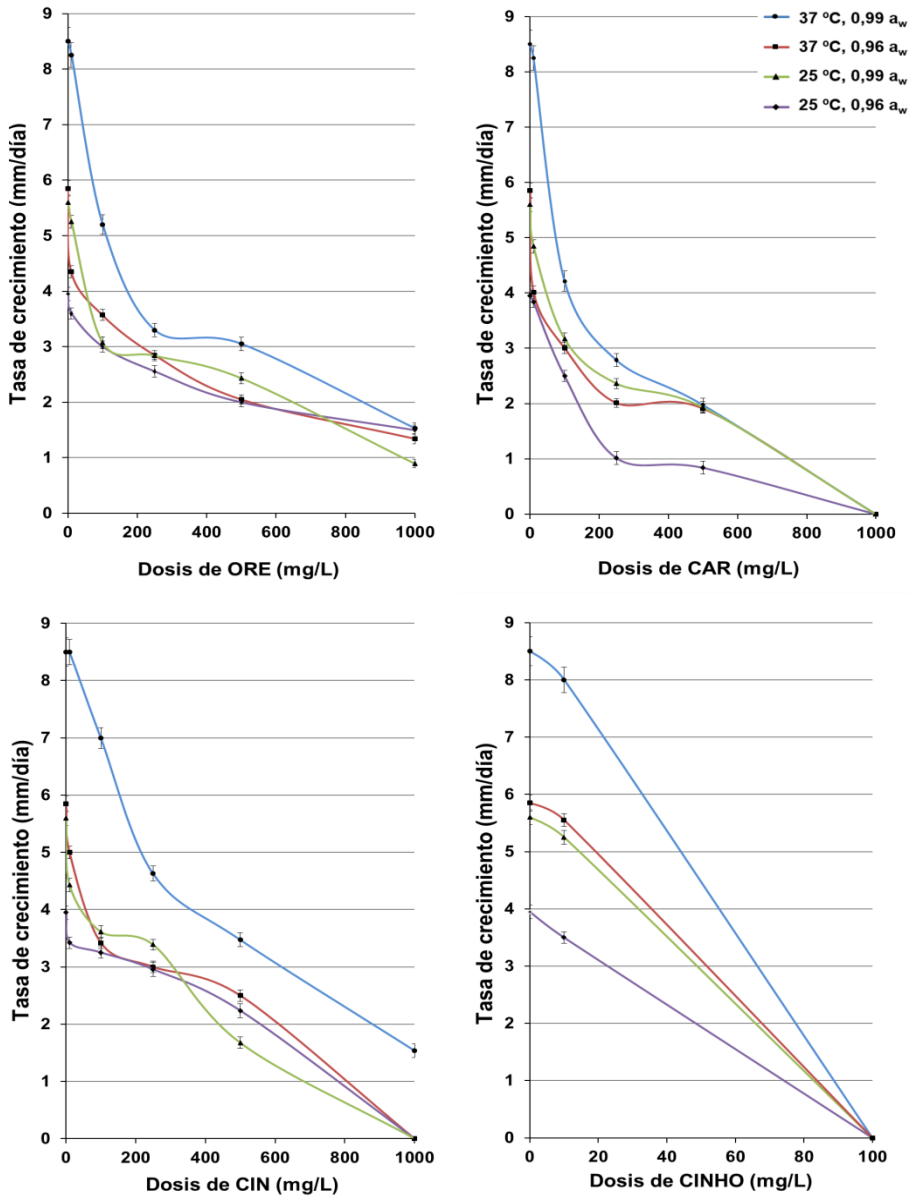


Figura 39. Tasa de crecimiento (mm/día) de *A. flavus* en MEM con diferentes a_w y diferentes dosis de ORE, CAR, CIN y CINHO, incubado a 37 y 25 °C. Las barras de error representan las desviaciones estándar.

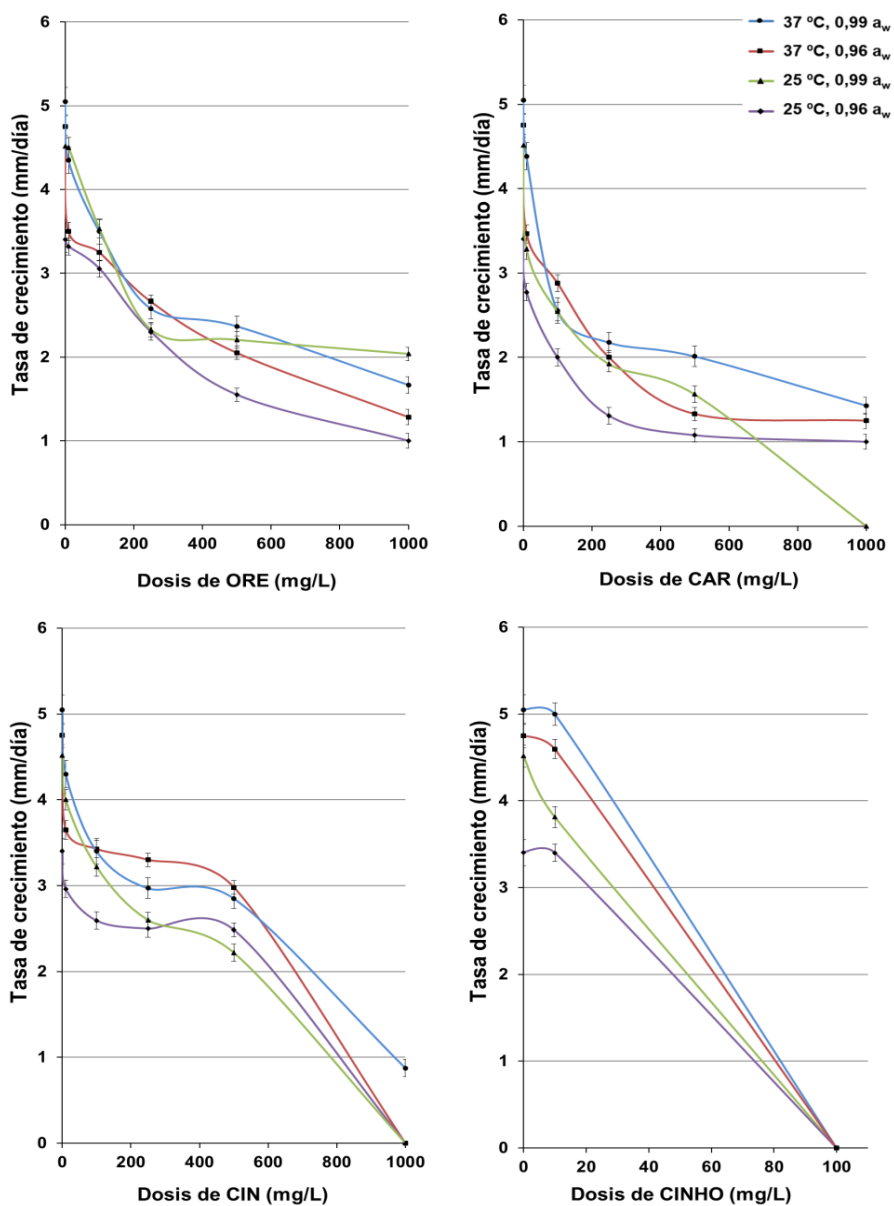


Figura 40. Tasa de crecimiento (mm/día) de *A. parasiticus* en MEM con diferentes a_w y diferentes dosis de ORE, CAR, CIN y CINHO, incubado a 37 y 25 °C. Las barras de error representan las desviaciones estándar.

Tabla 16. DE₅₀ y DE₉₀ (mg/L) de ORE, CAR, CIN y CINHO frente a *A. flavus* en MEM bajo diferentes condiciones de incubación.

		Aceites esenciales y componentes de aceites esenciales							
		ORE		CAR		CIN		CINHO	
Temp	a _w	DE ₅₀	DE ₉₀	DE ₅₀	DE ₉₀	DE ₅₀	DE ₉₀	DE ₅₀	DE ₉₀
25	0.96	505	>1000	142	770	560	913	49,0	89,7
	0.99	270	>1000	145	860	332	820	52,2	90,5
37	0.96	225	>1000	107	853	295	855	52,6	90,5
	0.99	152	>1000	98	787	300	>1000	52,5	90,5

Tabla 17. DE₅₀ y DE₉₀ (mg/L) de ORE, CAR, CIN y CINHO frente a *A. parasiticus* en MEM bajo diferentes condiciones de incubación

		Aceites esenciales y componentes de aceites esenciales							
		ORE		CAR		CIN		CINHO	
Temp	a _w	DE ₅₀	DE ₉₀	DE ₅₀	DE ₉₀	DE ₅₀	DE ₉₀	DE ₅₀	DE ₉₀
25	0.96	425	>1000	150	>1000	675	934	55,5	91,0
	0.99	275	>1000	155	855	490	900	46,0	89,9
37	0.96	345	>1000	175	>1000	615	923	53,8	90,8
	0.99	260	>1000	101	>1000	596	>1000	55,0	91,0

El ANOVA multifactorial indicó que los factores principales especie fúngica, aceite esencial o sus principales componentes, a_w y temperatura tuvieron un efecto significativo sobre la DE_{50} ($p < 0,01$). Todas las interacciones de segundo orden entre los factores mencionados excepto la interacción de especie fúngica $\times a_w$ fueron significativas ($p < 0,05$). Las interacciones aceite esencial \times temperatura $\times a_w$ y aceite esencial \times temperatura \times especie también fueron significativas. En general, la eficacia de los AE o de sus componentes mayoritarios se situó en el siguiente orden: CINHO $>$ CAR $>$ ORE $>$ CIN, con independencia de la especie fúngica ensayada. Usualmente, las mayores DE_{50} se registraron en los tratamientos de *A. parasiticus* con a_w 0,96, incubados a 25 °C. El tipo de aceite esencial o sus componentes individuales y la especie fúngica afectaron significativamente a las DE_{90} y estas fueron usualmente mayores en los tratamientos contra *A. parasiticus* que en los tratamientos contra *A. flavus*. Las DE_{90} más bajas se obtuvieron con CINHO (Tablas 16 y 17). Los AE ensayados y sus componentes activos mayoritarios fueron más efectivos a 37 °C en los cultivos con a_w 0,99, y frente a *A. flavus* que frente a *A. parasiticus*. En este trabajo no se ensayaron dosis mayores de 1000 mg/L por considerarlas poco apropiadas en la práctica debido al aroma y sabor de estos compuestos volátiles que podrían afectar a las propiedades organolépticas del alimento.

3.2.2. Efecto en la producción de aflatoxinas

En este trabajo se ha examinado la efectividad de diferentes tratamientos con CINHO, CIN, ORE y CAR en el control del crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus* y en la producción de AF por estas especies.

Los compuestos ensayados fueron incluidos en el medio de cultivo (MEM) y los ensayos se realizaron bajo diferentes condiciones ambientales. Los medios elaborados con harina de cereales con aproximadamente un 3% w/v de harina son medios consolidados como

una buena aproximación al propio cereal para el estudio de los patrones de crecimiento y producción de micotoxinas por hongos productores (Bernáldez et al., 2017; Bluma et al., 2008; Mateo et al., 2011a). Estos medios permiten realizar mediciones muy precisas del crecimiento radial de la colonia fúngica y, además, facilitan el registro de la producción de micotoxinas con metodologías más simples y resultados más reproducibles que cuando los cultivos se realizan en granos de cereal, especialmente, en el caso del maíz por tratarse de granos de gran tamaño si se comparan con los del resto de cereales. En el presente trabajo el medio que se ha empleado (MEM) contiene un 3% w/v de granos de maíz molido como única fuente de nutrientes.

En todos los cultivos control y en los cultivos tratados con films bioactivos se determinaron los niveles de AF producidas por *A. flavus* y *A. parasiticus* en todas las condiciones ensayadas. Los niveles de AFB1 y AFB2 en los cultivos de *A. flavus* se muestran en la Figura 41 y los niveles de AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2 de los cultivos de *A. parasiticus* aparecen en las Figuras 42 y 43. En los controles y tratamientos de ambas especies, las concentraciones de AFB1 y AFB2 fueron menores en los cultivos de *A. flavus* que en los de *A. parasiticus*, menores con a_w 0,96 que con a_w 0,99, y menores a 37 que a 25 °C. La producción de AF fue también menor, e incluso nula, a dosis elevadas que a dosis bajas de cualquier AE o componente de AE; asimismo, fueron usualmente menores en los tratamientos con CINHO que en los tratamientos con CIN, ORE o CAR.

En los cultivos de *A. parasiticus*, el ANOVA multifactorial indicó que todos los factores influyen significativamente en la producción de AFG1 y AFG2 ($p < 0,02$). Los niveles de AFG1 y AFG2 fueron también menores en los cultivos con a_w 0,96, en los tratamientos con dosis elevadas de los AE o de los componentes activos, a 37 °C y en los tratamientos con CINHO.

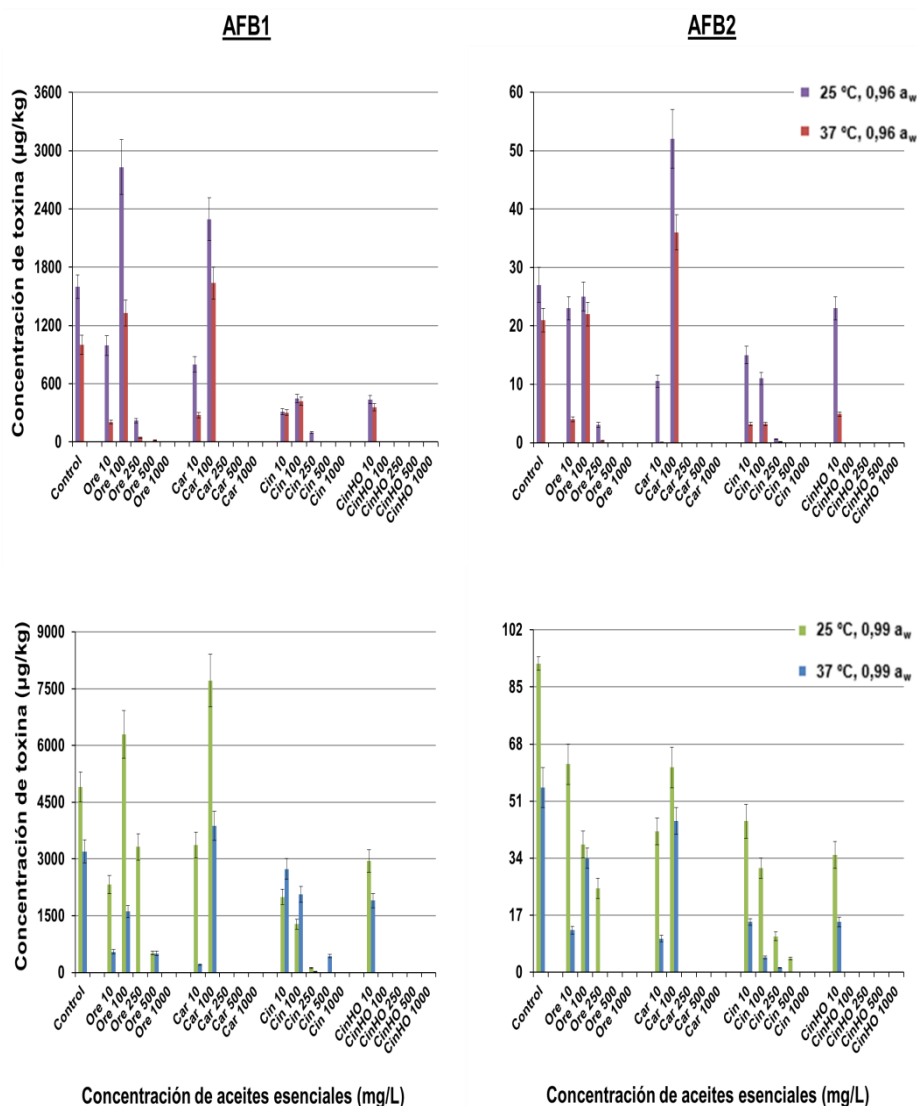


Figura 41. Producción de AFB1 y AFB2 por *A. flavus* en MEM en presencia de orégano (Ore), carvacrol (Car), canela (Cin) y cinamaldehído (CinHO) a diferentes dosis, valores de a_w y temperaturas. El periodo de incubación fue de 12 días. Las barras de error representan las desviaciones estándar.

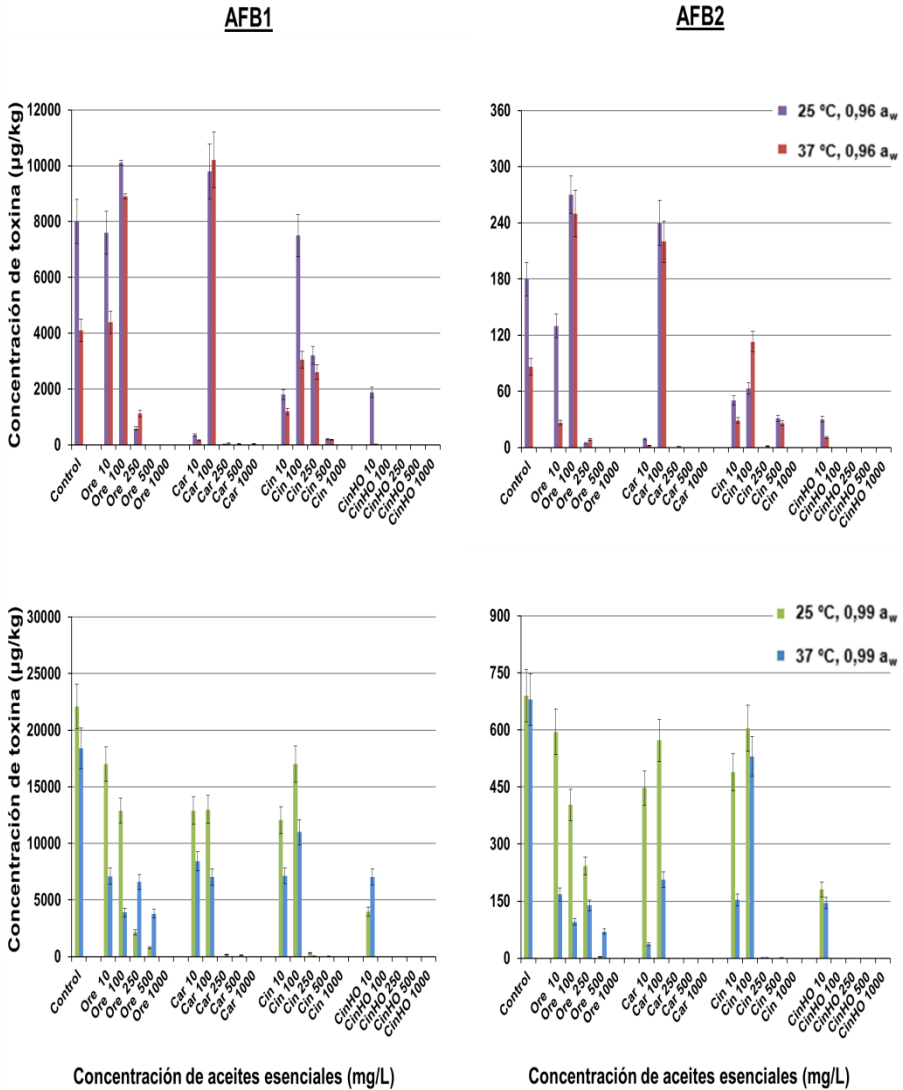


Figura 42. Producción de AFB1 y AFB2 por *A. parasiticus* en MEM en presencia de orégano (Ore), carvacrol (Car), canela (Cin) y cinamaldehído (CinHO) a diferentes dosis, valores de a_w y temperaturas. El periodo de incubación fue de 12 días. Las barras de error representan las desviaciones estándar.

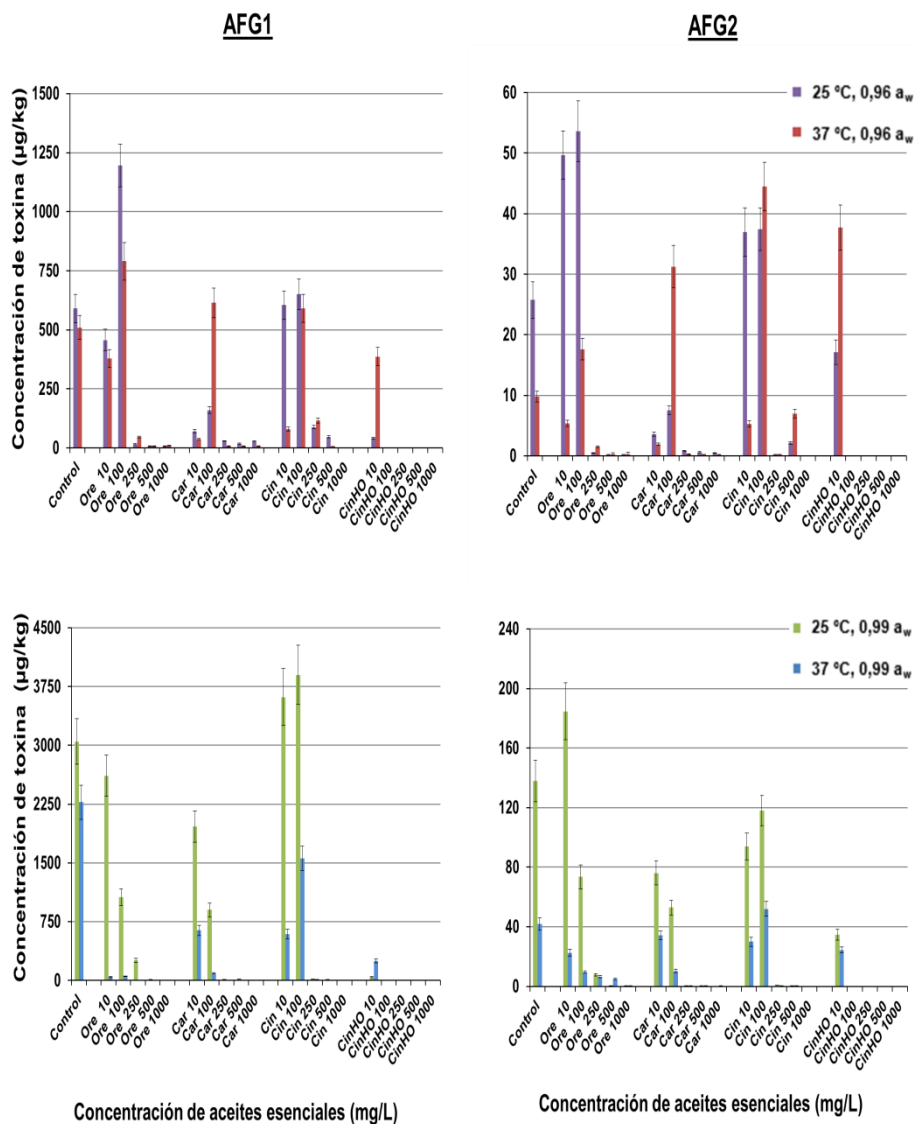


Figura 43. Producción de AFG1 y AFG2 por *A. parasiticus* en MEM en presencia de orégano (Ore), carvacrol (Car), canela (Cin) y cinamaldehído (CinHO) a diferentes dosis, valores de a_w y temperaturas. El periodo de incubación fue de 12 días. Las barras de error representan las desviaciones estándar.

El ANOVA reveló la existencia de interacciones significativas entre los factores (las seis posibles interacciones de segundo orden para la AFG1 y cuatro para la AFG2, y la interacción dosis \times nivel de a_w \times temperatura), lo que permite deducir que existen complejas relaciones que gobiernan la producción de AF. En los tratamientos con las dosis más bajas se observó frecuentemente estimulación de la producción de AF (Figuras 41, 42 y 43), pero las dosis de 250, 500 y 1000 mg/L fueron muy eficientes para controlar su biosíntesis. El test *post-hoc* de Duncan agrupó estas tres dosis en el mismo conjunto homogéneo. Este estudio, en el que los compuestos activos se incluyen como ingrediente en el medio de cultivo, ha mostrado que las interacciones entre dosis de CIN, ORE, CINHO o CAR, la a_w y la temperatura tienen una influencia significativa en el crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus*, así como en la producción de AF.

En los controles y, por tanto, en ausencia de los compuestos bioactivos, ambas especies crecieron más rápidamente en los medios con a_w 0,99 que con 0,96, y en los medios incubados a 37 °C que a 25 °C. Sin embargo, la temperatura óptima para la producción de AF fue 25 °C. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Schmidt-Heydt et al. (2009) en cultivos de *A. flavus* en medio YES, y concuerdan parcialmente con lo descrito por Schmidt-Heydt et al. (2010) en cultivos de *A. parasiticus* en este mismo medio. En esos dos trabajos se ensayaron diferentes a_w y temperaturas, y se concluyó que el crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus* es más rápido en los cultivos con a_w 0,99 que con a_w 0,96 y a 35-37 °C que a 25 °C. Bernaldez et al. (2017) estudiaron el crecimiento de *A. flavus* y la producción de AF en un medio elaborado con maíz, en un intervalo de temperaturas de 20-30 °C y de a_w de 0,90-0,99, y llegaron a las mismas conclusiones. El mayor crecimiento de *A. flavus* ocurrió a las temperaturas y a_w más elevadas, y la mayor producción de AFB1 se registró en el rango 25-30 °C y a_w 0,99.

En un trabajo complementario a este (apartado 3.1) (Mateo et al., 2017a), hemos estudiado el crecimiento de *A. flavus* en medio de cultivo YES y en granos de maíz con a_w 0,95 y 0,99 y a 25 y 37 °C,

concluyendo que en ambos sustratos las temperaturas óptimas para el crecimiento del hongo y para la producción de AF son 37 °C y 25 °C, respectivamente. Estos resultados también concuerdan con los descritos por Liu et al. (2017) en cacahuets desprovistos de cáscara.

Por lo tanto, con independencia de la cepa y del sustrato, el crecimiento óptimo de *A. flavus* y *A. parasiticus* parece que se produce a 35-37 °C y la producción de AF a temperaturas ligeramente más bajas. Este hecho implica que actualmente ambas son las especies fúngicas mejor adaptadas a temperaturas elevadas dentro de un amplio rango de a_w . Estos atributos permiten a ambas especies ser fuertes competidores en nuevos escenarios asociados al cambio climático, tanto en pre-cosecha como en post-cosecha, aumentando los riesgos de contaminación fúngica y producción de AF en los alimentos derivados (Battilani et al., 2013; Giorni et al., 2007; Medina et al., 2017; Paterson y Lima, 2010; Piva et al., 2006). Además de ello, un análisis comparativo de los datos obtenidos en el trabajo de Mateo et al. (2017b), junto con los datos obtenidos en el presente estudio, muestra que los granos de maíz constituyen un sustrato más favorable que el MEM para la biosíntesis de AF por *A. flavus* y *A. parasiticus*.

Los AE ORE y CIN, y sus compuestos individuales CAR y CINHO tienen diferentes efectos sobre el crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus*, y sobre la biosíntesis de AF. El compuesto más efectivo para inhibir ambos procesos fue CINHO, mientras que el aceite esencial CIN fue el menos efectivo (Tablas 16 y 17).

Con la dosis de 100 mg/L de CINHO se consiguió la completa inhibición del crecimiento de ambas especies. En el presente estudio se empleó CIN (*Cinnamomum zeylanicum*) procedente de la corteza, que presenta un 66,5% de CINHO y se requirieron dosis superiores a 1000 mg/L para la inhibición completa del crecimiento fúngico. Previamente, Manso et al. (2013) ensayaron CIN fortificado con CINHO hasta una concentración final del 90% frente a *A. flavus* mediante el método de macro-diluciones en medio líquido y determinaron una concentración mínima inhibitoria (CMI) y una

concentración mínima fungicida (CMF) en los rangos 50-100 mg/L y 50-200 mg/L, respectivamente, dependiendo del inóculo inicial.

Tian et al. (2012) estudiaron el AE de *Cinnamomum jersenianum* frente a *A. flavus* y frente a la producción de AFB₁. Mediante un análisis por GC-MS identificaron un total de 55 componentes en este aceite. El componente más abundante fue eucaliptol (17,26%). Estos autores observaron que el AE de canela produjo una reducción significativa del crecimiento del micelio a las dosis de 1, 2, 4 y 6 mL/L con porcentajes de reducción de 27,6%, 59,7%, 81,4% y 87,0%, respectivamente, siendo la CMF 8 mL/L. La producción de AFB₁ se inhibió completamente con la dosis de 6 mL/L. Estos resultados concuerdan con los del presente estudio, y confirman que CINHO puede ser uno de los principales componentes activos para el control del crecimiento de especies aflatoxigénicas y de la producción de AF. La ausencia de datos respecto a la producción de AFB₂, AFG₁ y AFG₂ en tratamientos frente a especies aflatoxigénicas con los compuestos usados en nuestro estudio dificulta la realización de análisis comparativos.

En trabajos previos se ha ensayado la efectividad de otros AE (diferentes de los empleados en este estudio) frente a especies del género *Aspergillus* de la sección *Flavi*. En alguno de estos trabajos también se evaluó el efecto de esos AE sobre la producción de AFB₁. Así, Bluma et al. (2008) probaron 22 AE frente a *A. flavus* y *A. parasiticus* en medio con extracto de harina de maíz y encontraron que los AE de clavo, poleo, tomillo, anís, orégano y boldo producían inhibición parcial en el crecimiento de los hongos, mientras que los AE de menta, eucalipto, piperina, hierba Luisa, camomila, mejorana, romero y lavanda no le afectaban. Los AE más efectivos fueron los de clavo, poleo y tomillo. A dosis de 500 mg/kg estos AE inhibieron el desarrollo de ambas especies en más de un 90%. Además, en presencia de los AE de clavo y poleo en cultivos con a_w de 0,982, la producción de AFB₁ fue casi completamente inhibida. En presencia de los AE de tomillo y eucalipto la inhibición de la producción de AFB₁ fue de un 85% y un 90%, respectivamente.

En los trabajos de Shukla et al. (2009, 2012, 2013) se describe la inhibición total del crecimiento de *A. flavus* con 1 mL/L de geraniol, 0,819 mL/L de *Callistemon lanceolatus* y 0,4 mL/L de *Acorus calamus*, mientras que la inhibición completa de la biosíntesis de AF se logró con la concentración de 0,8 mL/L de *Lippia alba*, 0,6 mL/L de geraniol, 0,8 mL/L de nerol, 0,546 mL/L de *Callistemon lanceolatus* y 0,250 mL/L de *Acorus calamus*. Tian et al. (2011a, 2011b) ensayaron la actividad antifúngica de AE extraídos de los frutos de *Circuta virosa* y de las semillas de *Anethum graveolens* frente a *A. flavus*. Los valores de CMI fueron 5 y 2 mL/L, respectivamente, y con el empleo de la dosis de 4 mL/L de *Circuta virosa* se consiguió la completa inhibición de la producción de AFB1.

Prakash et al. (2014) determinaron que el aceite esencial de *Boswellia carterii* inhibe significativamente el crecimiento de *A. flavus* y la producción de AF en las dosis de 1,75 mL/L y 1,25 mL/L, respectivamente. Finalmente, Hu et al. (2017) encontraron tasas de inhibición del crecimiento de *A. flavus* del 63,31%, 71,15%, 78,99%, 91,03% y 93,41% con el empleo de dosis de 1, 2, 3, 4 y 8 mL/L del aceite esencial de *Curcuma longa*.

Un análisis comparativo de los datos publicados en estos trabajos y de los resultados del presente estudio (Figuras 39-43 y Tablas 16 y 17) revela que el grado de efectividad del ORE (*Origanum vulgare*) y de su principal compuesto activo, el CAR, y de CIN (*Cinnamomum zeylanicum*) en el control de especies aflatoxigénicas y en el control de la producción de AF se sitúa en una posición intermedia respecto a otros AE ensayados. Sin embargo, es muy importante enfatizar que la efectividad del CINHO en la inhibición del crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus* y de la producción de AF fue muy superior a la descrita para cualquiera de los AE ensayados en estudios previos.

En general se aprecia un paralelismo entre el aumento en las dosis de los AE o de los compuestos activos individuales y el descenso en la tasa de crecimiento fúngico, y esto concuerda con resultados

previos obtenidos en los trabajos que se han citado anteriormente. Sin embargo, los AE no se asocian siempre con un efecto inhibitorio de la acumulación de AF en el sustrato. Dosis bajas de los AE, en combinación con determinadas condiciones ambientales, estimulan frecuentemente la producción de AF. Ello fue observado en el presente estudio, excepto con los tratamientos con CINHO.

De acuerdo con Bluma et al. (2008), da Cruz Cabral et al. (2013) o Prakash et al. (2015), concentraciones subletales de AE en combinación con determinadas condiciones ambientales pueden potenciar la biosíntesis de AF en el sustrato (Bernáldez et al., 2017). Esta estimulación también ha sido detectada por nuestro grupo en presencia de agentes antifúngicos sintéticos. Así, en el trabajo de Mateo et al. (2017a), se detectó una estimulación de la producción de AFB1 y AFB2 en cultivos tratados con dosis bajas de la formulación compuesta por la combinación de procloraz + tebuconazol (0,01 + 0,005 mg/L) (2:1) a 25 °C y a_w 0,99.

Se ha observado, también, que tratamientos con el fungicida Rovral, un imidazol, permiten un descenso en la tasa de crecimiento de *P. verrucosum*, pero implican una fuerte inducción de la biosíntesis de OTA (Schmidt-Heydt et al., 2013). También Mateo et al. (2011a) y Mateo et al. (2013) encontraron que la producción de las toxinas T-2 y HT-2 es estimulada con dosis bajas de azoles bajo algunas condiciones ambientales en tratamientos de *F. langsethiae* llevados a cabo en medio de extracto de avena y en granos de avena. Este fenómeno también ha sido descrito en tratamientos con agentes antifúngicos ecológicos (Mateo et al., 2011c).

Por tanto, la estimulación de la producción de micotoxinas bajo condiciones sub-letales de antifúngicos es un hecho común. Sin embargo, la estimulación de la biosíntesis de micotoxinas no depende solo del tratamiento, depende de múltiples factores individuales e interacciones entre ellos incluyendo el tipo de tratamiento (principio activo y dosis), el tipo de micotoxina, la especie fúngica, las

condiciones ambientales y sus interacciones, por lo que cada caso requiere un estudio particular.

Aunque el modo de acción de los AE de plantas todavía no está claramente comprendido, se pueden considerar tres grupos de compuestos.

En un primer grupo podrían incluirse los AE que presentan una elevada inhibición de la biosíntesis de micotoxinas y pocos efectos adversos en el crecimiento del hongo. Jayashree y Subramanyam (1999) encontraron que el eugenol en una concentración de hasta 0,75 mmol/L inhibe la producción de AF debido a que este compuesto inhibe la peroxidación de lípidos en la producción de las toxinas por *A. parasiticus*. Sin embargo, esto no produce una inhibición significativa del crecimiento o metabolismo primario del hongo. Este tipo de compuestos no previenen la contaminación fúngica, por lo que, a pesar de su interés en tecnología de alimentos, presentan limitaciones.

Un segundo grupo de AE son los que actúan reduciendo el crecimiento del hongo y la producción de micotoxinas, pero no llegan a la inhibición total a concentraciones aceptables por lo que, si se aplicaran en tecnología de alimentos, sería adecuado un tratamiento complementario. En esta línea se puede citar el trabajo de Hu et al. (2017), en el que se investigaron los mecanismos potenciales de acción del aceite esencial de *Curcuma longa* frente a *A. flavus* y a la biosíntesis de AF. Los autores del estudio determinaron que los efectos antifúngicos de este compuesto estaban relacionados con la inhibición de la biosíntesis de ergosterol y de las actividades ATPasa mitocondrial, malato deshidrogenasa y succinato deshidrogenasa. Además, estudiaron la expresión de los genes reguladores *afIR* y *afIS*, y de los genes estructurales *afID*, *afIM*, *afIO*, *afIP* y *afIQ*, implicados en etapas tempranas y tardías de la ruta biosintética de las AF, respectivamente. Los resultados indicaron que la reducción en la producción de AFB1 por el aceite esencial de cúrcuma podía ser debida a la disminución de la transcripción de los genes implicados en la biosíntesis de AF, por ejemplo, *afIM*, *afIO*, *afIP* y *afIQ*. No obstante, la

efectividad del aceite esencial de *Curcuma longa* no fue muy elevada, ya que la inhibición total del crecimiento fúngico y de la biosíntesis de AF no se consiguió pese a la aplicación de dosis de hasta 8 mL/L.

El tercer grupo de AE y el de mayor interés en tecnología de alimentos es el que incluye los que actúan como fuertes inhibidores del crecimiento fúngico, debido a que alteran y dañan la estructura celular. Esto causa una reducción drástica o una inhibición total del hongo, y, consecuentemente, de la producción de AF. Este mecanismo de acción ha sido propuesto para el CINHO ya que su principal diana es la biosíntesis de ergosterol en las células fúngicas (Hua et al., 2014).

Debido a su naturaleza lipófila, los AE pueden atravesar la membrana de las células fúngicas o acumularse allí. Esto resultaría en una interacción con las enzimas y proteínas allí presentes provocando alteraciones en la permeabilidad celular como consecuencia de la producción de un flujo de protones hacia el exterior celular, alteraciones de la organización de la membrana celular fúngica y la muerte de las células (Hua et al., 2014; Nogueira et al., 2010; Tian et al., 2012). Por consiguiente, el CINHO previene la contaminación fúngica y la acumulación de AF en el sustrato. Además, los compuestos CINHO y CAR junto con carvona, citral, p-cimeno, eugenol, limoneno, mentol, linalol, vanilina y timol son constituyentes de AE registrados por la Comisión Europea para su empleo como aromatizantes en productos alimenticios debido a la ausencia de efectos tóxicos en mamíferos y a su potencial antimicrobiano (Prakash et al., 2015; Tajkarimi et al., 2010). La mayor desventaja de los AE de plantas es su aroma. La alternativa más prometedora frente a esta desventaja podría ser el uso de algunos de los compuestos puros más activos en lugar de los extractos de AE completos, y combinar el tratamiento con el compuesto activo con otros mecanismos inhibitorios complementarios, como el uso de atmósferas gaseosas controladas y/o un bajo nivel de a_w , temperatura o pH.

En esta línea, en el trabajo de Amiri et al. (2008), se describe que el tratamiento de manzanas con disoluciones de eugenol produce

daños en la cutícula de las frutas tratadas. Sin embargo, los autores de dicho trabajo observaron que una mezcla líquida de eugenol en la concentración de 2000 mg/L y lecitina de soja en la concentración de 50000 mg/L aplicados a niveles de 7, 6, 4 y 2%, respectivamente, tras 6 meses de almacenamiento a 2 °C reducía muy significativamente la infección causada por *Penicillium expansum*, *Phlyctema vagabunda*, *Botritis cinerea* y *Monilinia fructigena* en dos cultivos de manzanas. Estos autores concluyeron que en estas condiciones el eugenol no afectó a la apariencia, integridad de la cutícula o sabor de las manzanas. Por tanto, para conocer la eficacia de cada aceite esencial o de sus principales compuestos activos frente a determinados hongos y frente a la producción de micotoxinas, son necesarios estudios particulares. Hay que destacar que los resultados de este estudio junto con los obtenidos en otro trabajo del grupo (apartado 3.3) (Mateo et al., 2017b) en experiencias realizadas con estas sustancias en fase gaseosa (incluidas en films de EVOH) aportan información muy valiosa respecto a las ventajas y desventajas del empleo de AE, o de sus principales componentes puros, por contacto y en fase de vapor, para el control de hongos productores de micotoxinas y para el control de la biosíntesis de las micotoxinas.

3.3. Efecto de films de EVOH con aceites esenciales en el crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus* y en la producción de aflatoxinas

3.3.1. Características de los films activos obtenidos

La investigación comenzó con la fabricación de los films bioactivos. Para ello, los AE ORE y CIN, y los principales componentes de estos, el CAR y el CINHO, respectivamente, fueron incorporados en films construidos con el copolímero EVOH al 29% (EVOH-29). Todos los films que se obtuvieron fueron transparentes y presentaron el

aroma típico de los compuestos que contenían. Debido a la alta volatilidad de este tipo de compuestos, el contenido de las sustancias activas puede reducirse significativamente durante la elaboración de los films, por lo que se hace necesaria la determinación del contenido final de los compuestos activos en el film. El análisis de los films reveló un contenido similar de CINHO, CIN y ORE (en torno al $3,5 \pm 0,75$ % (w/w) del peso seco del polímero); sin embargo, la concentración de CAR fue mayor ($5,5 \pm 1,0$ % w/w del peso seco del polímero). Estos resultados determinaron el tamaño de los fragmentos de films utilizados a fin de conseguir unificar las concentraciones ensayadas de ORE, CAR, CIN y CINHO en los diferentes ensayos. Estas concentraciones fueron: 0,25, 1,0, 1,5 y 4,0 mg/placa Petri o mg/25 g de maíz para cada uno de los AE o sus componentes individuales.

3.3.2. Efecto en el crecimiento

Las condiciones ensayadas fueron muy adecuadas para el crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus* y en ambas especies se observaron colonias circulares sobre los granos de maíz en las que fue posible hacer un seguimiento del crecimiento radial de la colonia. Dependiendo de las condiciones de cada cultivo, la fase lag (tiempo necesario hasta que la colonia alcanza un diámetro de 5 mm) fue de 2-3 días. La tasa de crecimiento de ambos hongos en las diferentes condiciones ensayadas se muestra en las Figuras 44 y 45.

En los cultivos control sin films y en los cultivos con films de EVOH carentes de compuestos activos, bajo las mismas condiciones, el desarrollo radial de las colonias fue similar. Por ello, la tasa de crecimiento representada en las Figuras 44 y 45 para los controles es la media de las seis réplicas. Tanto en los cultivos control como en los cultivos tratados, la tasa de crecimiento fue superior a 37 °C que a 25 °C (independientemente del nivel de a_w), y mayor con a_w 0,99 que con a_w 0,96 (con independencia de la temperatura).

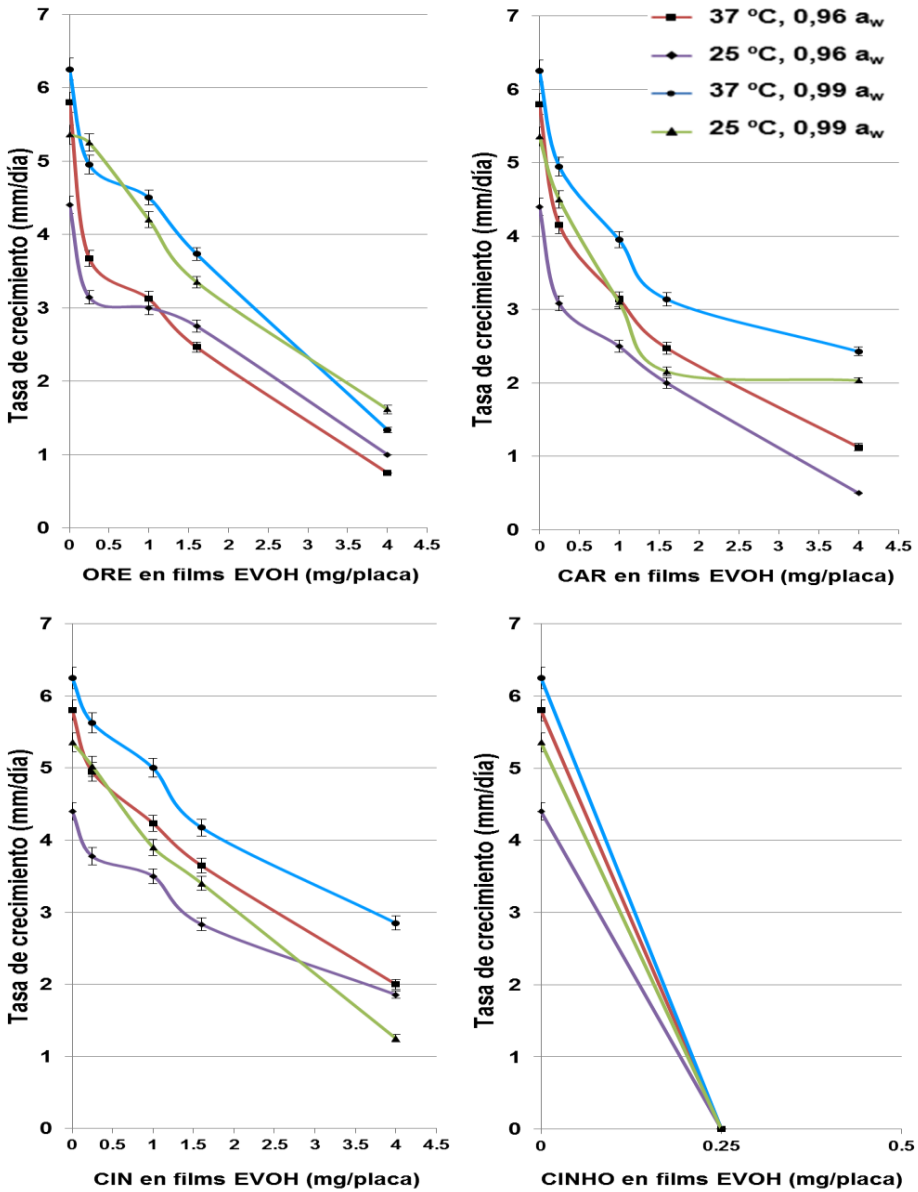


Figura 44. Tasa de crecimiento (mm/día) de *A. flavus* en granos de maíz en presencia de los films EVOH-ORE, EVOH-CAR, EVOH-CIN y EVOH-CINHO a diferentes temperaturas y valores de a_w . Las barras de error representan las desviaciones estándar.

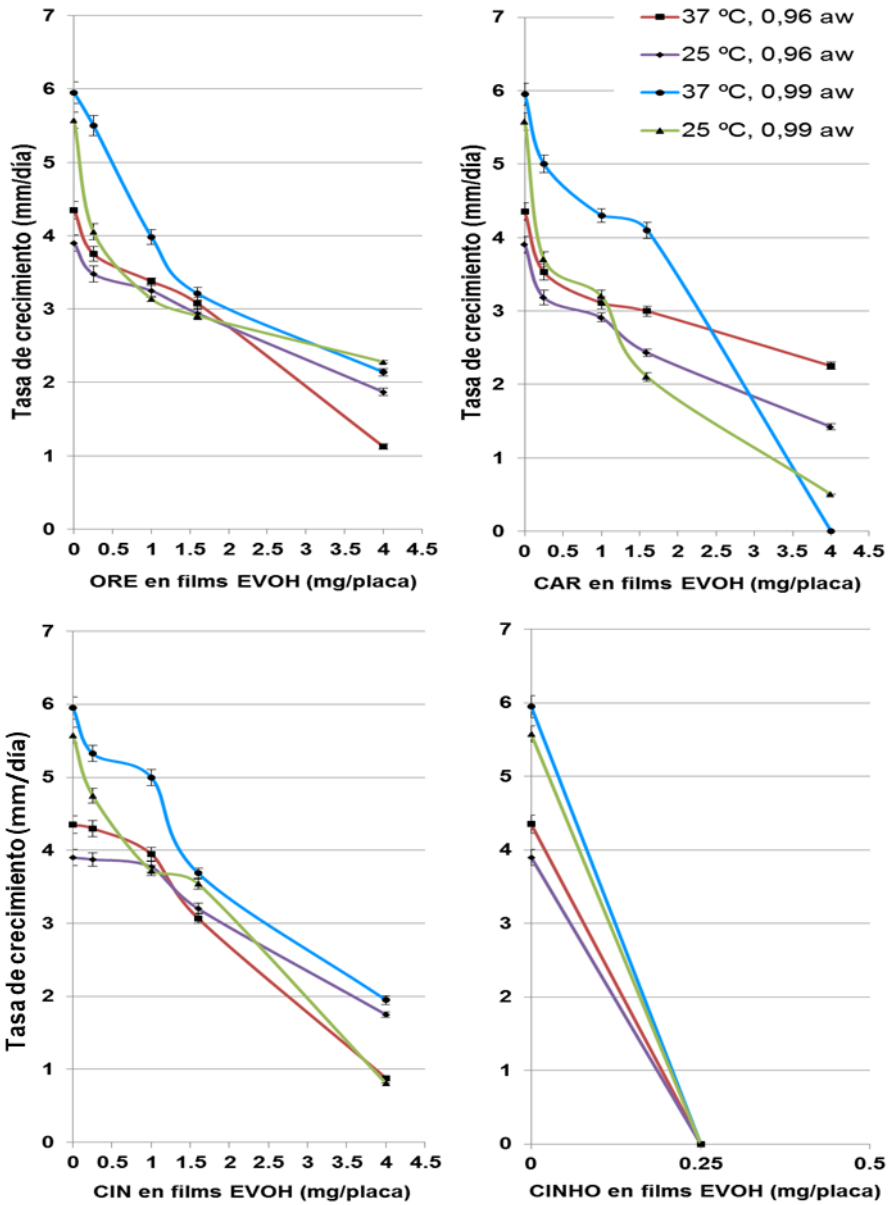


Figura 45. Tasa de crecimiento (mm/día) de *A. parasiticus* en granos de maíz en presencia de los films EVOH-ORE, EVOH-CAR, EVOH-CIN y EVOH-CINHO a diferentes temperaturas y valores de a_w . Las barras de error representan las desviaciones estándar.

En los cultivos tratados con films la tasa de crecimiento generalmente se redujo con el aumento de la dosis del compuesto activo independientemente de los factores a_w , temperatura y especie fúngica. Sin embargo, se observó una respuesta diferente en función del tipo de film. El ANOVA multifactorial determinó diferencias significativas entre los tipos de film ($p < 0,01$) y sus dosis. El orden de efectividad de los films en el control del crecimiento fúngico fue EVOH-CINHO > (EVOH-CAR o EVOH-ORE) > EVOH-CIN.

El test *post-hoc* de Duncan confirmó estos resultados. La dinámica de crecimiento, de ambas especies sometidas a los diferentes tratamientos, fueron usadas para determinar la DE_{50} y la DE_{90} de cada compuesto en las diferentes condiciones ensayadas (Tablas 18 y 19).

El ANOVA mostró que los factores principales tipo de film, dosis y temperatura tienen una influencia significativa sobre la tasa de crecimiento ($p < 0,01$ para los dos primeros grupos de Duncan y $p < 0,03$ para el tercero), mientras que los factores especie fúngica y a_w no la afectaron. Las interacciones entre a_w y temperatura, a_w y dosis, tipo de film y dosis, y tipo de film y especie fúngica también resultaron significativas ($p < 0,01$), al igual que la interacción entre tipo de film y temperatura ($p < 0,03$).

Como se muestra en la Tabla 18, en los cultivos de *A. flavus* en maíz tratados con films que contienen ORE, CAR y CIN, los valores de DE_{50} (mg/placa Petri) fluctuaron en los rangos 1,12-2,57, 1,15-1,63 y 2,48-3,50, respectivamente; en los tratados con CINHO, este valor fue de 0,13 en todos los casos.

Con respecto a los cultivos de *A. parasiticus* sobre granos de maíz, la Tabla 19 ilustra dichos valores, que se hallaron en los rangos 2,00-3,75, 1,18->4,0, 2,28-3,63 y 0,12-0,13 en los cultivos tratados con ORE, CAR, CIN y CINHO, respectivamente. La eficacia de estos films bioactivos para controlar el crecimiento de las dos especies aumentó en el orden EVOH-CINHO > EVOH-CAR > EVOH-ORE > EVOH-CIN.

Tabla 18. DE₅₀ y DE₉₀ (mg/placa Petri) de los films de EVOH con ORE, CAR, CIN y CINHO en fase gaseosa contra *A. flavus* en granos de maíz bajo diferentes condiciones de incubación.

		Aceites esenciales y componentes de aceites esenciales							
		ORE		CAR		CIN		CINHO	
Temp	a _w	DE ₅₀	DE ₉₀	DE ₅₀	DE ₉₀	DE ₅₀	DE ₉₀	DE ₅₀	DE ₉₀
25	0,96	2,30	>4,0	1,30	>4,0	3,06	>4,0	0,13	0,22
	0,99	2,57	>4,0	1,15	>4,0	2,48	>4,0	0,13	0,23
37	0,96	1,12	>4,0	1,15	>4,0	2,65	>4,0	0,13	0,23
	0,99	2,15	>4,0	1,63	>4,0	3,50	>4,0	0,13	0,23

Tabla 19. DE₅₀ y DE₉₀ (mg/placa Petri) de los films de EVOH con ORE, CAR, CIN y CINHO en fase gaseosa contra *A. parasiticus* en granos de maíz bajo diferentes condiciones de incubación.

		Aceites esenciales y componentes de aceites esenciales							
		ORE		CAR		CIN		CINHO	
Temp.	a _w	DE ₅₀	DE ₉₀	DE ₅₀	DE ₉₀	DE ₅₀	DE ₉₀	DE ₅₀	DE ₉₀
25	0,96	3,75	>4,0	2,63	>4,0	3,63	>4,0	0,12	0,23
	0,99	2,13	>4,0	1,18	3,98	2,28	>4,0	0,13	0,23
37	0,96	2,69	>4,0	>4,0	>4,0	2,55	>4,0	0,13	0,23
	0,99	2,00	>4,0	2,25	3,68	2,48	>4,0	0,13	0,23

El ANOVA multifactorial reveló que en la DE_{50} influyen significativamente los factores tipo de film, a_w y especie fúngica ($p < 0,01$), pero no la temperatura. El test Duncan también mostró que la DE_{50} para cada uno de los films ensayados fue diferente ($p < 0,05$). Bajo las condiciones ensayadas solo el factor tipo de film tuvo influencia significativa en la DE_{90} . El valor de este parámetro solo pudo ser estimado en todas las condiciones ensayadas en los tratamientos con EVOH-CINHO y estuvo entre 0,22 y 0,23 mg/placa en ambas especies.

En lo que se refiere a la influencia del tipo de film sobre la DE_{90} , el test de Duncan confirmó la existencia de dos grupos homogéneos no superpuestos: EVOH-CINHO y el resto de films ($p < 0,05$). No se ensayaron films con dosis superiores a 4,0 mg/placa debido a que estas serían menos apropiadas para su aplicación en la industria alimentaria. Como ya se ha indicado anteriormente una de las principales desventajas del empleo de AE en la conservación de alimentos es que su aroma puede alterar las propiedades organolépticas de los alimentos, aunque son muy volátiles y, por tanto, su eliminación es fácil y rápida.

3.3.3. Efecto en la producción de aflatoxinas

En los cultivos de este estudio se llevaron a cabo dos análisis simultáneos. En el primer análisis se determinó la actividad de los films EVOH que contenían los compuestos activos ORE, CAR, CIN y CINHO frente al crecimiento de las especies *A. flavus* y *A. parasiticus* sobre granos de maíz. En el segundo análisis se evaluó la eficacia de dichos films en el control de la biosíntesis de AFB1 y AFB2 por *A. flavus* y de AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2 por *A. parasiticus*. El estudio también demostró el impacto de las interacciones entre condiciones ambientales y estos films activos sobre el crecimiento fúngico y la producción de AF. Las cepas fúngicas empleadas para el presente ensayo fueron aisladas de maíz.

El maíz es el cereal que presenta mayores niveles de AF en todo el mundo (EFSA, 2012). Por ello, y ante la carencia de datos en España, fue elegido como sustrato para el estudio.

Los dos valores de a_w y de temperatura se seleccionaron en base a la excepcional adaptación y competitividad de estas especies a un amplio rango de humedad relativa y temperatura ambiental (EFSA, 2012). Todo esto ilustra la importancia y utilidad del presente estudio en materia de seguridad, calidad y tecnología alimentaria.

Los cultivos de *A. flavus* y *A. parasiticus* fueron examinados bajo todas las condiciones ensayadas para determinar la producción de AF. En los de *A. flavus* se determinaron AFB1 y AFB2 (Figura 46), y en los de *A. parasiticus*, AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2 (Figuras 47 y 48). Cuando fue necesario, debido a que las concentraciones eran superiores a las usadas para la construcción de la recta de calibrado, los extractos se diluyeron hasta 1:400 previamente a su análisis cromatográfico definitivo.

En los cultivos de *A. flavus* el ANOVA multifactorial mostró que la especie fúngica, el nivel de a_w , la dosis y el tipo de film afectan significativamente ($p < 0,001$ en todos los casos) a la producción de AFB1 y AFB2. Los niveles de ambas toxinas fueron menores en los cultivos de *A. flavus* que en los de *A. parasiticus*, a $a_w 0,96$ que $a_w 0,99$, con altas dosis de los compuestos activos y cuando el tratamiento se realiza con EVOH-CINHO. Aunque la temperatura no afectó significativamente a la producción de AFB1 y AFB2, los niveles de ambas toxinas fueron menores en los cultivos incubados a 37 °C que en los incubados a 25 °C.

En los cultivos de *A. parasiticus* el ANOVA multifactorial mostró que los factores a_w , tipo de film, dosis y temperatura afectan significativamente a la producción de AFG1 y AFG2 ($p < 0,05$). Las concentraciones de AFG1 y AFG2 fueron también más bajas en el nivel de $a_w 0,96$, con altas dosis de los AE o compuestos activos y a 37 °C. Aunque la a_w y la dosis fueron los factores más significativos ($p <$

0,001), también se detectaron interacciones significativas entre factores. El test de Duncan estableció tres grupos homogéneos en relación a la producción de ambas toxinas. Un primer grupo en el que se sitúan los controles, un segundo grupo que engloba los tratamientos con las dosis más bajas, y un tercero que incluye los cultivos con el resto de condiciones.

En lo referente a la dosis de los AE o compuestos activos (en fase gaseosa) es muy destacable que dosis bajas (0,25-1,00 mg/placa Petri) estimularon frecuentemente la producción de AF, salvo en el caso de CINHO. Los niveles de las toxinas en estos cultivos excedieron los niveles en los cultivos control bajo las mismas condiciones (Figuras 46-48).

Hasta lo que conocemos, en ningún estudio previo a este se ha examinado el impacto que tienen las interacciones entre las condiciones ambientales y los films bioactivos EVOH-ORE, EVOH-CIN, EVOH-CAR y EVOH-CINHO sobre el crecimiento de hongos aflatoxigénicos y sobre la producción de AF, aunque una amplia variedad de trabajos ha mostrado que el crecimiento fúngico puede ser inhibido por AE de plantas o sus componentes, y parte de estos trabajos han sido recopilados en revisiones (da Cruz Cabral et al., 2013; Nguyen Van Long et al., 2016).

En estos trabajos se emplean metodologías y condiciones de ensayo muy diferentes entre sí, lo que dificulta estudios comparativos y destaca la necesidad de métodos estandarizados para la monitorización del crecimiento fúngico. Por ello, en nuestro trabajo se han establecido parámetros estándar, como son las DE_{50} y DE_{90} para los AE y principios activos ensayados. Estos parámetros, aunque escasamente, se han empleado anteriormente en algunos estudios para describir la respuesta de diferentes especies y cepas fúngicas a dosis sub-letales de agentes antifúngicos (Marín et al 2013; Mateo et al., 2011a, 2013). Estos parámetros son muy útiles ya que permiten realizar análisis comparativos entre estudios similares.

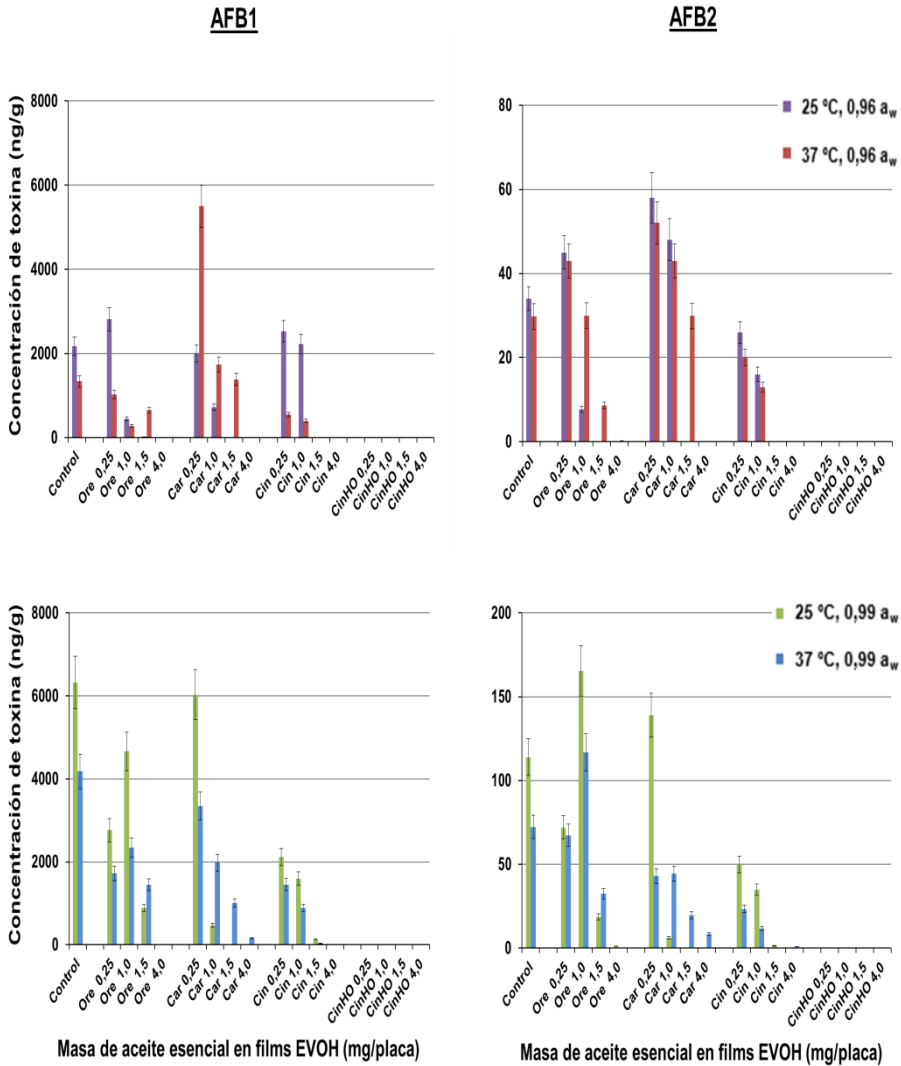


Figura 46. Producción de AFB1 y AFB2 por *A. flavus* en granos de maíz en presencia de los films EVOH-ORE, EVOH-CAR, EVOH-CIN y EVOH-CINHO con diferentes dosis y a diferentes temperaturas y valores de a_w. El periodo de incubación fue de 12 días. Las barras de error representan las desviaciones estándar.

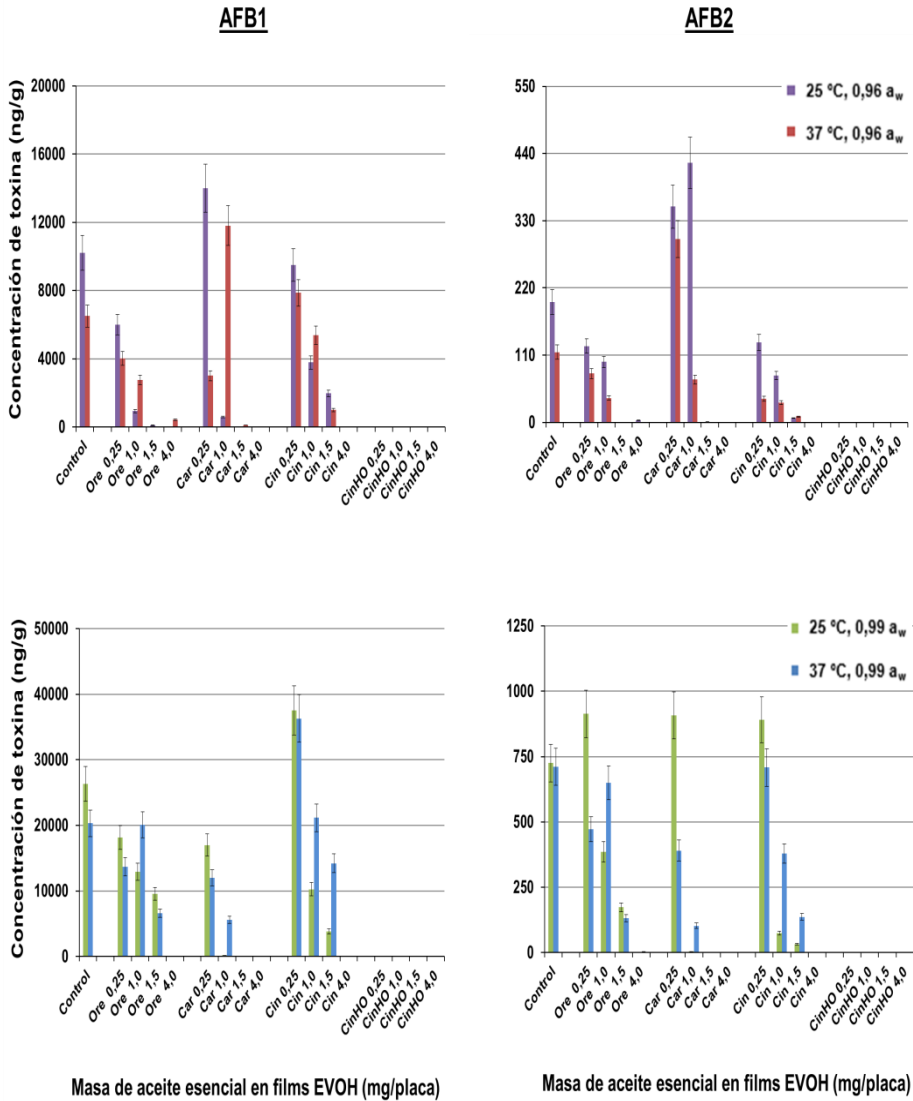


Figura 47. Producción de AFB1 y AFB2 por *A. parasiticus* en granos de maíz en presencia de los films EVOH-ORE, EVOH-CAR, EVOH-CIN y EVOH-CINHO, con diferentes dosis y a diferentes temperaturas y valores de a_w. El periodo de incubación fue de 12 días. Las barras de error representan las desviaciones estándar.

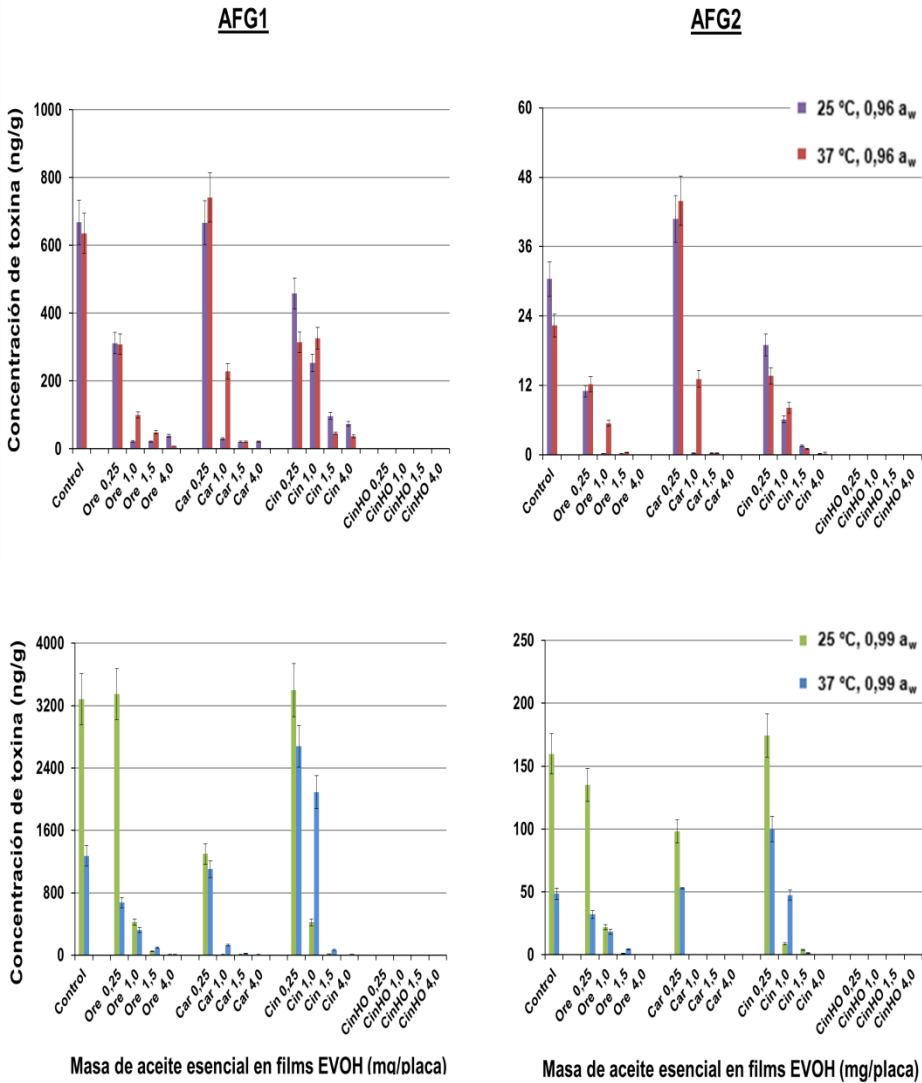


Figura 48. Producción de AFG1 y AFG2 por *A. parasiticus* en granos de maíz en presencia de los films EVOH-ORE, EVOH-CAR, EVOH-CIN y EVOH-CINHO, con diferentes dosis y a diferentes temperaturas y valores de a_w . El periodo de incubación fue de 12 días. Las barras de error representan las desviaciones estándar.

En la mayoría de estudios que se han realizado, los AE o sus componentes individuales han sido incluidos en los medios de cultivo como ingredientes de los mismos. Bluma et al. (2008) estudiaron la tasa de crecimiento micelial de *Aspergillus* spp. de la sección *Flavi* (*A. flavus* y *A. parasiticus*) en el medio agar extracto de harina de maíz al que se añadieron concentraciones de entre 150-500 $\mu\text{g/g}$ de los AE de clavo, poleo o tomillo. Encontraron que los tres AE a dosis de 500 $\mu\text{g/g}$ inhiben el crecimiento de todas las cepas en más del 90%. Generalmente, con la menor a_w ensayada (0,955), las dosis de 150 $\mu\text{g/g}$ de los aceites de poleo y tomillo fueron insuficientes para afectar al crecimiento fúngico. El AE de eucalipto no resultó efectivo a ninguna de las a_w ensayadas. En otro trabajo publicado en el mismo año (Bluma y Etcheverry, 2008), estos autores también determinaron que la dosis necesaria para controlar la tasa de crecimiento de *A. flavus* y la producción de AFB1 en granos de maíz estériles fue mucho mayor (2000-3000 $\mu\text{g/g}$) que en agar extracto de maíz.

Este hecho también fue descrito por Hope et al. (2002) para la especie *F. culmorum*. En este trabajo, concentraciones bajas (50-100 $\mu\text{g/g}$) de diferentes AE fueron efectivas para el control del crecimiento del hongo en medios con agar, pero se requirieron concentraciones mucho más elevadas (500 $\mu\text{g/g}$) para controlar el crecimiento de *F. culmorum* en granos de trigo estériles. En ensayos con agentes antifúngicos sintéticos, como morfolinas y azoles (Mateo et al., 2011a, 2013), más efectivos que los AE, pero menos seguros para la salud, se han encontrado resultados similares. Por tanto, para controlar el crecimiento fúngico en alimentos podrían ser necesarias dosis de agentes antifúngicos superiores a las empleadas en medios sintéticos o semisintéticos, con independencia de las condiciones ambientales, las especies fúngicas y los compuestos activos.

En los trabajos citados en los que los AE se incluyen en el medio de cultivo, si se considera el peso de medio de cultivo por cada placa Petri, la masa de cada AE/placa Petri usada por los diferentes autores es mayor que la usada en nuestro estudio (en fase gaseosa). Múltiples estudios han determinado que existe una mayor actividad antifúngica

de estos compuestos volátiles por contacto gaseoso que en disolución acuosa en el medio de cultivo (Hua et al., 2014; Inuoye et al., 2000; Nielsen y Ríos, 2000; Passone et al., 2012; Tullio et al., 2006; Tyagi y Malik, 2011a, 2011b; Vilela et al., 2009).

En el presente estudio, como productos activos se eligió el AE del orégano y uno de sus componentes activos mayoritarios, el carvacrol, así como el AE de la canela y uno de sus componentes mayoritarios, el cinamaldehído, con el objetivo de poder realizar un análisis comparativo de los resultados obtenidos aquí con los resultados obtenidos con las mismas especies y los mismos compuestos incluidos en el medio de cultivo descritos anteriormente en el apartado 3.2 de Resultados y discusión de la tesis. En ese estudio previo, con la dosis de 100 mg de CINHO/L incluida en MEM se consiguió la inhibición total del crecimiento de *A. flavus* y de *A. parasiticus* y, por tanto, la inhibición de la producción de AF.

Los resultados obtenidos aquí con films bioactivos compuestos por EVOH y los mismos componentes activos muestran que los films EVOH-CINHO con dosis muy bajas de compuesto activo (250 µg/placa con 25 g de maíz) inhiben completamente el crecimiento de *A. flavus* y de *A. parasiticus* y la producción de AF bajo todas las condiciones ambientales ensayadas. El resto de films bioactivos fueron menos efectivos. Un análisis comparativo de ambos trabajos permite concluir que estas especies aflatoxigénicas exhiben una mayor sensibilidad en los tratamientos con CINHO aplicado en fase vapor (EVOH-CINHO) que en los tratamientos en los que el CINHO se introduce en el interior del medio.

Por tanto, los datos revelan que los tratamientos en fase vapor mejoran la eficiencia de CAR, ORE y CIN en el control del crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus* y en el control de la acumulación de AF en el medio. Passone et al. (2012, 2013) también observaron que el AE de boldo es más efectivo frente a *A. flavus* y *A. parasiticus* y la producción de AFB1 en fase vapor que en ensayos por contacto. Otros investigadores también han encontrado mayor actividad antifúngica de

diferentes AE, como los del tomillo rojo o el clavo (Tullio et al., 2007), *Eucalyptus globulus* o *Mentha piperita* (Tyagi y Malik, 2011a; 2011b) en fase gaseosa que por contacto en fase acuosa.

Una metodología muy interesante es la inclusión de AE en films comestibles. Con esta estrategia se ha conseguido obtener diferentes grados de inhibición del crecimiento de *Aspergillus niger* y *Penicillium digitatum* usando los AE de canela, orégano mejicano y “lemongrass” incuidos en films comestibles de amaranto, quitosano y almidón (Ávila-Sosa et al., 2012). Los films se formularon con concentraciones de los AE del 0%, 0,25%, 0,50%, 0,75%, 1,00%, 2,00% o 4,00% (en base húmeda). Los films fueron dispuestos en la parte interna de placas Petri, cubriendo toda la superficie (Ávila-Sosa et al., 2012). Los ensayos se llevaron a cabo en fase vapor empleando la técnica de la placa invertida. En este trabajo se comprobó que cada uno de los diferentes polímeros ensayados retiene el AE en un grado distinto; así, los films comestibles de quitosano con orégano mejicano o canela fueron más efectivos en la inhibición del crecimiento de *A. niger* y *P. digitatum* que los films de amaranto. Un estudio comparativo de los resultados obtenidos por el grupo de Ávila-Sosa y los de nuestro trabajo no resulta fácil ya que el principal componente del orégano mejicano es el timol, mientras que en el orégano europeo la concentración de carvacrol es mucho más elevada (86%) que la de timol (2%). Por tanto, la actividad antifúngica de ORE empleado en nuestro trabajo es debida a la presencia de CAR junto a otros componentes minoritarios, incluyendo timol.

Por otro lado, el CINHO es el principal componente de la canela de rama y representa el 65% de la canela empleada en este estudio. Sin embargo, el aceite de hojas y ramas de algunos arbustos de canela tiene eugenol como componente mayoritario. Las diferencias en el tipo de film y en el origen de los AE usados por los diferentes autores también dificultan la comparación entre estudios. En cualquier caso, las dosis empleadas en el trabajo de Ávila-Sosa son superiores a las del presente estudio. En el trabajo de Ávila-Sosa et al. (2012) se proponen films comestibles de quitosano con AE de orégano mejicano

o canela para controlar el crecimiento de *A. niger* y *P. digitatum*, mientras que en el presente estudio los films EVOH con CINHO son los más efectivos en el control del crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus* en granos de maíz.

Otro ejemplo de films usados en envasado activo son los de PET. Manso et al. (2013) estudiaron films PET con CIN, en fase vapor, frente a *A. flavus*. Los films se colocaron recubriendo las placas de los cultivos, sustituyendo a la tapa de la placa Petri. El medio de cultivo que emplearon fue Czapek y la temperatura de incubación fue 25 °C. Bajo estas condiciones, la inhibición del crecimiento de *A. flavus* expuesto a PET al 2%, 4% y 8% de CIN dependió en gran medida de la concentración inicial de inóculo fúngico. Usando 100 µL de una suspensión de 10⁴ esporas de *A. flavus*/mL el crecimiento fue totalmente inhibido por los films PET con un 2 % de CIN, y concentraciones mayores causaron la inhibición total del crecimiento de todos los inóculos ensayados (10⁴, 10⁵ y 10⁶ esporas/mL).

Los films bioactivos que contienen AE pueden reducir la difusión en los diferentes productos donde se apliquen ya que el AE forma parte de la estructura química del film e interactúa con el polímero y el agente emulsificante, que es normalmente requerido para asegurar la dispersión y la formación de una cubierta homogénea (Atarés et al., 2016; da Cruz-Cabral et al., 2013). Además, los AE son liberados gradualmente de la matriz del polímero sobre la superficie de los productos a lo largo del tiempo, manteniéndose así una concentración constante de los compuestos antimicrobianos durante el periodo de incubación y permitiendo el empleo de dosis más bajas en comparación con la aplicación directa de AE en un medio de cultivo o en contacto directo con una superficie alimentaria.

Los resultados de este estudio, especialmente en los cultivos con films EVOH-CINHO, muestran que niveles extraordinariamente bajos del compuesto (0,12-0,23 mg/placa) permiten inhibir el crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus* (50%-90%) bajo las diferentes condiciones ensayadas. El resto de films bioactivos ensayados presentaron una

actividad antifúngica relevante, aunque fueron menos efectivos que los films EVOH-CINHO. La inhibición total del crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus* se consiguió con la dosis de 0,25 mg/placa de los films EVOH-CINHO.

Del análisis estadístico de los datos se deduce que el tipo de film, la dosis, la a_w , la especie fúngica y la temperatura tienen una influencia significativa ($p < 0,05$) sobre la tasa de crecimiento fúngico y los valores DE_{50} . En general, los valores DE_{50} fueron más elevados en los cultivos a 37 °C que a 25 °C, y con a_w 0,99 que con a_w 0,96. Esto concuerda con los trabajos de otros autores (aunque ellos no emplearon films bioactivos). Así, Passone et al., (2012, 2013), encontraron que el efecto inhibitorio de los AE de boldo, poleo y clavo aumentaba cuando la a_w se reducía. El tratamiento con 1000 $\mu\text{L/L}$ de poleo implicó una inhibición en las tasas de crecimiento fúngico entre un 16,1% y un 75,8%, y entre un 3,7% y un 74,7% a niveles de a_w de 0,98 y 0,95, respectivamente, mientras que se observaron inhibiciones entre un 39,4% y un 72,8% con una a_w de 0,93. Bluma et al. (2008) también encontraron que la eficacia de los AE de anís, boldo, tomillo, clavo y poleo frente a hongos del género *Aspergillus* de la sección *Flavi* incubados con diferentes a_w (0,982, 0,955 y 0,90) se incrementó cuando aumentó la concentración de los AE y disminuyó la a_w .

En nuestro estudio, la producción de AF fue generalmente inhibida con el empleo de films EVOH con ORE, CAR, CIN y CINHO (en fase vapor) a las mayores dosis empleadas, independientemente de la temperatura y la a_w . Para los films EVOH con dosis medias o bajas de ORE, CAR y CIN, este efecto dependió de la a_w y de las dosis aplicadas por placa, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por otros autores con diferentes AE (boldo, poleo, clavo, anís y tomillo) (Bluma y Etcheverry, 2008; Passone et al., 2012). Aunque en estos trabajos solo se estudió la AFB1 y no se emplearon films, se observó que los AE redujeron significativamente la acumulación de AFB1.

Otro tipo de films son los de polipropileno activo (PP). Manso et al. (2014) estudiaron la acción antiaflatoxigénica de este tipo de films

provistos de CIN en cultivos de *A. flavus*. Los resultados de dicho estudio mostraron una reducción significativa en la producción de AFB1 en los tratamientos con films que contenían un 2% de CIN, y una inhibición total con los que contenían un 4% y un 6% de CIN. En este trabajo, toda la superficie interna de las placas de los cultivos fue cubierta con los films. En nuestro estudio los films de EVOH con 0,25 mg de CINHO por placa inhibieron por completo la producción de AF por *A. flavus* y *A. parasiticus* bajo todas las condiciones ensayadas. La acumulación de AF fue estimulada en algunos cultivos, especialmente con concentraciones bajas y medias de los AE y principios activos, excepto para el caso de CINHO. Esto concuerda con más publicaciones previas en las que se indica que la producción de micotoxinas puede ser estimulada debido a condiciones ambientales y dosis bajas de antifúngicos que generen estrés en los hongos productores (da Cruz Cabral et al., 2013; Mateo et al., 2011a, 2011c, 2013; Medina et al., 2007a; Prakash et al., 2015). Por ejemplo, en el trabajo Bluma et al. (2008) se describe la estimulación de la acumulación de AFB1 por los AE de eucalipto y tomillo. En el presente estudio, este fenómeno se detectó con frecuencia en cultivos tratados con los films de EVOH con CAR, ORE y CIN.

En la especie *A. flavus* se ha estudiado la correlación entre el transcriptoma y el proteoma en rutas biológicas y clusters de metabolismo secundario en respuesta a la temperatura (Bai et al., 2015). Zhang et al. (2014) encontraron que numerosas rutas metabólicas implicadas en la biosíntesis de AF eran significativamente sobreexpresadas en los tratamientos con a_w 0,99. Dependiendo de la combinación particular de parámetros de crecimiento externos, la biosíntesis de AF puede ser completamente inhibida, aunque el crecimiento normal sea posible, o puede ser completamente activada, incluso con crecimiento deficiente.

Los copolímeros de EVOH son muy útiles para el recubrimiento y el contacto directo con alimentos. Estos presentan excelentes propiedades térmicas y de barrera. Estos films pueden emplearse solos o como recubrimiento de otros sustratos. Se han llevado a cabo

diversos trabajos con estos films y se han probado como envase para vegetales, nueces, carne fresca, surimi, sopas o aderezos y salsas, con excelentes resultados.

En esta tesis hemos demostrado que si a estos films se incorporan determinados AE de plantas o sus componentes activos individuales se convierten en una excelente barrera bioactiva. Los dos trabajos desarrollados en esta tesis para el control del crecimiento de especies aflatoxigénicas y para el control de la producción de AF (Gómez et al., 2018; Mateo et al., 2017b) proporcionan dos estudios únicos y complementarios. En ambos estudios el CINHO fue el tratamiento más efectivo para inhibir el crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus* y la producción de AF. En los ensayos llevados a cabo en fase vapor las DE fueron más bajas que en los ensayos por contacto, con independencia de la a_w y de la temperatura. Este fenómeno también se observó con CAR y los AE ORE y CIN. La tasa de crecimiento, la DE_{50} y la inhibición de la biosíntesis de AF resultan significativamente afectadas por las interacciones entre los diferentes factores, lo cual se observó en ambos estudios.

También hay que mencionar que ciertas combinaciones de temperatura, a_w y dosis bajas de los AE o sus componentes individuales estimularon la producción de AF, excepto en los tratamientos con CINHO. Así, los datos de este estudio sugieren que la aplicación de CINHO seguido de CAR, ORE y CIN mediante ensayos por contacto y, preferiblemente, cuando es posible, en fase gaseosa generada a partir de films EVOH podría llegar a ser un método exitoso para el control de hongos aflatoxigénicos y de la producción de AF en alimentos. La implementación de dosis letales de AE o sus componentes individuales en disolución acuosa o en fase gaseosa frente a especies aflatoxigénicas en alimentos, como única medida efectiva para prevenir el desarrollo fúngico puede llegar a ser inviable ya que, en muchos casos, serían necesarias dosis demasiado elevadas. Por ello, el conocimiento de las DE_{50} y DE_{90} y la dosis para la inhibición total del crecimiento del hongo y la producción de micotoxinas bajo condiciones estandarizadas puede ser muy útil en

tecnología de alimentos para prolongar el periodo de vida útil, para determinar la necesidad de aplicación de tratamientos complementarios y, especialmente, para la reducción del empleo de otros conservantes químicos perjudiciales para la salud.

3.4. Efecto de films de EVOH con compuestos activos de aceites esenciales en el crecimiento de *F. sporotrichioides* y en la producción de las toxinas T-2 y HT-2

En este trabajo se estudia la efectividad de diferentes tratamientos con films de EVOH con CINHO, IEG, CIT o LIN, como principios activos, en el control del crecimiento de *F. sporotrichioides* y en el control de la producción de las toxinas T-2 y HT-2 en granos de avena, bajo diferentes condiciones de temperatura (15, 20 y 28 °C) y a_w (0,96 y 0,99).

3.4.1. Efecto sobre el crecimiento

La fase lag (tiempo necesario para que la colonia alcance un tamaño de 5 mm de diámetro a partir del inóculo inicial) fue variable dependiendo de la temperatura, a_w y tipo de tratamiento. La tasa de crecimiento del hongo se observa en la Figura 49. Esta fue superior a 28 °C que a 20 y 15 °C ($p < 0,0001$). El test de Duncan situó cada una de las tres temperaturas en un grupo. Aunque se detectó mayor desarrollo fúngico en los cultivos con a_w 0,99 que con a_w 0,96 (Figura 49), el ANOVA no encontró diferencias significativas relacionadas con este parámetro; sin embargo, las interacciones de $a_w \times$ tipo de film ($p < 0,034$) y $a_w \times$ temperatura ($p < 0,0006$) afectaron significativamente al crecimiento del hongo. Del mismo modo, las interacciones $a_w \times$ temperatura \times tipo de film y $a_w \times$ temperatura \times dosis también fueron significativas.

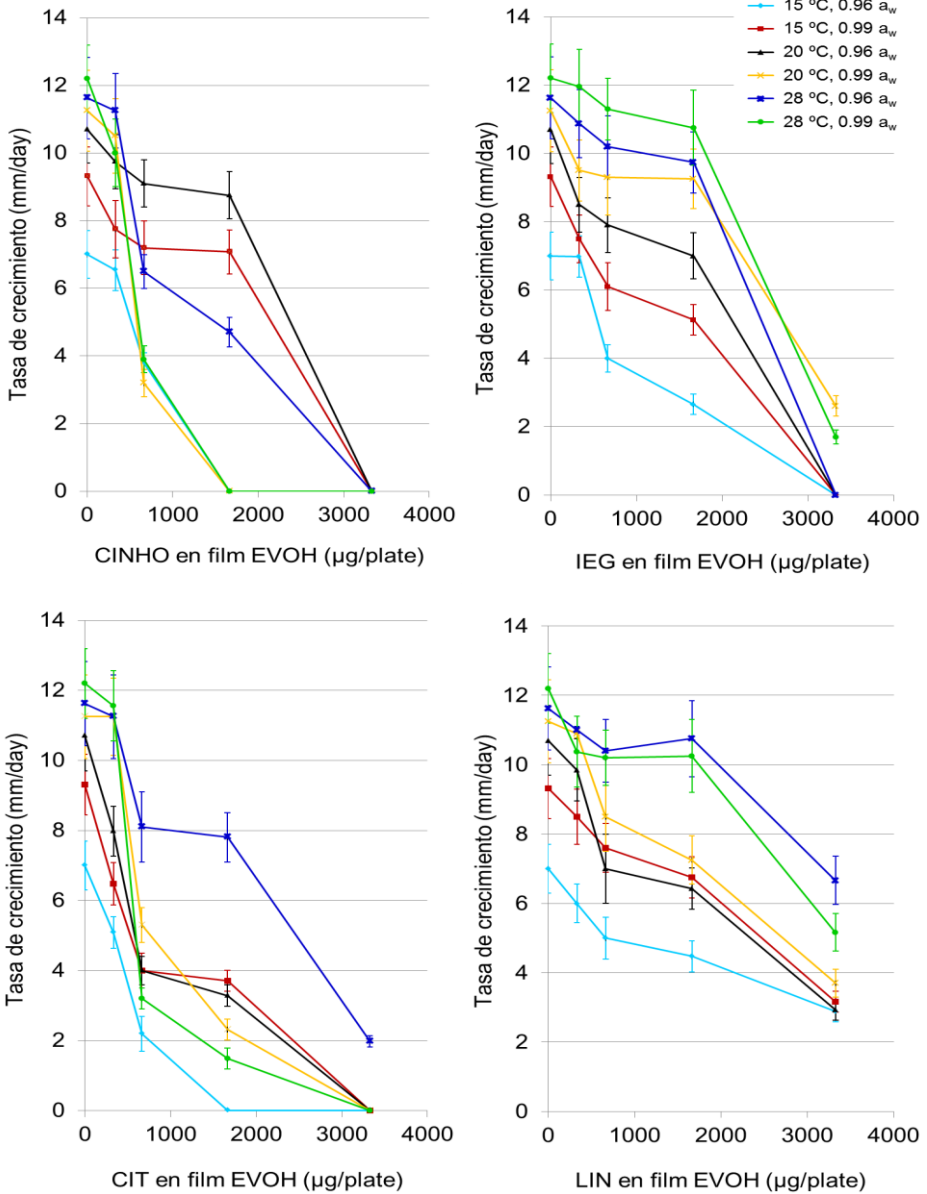


Figura 49. Tasa de crecimiento (mm/día) de *F. sporotrichioides* en avena en presencia de los films EVOH-CINHO, EVOH-IEG, EVOH-CIT y EVOH-LIN a diferentes temperaturas y valores de a_w. Las barras de error representan las desviaciones estándar.

El tipo de film afectó significativamente al crecimiento del hongo ($p < 0,001$). Según el compuesto activo de los films, de mayor a menor efectividad, el test de Duncan los situó en tres grupos, el primero fue EVOH-CIT y EVOH-CINHO, el segundo EVOH-IEG, y el tercero EVOH-LIN.

Con respecto a la dosis, el test de Duncan estableció cuatro grupos sin solapamiento. Las interacciones dosis \times tipo de film y temperatura \times tipo de film también fueron significativas ($p < 0,05$). Las dosis efectivas para la reducción de la tasa de crecimiento de *F. sporotrichioides* en un 50%, 90% y 100% (DE_{50} , DE_{90} y DE_{100}) se muestran en la Tabla 20. Dosis superiores a 3330 μg de principio activo no fueron ensayadas por considerarlas de menor interés en matrices alimentarias, ya que, aunque los AE de plantas o sus componentes individuales son muy volátiles y se eliminan fácilmente del alimento una vez que este entra en contacto con el medio ambiente, concentraciones elevadas pueden llegar a afectar a sus propiedades organolépticas debido a su intenso aroma.

Tabla 20. DE_{50} , DE_{90} y DE_{100} (μg de compuesto activo/cultivo en placa) de films de EVOH con CINHO, IEG, CIT y LIN en fase gaseosa frente a *F. sporotrichioides* en avena bajo diferentes condiciones de incubación.

Temp. (°C)		Componentes individuales de aceites esenciales											
		CINHO			IEG			CIT			LIN		
		a_w	DE_{50}	DE_{90}	DE_{100}	DE_{50}	DE_{90}	DE_{100}	DE_{50}	DE_{90}	DE_{100}	DE_{50}	DE_{90}
15	0,96	745	1480	1665	1030	2890	3330	515	1350	1665	2680	>3330	>3330
	0,99	2240	3120	3330	2425	3035	3330	580	2910	3330	2640	>3330	>3330
20	0,96	2310	3130	3330	2065	3080	3330	555	2790	3330	2175	>3330	>3330
	0,99	555	1315	1665	2585	>3330	>3330	650	2525	3330	2430	>3330	>3330
28	0,96	1050	2920	3330	2340	3130	3330	2235	>3330	>3330	>3330	>3330	>3330
	0,99	545	1350	1665	2520	>3330	>3330	550	1975	3330	3025	>3330	>3330

3.4.2. Efecto sobre la producción de las toxinas T-2 y HT-2

Las Figuras 50, 51 y 52 muestran las concentraciones de las toxinas T-2 y HT-2 en los controles y en los tratamientos incubados a 15, 20 y 28 °C con las dos a_w . El nivel de ambas toxinas fue significativamente menor en los cultivos con a_w 0,96 que con a_w 0,99 ($p < 0,0001$) y también en los cultivos tratados que en los controles ($p < 0,0001$). En los tratamientos, el test de Duncan para la toxina T-2 distingue un grupo homogéneo para cada dosis. A mayor dosis menor producción de la toxina. Para la HT-2 distingue dos grupos, uno para las dos dosis más altas y otro para las dos más bajas.

En la producción de T-2 el test de Duncan estableció tres grupos en relación con el tipo de film, un grupo con el film EVOH-CIT (el más efectivo en la inhibición de la síntesis de la toxina), un segundo grupo con los films EVOH-CINHO y EVOH-IEG, y un tercer grupo con EVOH-IEG y EVOH-LIN. Sin embargo, para la toxina HT-2, aunque el film EVOH-CIT dio lugar a menor producción que los demás, el ANOVA no detectó diferencias significativas ($p = 0.077$).

También se encontró una influencia significativa de la temperatura sobre la inhibición de la síntesis de ambas toxinas ($p < 0,005$). El test de Duncan, en relación con la influencia de la temperatura en la inhibición en la síntesis de la toxina T-2, determinó tres grupos sin solapamiento. El primero correspondió a los cultivos incubados a 15 °C, donde se registraron mayores niveles de toxina, el segundo a los incubados a 20 °C, con niveles intermedios y el tercero en los incubados a 28 °C, donde se registraron los niveles más bajos. En el caso de la toxina HT-2, el test de Duncan colocó en un grupo los cultivos incubados a 15 °C, y en otro los incubados a 20 y 28 °C.

Además de los factores individuales descritos también tuvieron influencia significativa sobre la inhibición de la síntesis de T-2 las siguientes interacciones: $a_w \times$ temperatura, $a_w \times$ dosis, $a_w \times$ tipo de film, tipo de film \times dosis, dosis \times temperatura, $a_w \times$ dosis \times temperatura y a_w

× dosis × tipo de film ($p < 0,02$). Para HT-2 las interacciones significativas fueron a_w × temperatura, a_w × dosis, dosis × temperatura y a_w × dosis × temperatura ($p < 0,001$).

F. sporotrichioides y *F. langsethiae* se han encontrado en diversos cereales en múltiples estudios (Kosiak et al., 2007; Yli-Mattila et al., 2004a, 2004b). También se ha descrito que la temperatura óptima para la esporulación de *F. sporotrichioides* es superior a la óptima para la esporulación de *F. langsethiae* ($32,3 \pm 2,1$ °C frente a $24,5 \pm 0,7$ °C, respectivamente) y que el tiempo requerido para desarrollar dicha esporulación es inferior en *F. sporotrichioides* (Nazari et al., 2016).

En estudios previos se ha encontrado que *F. sporotrichioides* crece a mayor velocidad que *F. langsethiae*, tanto *in vitro* como *in vivo* (Nazari et al., 2014; Torp y Nirenberg, 2004). En el presente trabajo el desarrollo de *F. sporotrichioides* ha sido siempre mayor en los cultivos incubados a la temperatura más elevada (28 °C) con independencia del resto de factores estudiados. Se ha encontrado que *F. langsethiae* presenta mayor tasa de crecimiento a 25 °C que a temperaturas inferiores o superiores a esta (Mateo et al., 2011a, 2013; Medina y Magan, 2010; Torp y Nirenberg, 2004). Por tanto, la temperatura óptima de crecimiento para estas dos especies podría diferir en $\pm 2-3$ °C, siendo superior en *F. sporotrichioides*, lo que puede explicar la distribución geográfica de cada una de ellas. Por tanto, la incidencia de *F. sporotrichioides* y *F. langsethiae* parece estar muy ligada a las condiciones ambientales de cada región, que marcarían significativamente su presencia en cereales. Así, mientras que *F. sporotrichioides* cuenta con una amplia distribución en casi todo el mundo (Glenn, 2007; Visconti et al., 1985), la distribución de *F. langsethiae*, es más restrictiva y se sitúa principalmente en regiones del centro y norte de Europa, incluyendo Austria, la República Checa, Dinamarca, Reino Unido, Alemania y Noruega (Torp y Nirenberg, 2004), Finlandia, norte de Italia (Infantino et al., 2007), Polonia (Lukanowski et al., 2008) o Serbia (Bocarov-Stancic et al., 2008), entre otras.

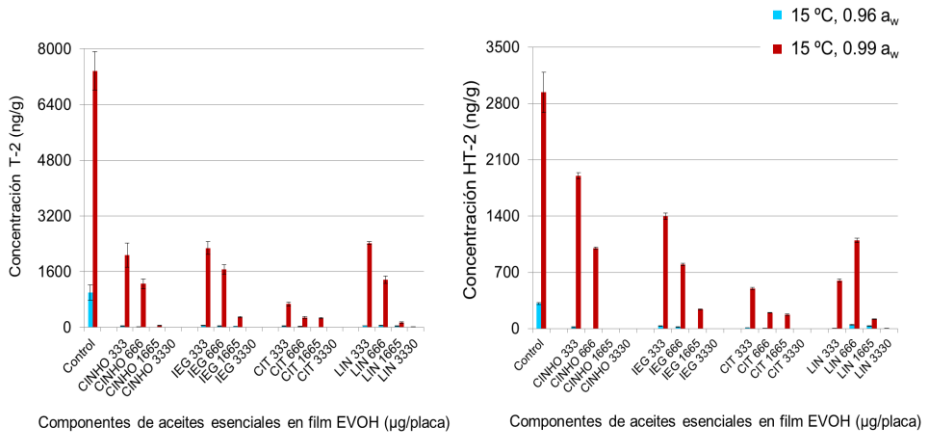


Figura 50. Niveles de las toxinas T-2 y HT-2 (ng/g) en cultivos de *F. sporotrichioides* en avena tratados con films de EVOH con CINHO, IEG, CIT y LIN con diferentes dosis del compuesto activo (µg de compuesto activo/cultivo en placa Petri). Temperatura de incubación: 15 °C; a_w: 0,96 y 0,99. Periodo de incubación: 30 días.

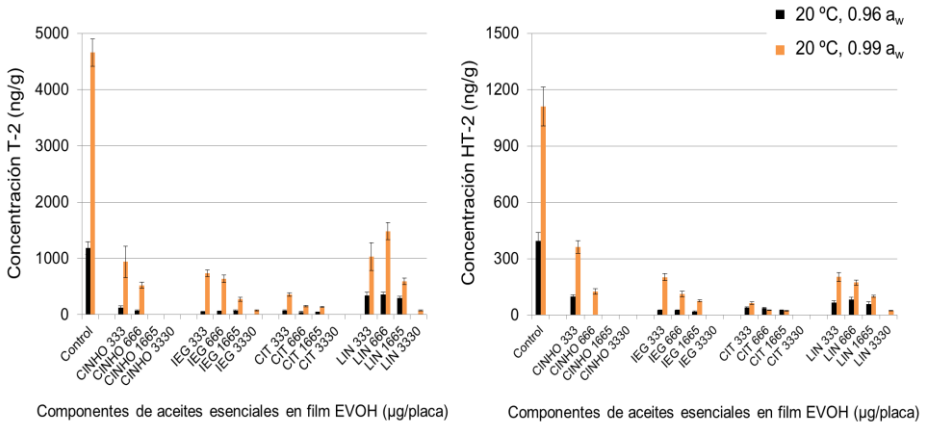


Figura 51. Niveles de las toxinas T-2 y HT-2 (ng/g) en cultivos de *F. sporotrichioides* en avena tratados con films de EVOH con CINHO, IEG, CIT y LIN con diferentes niveles del compuesto activo (dosis en µg de compuesto activo/cultivo en placa Petri). Temperatura de incubación: 20 °C; a_w: 0,96 y 0,99. Periodo de incubación: 30 días.

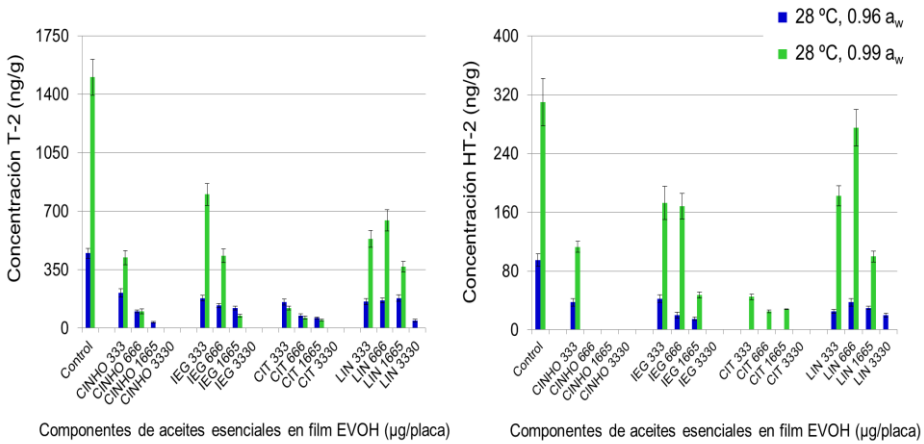


Figura 52. Niveles de las toxinas T-2 y HT-2 (ng/g) en cultivos de *F. sporotrichioides* en avena tratados con films de EVOH con CINHO, IEG, CIT y LIN con diferentes niveles del compuesto activo (dosis en µg de compuesto activo/cultivo en placa Petri). Temperatura de incubación: 28 °C; a_w : 0,96 y 0,99. Periodo de incubación: 30 días.

La mayor producción de las toxinas T-2 y HT-2 se registró en los cultivos con a_w 0,99. La comparación de nuestros resultados con los encontrados por otros autores es difícil debido a la escasez de investigaciones previas realizadas con esta especie. En 1995, Schwabe y Krämer (1995) encontraron mayor producción de la toxina T-2 por *F. sporotrichioides* en cultivos con a_w 0,995 que con a_w 0,97, y también mayor en cultivos con a_w 0,97 que con a_w 0,945, por lo que el aumento del valor de a_w , ya entonces, se relacionó con un incremento en la producción de la toxina. Estos resultados coinciden con los obtenidos en esta tesis y con los obtenidos en otros trabajos para la especie *F. langsethiae* (Mateo et al., 2011a, 2013; Medina y Magan, 2011); por ello, se puede concluir que estas especies de la sección *Sporotrichiella* implicadas en la producción de las toxinas T-2 y HT-2 presentan mayor riesgo en cereales cultivados y almacenados en ambientes con elevada humedad relativa.

También se detectó que, en cultivos de granos de avena, *F. sporotrichioides* produce mayores niveles de la toxina T-2 que de la toxina HT-2. Estos resultados coinciden con los de otros autores como Nazari et al. (2014) que también determinaron una concentración superior de la toxina T-2 que de la HT-2 en cultivos de esta especie en granos de trigo. En otros trabajos en diferentes cereales se llega igualmente a esta conclusión (Kokkonen et al., 2010; Marasas et al., 1987; Mateo et al., 2002). En cambio, para *F. langsethiae* se ha encontrado mayor producción de la toxina HT-2 que de T-2 en avena (Mateo et al., 2013).

La temperatura óptima para la producción de las toxinas T-2 y HT-2 por estas especies (*F. sporotrichioides* y *F. langsethiae*) está mucho menos consensuada que la a_w del sustrato por existir resultados contradictorios en la literatura. En trabajos previos (Kokkonen et al., 2010; Marasas et al., 1987) se ha observado que la producción de las toxinas T-2 y HT-2 por *F. sporotrichioides* parece ser mayor a temperaturas bajas (10, 15 o 20 °C). El descubrimiento de la especie *F. langsethiae* en 2004 (Torp y Nirenberg, 2004) en avena y otros cereales contaminados con las toxinas T-2 y HT-2 en países del centro y norte de Europa, llevaron a pensar que la biosíntesis de estas micotoxinas ocurre principalmente a temperaturas bajas y las investigaciones se centraron más en esta nueva especie. Sin embargo, los resultados obtenidos en la última década, muchos de ellos por nuestro grupo de investigación en colaboración con investigadores de la Universidad de Cranfield (Reino Unido), han mostrado que la producción de T-2 y HT-2 por *F. langsethiae* en medios elaborados con avena y en granos de avena es a 25 °C > 20 °C > 15 °C (Mateo et al., 2011a, 2013). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Medina y Magan. (2011) e indican que *F. langsethiae* presenta mayor velocidad de crecimiento y mayor producción de las toxinas T-2 y HT-2 en el intervalo de temperatura entre 20 y 30 °C y a_w entre 0,98 y 0,99 que a temperaturas inferiores a 20 °C. Scudamore et al. (2009) también encontraron mayores niveles de contaminación con las toxinas T-2 y HT-2 en las muestras de avena procedentes del Reino Unido que

en las muestras procedentes de Escandinavia, país con climatología más fría y adversa para el crecimiento de las especies productoras (Torp y Nirenberg, 2004) y la producción de las toxinas. En líneas generales, los resultados obtenidos en esta Tesis para *F. sporotrichioides* aislada de avena comercializada en España respaldan una mayor producción de las toxinas a las temperaturas de 15 y 20 °C que a 28 °C. Si se considera que la temperatura en torno a 30 °C favorece la esporulación de *F. sporotrichioides* (Nazari et al., 2016) se puede concluir que ambientes con alta humedad relativa y temperaturas que varían en el intervalo 15-30 °C entre el día y la noche parecen ser favorables para la esporulación, germinación de las esporas, desarrollo del hongo en el cereal y producción de las toxinas T-2 y HT-2 por *F. sporotrichioides*, lo que apoya que esta sea la principal especie implicada en la presencia de las toxinas en cereales cultivados en las regiones más cálidas, como España.

La discusión de los resultados obtenidos en los cultivos de *F. sporotrichioides* tratados con los films de EVOH con CINHO, IEG, CIN y LIN con resultados obtenidos previamente por otros autores es difícil, ya que los ensayos con AE de plantas o con sus componentes individuales frente a *F. sporotrichioides*, bien en disolución acuosa (incluidos en el medio de cultivo) o en fase gaseosa (incluidos en polímeros), son muy limitados. Lo mismo ocurre con los ensayos que evalúan el efecto de estos compuestos activos en la producción de las toxinas T-2 y HT-2. Solo Degola et al. (2015) determinaron que una forma del CINHO (trans-cinamaldehído tiosemicarbazona) era capaz de inhibir el crecimiento micelial de *F. sporotrichioides* en un 24,9%, y de inhibir la producción de micotoxinas por este hongo en un 91,4% en medio PDA suplementado con Tween 20. Como ya ha sido detallado en otros apartados de la tesis, se ha observado la efectividad de este tipo de compuestos en otras especies fúngicas. Por otra parte, en trabajos incluidos en esta tesis, también se ha encontrado que el crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus* resultan totalmente inhibidos con una dosis de 0,25 mg de CINHO en films de EVOH. En ambos trabajos el medio de cultivo fue maíz. Estos trabajos presentan, sin

duda, un gran interés en salud pública y seguridad alimentaria, ya que proponen alternativas efectivas e inocuas para la prevención y control de diferentes micotoxinas y hongos productores en alimentos. Otro aspecto a destacar es que los niveles de las toxinas en los tratamientos con dosis de LIN de 666 µg/placa son mayores que los obtenidos en los tratamientos con dosis de 333 µg/placa (Figuras 50 y 52). Este comportamiento de los hongos productores de micotoxinas se ha detectado también en otros trabajos con diferentes agentes antifúngicos (da Cruz Cabral et al., 2013; Mateo et al., 2011a, 2011c, 2013, 2017b; Medina et al., 2007a; Prakash et al., 2015) y, como se ha comentado anteriormente, parece que obedece a estrés fúngico debido a condiciones ligeramente desfavorables.

Además de las condiciones ambientales, parece que el cereal ejerce un papel fundamental en el desarrollo de estos hongos y en la producción de las toxinas T-2 y HT-2. Como indican los resultados obtenidos en esta Tesis (apartado 2.2 de Resultados y discusión), en España, los niveles de las toxinas T-2 y HT-2 son significativamente más elevados en avena que en maíz, con independencia de la climatología de cada región. Por otra parte, diferentes trabajos han reportado niveles inusualmente elevados de ambas toxinas en avena cultivada en los países del centro y norte de Europa (Bernhoft et al., 2010; Edwards, 2009a; Langseth et al., 1998; Opoku et al., 2013, 2017).

Varias investigaciones avalan que la aplicación de AE en fase vapor como antifúngicos es más eficaz que cuando se emplean en disolución acuosa (Hua et al., 2014; Inuoye et al., 2000; Nielsen y Ríos, 2000; Passone et al., 2012; Tullio et al., 2006; Tyagi y Malik, 2011a, 2011b; Vilela et al., 2009). Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que los componentes activos de AE incluidos en los films de EVOH ensayados presentan un alto grado de efectividad en el control del crecimiento de *F. sporotrichioides* y que este efecto depende del tipo de compuesto activo, dosis, a_w , temperatura y de diversas interacciones entre estos factores.

3.5. Efecto de nanopartículas de plata (AgNPs) en el crecimiento de las especies productoras de aflatoxinas o de las toxinas T-2 y HT-2 y en la producción de las micotoxinas

En este apartado se describen y discuten los resultados obtenidos en los ensayos con AgNPs en el control del crecimiento de *A. flavus*, *A. parasiticus*, *F. sporotrichioides*, *F. langsethiae* y *F. poae*. Asimismo, se muestran los resultados sobre el efecto de las AgNPs en la producción de AFB1 y AFB2 por *A. flavus*, AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2 por *A. parasiticus*, de las toxinas T-2 y HT-2 por *F. sporotrichioides* y *F. langsethiae* y de NIV por *F. poae*. Esta investigación forma parte de dos trabajos del grupo (Gómez et al., 2019; Tarazona et al., 2019) mucho más amplios. Una parte de estos trabajos está incluida en esta tesis, y se expone a continuación.

3.5.1. Caracterización de las AgNPs

En primer lugar, los ensayos se inician con la fabricación de las AgNPs. La distribución de los tamaños (diámetros) de las AgNPs obtenidas, analizados mediante SP-ICP-MS, se muestran en la Figura 53. El tamaño medio de las AgNPs fue de 30 nm y el rango e entre 20 y 100 nm. El número de AgNPs/mL en la suspensión obtenida, siguiendo la metodología indicada en el apartado 2.6.2, fue $6,48 \times 10^{10}$ y la concentración de plata fue 59,24 mg/L. El diámetro mínimo de las partículas que se pudo detectar debido al ruido de fondo de la suspensión diluida de AgNPs fue de 20 nm (1500 cps con un tiempo de permanencia de 3 ms).

La concentración de AgNPs en la suspensión resultante mediante el método empleado fue menor que la indicada en el trabajo de Agnihotri et al. (2014) para AgNPs de 30 nm ($1,71 \times 10^{13}$

AgNPs/mL). Esto puede deberse a posibles diferencias en las condiciones experimentales durante la síntesis, como la velocidad de agitación, el calentamiento, la adición de AgNO_3 , las condiciones de centrifugación y la diferencia entre los métodos empleados para la medición de las partículas que fue SP-ICP-MS en el presente trabajo frente a dispersión dinámica de la luz en el trabajo de estos autores.

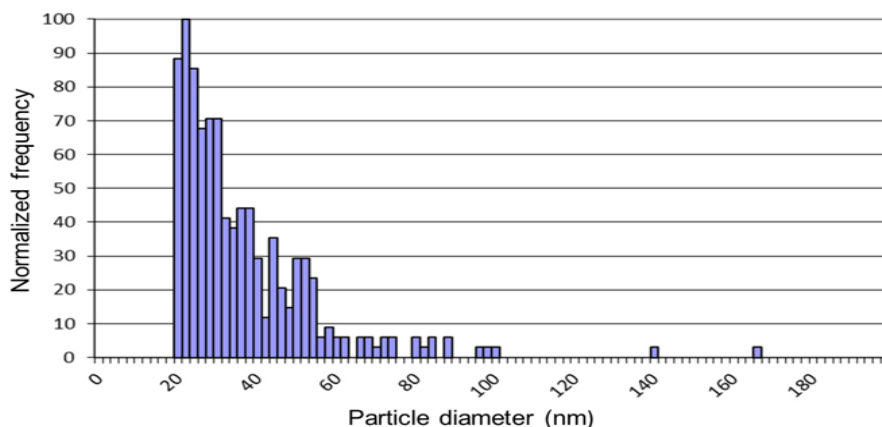


Figura 53. Distribución de tamaños de AgNPs analizadas por SP-ICP-MS.

En la Figura 54a se muestra una micrografía obtenida por TEM en la que se puede apreciar que la mayoría de AgNPs son aproximadamente esféricas y tienen un diámetro medio de entre 20 y 40 nm. La estabilidad de las AgNPs obtenidas frente al tiempo en el medio líquido usado en los ensayos de contacto (agua + 0,005% de Tween 80) fue evaluada por espectrofotometría en la zona del UV-visible (Figura 54b).

La suspensión de AgNPs fue diluida con Tween 80, quedando con un color verdoso-amarillento. La máxima absorción fue observada a 405-409 nm, y el perfil de la curva de absorción permaneció prácticamente invariable al menos durante 30 horas. No se detectaron

hombros atribuibles a la plata en la zona de 350 nm del espectro ni tampoco se observaron depósitos de AgNPs. Las longitudes de onda a las cuales aparece el máximo de absorción se corresponden bien con los valores previamente indicados por Paramelle et al. (2014) para AgNPs con cubierta de citrato y diámetros en torno a 30 nm. El citrato actúa como un agente estabilizante en el proceso de síntesis de AgNPs, y la adición de Tween 80 durante la fase de exposición de las esporas fúngicas también aporta una estabilidad adicional (Kvítec et al., 2008; Li et al., 2012). Sin embargo, se observó un ligero incremento en las absorbancias entre 450 y 550 nm, y una ligera reducción en las absorbancias entre 550 y 750 nm (Figura 54b).

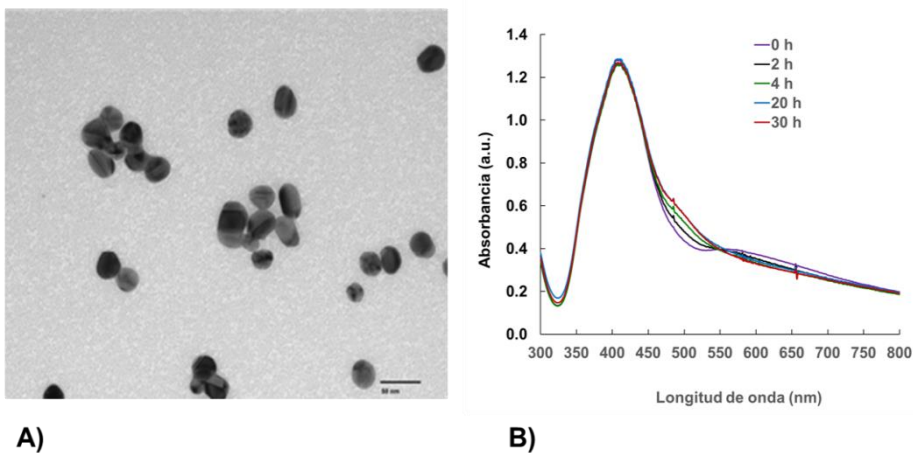


Figura 54. A) Micrografía de las AgNPs analizadas por TEM, B) Espectro UV-Visible de la suspensión de AgNPs en Tween 80 (0,005%) a las 0, 2, 4, 20 y 30 h.

Por tanto, a lo largo del tiempo del ensayo podría ocurrir una ligera agregación de las AgNPs incluso en presencia de Tween 80. Mediante el empleo de la misma prueba aplicada a la suspensión de AgNPs no se detectó la presencia de iones Ag^+ en las suspensiones durante el tiempo de contacto entre las AgNPs y las esporas fúngicas.

Tampoco se vio turbidez en la suspensión que pudiera ser atribuida al ion Ag^+ . Esta ausencia de turbidez se determinó tras la centrifugación de una alícuota de las suspensiones de esporas, toma de una parte de los sobrenadantes y adición a los mismos de una disolución concentrada de NaCl.

La distribución de tamaños, analizados mediante TEM, se puede observar en la Figura 55. El rango de diámetros osciló entre 14 y 100 nm, lo que concuerda con lo visto en la Figura 53, aunque también se observaron diámetros entre 14 y 20 nm. El diámetro promedio fue de 30,9 nm. Los diámetros superiores a 100 nm detectados por la técnica de SP-ICP-MS pueden deberse a la formación de aglomerados de AgNPs de pequeño tamaño.

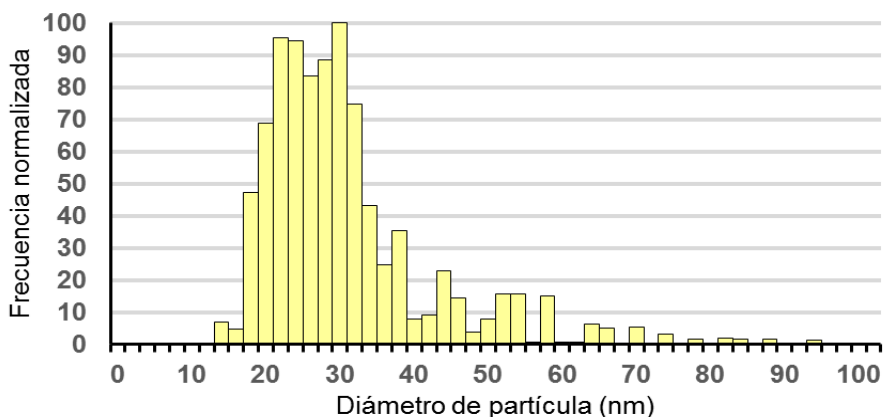


Figura 55. Distribución de tamaños de AgNPs analizadas por TEM.

Hasta ahora, se conoce muy poco acerca de los efectos de las AgNPs en el crecimiento de hongos fitopatógenos y toxigénicos ya que, aunque los trabajos son muy escasos, la mayoría de ellos se han dirigido al estudio de su efectividad en el control del crecimiento de patógenos bacterianos y víricos que afectan a humanos y animales. En esta tesis se evalúa la actividad antifúngica de AgNPs con tamaño en

rango de 14-100 nm frente a las principales especies productoras de AF o de las toxinas T-2 y HT-2 que afectan a cereales y otros cultivos en todo el mundo, así como a los alimentos derivados de ellos. Las especies que se ensayan son *A. flavus* y *A. parasiticus*, productoras de AF, *F. sporotrichioides* y *F. langsethiae*, productoras de las toxinas T-2 y HT-2, y *F. poae*, productora de NIV.

3.5.2. Efecto de las AgNPs en la viabilidad de las esporas

En la Figura 56 se muestra el efecto de la dosis de AgNPs y del tiempo de exposición a las AgNPs en la viabilidad de las esporas fúngicas de las diferentes especies estudiadas en MEM y en las Tablas 21 y 22 se pueden observar las dosis efectivas de AgNPs para reducir/inhibir el número de esporas viables y la tasa de crecimiento radial de las colonias, respectivamente. El ANOVA de los datos indica que se produce un descenso significativo en el número de UFC/mL con el aumento de la dosis de AgNPs, con el aumento del tiempo de exposición de las esporas a las AgNPs, y varía también en relación con las especies fúngicas ($p < 0,0001$). El número de UFC/mL tras el tratamiento también fue dependiente de las interacciones entre estos factores ($p < 0,02$).

El test de Duncan determinó cuatro, tres y tres grupos homogéneos para los factores dosis de AgNPs, tiempo de exposición y especie fúngica, respectivamente (Tabla 23). *A. flavus* y *A. parasiticus* fueron las especies más resistentes al tratamiento con AgNPs, mientras que *F. sporotrichioides* y *F. langsethiae* fueron las más sensibles.

Las dosis efectivas de AgNPs para reducir el número de esporas viables al 50%, 90% y 100% (DE_{50} , DE_{90} y DE_{100}) tras los tratamientos se indican en la Tabla 21.

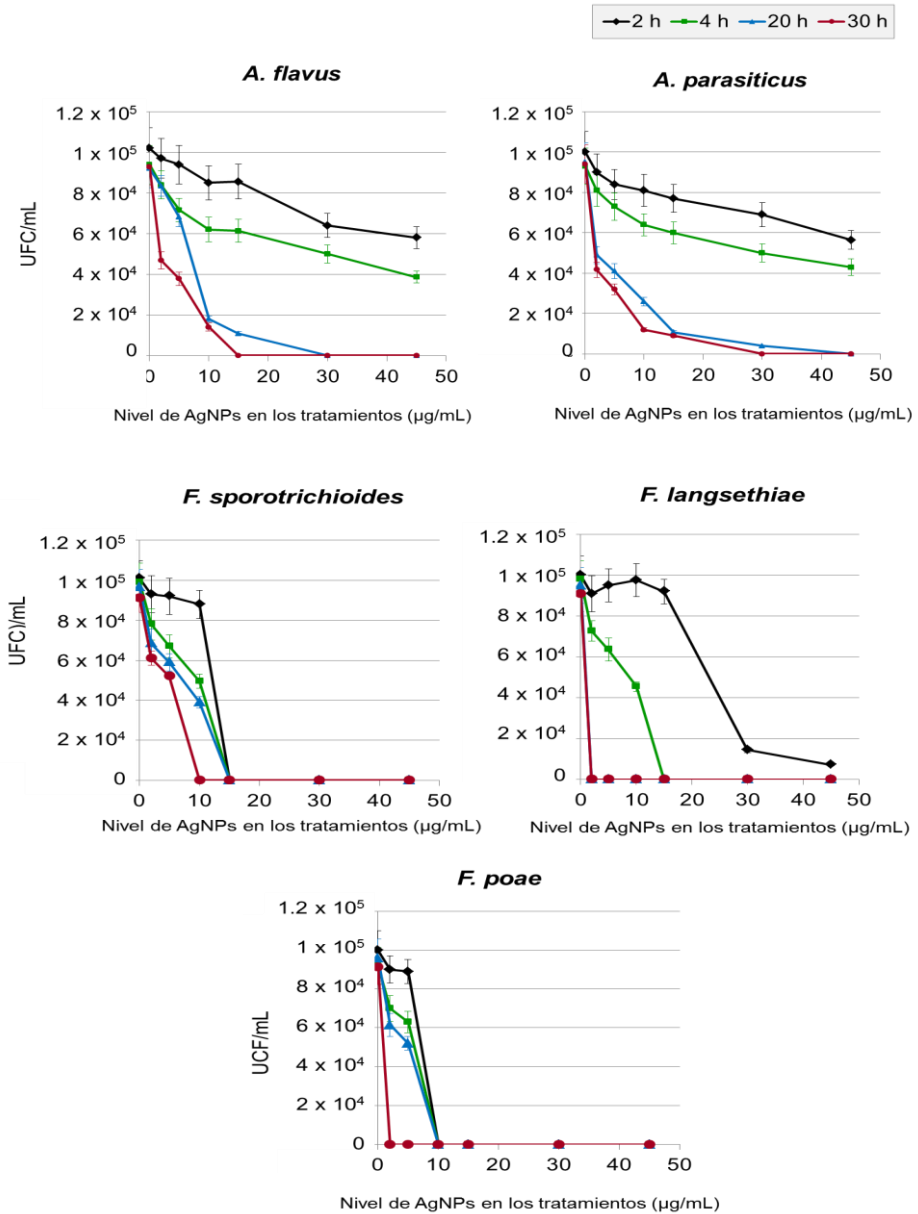


Figura 56. Viabilidad de las esporas de *A. flavus*, *A. parasiticus*, *F. sporotrichioides*, *F. langsethiae* y *F. poae* en MEM tras los tratamientos con las diferentes dosis de AgNPs. Las barras de error representan las desviaciones estándar.

Tabla 21. Dosis efectivas de AgNPs ($\mu\text{g}/\text{mL}$) para reducir el número de esporas viables en MEM en un 50% (DE_{50}), 90% (DE_{90}) y 100% (DE_{100}) con respecto a los controles, tras tratamientos con diferentes tiempos de exposición.

Especie fúngica	Tiempo de contacto AgNPs-esporas fúngicas											
	2 h			4 h			20 h			30 h		
	DE_{50}	DE_{90}	DE_{100}	DE_{50}	DE_{90}	DE_{100}	DE_{50}	DE_{90}	DE_{100}	DE_{50}	DE_{90}	DE_{100}
<i>A. flavus</i>	>45	>45	>45	34,0	>45	>45	7,3	17,0	30,0	2,0	11,7	15,0
<i>A. parasiticus</i>	>45	>45	>45	37,5	>45	>45	2,5	17,7	45,0	1,8	14,5	30,0
<i>F. sporotrichoides</i>	12,2	14,4	15	10,0	14,0	15,0	7,7	13,8	15,0	5,6	9,1	10,0
<i>F. langsethiae</i>	23,2	>45	>45	11,2	14,2	15,0	1,0	1,8	2,0	1,0	1,8	2,0
<i>F. poae</i>	7,2	9,4	10,0	6,3	8,6	10,0	5,4	9,1	10,0	1,0	1,8	2,0

Bajo las condiciones ensayadas, estas dosis efectivas no se pudieron determinar para todas las especies incluidas en el estudio. En particular, esto ocurrió en los tratamientos en los que el tiempo de exposición fue de 2 y 4 horas; en cambio, en los tratamientos con tiempos de exposición de 20 y 30 horas se consiguió determinar los valores de las DE_{50} , DE_{90} y DE_{100} . Estos resultados confirman que el tiempo de exposición es fundamental en la efectividad del tratamiento. Las esporas de *A. parasiticus* y *A. flavus* fueron muy poco susceptibles a los tratamientos. Las dosis de AgNPs necesarias para alcanzar las DE_{50} , DE_{90} y DE_{100} tras 2 horas de contacto son superiores a 45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en ambas especies. Tras 4 horas de contacto, la DE_{50} frente a *A. flavus* fue de 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que las DE_{90} y DE_{100} fueron > 45 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Para *A. parasiticus* las DE fueron 37,5, > 45 y > 45 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Tras 20 horas de contacto las DE_{50} , DE_{90} y DE_{100} para *A. flavus* fueron 7,3, 17,0 y 30,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente, mientras que para *A. parasiticus* fueron 2,5, 17,7 y 45,0, respectivamente. Finalmente, tras 30 horas de contacto las DE_{50} , DE_{90} y DE_{100} para *A. flavus* fueron 2,0, 11,7 y 15,0,

$\mu\text{g/mL}$, respectivamente, mientras que para *A. parasiticus* fueron 1,8, 14,5 y 30,0 $\mu\text{g/mL}$ (Tabla 21). Las dosis efectivas frente a *F. sporotrichioides*, *F. langsethiae* y *F. poae*, como se puede apreciar en la Tabla 21, fueron, por lo general, mucho menores que para los hongos aflatoxigénicos.

3.5.3. Efecto de las AgNPs en el crecimiento de las colonias fúngicas

Para determinar la evolución del crecimiento de la colonia producida a partir del inóculo de esporas de los hongos después de haber sido sometidas a los diferentes tratamientos se sembró una alícuota de los controles y los tratamientos en MEM y se incubó durante 10 días a diferente temperatura, dependiendo de la especie, como se indica en el apartado 2.6.3.

La fase lag fue considerada como el tiempo requerido para que la colonia alcanzase un diámetro de 5 mm. En la Figura 57 se muestran los valores de la fase lag en las diferentes condiciones ensayadas. Como se puede apreciar, los valores de la fase lag variaron entre 1 y 10 días, dependiendo del tratamiento, de la especie fúngica y del tiempo de exposición. El test de Duncan estableció cuatro y tres grupos homogéneos para las concentraciones de AgNPs y las especies fúngicas, respectivamente (Tabla 23). Para el tratamiento estadístico de los datos, la ausencia de crecimiento después de los 10 días de incubación que duró el ensayo se correspondió con una fase lag de 10 días. La dosis de AgNPs, el tiempo de contacto entre la suspensión de AgNPs y las esporas, y la especie fúngica influyeron significativamente en la duración de fase lag ($p < 0,0001$) (Tabla 23). También afectaron significativamente a esta fase las interacciones entre dosis y especie fúngica, y entre especie fúngica y tiempo ($p < 0,005$).

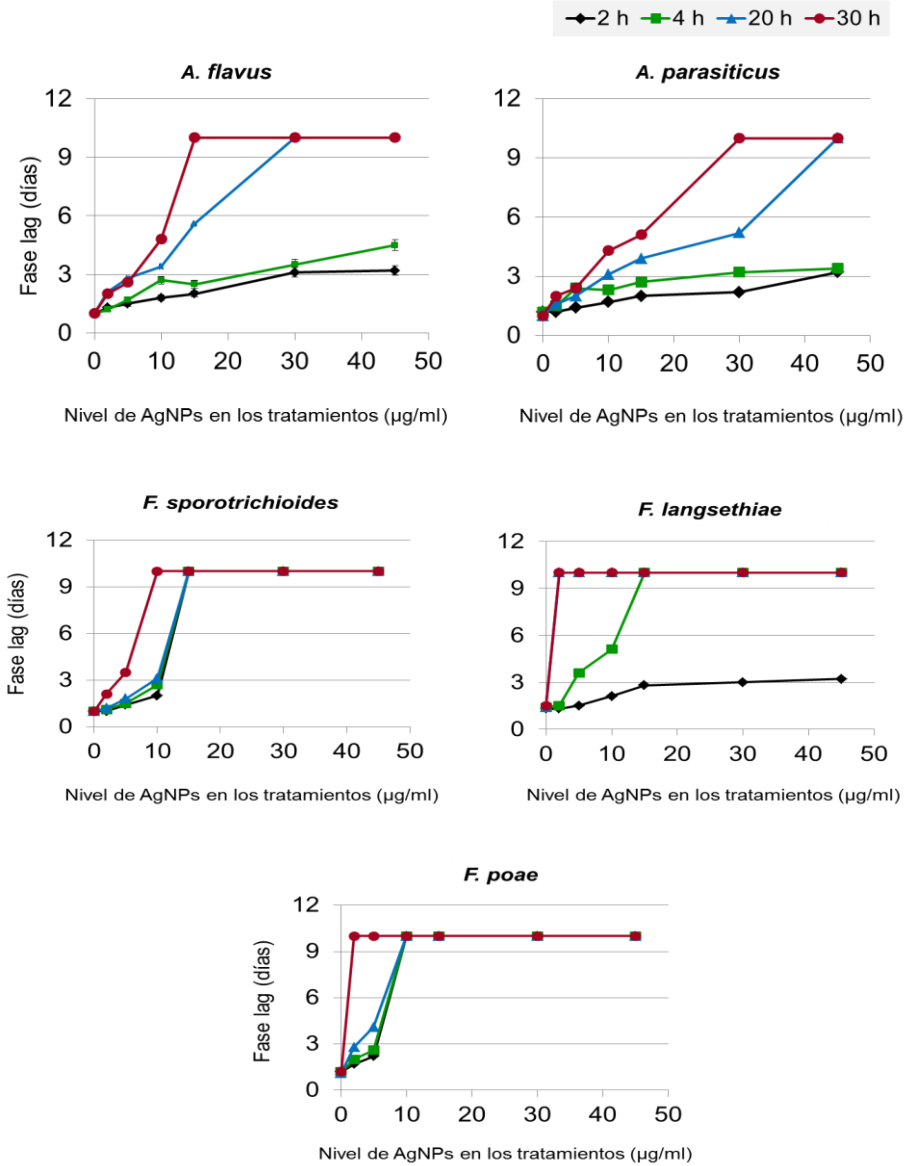


Figura 57. Fase lag (días) de las colonias de *A. flavus*, *A. parasiticus*, *F. sporotrichioides*, *F. langsethiae* y *F. poae* en MEM crecidas a partir de inóculos de esporas no tratadas (controles) y de esporas tratadas con diferentes dosis de AgNPs. Las barras de error no se incluyen debido a su escasa visibilidad.

En la Figura 58 se representa la tasa de crecimiento radial de las colonias frente a la dosis empleada en los respectivos tratamientos. El ANOVA de los datos mostró que los factores dosis de AgNPs, especie fúngica y tiempo de exposición influyeron significativamente en la tasa de crecimiento radial de las colonias ($p < 0,0001$). También se presentaron diferencias significativas en la velocidad de crecimiento de las colonias dependiendo de las interacciones entre los factores especie fúngica y dosis de AgNPs ($p < 0,02$). El test de Duncan estableció tres grupos homogéneos para cada uno de los parámetros analizados (dosis, especie fúngica y tiempo de exposición) (Tabla 23).

Las dosis efectivas DE_{50} , DE_{90} y DE_{100} para conseguir la reducción de la tasa de crecimiento radial o inhibición total del crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus* fueron superiores a 45 $\mu\text{g/mL}$ en los tiempos de exposición de 2 y 4 horas. Con tiempos de exposición de 20 horas estos valores para *A. flavus* fueron 21,7, 28,4 y 30,0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, y para *A. parasiticus* 36,5, 43,3 y 45,0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Tras 30 horas de exposición las dosis efectivas disminuyeron considerablemente siendo para *A. flavus* de 12,0, 14,4 y 15,0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, y para *A. parasiticus* 20,7, 28,1 y 30,0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Para la reducción o inhibición del crecimiento de *F. sporotrichioides*, *F. poae* y *F. langsethiae*, en general, estas dosis fueron más bajas. En los cultivos de las especies del género *Fusarium*, como se puede ver en la Tabla 22, las dosis efectivas se situaron dentro del rango de las concentraciones de AgNPs ensayadas.

En general, se puede concluir que la efectividad de las AgNPs aumenta con el incremento de la dosis con independencia de la especie fúngica. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores con diferentes especies fúngicas a las ensayadas en esta Tesis (Jo et al., 2009; Kim et al., 2009; Min et al., 2009; Park et al., 2006).

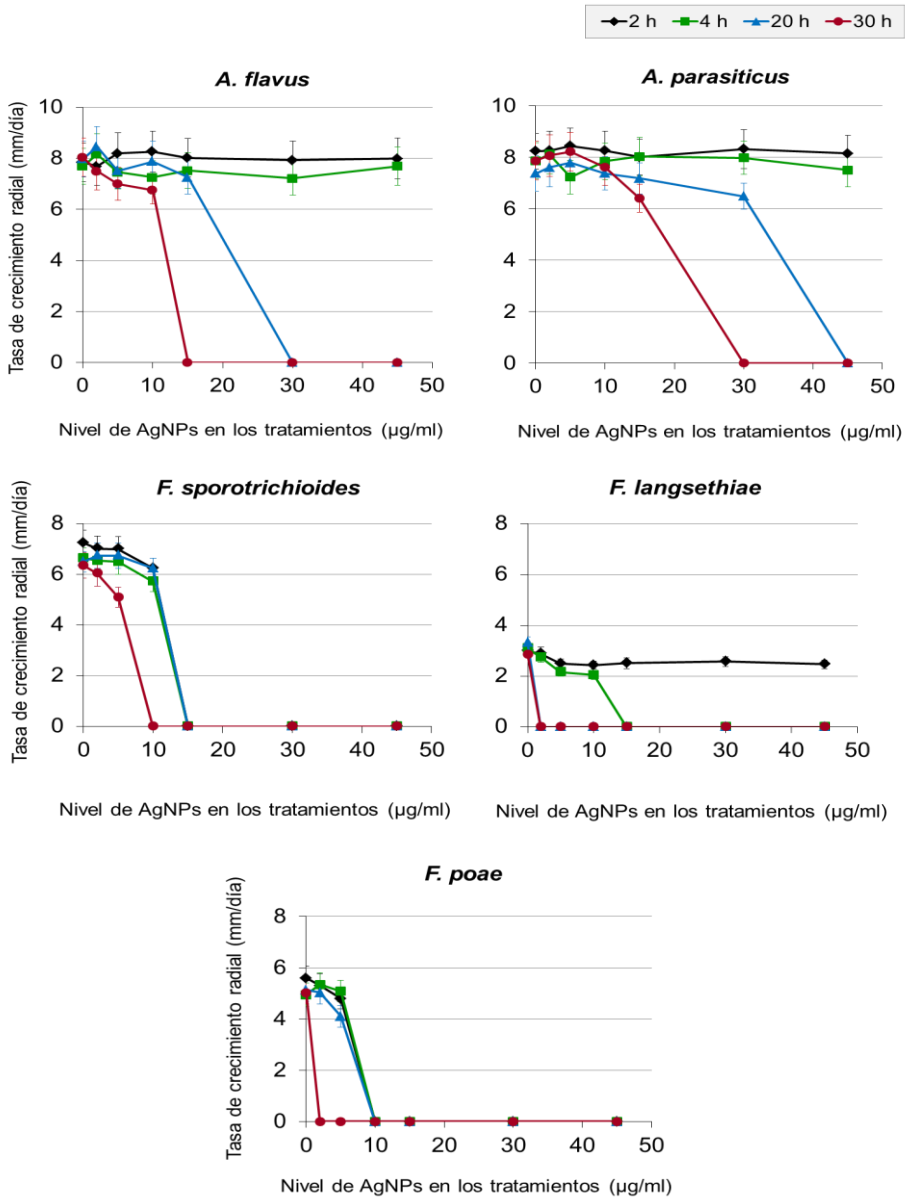


Figura 58. Tasa de crecimiento radial (mm/día) de las colonias de *A. flavus*, *A. parasiticus*, *F. sporotrichioides*, *F. langsethiae* y *F. poae* crecidas en MEM tras los tratamientos con las diferentes dosis de AgNPs. Las barras de error representan las desviaciones estándar.

Tabla 22. Dosis efectivas de AgNPs ($\mu\text{g/mL}$) para reducir la tasa de crecimiento radial de las colonias en MEM en un 50% (DE_{50}), 90% (DE_{90}) y 100% (DE_{100}) con respecto a los controles, tras tratamientos con diferentes tiempos de exposición.

Especie fúngica	Tiempo de contacto AgNPs-esporas fúngicas											
	2 h			4 h			20 h			30 h		
	DE_{50}	DE_{90}	DE_{100}	DE_{50}	DE_{90}	DE_{100}	DE_{50}	DE_{90}	DE_{100}	DE_{50}	DE_{90}	DE_{100}
<i>A. flavus</i>	>45	>45	>45	>45	>45	>45	21,7	28,4	30,0	12,0	14,4	15,0
<i>A. parasiticus</i>	>45	>45	>45	>45	>45	>45	36,5	43,3	45,0	20,7	28,1	30,0
<i>F. sporotrichioides</i>	12,1	13,8	15,0	12,1	14,4	15,0	12,4	14,5	15,0	6,9	9,4	10,0
<i>F. langsethiae</i>	>45	>45	>45	11,2	14,2	15,0	1,0	1,8	2,0	1,0	1,8	2,0
<i>F. poae</i>	7,1	9,4	10,0	7,5	9,5	10,0	7,4	9,5	10,0	1,0	1,8	2,0

Un análisis crítico comparativo entre nuestro trabajo y los de otros autores es difícil debido a la escasez de trabajos en los que se haya estudiado el efecto de AgNPs sobre hongos toxigénicos, a lo que se suma el hecho de que la metodología empleada por los diferentes autores es muy distinta y ciertos factores que influyen en el crecimiento fúngico, como es el nivel de a_w del sustrato, no han sido controlados. Por otra parte, en la mayoría de los estudios previos llevados a cabo con AgNPs, estas han sido incorporadas en el medio de cultivo y, por tanto, en esos ensayos no se ha podido determinar el efecto del tiempo de exposición ni su interacción con las dosis efectivas de AgNPs, lo que es necesario para optimizar y minimizar los niveles de AgNPs para una posible aplicación.

Pese a la escasez de estudios previos sobre el efecto de AgNPs en el crecimiento de hongos productores de micotoxinas y en la biosíntesis de estos metabolitos, los datos encontrados en la bibliografía permiten extraer algunas conclusiones generales. Los

resultados disponibles sugieren que la susceptibilidad de algunos hongos fitopatógenos y/o toxigénicos a las AgNPs depende del tamaño de estas y de las especies. Así, se ha observado que el empleo de AgNPs de pequeño tamaño y bien dispersadas aumenta el efecto antimicrobiano con respecto a AgNPs de mayor tamaño (Hannon et al., 2015; Xiu et al., 2012), lo cual probablemente se deba al aumento de la intensidad con que las nanopartículas pueden adherirse a las hifas fúngicas y a los conidios.

Son varios los autores que han estudiado los efectos de distintos tipos de AgNPs frente a especies del género *Aspergillus* y de la sección *Flavi* en particular. Yassin et al. (2017) estudiaron el efecto de AgNPs en *A. flavus* var. *Columnaris* en medio PDA suplementado con AgNPs de tamaños en el rango de 3-13 nm. En este trabajo los cultivos se incubaron a 28 °C durante 10 días y los diámetros de las colonias se midieron diariamente. Las DE₅₀ y DE₉₀ fueron 224,5 y 4001,8 ppm, respectivamente. También, Al-Othman et al. (2014) ensayaron con el mismo método la efectividad de AgNPs en un rango de tamaños de 5 y 30 nm sobre diferentes cepas de *A. flavus*, en cultivos incubados a 25 °C. Observaron que, con el empleo de una dosis de 150 ppm de AgNPs, obtenían una tasa de inhibición media del crecimiento de las colonias de 86,3%, y de un 8,9% con el empleo de una dosis de 50 ppm. Ismaiel y Tharwat. (2014), mediante ensayos de difusión a partir de pocillos excavados en medio YES, hallaron valores de CMI y CMF de 70 y 120 µg de AgNPs/mL, respectivamente, frente a *A. flavus*.

Posteriormente, Mousavi y Pourtalebi. (2015) determinaron una CMI de 180 µg de AgNPs/mL frente a *A. parasiticus* en caldo de patata y dextrosa. En todos estos estudios los niveles de AgNPs ensayados son mayores que los empleados en nuestro trabajo y, además de ello, se emplean protocolos en los que las AgNPs se incluyen en el propio medio de cultivo. Sin embargo, en nuestro trabajo se realiza un ensayo previo de contacto en medio líquido y, posteriormente, las esporas se transfieren a un medio (MEM) libre de AgNPs donde se evalúa el crecimiento. Este protocolo tiene la ventaja de que si se tratara, por ejemplo, de un envase bioactivo conteniendo AgNPs podría actuar

contra esporas fúngicas dentro y fuera del envase, sin necesidad de contacto físico del envase bioactivo con el alimento.

En otros trabajos (Bocate et al., 2019), se ha determinado la CMI y la CMF de AgNPs frente a *A. flavus* y *A. parasiticus* mediante microdiluciones en caldo e incubación a 30 °C durante 48 horas. Los valores obtenidos para la CMI fueron 8 µg de AgNPs/mL para ambas especies, mientras que la CMF frente a *A. flavus* y *A. parasiticus* fue 64 y 32 µg de AgNPs/mL, respectivamente. Estos resultados concuerdan con los de nuestro estudio.

Otros autores han encontrado valores de CMI muchos más bajos; así, Qian et al. (2013), usando también el método de microdiluciones e incubación de los caldos durante 48 horas a 25 °C, registraron valores de CMI de 0,5 µg de AgNPs/mL frente a *A. flavus*. La comparación de los resultados obtenidos para las especies *F. sporotrichioides*, *F. langsethiae* y *F. poae* con trabajos previos no es posible ya que el presente estudio es el primero que se realiza con estas especies.

Aunque el mecanismo de acción de las AgNPs no está completamente elucidado, algunos autores (Al-Othman et al., 2014) señalan que las AgNPs afectan a las funciones celulares y causan deformación en las hifas fúngicas de *A. flavus*, además de malformaciones, hipertrofia y reducción del número de esporas formadas. Por su parte, Kotzybik et al. (2016) encontraron que las AgNPs de pequeño tamaño (≤ 5 nm) penetran con facilidad en los filamentos del micelio de *P. verrucosum* produciendo aglomerados de plata dentro del citoplasma de las células; sin embargo, esto no se detectó con partículas de mayor tamaño (50-100 nm).

Considerando los resultados obtenidos en nuestro estudio, la intensidad de los efectos de las AgNPs sobre la estructura fúngica y las funciones celulares parece ser diferente en las distintas especies, pero esto deberá ser confirmado en futuras investigaciones.

Tabla 23. Disposición de grupos homogéneos en relación a las dosis de AgNPs, especies fúngicas y tiempos de exposición, con respecto a los efectos de AgNPs sobre la viabilidad de las esporas, la fase lag y la tasa de crecimiento en cultivos en MEM según el procedimiento de comparación múltiple de Duncan.

Factor	Nivel	Viabilidad de esporas			Fase lag			Tasa de crecimiento		
		Mayor →	Menor		Mayor →	Menor		Mayor →	Menor	
Dosis de AgNPs (µg/mL)	0	●					●	●		
	2		●				●	●		
	5		●				●	●		
	10			●		●			●	
	15				●	●				●
	30				●	●				●
	45				●	●				●
Tiempo de exposición (h)	2	●					●	●		
	4		●				●	●		
	20			●		●			●	
	30			●		●			●	
Especie fúngica	<i>A. flavus</i>	●					●	●		
	<i>A. parasiticus</i>	●					●	●		
	<i>F. sporotrichioides</i>			●		●			●	
	<i>F. langsethiae</i>		●	●		●	●			●
	<i>F. poae</i>		●			●				●

En cada columna los niveles que contienen un círculo forman un grupo de medias dentro de los cuales no existen diferencias significativas. Los círculos en la misma fila indican solapamiento.

El tamaño de las AgNPs parece ser decisivo en su posible transferencia y aplicación en el sector agroalimentario. En ensayos de citotoxicidad se ha medido el daño en células humanas de pulmón y se ha determinado que las dosis de 20 y 50 µg de AgNPs/mL (10 nm en diámetro), son tóxicas con independencia de la cubierta de superficie (citrato o polivinilpirrolidona) que posean, mientras que nanopartículas de 40 y 75 nm no lo son (Gliga et al., 2014). Para una misma concentración (mg/mL), si se obtiene con AgNPs de 10 nm se llega a

un total de superficie y concentraciones de partículas (número/mL) del orden de 10 y 1000 veces mayor, respectivamente, que si se obtiene con AgNPs de 100 nm de diámetro. En el primer caso, es mayor la probabilidad y el riesgo de interactuar con biomoléculas circundantes y desencadenar respuestas adversas (Cho et al., 2018). Del mismo modo, Park et al. (2011) encontraron que AgNPs de 4 nm inducían la producción de niveles de ROS y secreción de interleucina-8 por parte de macrófagos mucho mayores que las AgNPs de 20 y 70 nm, lo que fortalece la hipótesis de que el tamaño de partícula puede ser el principal factor que afecte a la toxicidad de las AgNPs. La plata está presente en su forma elemental en el aditivo alimentario E 174 (como polvo de color plateado u hojas pequeñas) autorizado para su uso en alimentos. La Comisión Europea cuenta con especificaciones definidas para el empleo de la plata en este contexto (European Commission, 2012e). De acuerdo con el panel de la Comisión, la caracterización del tamaño de las partículas en el polvo del aditivo E 174 debe ser incluida en las especificaciones.

3.5.4. Efecto de las AgNPs en la producción de micotoxinas

El método optimizado para la determinación de las micotoxinas en los cultivos presenta una recuperación media del 85%, 88%, 77%, 90%, 99%, 96% y 97% para AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, T-2, HT-2 y NIV, respectivamente. Los valores de RSD en los experimentos de recuperación oscilaron entre el 5 y el 9%. Los LOD (ng/g MEM) basados en la relación señal:ruido de 3:1 fue de 0,15, 0,2, 0,2, 0,3, 2, 2 y 20 para AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, T-2, HT-2 y NIV, respectivamente. Los valores de LOQ fueron considerados como 3,3 x LOD. Los cultivos en medio MEM usados para el estudio de la producción de micotoxinas fueron los mismos que se emplearon para el seguimiento del crecimiento de las colonias. Las micotoxinas fueron analizadas al final del periodo de incubación (10 días) y los niveles que

se encontraron estuvieron estrechamente correlacionados con el radio alcanzado por las colonias en ese periodo. En la Figura 59 se muestran los niveles de AF en los cultivos de *A. flavus* y *A. parasiticus* y en la Figura 60 se muestran los niveles de las toxinas T-2 y HT-2 en los cultivos de *F. sporotrichioides* y *F. langsethiae* y de NIV en los cultivos de *F. poae*. En esas figuras se puede observar la concentración de micotoxinas tanto en los cultivos control como en los cultivos tratados con AgNPs. El ANOVA reveló que los factores dosis de AgNPs, tiempo de exposición y especie afectaron significativamente a la producción de AFB1 y AFB2 por *A. flavus* y *A. parasiticus*. Además, las concentraciones de AFG1 y AFG2 en los cultivos de *A. parasiticus* estuvieron también significativamente influidas por el tiempo de exposición y la dosis de AgNPs.

Las interacciones entre la especie fúngica y el tiempo de exposición, y entre la especie fúngica y la dosis de AgNPs también afectaron significativamente a la producción de AFB1 y AFB2. Con respecto a la producción de AFB1 y AFB2 el test de Duncan agrupa las siete dosis de AgNPs de los tratamientos en cinco conjuntos homogéneos con cierta superposición de las concentraciones intermedias y el tiempo de exposición en tres grupos homogéneos (2, 4 y 20-30 horas) (Tabla 24). El ANOVA también determinó un efecto significativo del tiempo de exposición y de la dosis de AgNPs sobre los niveles de AFG1 y AFG2 en los cultivos de *A. parasiticus*. La concentración de AF se correlacionó positivamente con la tasa de crecimiento y negativamente con la fase lag en los cultivos de *A. flavus* y *A. parasiticus*. Las concentraciones muy bajas o indetectables de AF se corresponden con cultivos con fases lag largas y tasa de crecimiento baja o nula. Con respecto a la producción de las toxinas T-2 y HT-2, es muy destacable que dosis de 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o superiores en combinación con tiempos de exposición ≥ 4 horas inhiben totalmente la producción de ambas toxinas. El ANOVA determinó que la dosis de AgNPs, el tiempo de exposición y la especie influyen significativamente en la producción de las toxinas T-2 y HT-2 en los cultivos de *F. sporotrichioides* y *F. langsethiae* ($p < 0,001$) (Tabla 25).

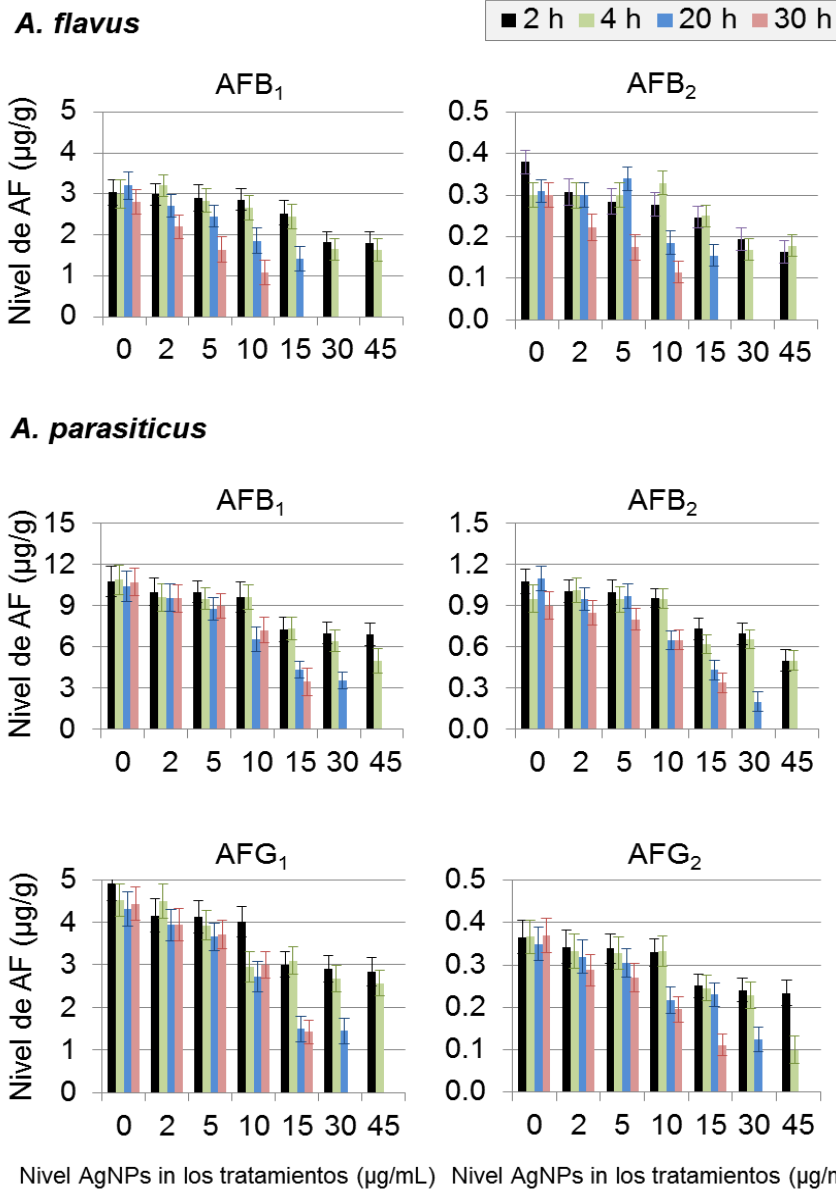


Figura 59. Producción de aflatoxinas ($\mu\text{g/g}$) por *A. flavus* y *A. parasiticus* en los cultivos en MEM tras tratamientos con diferentes dosis de AgNPs. Periodo de incubación: 10 días. Temperatura: 37 °C. Las barras de error representan las desviaciones estándar.

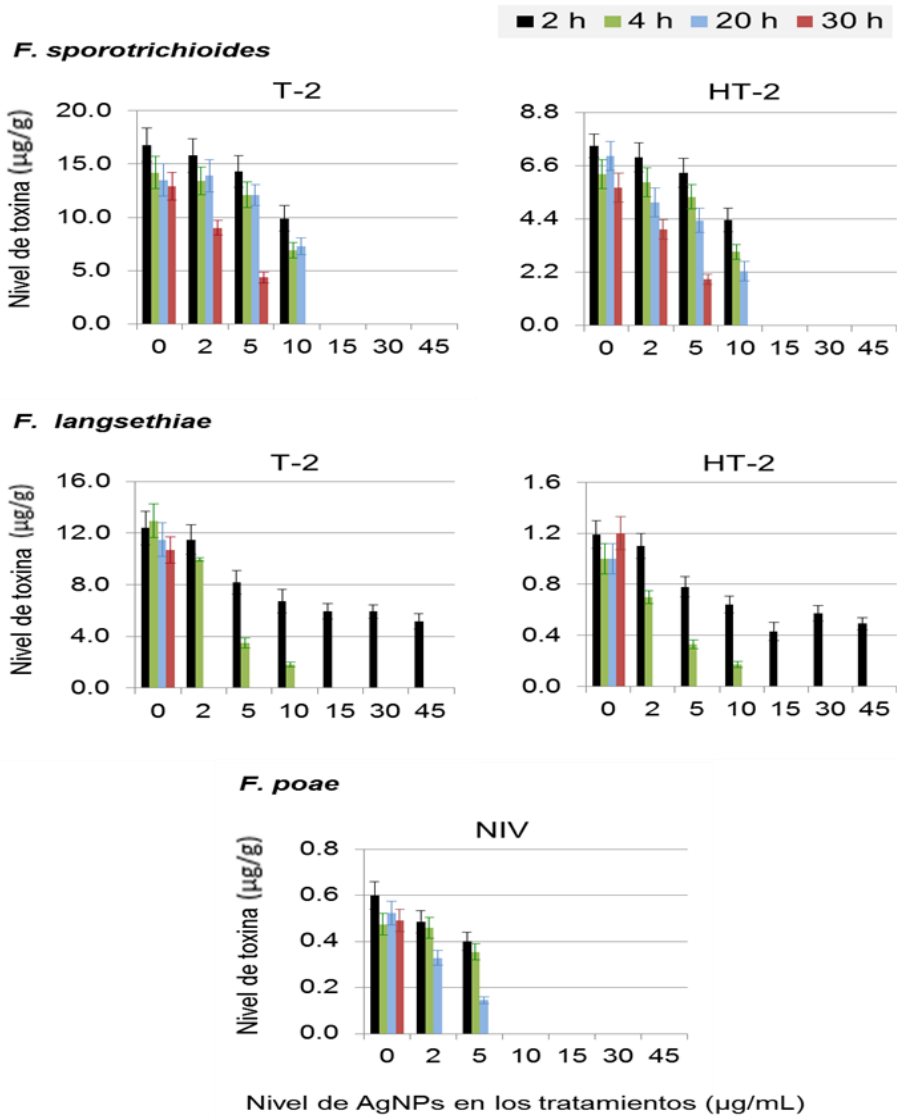


Figura 60. Producción de tricotecenos T-2 y HT-2 por *F. sporotrichioides* y *F. langsethiae*, y de NIV por *F. poae* (µg/g) en MEM tras tratamientos con diferentes dosis de AgNPs. Periodo de incubación: 10 días. Temperatura: 28 °C (*F. sporotrichioides* y *F. poae*) y 25 °C (*F. langsethiae*). Las barras de error representan las desviaciones estándar.

Tabla 24. Disposición de grupos homogéneos en relación a las dosis de AgNPs, tiempos de exposición y especies fúngicas, con respecto a a los efectos de las AgNPs en la acumulación de AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2 en cultivos de *A. flavus* y *A. parasiticus* en MEM según el procedimiento de comparación múltiple de Duncan.

Factor	Nivel	AFB1		AFB2		AFG1		AFG2	
		Mayor →	Menor	Mayor →	Menor	Mayor →	Menor	Mayor →	Menor
Dosis de AgNPs (µg/ml)	0	●		●		●		●	
	2	● ●		● ●		● ●		● ●	
	5		● ●		● ●		● ●		● ●
	10			●		●		●	
	15			●		●		●	
	30		● ●		● ●		● ●		● ●
	45			●		●		●	
Tiempo de exposición (h)	2	●		●		●		●	
	4		●		●		●		●
	20			●		●		●	
	30		●		●		●		●
Especie fúngica	<i>A. flavus</i>	●		●		●		●	
	<i>A. parasiticus</i>	●		●		●		●	

El significado de los círculos es el que se indica en la Tabla 23.

Las interacciones de segundo orden entre estos factores también afectan significativamente ($p < 0,05$) a la producción de las toxinas. En función de la dosis de AgNPs, el test de Duncan estableció cinco y cuatro conjuntos homogéneos en cuanto a la concentración de las toxinas T-2 y HT-2, y en función del tiempo de exposición tres conjuntos homogéneos (Tabla 25). En los cultivos de *F. poae* la dosis de AgNPs influyó significativamente en los niveles de NIV, pero, aunque dichos niveles descendieron con el tiempo de exposición, este factor no fue significativo.

Tabla 25. Disposición de grupos homogéneos en relación a las dosis de AgNPs, tiempos de exposición y especies fúngicas, con respecto a los efectos de las AgNPs en la acumulación de T-2, HT-2 y NIV en cultivos de *F. sporotrichioides*, *F. langsethiae* y *F. poae* en MEM según el procedimiento de comparación múltiple de Duncan.

Factor	Nivel	Micotoxina								
		T-2		HT-2		NIV				
		Mayor	Menor	Mayor	Menor	Mayor	Menor			
Dosis de AgNPs (µg/mL)	0	●				●			●	
	2		●			●	●			●
	5			●			●			●
	10				●		●			●
	15					●		●		●
	30					●		●		●
	45					●		●		●
Tiempo de exposición (h)	2	●				●			●	
	4		●				●		●	
	20		●				●		●	
	30			●			●		●	
Especie fúngica	<i>F. sporotrichioides</i>	●				●				
	<i>F. langsethiae</i>		●				●			
	<i>F. poae</i>								●	

El significado de los círculos es el que se indica en la Tabla 23.

Por tanto, los niveles de micotoxinas encontrados en los cultivos de MEM inoculados con esporas tratadas (empleando diferentes dosis de AgNPs y diferentes tiempos de exposición) están fuertemente relacionados con el tamaño de las colonias en los cultivos correspondientes. A mayor diámetro de la colonia, mayor fue el nivel de micotoxina en el cultivo. Obviamente, el tamaño de las colonias dependió del número de esporas viables en el inóculo, del periodo lag y de la tasa de crecimiento de la colonia de cada especie. Ninguno de los tratamientos probados produjo una estimulación significativa del

crecimiento fúngico o de la biosíntesis de micotoxinas con respecto a los controles.

Por lo tanto, la inhibición total o parcial de la producción de micotoxinas por placa es una consecuencia directa del efecto de las AgNPs sobre las esporas fúngicas. Algunos investigadores (Al-Othman et al., 2014) han encontrado que la inhibición de la producción de AFB1 en cultivos de *A. flavus* en medio líquido suplementado con 50, 100 y 150 ppm de AgNPs osciló entre un 48,2% y un 61,8%, entre un 46,1% y un 82,2% y fue del 100%, respectivamente. Mousavi y Pourtalebi. (2015) también detectaron una inhibición significativa de la biosíntesis de AFB1 con dosis de 90 ppm de AgNPs. Aunque no se conoce con exactitud, a nivel molecular, el mecanismo por el que las nanopartículas afectan a la producción de micotoxinas, en el trabajo de Deabes et al. (2018) se describe que las AgNPs tienen un impacto significativo sobre la expresión del gen *omt-A* (implicado en la biosíntesis de AF) de la cepa ATCC 28542 de *A. flavus*. El conjunto de resultados sugiere que el efecto de las AgNPs en el control de la producción de micotoxinas por hongos filamentosos puede estar ligado al control del crecimiento de los hongos y a alteraciones en la expresión de los genes implicados en las rutas de biosíntesis de las micotoxinas. Nuestros datos, junto con los de otros trabajos como Deabes et al. (2018) y Horky et al. (2018), sugieren que existen tres estrategias principales que pueden ser consideradas en relación con la utilidad de las AgNPs: 1) la inhibición del crecimiento de los mohos, 2) la inhibición de la expresión de los genes vinculados a la biosíntesis de micotoxinas, y 3) la adsorción de micotoxinas. Para confirmar estas hipótesis son necesarios nuevos estudios.

En resumen, los resultados de nuestro estudio permiten concluir que los tratamientos con AgNPs investigados en esta tesis resultan muy efectivos en el control del crecimiento de *A. flavus*, *A. parasiticus*, *F. sporotrichioides*, *F. langsethiae* y *F. poae* y en el control de la producción de las AF, las toxinas T-2 y HT-2 y NIV usando dosis muy bajas y cortos periodos de exposición de las esporas fúngicas a las AgNPs. Las especies más susceptibles a las AgNPs, de entre las

ensayadas en el estudio, son *F. sporotrichioides* y *F. langsethiae*. Las AgNPs, por tanto, podrían tener diferentes aplicaciones si se incluyen en disoluciones de limpieza, por ejemplo, en silos y almacenes de cereales y otros productos agrícolas, o como ingredientes activos en pinturas, films u otros sistemas de envasado útiles en el sector agroalimentario. Podrían ser parte de estrategias para la adecuada gestión de hongos productores de micotoxinas y de micotoxinas en alimentos, de gran repercusión en el ámbito de la seguridad alimentaria, aunque es necesario potenciar la investigación para determinar la posible migración excesiva de nanopartículas a matrices alimentarias.

V. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones de la investigación llevada a cabo durante la realización de esta tesis son las que se exponen a continuación:

Incidencia de especies productoras de aflatoxinas o de las toxinas T-2 y HT-2 en maíz y avena en el periodo 2015-2019

- *A. flavus* fue la especie aflatoxigénica predominante. Esta y *A. parasiticus* presentaron mayor incidencia en las muestras de maíz (86,7%) que en las de avena (79%), mientras que *F. sporotrichioides* y *F. poae* fueron más frecuentes en avena (49%) que en maíz (36,7%). El nivel de contaminación fúngica (UFC/g) dependió del año de la cosecha y fue independiente de la región geográfica.
- El método voltamperométrico diseñado para la identificación de las principales especies productoras de micotoxinas permitió la discriminación a nivel de sección y, en muchos casos, a nivel de especie.

- La concentración total de AF en las muestras, determinada por UPLC/MS/MS, y los recuentos de especies aflatoxigénicas presentaron un coeficiente de correlación de Spearman de 0,65, mientras que los niveles de las toxinas T-2 y HT-2 y los recuentos de *Fusarium* de la sección *Sporotrichiella* mostraron un coeficiente de correlación de 0,83.
- Las toxinas AFB1, AFB2, AFG2, T-2 y HT-2 presentaron concentraciones por encima del LOQ en el 9,2%, 9,2%, 2,0%, 5,1% y 5,1% de las muestras de maíz y en el 5,0%, 1,0%, 2,0 %, 12,0% y 36,0% de las muestras de avena. La AFG1 no se detectó en ninguna muestra.
- El riesgo de AF y de las toxinas T-2 y HT-2 asociado al consumo de maíz y avena españoles es muy bajo. Solo el 3,0% de las muestras de maíz y el 2,0% de las de avena superaron el límite máximo de AF permitido por la legislación de la UE y ninguna de las muestras de avena superó el nivel máximo recomendado de T-2 + HT-2 para avena con cáscara.

Eficacia de los antifúngicos sintéticos y aceites esenciales en disolución acuosa (incluidos en el medio de cultivo) en el control del crecimiento y la producción de micotoxinas por las especies estudiadas

- El antifúngico sintético más efectivo, tanto en el control del crecimiento de *A. flavus* como en la producción de AFB1 y AFB2, fue procloraz seguido de las formulaciones de procloraz + tebuconazol y de tebuconazol. *A. flavus* fue más sensible a todos los tratamientos en los cultivos con a_w de 0,99 que con a_w 0,95 y a 37 °C que a 25 °C.
- Aunque *A. flavus* creció a mayor velocidad a 37 °C que a 25 °C y mejor en medio YES que en granos de maíz, la producción de AFB1 y AFB2 fue mayor en maíz, a 25 °C y a a_w 0,99. El

crecimiento del hongo en maíz se inhibió totalmente en los cultivos con a_w 0,95 a 37 °C.

- La velocidad de crecimiento de *A. parasiticus* fue inferior a la de *A. flavus* ($p < 0,0001$) en todas las condiciones ensayadas. Sin embargo, en condiciones óptimas para la producción de AF por ambas especies (25 °C y a_w 0,99) los niveles de las toxinas fueron significativamente superiores en los cultivos de *A. parasiticus* que en los de *A. flavus*.
- La efectividad del cinamaldehído en el control del crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus* y en el control de la producción de AF, en agar extracto de maíz, fue significativamente superior a la del carvacrol y los aceites esenciales de orégano y canala, siendo el orden CINHO > CAR > ORE > CIN. Dosis de CINHO de 100 mg/L inhibieron totalmente el crecimiento de ambas especies y la producción de AF en todas las condiciones ensayadas.

Efectividad de los films de etileno-alcohol vinílico (EVOH) unidos a AE o sus componentes activos en el control del crecimiento y de la producción de micotoxinas por las especies estudiadas

- Los films de etileno-alcohol vinílico más efectivos en el control del crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus* y en el control de la producción de AF en maíz fueron los de EVOH-CINHO seguidos de EVOH-CAR, EVOH-ORE y EVOH-CIN. Dosis de EVOH-CINHO de 0,25 mg/placa (25 g de maíz) inhibieron totalmente el crecimiento de ambas especies y la producción de las toxinas con independencia del resto de factores estudiados.
- La efectividad de los films de etileno-alcohol vinílico en el control del crecimiento de *F. sporotrichioides* y de la producción de las toxinas T-2 y HT-2 en avena, de mayor a menor, fueron EVOH-CIT seguidos de EVOH-CINHO e EVOH-IEG y EVOH-LIN. Dosis de EVOH-CIT y de EVOH-CINHO entre 1665 y 3330

µg/placa (25 g de avena) inhibieron totalmente el crecimiento y la producción de las toxinas T-2 y HT-2, dependiendo de la temperatura y la a_w .

- La tasa de crecimiento de *F. sporotrichioides* en avena fue mayor a 28 °C que a 20 °C y a 15 °C, pero no resultó afectada por la a_w . Por el contrario, la producción de las toxinas T-2 y HT-2 fue siempre superior a 15 °C que a 20 y a 25 °C y a_w 0,99.
- En condiciones de ligero estrés hídrico, térmico y a bajas dosis de algunos antifúngicos sintéticos, aceites esenciales y componentes puros de aceites esenciales, ocasionalmente, estimularon la producción de las toxinas.

Efectividad de las AgNPs en el control del crecimiento de *A. flavus*, *A. parasiticus*, *F. langsethiae*, *F. sporotrichioides* y *F. poae* y en la producción de AF, toxinas T-2 y HT-2 y nivalenol

- En los tratamientos con AgNPs la dosis y el tiempo de exposición afectaron significativamente a la duración de la fase lag, la viabilidad de las esporas, y la tasa de crecimiento de *A. flavus*, *A. parasiticus*, *F. langsethiae*, *F. sporotrichioides* y *F. poae*, y a la producción de AF y de las toxinas T-2 y HT-2.
- En general, dosis de AgNPs entre 2 y 15 µg/mL, dependiendo del tiempo de exposición (2-30 h) inhibieron totalmente el crecimiento y la producción de micotoxinas en los cultivos de *Fusarium* spp., mientras que en los de las especies aflatoxigénicas este efecto se alcanzó con dosis de entre 15 y 45 µg/mL y tiempos de exposición largos (20 y 30 h).
- En ninguno de los tratamientos con AgNPs se observó estimulación en la producción de micotoxinas.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, H.K., Wilkinson, J., Zablotowicz, R.M., Accinelli, C., Abel, C.A., Bruns, H.A., Weaver, M.A. 2009. Ecology of *Aspergillus flavus*, regulation of aflatoxin production, and management strategies to reduce aflatoxin contamination of corn. *Toxin Reviews* 28, 142–153.
- Abbas, H.K., Zablotowicz, R.M., Locke, M.A. 2004. Spatial variability of *Aspergillus flavus* soil populations under different crops and corn grain colonization and aflatoxins. *Canadian Journal of Botany* 82, 1768–1775.
- Abdel-Hadi, A., Schmidt-Heydt, M., Parra, R., Geisen, R., Magan, N. 2012. A systems approach to model the relationship between aflatoxin gene cluster expression, environmental factors, growth and toxin production by *Aspergillus flavus*. *Journal of the Royal Society Interface* 9, 757–767.
- Agnihotri, S., Mukherji, S., Mukherji, S. 2014. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5-100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *RSC Advances* 4, 3974–3983.
- Agrios, G.N. 2005. *Plant Pathology*, 5th Ed. Burlington, Elsevier, pp. 724–820.

-
- Ahlberg, S.H., Joutsjoki, V., Korhonen, H.J. 2015. Potential of lactic acid bacteria in aflatoxin risk mitigation. *International Journal of Food Microbiology* 207, 87–102.
 - Ahmad, I., Iram, S. 2008. Effect of zero and conventional tillage on the soil mycoflora of rice-wheat cropping system. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 41, 67–74.
 - Ahmad, A., Wei, Y., Syed, F., Tahir, K., Rehman, A.U., Khan, A., Ullah, S., Yuan, Q. 2017. The effects of bacteria-nanoparticles interface on the antibacterial activity of green synthesized silver nanoparticles. *Microbial Pathogenesis* 102, 133–142.
 - Akbar, A., Medina, A., Magan, N. 2016. Impact of climate change factors on growth and ochratoxin A production by *Aspergillus* section *Circumdati* and *Nigri* species on coffee. *World Mycotoxin Journal* 9, 863–874.
 - Al-Bahrani, R.M., Muayad, S., Majeed, A., Owaid, M.N. 2018. Phyto-fabrication, characteristics and anticandidal effects of silver nanoparticles from leaves of *Ziziphus mauritiana* Lam. *Acta Pharmaceutica Scientia* 56, 85–92.
 - Alborch, L., Bragulat, M.R., Castellá, G., Abarca, M.L., Cabañes, F.J. 2012. Mycobiota and mycotoxin contamination of maize flours and popcorn kernels for human consumption commercialized in Spain. *Food Microbiology* 32, 97–103.
 - Aldred, D., Cairns-Fuller, V., Magan, N. 2008. Environmental factors affect efficacy of some essential oils and resveratrol to control growth and ochratoxin A production by *Penicillium verrucosum* and *Aspergillus westerdijkiae* on wheat grain. *Journal of Stored Products Research* 44, 341–346.
 - Allameh, A., Safamehr, A., Mirhadi, S.A., Shivazad, M., Razzaghi-Abyaneh, M., Afshar-Naderi, A. 2005. Evaluation of biochemical and production parameters of broiler chicks fed ammonia treated aflatoxin contaminated maize grains. *Animal Feed Science and Technology* 122, 289–301.

-
- Almeida, M.I., Almeida, N.G., Carvalho, K.L., Gonçalves, G.A.A., Silva, C.N., Santos, E.A., Garcia, J.C., Vargas, E.A. 2012. Co-occurrence of aflatoxins B1, B2, G1 and G2, ochratoxin A, zearalenone, deoxynivalenol, and citreoviridin in rice in Brazil. *Food Additives and Contaminants Part A* 29, 694–703.
 - Al-Othman, M.R., Abd El-aziz, A.R.M., Mahmoud, M.A., Eifan, S.A., El-shikh, M.S. 2014. Application of silver nanoparticles as antifungal and antiaflatoxin B1 produced by *Aspergillus flavus*. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* 9, 151–157.
 - Amiri, A., Dugas, R., Pichot, A.L., Bompeix, G. 2008. *In vitro* and *in vivo* activity of eugenol oil (*Eugenia caryophyllata*) against four important postharvest apple pathogens. *International Journal of Food Microbiology* 126, 13–19.
 - Arroyo, M., Aldred, D., Magan, N. 2005. Environmental factors and weak organic acid interactions have differential effects on control of growth and ochratoxin A production by *Penicillium verrucosum* isolates in bread. *International Journal of Food Microbiology* 98, 223–231.
 - Asghar, M.A., Iqbal, J., Ahmed, A., Khan, M.A. 2014. Occurrence of aflatoxins contamination in brown rice from Pakistan. *Iran Journal of Public Health* 43, 291–299.
 - Astoreca, A., Vaamonde, G., Dalcerro, A., Ramos, A.J., Marín, S. 2012. Modelling the effect of temperature and water activity of *Aspergillus flavus* isolates from corn. *International Journal of Food Microbiology* 156, 60–67.
 - Astoreca, A., Vaamonde, G., Dalcerro, A., Marín, S., Ramos, A.J. 2014. Abiotic factors and their interactions influence on the coproduction of aflatoxin B1 and cyclopiazonic acid by *Aspergillus flavus* isolated from corn. *Food Microbiology* 38, 276–283.
 - Atarés, L., Chiralt, A. 2016. Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. *Trends in Food Science and Technology* 48, 51-62.

-
- Atehnkeng, J., Ojiambo, P.S., Cotty, P.J., Bandyopadhyay, R. 2014. Field efficacy of a mixture of atoxigenic *Aspergillus flavus* Link: Fr vegetative compatibility groups in preventing aflatoxin contamination in maize (*Zea mays L.*). *Biological Control* 72, 62-70.
 - Aucejo, S., Catalá, R., Gavara, R. 2000. Interactions between water and EVOH food packaging films. *Food Science and Technology International* 6, 159-164.
 - Austin, L.A., Kang, B., Yen, C.W., El-Sayed, M.A. 2011. Nuclear targeted silver nanospheres perturb the cancer cell cycle differently than those of nanogold. *Bioconjugate Chemistry* 22, 2324-2331.
 - Ávila-Sosa, R., Palou, E., Jiménez-Munguía, M.T., Nevárez-Moorillón, G.V., Navarro-Cruz, A.R., López-Malo, A. 2012. Antifungal activity by vapor contact of essential oils added to amaranth, chitosan, or starch edible films. *International Journal of Food Microbiology* 153, 66-72.
 - Badii F., Moss M.O. 1988. The effect of the fungicides tridemorph, fenpropimorph and fenarimol on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* Speare. *Letters in Applied Microbiology* 7, 37-39.
 - Baggiani, C., Anfossi, L., Giovannoli, C. 2007. Solid phase extraction of food contaminants using molecular imprinted polymers. *Analytica Chimica Acta* 591, 29-39.
 - Bai, Y., Wang, S., Zhong, H., Yang, Q., Zhang, F., Zhuang, Z., Yuan, J., Nie, X., Wang, S. 2015. Integrative analyses reveal transcriptome-proteome correlation in biological pathways and secondary metabolism clusters in *A. flavus* in response to temperature. *Science Reports* 5, 14582.
 - Bailly, S., El-Mahgubi, A., Carvajal-Campos, A., Lorber, S., Puel, O., Oswald, I.P., Bailly, J-D., Orlando, B. 2018. Occurrence and identification of *Aspergillus* section *Flavi* in the context of the emergence of aflatoxins in French maize. *Toxins* 10, 525.
 - Baker, S., Volova, T., Prudnikova, S.V., Satish, S., Prasad, M.N.N. 2017. Nanoparticles emerging trends and future prospect in

- modern agricultura system. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 53, 10–17.
- Balaguer, M.P., Fajardo, P., Gartner, H., Gómez-Estaca, J., Gavara, R., Almenar, E., Pilar-Hernández, M. 2014. Functional properties and antifungal activity of films based on gliadins containing cinnamaldehyde and natamycin. *International Journal of Food Microbiology* 173, 62-71.
 - Bansal, J., Pantazopoulos, P., Tam, J., Cavlovic, P., Kwong, K., Turcotte, A.M., Lau, B.P.Y., Scott, P.M. 2011. Surveys of rice sold in Canada for aflatoxins, ochratoxin A and fumonisins. *Food Additives and Contaminants Part A* 28, 767-774.
 - Bara, M.T.F., Serrano, S.H.P., Asquiere, E.R., Lúcio, T.C., Gil, E.S. 2008. Medida del potencial anódico en estado sólido: Una herramienta para la determinación del potencial antioxidante de fitoterápicos. *Latin American Journal of Pharmacy* 27, 89-92.
 - Bartoli, A., Maggi, O. 1978. Four new species of *Aspergillus* from Ivory Coast soil. *Transactions of the British Mycological Society* 71, 383–394.
 - Battilani, P., Pietri, A., Bertuzzi, T., Languasco, L., Giorni, P., Kozakiewicz. 2003. Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in grapes grown in Italy. *Journal of Food Protection* 66, 633–636.
 - Battilani, P., Barbano, C., Piva, G. 2008. Aflatoxin B1 contamination in maize related to the aridity index in North Italy. *World Mycotoxin Journal* 1, 449–456.
 - Battilani, P., Rossi, V., Giorni, P., Pietri, A., Gualla, A., van der Fels-Klerx, H.J., Boon, C.J.H., Moretti, A., Logrieco, A., Miglietta, F., Toscano, P., Miraglia, M., De Santis, B., Brera, C. 2012. Scientific report submitted to EFSA. Modelling, predicting and mapping the emergence of aflatoxins in cereals in the EU due to climate change. Question No EFSA-Q-2009-00812.
 - Battilani, P., Camardo-Leggieri, M., Rossi, V., Giorni, P. 2013. AFLA-maize, a mechanistic model for *Aspergillus flavus* infection

and aflatoxin B1 contamination in maize. 2013. *Computers and Electronics in Agriculture* 94, 38–46.

- Battilani, P., Toscano, P., Van der Fels-Klerx, H.J., Moretti, A., Camardo Leggieri, M., Brera, C., Rortais, A., Goumperis, T., Robinson, T. 2016. Aflatoxin B1 contamination in maize in Europe increases due to climate change. *Science Reports* 6, 24328.
- Bbosa, G.S., Kitya, D., Odda, J., Ogwal-Okeng, J. 2013. Aflatoxins metabolism, effects on epigenetic mechanisms and their role in carcinogenesis. *Health* 5 (10A), 21.
- Bellí, N., Marín, S., Sanchis, V., Ramos, A.J. 2006. Impact of fungicides on *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production on synthetic grape-like medium and on grapes. *Food Additives and Contaminants* 23, 1021–1029.
- Bernáldez, V., Córdoba, J.J., Magan, N., Peromingo, B., Rodríguez, A. 2017. The influence of ecophysiological factors on growth, *afIR* gene expression and aflatoxin B₁ production by a type strain of *Aspergillus flavus*. *Food Science and Technology* 83, 283–291.
- Bernhoft, A., Clasen, P.-E., Kristoffersen, A.B., Torp, M. 2010. Less *Fusarium* infestation and mycotoxin contamination in organic than in conventional cereals. *Food Additives and Contaminants Part A* 27, 842–852.
- Bernhoft, A., Torp, M., Clasen, P.-E., Løes, A.-K., Kristoffersen, A.B. 2012. Influence of agronomic and climatic factors on *Fusarium* infestation and mycotoxin contamination of cereals in Norway. *Food Additives and Contaminants Part A* 29, 1129–1140.
- Bertuzzi, T., Rastelli, S., Mulazzi, A., Pietri, A. 2012. Evaluation and improvement of extraction methods for the analysis of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 from naturally contaminated maize. *Food Analytical Methods* 5, 512–519.
- Beti, J.A., Phillips, T.W., Smalley, E.B. 1995. Effects of maize weevils (Coleoptera: Curculionidae) on production of aflatoxin B1 by *Aspergillus flavus* in stored corn. *Journal of Economic Entomology* 88, 1776–1782.

- Bhatti, S.A., Khan, M.Z., Saleemi, M.K., Saqib, M., Khan, A., Ul-Hassan, Z. 2017. Protective role of bentonite against aflatoxin B1 - and ochratoxin A-induced immunotoxicity in broilers. *Journal of Immunotoxicology* 14, 66–76.
- Birzele, B., Meier, A., Hindorf, H., Jramer, J., Dehne, H.W. 2002. Epidemiology of *Fusarium* infection and deoxynivalenol content in winter wheat in the Rhineland, Germany. *European Journal of Plant Pathology* 108, 667–673.
- Blankson, G.K., Mills-Robertson, F.C., Osofu, I.W. 2019. Survey of occurrence levels of aflatoxins in selected locally processed cereal-based foods for human consumption from Ghana. *Food Control* 95, 170–175.
- Bluma, R., Amaiden, M.R., Etcheverry, M. 2008. Screening of Argentine plant extracts: impact on growth parameters and aflatoxin B1 accumulation by *Aspergillus* section *Flavi*. *International Journal of Food Microbiology* 122, 114–125.
- Bluma, R., Etcheverry, M. 2008. Application of essential oils in maize grain: Impact on *Aspergillus* section *Flavi* growth parameters and aflatoxin B1 accumulation. *Food Microbiology* 25, 324–334.
- Bocarov-Stancic, A., Levic, J., Stankovic, S., Tancic, S., Krnjaja, V., Salma, N. 2008. Toxigenic potential of *Fusarium langsethiae* isolates from Serbian wheat kernels. *Cereal Research Communications* 36, 345–346.
- Bocate, K P., Reis, G.F., de Souza, P.C., Oliveira Junior, A.G., Durán, N., Nakazato, G., Furlaneto, M.C., de Almeida, R.S., Panagio, L.A. 2019. Antifungal activity of silver nanoparticles and simvastatin against toxigenic species of *Aspergillus*. *International Journal of Food Microbiology* 291, 79–86.
- Bol, E.K., Araujo, L., Veras, F.F., Welke, J.E. 2016. Estimated exposure to zearalenone, ochratoxin A and aflatoxin B1 through the consume of bakery products and pasta considering effects of food processing. *Food and Chemical Toxicology* 89, 85–91.

-
- Borisade, O.A., Magan, N. 2015. Resilience and relative virulence of strains of entomopathogenic fungi under interactions of abiotic stress. *African Journal of Microbiology Research* 9, 988–1000.
 - Bradburn, N., Coker, R.D., Blunden, G. 1994. The aetiology of turkey “x” disease. *Phytochemistry* 35, 817.
 - Bräse, S., Gläser, F., Kramer, C., Lindner, S., Linsenmeier, A.M., Masters, K.-S., Meister, A.C., Ruff, B.M., Zhong, S. 2013. *The Chemistry of Mycotoxins. Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, Vol. 97. Vienna, Austria, Springer-Verlag.
 - Braun, H., Woitsch, L., Hetzer, B., Geisen, R., Zange, B., Schmidt-Heydt, M. 2018. *Trichoderma harzianum*: Inhibition of mycotoxin producing fungi and toxin biosynthesis. *International Journal of Food Microbiology* 280, 10–16.
 - Buchanan, R.L., Jones S.B., Stahl H.G. 1987. Effect of miconazole on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Mycopathologia* 100, 135–144.
 - Calado, T., Venancio, A., Abrunhosa, L. 2014. Irradiation for mold and mycotoxin control: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 13, 10491061.
 - Calderari, T.O., Iamanaka, B.T., Frisvad, J.C., Pitt, J.I., Sartori, D., Pereira, J.L., Fungaro, M.H.P., Taniwaki, M.H. 2013. The biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* in Brazil nuts: from rainforest to consumer. *International Journal of Food Microbiology* 160, 267–272.
 - Cano-Sancho, G., Valle-Algarra, F.M., Jiménez, M. Burdaspal, P., Legarda, T.M., Ramos, A.J., Sanchis, V., Marín, S. 2011. Presence of trichothecenes and co-occurrence in cereal-based food from Catalonia (Spain). *Food Control* 22, 490–495.
 - Cano-Sancho, G., Perello, G., Nadal, M., Domingo, J.L. 2015. Comparison of the nutritional composition and the concentrations of various contaminants in branded and private label yogurts. *Journal of Food Composition and Analysis* 42, 71–77.

-
- Caporalet, L.R. 1976. Ergotism: the satan loosed in Salem? *Science* 192, 21-26.
 - Carbone, M., Donia, D.T., Sabbatella, G., Antiochia, R. 2016. Silver nanoparticles in polymeric matrices for fresh food packaging. *Journal of King Saud University-Science* 28, 273–279.
 - Carrillo, L. 2003. *Los hongos de los alimentos y forrajes*. Universidad Nacional de Salta. ISBN 978-9381-19-X
 - Carvajal-Moreno, M., Vargas-Ortiz, M., Hernández-Camarillo, E., Ruiz-Velasco, S., Rojo-Callejas, F. 2019. Presence of unreported carcinogens, Aflatoxins and their hydroxylated metabolites, in industrialized Oaxaca cheese from Mexico City. *Food and Chemical Toxicology* 124, 128–138.
 - Cazzaniga, D., Basilico, J.C., Gonzalez, R.J., Torres, R.L., de Greef, D.M. 2001. Mycotoxins inactivation by extrusion cooking of corn flour. *Letters in Applied Microbiology* 33, 144–147.
 - Cerisuelo, J.P., Muriel-Galet, V., Bermúdez, J.M., Aucejo, S., Català, R., Gavara, R., Hernández-Muñoz, P. 2012. Mathematical model to describe the release of an antimicrobial agent from an active package constituted by carvacrol in a hydrophilic EVOH coating on a PP film. *Journal of Food Engineering* 110, 26–37.
 - Chauhan, Y., Tatnell, J., Krosch, S., Karanja, J., Gnonlonfin, B., Wanjuki, I., Wainaina, J., Harvey, J. 2015. An improved simulation model to predict pre-harvest aflatoxin risk in maize. *Field Crops Research* 178, 91–99.
 - Chen, Y., Kong, Q., Liang, Y. 2019. Three newly identified peptides from *Bacillus megaterium* strongly inhibit the growth and aflatoxin B1 production of *Aspergillus flavus*. *Food Control* 95, 41-49.
 - Chitragada, D., Mishra, H.N. 2000. *In vitro* degradation of aflatoxin B1 by horse radish peroxidase. *Food Chemistry* 68, 309–313.
 - Cho, Y.M., Mizuta, Y., Akagi, J.I., Toyoda, T., Sone, M., Ogawa, K. 2018. Size-dependent acute toxicity of silver nanoparticles in mice. *Journal of Toxicologic Pathology* 31, 73–80.

-
- Cigić, I.K., Prosen, H. 2009. An overview of conventional and emerging analytical methods for the determination of mycotoxins. *International Journal of Molecular Sciences* 10, 62–115.
 - Codex Alimentarius (CAC) 2003. Code of practice for the prevention and reduction of mycotoxin contamination in cereals, including annexes on ochratoxin A, zearalenone, fumonisins and trichothecenes. CAC/RCP 51–2003.
 - Coker, R.B. 2000. Aflatoxins and Mycotoxins: Chromatography. En: Wilson, I.D., Adlard, E.R., Cooke, M., Poole, C.F. Eds. *Encyclopedia of Separation Science*, San Diego, CA, Academic Press, pp. 1873–1888.
 - Copetti, M.V., Iamanaka, B.T., Pereira, J.L., Fungaro, M.H., Taniwaki, M.H. 2011. Aflatoxigenic fungi and aflatoxin in cocoa. *International Journal of Food Microbiology* 148, 141–144.
 - Cotty, P.J. 1989. Virulence and cultural characteristics of two *Aspergillus flavus* strains pathogenic on cotton. *Phytopathology* 79, 808–814.
 - Coulombe, R.A. 1994. Nonhepatic disposition and effects of aflatoxin B1. En: Eaton D.L., Groopman J.D. Eds. *The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance.*, San Diego, CA, Academic Press, pp. 89–101.
 - D'Ovidio, K.L., Trucksess, M.W., Devries, J.W., Bean, G. 2007. Effects of irradiation on fungi and fumonisin B1 in corn, and of microwave-popping on fumonisins in popcorn. *Food Additives and Contaminants Part A* 24, 735–743.
 - da Cruz Cabral, L., Fernández-Pinto, V., Patriarca, A., 2013. Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. *International Journal of Food Microbiology* 166, 1–14.
 - da Silva-Ferreira, V., ConzFerreira, M.E., Lima, L.M.T.R., Frasés, S., de Souza, W., Sant'Anna, C. 2017. Green production of microalgae-based silver chloride nanoparticles with antimicrobial activity against

- pathogenic bacteria. *Enzyme and Microbial Technology* 97, 114–121.
- Danmek, K., Prasongsuk, S., Lotrakul, P. 2014. Effect of Avid (R) on the synnema-like formation of *Aspergillus flavus* grown on Czapek médium. *African Journal of Microbiology Research* 5, 2812–2815.
 - Darbre, P.D. 2015. *Endocrine Disruption and Human Health*. Elsevier Science. ISBN 978-0-12-801120-1.
 - de Azeredo, H.M.C. 2013. Antimicrobial nanostructures in food packaging. *Trends in Food Science and Technology* 30, 56–69.
 - Deabes, M.M., Khali, W.K.B., Attalla, A.G., El-Desouky, T.A., Naguib, K.M. 2018. Impact of silver nanoparticles on gene expression in *Aspergillus flavus* producer aflatoxin B1. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences* 6, 600–605.
 - Dean, R., Van Kan, J.A., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D., Rudd, J.J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., Foster, G.D. 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 13, 414–430.
 - Degola, F., Berni, E., Spotti, E., Ferrero, I., Restivo, F.M. 2009. Facing the problem of “false positives”: Re-assessment and improvement of a multiplex RT-PCR procedure for the diagnosis of *A. flavus* mycotoxin producers. *International Journal of Food Microbiology* 129, 300–305.
 - Degola, F., Morcia, C., Bisceglie, F., Mussi, F., Tumino, G., Ghizzoni, R., Pelosi, G., Terzi, V., Buschini, A., Restivo, F.M., Lodi, T. 2015. In vitro evaluation of the activity of thiosemicarbazone derivatives against mycotoxigenic fungi affecting cereals. *International Journal of Food Microbiology* 200, 104–111.
 - Desimoni, E., Brunetti, B. 2015. X-Ray photoelectron spectroscopic characterization of chemically modified electrodes used as chemical sensors and biosensors: A review. *Chemosensors* 3 (2), 70–117.
 - Desjardins, A.E., Hohn, T.M. 1997. Mycotoxins in plant pathogenesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10, 147–152.

-
- Dita-Rodríguez, M.A., Echegoyén-Ramos, P.E., Pérez-Vicente, L.F. 2013. Plan de contingencia ante un brote de la raza 4 tropical de *Fusarium oxysporum* f. spp. *cubense* en un país de la región del OIRSA. ORGANISMO INTERNACIONAL REGIONAL DE SANIDAD AGROPECUARIA (OIRSA). Sanidad Vegetal. San Salvador, El Salvador.
https://www.oirsa.org/contenido/2018/Sanidad_Vegetal/Manuales%20OIRSA%202015-2018/Plan_conting_FOC_R4T_2017-V2-Final-FEB18-2017.pdf
 - Dobolyi, C., Sebók, F., Varga, J., Kocsubé, S., Szigeti, G., Baranyi, N., Szécsi, Á., Tóth, B., Varga, M., Kriszt, B., Szoboszlai, S., Krifaton, C., Kukolya, J. 2013. Occurrence of aflatoxin producing *Aspergillus flavus* isolates in maize kernel in Hungary. *Acta Alimentaria (Acta Aliment Hung)* 42, 451–459.
 - Dohnal, V., Jezkova, A., Jun, D., Kuca, K. 2008. Metabolic pathways of T-2 toxin. *Current Drug Metabolism* 9, 77-82.
 - Doménech-Carbó, A., Doménech-Carbó, M.T., Calisti, M., Maiolo, V. 2010. Sequential identification of organic dyes using the voltammetry of microparticles approach. *Talanta* 81, 404–414.
 - Doménech-Carbó, A., Domínguez, I., Hernández-Muñoz, P., Gavara, R. 2015a. Electrochemical tomato (*Solanum lycopersicum* L.) characterisation using contact probe *in situ* voltammetry. *Food Chemistry* 172, 318–325.
 - Doménech-Carbó, A., Ibars, A.M., Prieto-Mossi, J., Estrelles, E., Scholz, F., Cebrián-Torrejón, G., Martini, M. 2015b. Electrochemistry-based chemotaxonomy in plants using the voltammetry of microparticles. *New Journal of Chemistry* 39, 7421–7428.
 - Doménech-Carbó, A., Villamón, E., Luna, I., Ramos, D., Doménech-Casasús, C., Cebrián-Torrejón, G. 2016. Transmembrane electrochemistry of erythrocytes: Direct electrochemical test for detecting hemolysis in whole blood. *Sensors and Actuators B* 226, 419–428.

-
- Doménech-Carbó, A., del Hoyo-Meléndez, J.M., Doménech-Carbó, M.T., Piquero-Cilla, J. 2017. Electrochemical analysis of the first Polish coins using voltammetry of immobilized particles. *Microchemical Journal* 130, 47–55.
 - Doménech-Carbó, A., Pontones, J.L., Doménech-Casasús, C., Artés, J., Villaroya, S., Ramos, D. 2018. Electrochemical detection and screening of bladder cancer recurrence using direct electrochemical analysis of urine: A non-invasive tool for diagnosis. *Sensors and Actuators B: Chemical* 265, 346–354.
 - Doménech-Carbó, A., Doménech-Carbó, M.T., Castelló-Palacios, A., Guerola-Blay, V., Pérez-Marín, E. 2019. Electrochemical identification of painters/workshops: The case of Valencian Renaissance-Baroque painters (ca. 1550-ca. 1670). *Electrochimica Acta* 297, 685–695.
 - Doménech-Carbó, A. 2020. Voltammetry of immobilized particles for the future. *Journal of Solid State Electrochemistry* 21, 2063–2065.
 - Dorn, B., Forrer, H.R., Schürch, S., Vogelgsang, S. 2009. *Fusarium* species complex on maize in Switzerland: Occurrence, prevalence, impact and mycotoxins in commercial hybrids under natural infection. *European Journal of Plant Pathology* 125, 51–61.
 - Dos-Santos, C.A., Martins-Seckler, M., Ingle, A.P., Gupta, I., Galdiero, S., Galdiero, M., Gade, A., Rai, M. 2014. Silver nanoparticles: therapeutical uses, toxicity, and safety issues. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 103, 1931–1944.
 - Driehuis, F., Spanjer, M.C, Scholten, J.M., Te Giffel, M.C. 2008. Occurrence of mycotoxins in maize, grass and wheat silage for dairy cattle in the Netherlands. *Food Additives and Contaminants Part B* 1, 41–50.
 - Eckard, S., Wettstein, F.E., Forrer, H.R., Vogelgsang, S. 2011. Incidence of *Fusarium* species and mycotoxins in silage maize. *Toxins* 3 (8), 949–967.

- Edwards, S.G. 2009a. *Fusarium* mycotoxin content in UK organic and conventional oats. *Food Additives and Contaminants* 26, 1063–1069.
- Edwards, S.G. 2009b. *Fusarium* mycotoxin content in UK organic and conventional wheat. *Food Additives and Contaminants* 26, 496–506.
- Edwards, S.G. 2009c. *Fusarium* mycotoxin content in UK organic and conventional barley. *Food Additives and Contaminants* 26, 1185–1190.
- Edwards, S.G. 2017. Impact of agronomic and climatic factors on the mycotoxin content of harvested oats in the United Kingdom. *Food Additives and Contaminants Part A* 34, 2230–2241.
- Edwards, S.G., Godley, N.P. 2010. Reduction of *Fusarium* head blight and deoxynivalenol in wheat with early fungicide applications of prothioconazole. *Food Additives and Contaminants Part A* 27, 629–635.
- Edwards, S.G., Anderson, E. 2011. Impact of agronomy on HT-2 and T-2 toxin content of oats. *Plant Breeding and Seed Science* 63, 49–57.
- Edwards, S.G., Imathiu, S.M., Ray, R.V., Back, M., Hare, M.C. 2012. Molecular studies to identify the *Fusarium* species responsible for HT-2 and T-2 mycotoxins in UK oats. *International Journal of Food Microbiology* 156, 168–175.
- Edwards, S., Jennings, P. 2016. Investigation of HT2 and T2 mycotoxins in oats from the 2014 harvest. Project Report No. 555.
- EFSA (European Food Safety Authority) 2007. Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain on a request from the Commission related to the potential increase of consumer health risk by a possible increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pistachios and derived products. *The EFSA Journal* 446, 1–127.

- EFSA (European Food Safety Authority) 2011a. Scientific opinión on the risks for animal and public health related to the presence of T-2 and HT-2 toxin in food and feed. EFSA Journal 9, 2481–2668.
- EFSA (European Food Safety Authority) 2011b. Guidance on the risk assessment of the application of nanoscience and nanotechnology in the food and feed chain. EFSA Journal 9, 2140.
- EFSA (European Food Safety Authority) 2012. Scientific report submitted to EFSA. En: Modelling, predicting and mapping the emergence of aflatoxins in cereals in the EU due to climate change, Question No EFSA-Q-2009-00812. Prepared by Battilani, P. et al. (172 pp).
- EFSA (European Food Safety Authority) 2014. Scientific Opinion on the risks for human and animal health related to the presence of modified forms of certain mycotoxins in food and feed. EFSA Journal 12, 3916.
- EFSA (European Food Safety Authority) 2017a. Scientific opinion on the appropriateness to set a group health based guidance value for T2 and HT2 toxin and its modified forms. EFSA Journal 15, 4655–4707.
- EFSA (European Food Safety Authority), Arcella D, Gergelova P, Innocenti, M.L., Steinkellner, H. 2017b. Scientific report on human and animal dietary exposure to T-2 and HT-2 toxin. EFSA Journal 15, 4972, 57 pp.
- EFSA (European Food Safety Authority) 2019. Safety of an essential oil from *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (Link) Letsw. var. Vulkan when used as a sensory additive in feed for all animal species. EFSA Journal 17, 5794.
- Elbashir, A.A., Ali, S.E.A. 2014. Aflatoxins, ochratoxins and zearalenone in sorghum and sorghum products in Sudan. Food Additives and Contaminants Part B 7, 135–140.
- El-Desouky, T., Sharoba, A., El-Desouky, A., El-Mansy, H., Naguib, K. 2012. Effect of ozone gas on degradation of aflatoxin B1 and

Aspergillus flavus fungal. Journal of Environmental and Analytical Toxicology 2, 1-6.

- El-Kady, I.A., El-Maraghy, S.S.M., Abdel-Mallek, A.Y., Hasan, H.A.H. 1993. Effect of four pesticides on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* IMI 89717. Zentralblatt für Mikrobiologie 148, 549-557.
- Elias-Orozco, R., Castellanos-Nava, A., Gaytan-Martinez, M., Figueroa-Cardenas, J.D., Loarca-Pina, G. 2002. Comparison of nixtamalization and extrusion processes for a reduction in aflatoxin content. Food Additives and Contaminants Part A 19, 878–885.
- El-Shanawani, A.A., Mostafa, M.E., Barakat, A. 2005. Fungal populations and mycotoxins in silage in Assiut and Sohag governorates in Egypt, with a special reference to characteristic *Aspergilli* toxins. Mycopathologia 159, 281–289.
- Escriva, L., Font, G., Manyes, L. 2015. *In vivo* toxicity studies of fusarium mycotoxins in the last decade: A review. Food and Chemical Toxicology 78, 185–206.
- European Commission 1993. Council Regulation (EC) No 315/93 of 8 February 1993 laying down Community procedures for contaminants in food. Official Journal of the European Communities L37, 1–3.
- European Commission 2001. Commission Regulation (EC) No 466/2001 of 8 March 2001 setting maximum levels for certain contaminants in food. Official Journal of the European Communities L77, 1–13.
- European Commission 2004. Regulation (EC) No 1935/2004 of the European Parliament and of the Council of 27 October 2004 on materials and articles intended to come into contact with food and repealing. Directives 80/590/EEC and 89/109/EEC. Official Journal of the European Union L338, 4–17.
- European Commission 2006a. Commission Regulation (EC) No 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling

and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. Official Journal of the European Union L70, 12–34.

- European Commission 2006b. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Official Journal of the European Union L364, 5–24.
- European Commission 2007. Commission Regulation (EC) 1126/2007 of 28 September 2007, amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards *Fusarium* toxins in maize and maize products. Official Journal of the European Union L255, 14–17.
- European Commission 2009a. Commission Regulation (EC) No 415/2009 of 20 May, 2009 amending Directive 2007/68/EC amending Annex IIIa to Directive 2000/13/EC of the European Parliament and of the Council as regards certain food ingredients. Official Journal of the European Union L125, 52–53.
- European Commission 2009b. Commission Regulation (EC) No 450/2009 of 29 May 2009 on active and intelligent materials and articles intended to come into contact with food. Official Journal of the European Union L135, 3–11.
- European Commission 2010a. Commission Regulation (EU) No 105/2010 of 5 February 2010 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards ochratoxin A. Official Journal of the European Union L35, 7–8.
- European Commission 2010b. Commission Regulation (EU) No 165/2010 of 26 February 2010. amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins. Official Journal of the European Union L50, 8.
- European Commission 2012a. Commission Regulation (EU) No 594/2012 of 5 July 2012 amending Regulation (EC) 1881/2006 as regards the maximum levels of the contaminants ochratoxin A, non

dioxin-like PCBs and melamine in foods. Official Journal of the European Union L176, 43–45.

- European Commission 2012b. Commission implementing regulation (EU) No 274/2012 of 27 March 2012 amending Regulation (EC) No 1152/2009 imposing special conditions governing the import of certain foodstuffs from certain third countries due to contamination risk with aflatoxins. Official Journal of the European Union L90, 14–16.
- European Commission 2012c. Commission Recommendation 2012/154/EU of 15 March 2012 on the monitoring of the presence of ergot alkaloids in feed and food. Official Journal of the European Union L77, 20–21.
- European Commission 2012d. Commission regulation (EU) No 1058/2012 of 12 November 2012 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels for aflatoxins in dried figs. Official Journal of the European Union L313, 14–15.
- European Commission 2012e. Commission Regulation (EC) 231/2012 of 9 March 2012 laying down specifications for food additives listed in Annexes II and III to Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council. Official Journal of the European Union L83, 1–216.
- European Commission 2013. Commission Recommendation of 27 March 2013 on the presence of T-2 and HT-2 in cereals and cereal products. Official Journal of the European Union L91, 12–15.
- European Commission 2014. Commission regulation (EU) No 212/2014 of 6 March 2014 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of the contaminant citrinin in food supplements based on rice fermented with red yeast *Monascus purpureus*. Official Journal of the European Union L67, 3–4.
- Faedmaleki, F., Shirazi, F.H., Salarian, A.A., Ashtiani, H.A., Rastegar, H. 2014. Toxicity effect of silver nanoparticles on mice liver primary cell culture and HepG2 cell line. Iranian Journal of Pharmaceutical Research 13, 235–242.

-
- Fahse, L., Papastefanou, P., Otto, M. 2018. Estimating acute mortality of Lepidoptera caused by the cultivation of insect-resistant Bt maize – The LepiX model. *Ecological Modelling* 371, 50–59.
 - Fanelli, F., Schmidt-Heydt, M., Haidukowski, M., Geisen, R., Logrieco, A., Mulè, G. 2012a. Influence of light on growth, fumonisin biosynthesis and FUM1 gene expresión by *Fusarium proliferatum*. *International Journal of Food Microbiology* 153, 148–153.
 - Fanelli, F., Schmidt-Heydt, M., Haidukowski, M., Susca, A., Geisen, R., Logrieco, A., Mulè, G. 2012b. Influence of light on growth, conidiation and fumonisin production by *Fusarium verticillioides*. *Fungal Biology* 116, 241–248.
 - FAO (Food Nutrition and Agriculture) 1991. Food for the Future. FAO 1.
 - FDA (Food and Drug Administration) 2016. Code of Federal Regulations (CFR). Title 21 - Food and Drugs. Chapter I-Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services, Subchapter B-Food for Human Consumption (Continued), Part 182 - Substances Generally Recognized as Safe (GRAS), Subpart A-General Provisions, Subpart 182.20-Essential Oils, Oleoresins, and Natural Extractives. Office of the Federal Register, Washington.
 - Ferri, F., Brera, C., De Santis, B., Fedrizzi, G., Bacci, T., Bedogni, L., Capanni, S., Collini, G., Crespi, E., Debegnach, F., Ferdenzi, P., Gargano, A., Gattei, D., Luberto, F., Magnani, I., Magnani, M.G., Mancuso, P., Menotta, S., Mozzanica, S., Olmi, M., Ombrini, G., Sala, O., Soricelli, S., Vicentini, M., Rossi, P.G. 2017. Survey on urinary levels of aflatoxins in professionally exposed workers. *Toxins* 9, 1–13.
 - Finamore, A., Serena, M., Britti, M.R., Bellovino, D., Gaetani, S., Mengheri, E. 2004. Novel approach for food safety evaluation. Results of a pilot experiment to evaluate organic and conventional foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 7425–7431.

-
- Firdous, S., Ashfaq, A., Khan, S.J., Khan, N. 2014. Aflatoxins in corn and rice sold in Lahore, Pakistan. *Food Additives and Contaminants Part B* 7, 95–98.
 - Fochesato, A.S., Cristofolini, A., Poloni, V.L., Magnoli, A., Merkis, C.I., Dogi, C.A., Cavaglieri, L.R. 2020. Culture medium and gastrointestinal environment positively influence the *Saccharomyces cerevisiae* RC016 cell wall polysaccharide profile and aflatoxin B₁ bioadsorption. *LWT – Food Science and Technology* 126, 109306.
 - Foldbjerg, R., Dang, D.A., Autrup, H. 2011. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A459. *Archives of Toxicology* 85, 743-750.
 - Franco-Molina, M.A., Mendoza-Gamboa, E., Sierra-Rivera, C.A., Gómez-Flores, R.A., Zapata-Benavides, P., Castillo-Tello, P., Alcocer-González, J.M., Miranda-Hernández, D.F., Tamez-Guerra, R.S., Rodríguez-Padilla, C. 2010. Antitumor activity of colloidal silver on MCF-7 human breast cancer cells. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 29, 148–154.
 - Fraser-Smith, S., Czislawski, E., Meldrum, R.A., Zander, M., O'Neill, W., Balali, G.R., Aitken, E.A.B. 2014. Sequence variation in the putative effector gene *SIX8* facilitates molecular differentiation of *Fusarium oxysporum* f. spp. *cubense*. *Plant Pathology* 63, 1044–1052.
 - Fredlund, E., Thim, A.M., Gidlund, A., Brostedt, S., Nyberg, M., Olsen, M. 2009. Moulds and mycotoxins in rice from the Swedish retail market. *Food Additives and Contaminants Part A* 26, 527–533.
 - Fredlund, E., Gidlund, A., Sulyok, M., Börjesson, T., Krska, R., Olsen, M., Lindblad, M. 2013. Deoxynivalenol and other selected *Fusarium* toxins in Swedish oats – Occurrence and correlation to specific *Fusarium* species. *International Journal of Food Microbiology* 167, 276–283.
 - Frisvad, J.C., Skouboe, P., Samson, R.A. 2005. Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B₁, sterigmatocystin and 3-O-

- methyl sterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* spp. nov. Systematic and Applied Microbiology 28, 442–453.
- Frisvad, J.C., Hubka, B., Ezekiel, C.N., Hong, S.-B., Nováková, A., Chen, A.J., Arzanlou, et al. 2019. Taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. Studies in Mycology 93, 1–63.
 - Gagkaeva, T. 2008. Introduction to *Fusarium* taxonomy. Laboratory of Mycology and Phytopathology. All-Russian Institute of Plant Protection. St. Petersburg, Russia.
 - Gams, W., Christensen, M., Onions, A.H.S., Pitt, J.I., Samson, R.A. 1985. Infrageneric taxa of *Aspergillus*. En *Advances in Penicillium and Aspergillus systematics*. Samson, R.A., Pitt, J.I. Eds. New York, Plenum Press. pp. 55–64.
 - García-Cela, E., Gil-Serna, J., Marín, S., Acevedo, H., Patiño, B., Ramos, A.J. 2012. Effect of preharvest anti-fungal compounds on *Aspergillus steynii* and *A. carbonarius* under fluctuating and extreme environmental conditions. International Journal of Food Microbiology 159, 167–176.
 - García-Cela, E., Marín, S., Sanchis, V., Crespo-Sempere, A., Ramos, A.J. 2015. Effect of ultraviolet radiation A and B on growth and mycotoxin production by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus parasiticus* in grape and pistachio media. Fungal Biology 119, 67–78.
 - Gardner, H.K., Koltun, S.P., Dollear, F.G., Rayner, E.T. 1971. Inactivation of aflatoxins in peanut and cottonseed meals by ammoniation. Journal of the American Oil Chemists' Society 48, 70–73.
 - Garmendia, G., Umpierrez-Failache, M., Ward, T.J., Vero, S. 2018. Development of a PCR-RFLP method based on the transcription elongation factor 1- α gene to differentiate *Fusarium graminearum* from other species within the *Fusarium graminearum* species complex. Food Microbiology 70, 28–32.

-
- Garrido, N.S., Iha, M.H., Santos Ortolani, M.R., Duarte Favaro, R.M. 2003. Occurrence of aflatoxins M(1) and M(2) in milk commercialized in Ribeirao Preto-SP, Brazil. *Food Additives and Contaminants* 20, 70–73.
 - Gavrilova, O., Skritnika, A., Gagkaeva, T. 2017. Identification and Characterization of spontaneous auxotrophic mutants in *Fusarium langsethiae*. *Microorganisms* 5, 14.
 - Geiser, D.M. 2008. Sexual structures in *Aspergillus*: morphology, importance and genomics. *Medical Mycology* 12, 1–6.
 - Georgianna, D.R., Payne, G. 2009. Genetic regulation of aflatoxin biosynthesis: from gene to genome. *Fungal Genetics and Biology* 26, 113–125.
 - Gershtater, M.C., Edwards, R. 2007. Regulating biological activity in plants with carboxylesterases. *Plant Science* 173, 579–588.
 - Getachew, A., Chala, A., Hofgaard, I.S., Brurberg, M.B., Sulyok, M., Tronsmo, A.M. 2017. Multimycotoxin and fungal analysis of maize grains from south and southwestern Ethiopia. *Food Additives and Contaminants Part B* 11, 64-74.
 - Ghali, R., Hmaissia-Khlifa, K., Ghorbel, H., Maaroufi, K., Hedii, A. 2008. Incidence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in Tunisian foods. *Food Control* 19, 921–924.
 - Ghali, R., Hmaissia-Khlifa, K., Ghorbel, H., Maaroufi, K., Hedii, A. 2010. Aflatoxin determination in commonly consumed foods in Tunisia. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90, 2347–2351.
 - Ghasain, S.A., Maghsood, A.H. 2012. Infants' exposure to aflatoxin M1 from Mother's breast milk in Iran. *Iranian Journal of Public Health* 41, 119–126.
 - Gil-Serna, J., Vazquez, C., Sardiñas, N., González-Jaén, M.T. Patiño, B. 2009a. Discrimination of the main ochratoxin A-producing species in *Aspergillus* section *Circumdati* by specific PCR assays. *International Journal of Food Microbiology* 136, 83–87.

- Gil-Serna, J., González-Salgado, A., González-Jaén, M.T., Vázquez, C., Patiño, B. 2009b. ITS-based detection and quantification of *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus westerdijkiae* in grapes and Green coffee beans by real-time quantitative PCR. *International Journal of Food Microbiology* 131, 162–167.
- Gil-Serna, J., Mateo, E.M., González-Jaén, M.T., Jiménez, M., Vázquez, C., Patiño, B. 2013. Contamination of barley seeds with *Fusarium* species and their toxins in Spain: An integrated approach. *Food Additives and Contaminants Part A* 30, 372–380.
- Gil-Serna, J., Patiño, B., Cortes, L., González-Jaén, M.T., Vázquez, C. 2015. *Aspergillus steynii* and *Aspergillus westerdijkiae* as potential risk of OTA contamination in food products in warm climates. *Food Microbiology* 46, 168–175.
- Giorni, P., Magan, N., Pietri, A., Berluzzi, T., Battilani, P. 2007. Studies on *Aspergillus* section *Flavi* isolated from maize in northern Italy. *International Journal of Food Microbiology* 113, 330–338.
- Giorni, P., Battilani, P., Pietri, A., Magan, N. 2008. Effect of a_w and CO_2 level on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production in high moisture maize post-harvest. *International Journal of Food Microbiology* 122, 109–113.
- Giusiano, G.E., Piontelli, E., Fernández, M.S., Mangiaterra, M.L., Cattana, M.E., Kocsubé, S., Varga, J. 2017. Biodiversity of species of *Aspergillus* section *Fumigati* in semi-desert soils in Argentina. *Revista Argentina de Microbiología* 49, 247–254.
- Glenn, A.E. 2007. Mycotoxigenic *Fusarium* species in animal feed. *Animal Feed Science and Technology* 137, 213–240.
- Gliga, A.R., Skoglund, S., Wallinder, I.O., Fadeel, B., Karlsson, H.L. 2014. Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: the role of cellular uptake, agglomeration and Ag release. *Particle and Fibre Toxicology* 11, 11.
- Gómez, J.V., Tarazona, A., Mateo-Castro, R., Gimeno-Adelantado, J.V., Jiménez, M., Mateo, E.M. 2018. Selected plant essential oils and their main active components, a promising approach to inhibit

aflatoxigenic fungi and aflatoxin production in food. *Food Additives and Contaminants Part A* 35, 1581–1595.

- Gómez, J.V., Tarazona, A., Mateo, F., Jiménez, M., Mateo, E.M. 2019. Potential impact of engineered nanoparticles in the control of aflatoxins, ochratoxin A and the main aflatoxigenic and ochratoxigenic species affecting foods. *Food Control* 101, 58–68.
- González-Osnaya, L., Cortés, C., Soriano, J. M., Moltó, J. C., Mañes, J. 2011. Occurrence of deoxynivalenol and T-2 toxin in bread and pasta commercialised in Spain. *Food Chemistry* 124, 156–161.
- González-Salgado, A., González-Jaén, T., Vázquez, C., Patiño, B. 2008. Highly sensitive PCR-based detection method specific for *Aspergillus flavus* in wheat flour. *Food Additives and Contaminants* 25, 758–764.
- Görtz, A., Zuehlke, S., Spitteller, M., Steiner, U., Dehne, H., Waalwijk, C., de Vries, I., Oerke, E. 2010. *Fusarium* species and mycotoxin profiles on commercial maize hybrids in Germany. *European Journal of Plant Pathology* 128, 101–111.
- Gottschalk, C., Barthel, J., Engelhardt, G., Bauer, J., Meyer, K. 2007. Occurrence of type A trichothecenes in conventionally and organically produced oats and oat products. *Molecular Nutrition and Food Research* 51, 1547–1553.
- Gottschalk, C., Barthel, J., Engelhardt, G., Bauer, J., Meyer, K. 2009. Simultaneous determination of type A, B and D trichothecenes and their occurrence in cereals and cereal products. *Food Additives and Contaminants Part A* 26, 1273–1289.
- Granados-Chinchilla, F., Molina, A., Chavarría, G., Alfaro-Cascante, M., Bogantes-Ledezma, D., Murillo-Williams, A. 2017. Aflatoxins occurrence through the food chain in Costa Rica: applying the one health approach to mycotoxin surveillance. *Food Control* 82, 217–226.
- Gruber-Dorninger, C., Jenkins, T., Schatzmay, G. 2019. Global mycotoxin occurrence in feed: A ten-year survey. *Toxins*, 11, 375.

- Guo, D., Zhu, L., Huang, Z., Zhou, H., Ge, Y., Ma, W., Wu, J., et al. 2013. Anti-leukemia activity of PVP-coated silver nanoparticles via generation of reactive oxygen species and release of silver ions. *Biomaterials* 34, 7884–7894.
- Guo, D., Zhao, Y., Zhang, Y., Wang, Q., Huang, Z., Ding, Q., Guo, Z., et al. 2014. The cellular uptake and cytotoxic effect of silver nanoparticles on chronic myeloid leukemia cells. *Journal of Biomedical Nanotechnology* 10, 669–678.
- Guo, M., Jin, T.Z., Wang, L., Scullen, O.J., Sommers, C.H. 2014. Antimicrobial films and coatings for inactivation of *Listeria innocua* on ready-to-eat deli turkey meat. *Food Control* 40, 64–70.
- Guo, P., Liu, A., Huang, D., Wu, Q., Fatima, Z., Tao, Y., Cheng, G., et al. 2018. Brain damage and neurological symptoms induced by T-2 toxin in rat brain. *Toxicology Letters* 286, 96–107.
- Gurunathan, S., Lee, K.J., Kalishwaralal, K., Sheikpranbabu, S., Vaidyanathan, R., Eom, S.H. 2009. Antiangiogenic properties of silver nanoparticles. *Biomaterials* 30, 6341–6350.
- Gurunathan, S., Raman, J., Abd-Malek, S.N., John, P.A., Vikineswary, S. 2013a. Green synthesis of silver nanoparticles using *Ganoderma neo-japonicum* Imazeki: a potential cytotoxic agent against breast cancer cells. *International Journal of Nanomedicine* 8, 4399–4413.
- Gurunathan, S., Woong-Han, J., Eppakayala, V., Jeyaraj, M., Kim, J-H. 2013b. Cytotoxicity of biologically synthesized silver nanoparticles in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *BioMed Research International* 2013, 535796–535805.
- Haidukowski, M., Pascale, M., Perrone, G., Pancaldi, D., Campagna, C., Visconti, A. 2005. Effect of fungicide in the development of *Fusarium* head blight, yield and deoxynivalenol accumulation in wheat inoculated under field conditions with *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85, 191–198.

-
- Hammer, K.A., Carson, C.F., Riley, T.V. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology* 86, 985–990.
 - Hammond, B. 2016. The Food Safety Assessment of *Bt* Crops. En: *Genetically Modified Organisms in Food - Production, Safety, Regulation and Public Health*. Watson, R.R. and Preedy, V.R. (Eds). Chapter 39. Academic Press, Elsevier. pp. 443–454.
 - Hannon, J.C., Kerry, J., Cruz-Romero, M., Morris, M., Cummins, E. 2015. Advances and challenges for the use of engineered nanoparticles in food contact materials. *Trends in Food Science and Technology* 43, 43–62.
 - Hardman, J.G., Limbird, L.E., Molinoff, P.B., Ruddon, R.W., Goodman Gilman, A. (Eds). 1996. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*, (9ª Ed). México. McGraw Hill-Interamericana, Vol. 1.
 - Hawksworth, D.L., Kirk, P.M., Sutton, B.C., Pegler, D.N. (Eds). 1995. *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi* (8ª Ed.). Wallingford, Reino Unido, CAB International. 616 pp.
 - Hedayati, M.T., Pasqualotto, A.C., Warn, P.A., Bowyer, P., Denning, D.W. 2007. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology* 153, 1677–1692.
 - Henry, T., Iwen, P.C., Hinrichs, S.H. 2000. Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 1510–1515.
 - Hewitt, A.F. 1998. *Fungicides in plant protection*. Wallingford, Reino Unido CAB International.
 - Hietaniemi, V., Ramo, S., Yli-Mattila, T., Jestoi, M., Peltonen, S., Kartio, M., Sievilainen, E., et al. 2016. Updated survey of *Fusarium* species and toxins in Finnish cereal grains. *Food Additives and Contaminants Part A*, 33, 831–848.
 - Hjelkrem, A.G.R., Aamot, H.U., Brodal, G., Strand, E.C., Torp, T., Edwards, S.G., Dill-Macky, R., Hofgaard, I.S. 2018. HT-2 and T-2 toxins in Norwegian oat grains related to weather conditions at

- different growth stages. *European Journal of Plant Pathology* 151, 501–514.
- Hochstrasser, M. 2016. *Plant Protection Guide PEP*. 2016. DoA Zurich (in German).
 - Hofgaard, I.S., Aamot, H.U., Torp, T., Jestoi, M., Lattanzio, V.M.T., Klemsdal, S.S., Waalwijk, C., et al. 2016. Associations between *Fusarium* species and mycotoxins in oats and spring wheat from farmer's fields in Norway over a six-year period. *World Mycotoxin Journal* 9, 365–378.
 - Hofmann-Antenbrink, M., Grainger, D.W., Hofman, H. 2015. Nanoparticles in medicine: Current challenges facing inorganic nanoparticle toxicity assessments and standardizations. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 11, 1689–1694.
 - Holladay, S.D., Blaylock, B.L., Comment, C.E., Heindel, J.J., Luster, M.I., 1993. Fetal thymic atrophy after exposure to T-2 toxin: selectivity for lymphoid progenitor cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 121, 8–14.
 - Holmquist, G.U., Walter, H.W., Stahr, H.M. 1983. Influence of temperature, pH, water activity and antifungal agents on growth of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Food Science* 48, 778–782.
 - Hope, R., Jestoi, M., Magan, N., Credland, P.F., Armitage, D.M., Bell, C.H., Cogan, P.M., Highley, E. 2002. Multitarget environmental approach for control of growth and toxin production by *Fusarium culmorum* using essential oil and antioxidant. *Advances in Stored Product Protection*, Cambridge, MA, CABI Publishing, pp. 486–492.
 - Hope, R., Cairns-Fuller, V., Aldred, D., Magan, N. 2005. Use of antioxidants and essential oils for controlling mycotoxins in grain. *BCPC International Congress Crop Science and Technology* 5B, 429-436.
 - Horizon 2020. EC, The EU Framework Programme for Research and Innovation.

-
- Horiky, P., Skalickova, S., Baholet, D., Skladanka, J. 2018. Nanoparticles as a solution for eliminating the risk of mycotoxins. *Nanomaterials* 8, 727.
 - Horn, B.W. 2005. Ecology and population biology of aflatoxigenic fungi in soil, En: Abbas, H.K. (Ed.). *Aflatoxin and food safety*. Boca Raton, FL, CRC Press, Taylor and Francis Group, pp. 95–116.
 - Hsu, I.C., Metcalf, A., Sun, T., Welsh, J.A., Wang, N.J., Harris, C.C. 1991. Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature* 350, 427–428.
 - Hu, Y., Zhang, J., Kong, W., Zhao, G., Yang, M. 2017. Mechanisms of antifungal and anti-aflatoxigenic properties of essential oil derived from turmeric (*Curcuma longa* L.) on *Aspergillus flavus*. *Food Chemistry* 220, 1–8.
 - Hua, H., Xing, F., Selvaraj, J.N., Wang, Y., Zhao, Y., Zhou, L., Liu, X., Liu, Y. 2014. Inhibitory effect of essential oils on *Aspergillus ochraceus* growth and ochratoxin A production. *PLoS ONE* 9, e108285.
 - Huy, T.Q., Hien Thanh, N.T., Thuy, N.T., Chung, P.V., Hung, P.N., Le, A.T., Hong Hanh, N.T. 2017. Cytotoxicity and antiviral activity of electrochemical – synthesized silver nanoparticles against poliovirus. *Journal of Virological Methods* 241, 52–57.
 - Iamanaka, B.T., Menezes, H.C., Vicente, E., Leite, R.S.F., Taniwaki, M.H. 2007. Aflatoxigenic fungi and aflatoxins occurrence in sultanas and dried figs commercialized in Brazil. *Food Control* 18, 454–457.
 - IARC (International Agency for Research on Cancer) 1993. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. Vol 56. Lyon, France.
 - IARC (International Agency for Research on Cancer) 2002. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. *Summary of data reported and evaluation, Monograph on the evaluation of carcinogenic risk to humans*. Vol 82. Lyon, France.

-
- ICH 2005. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. International Conference on Harmonization, Q2 (R1), Geneva, 17 pp.
 - Imathiu, S.M., Ray, R.V., Black, M., Hare, M.C., Edwards, S.G. 2017. Agronomic practices influence the infection of an oats cultivar with *Fusarium langsethiae*. Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica 52, 15–27.
 - Infantino, A., Pucci, N. Conca, G., Santori, A. 2007. First report of *Fusarium langsethiae* on durum wheat kernels in Italy. Plant Disease 91, 1362.
 - Inuoye, S., Tsuruoka, M., Watanabe, M., Takeo, A., Akao, M., Nishiyama, Y., Yamaguchi, H. 2000. Inhibitory effect of essential oils on apical growth of *Aspergillus flavus* by vapour contact. Mycoses 43, 17–23.
 - loos, R., Belhadj, A., Menez, M., Faure, A. 2005. The effects of fungicides on *Fusarium spp.* and *Microdochium nivale* and their associated trichothecene mycotoxins in French naturally-infected cereal grains. Crop Protection 24, 894–902.
 - IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change) Climate Change. 2014. Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Core Writing Team, Pachauri, R.K. and Meyer, L.A. (Eds.). Geneva, Switzerland. 151 pp.
 - Iqbal, S.Z., Rabbani, T., Asi, M.R., Jinap, S. 2014. Assessment of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in breakfast cereals. Food Chemistry 157, 257–262.
 - Iqbal, S.Z., Asi, M.R., Hanif, U., Zuber, M., Jinap, S. 2016. The presence of aflatoxins and ochratoxin A in rice and rice products; and evaluation of dietary intake. Food Chemistry 210, 135–140.
 - Iram, W., Anjum, T., Abbas, M., Khan, A.M. 2014. Aflatoxins and ochratoxin A in maize of Punjab, Pakistan. Food Additives and Contaminants Part B 7, 57–62.

-
- Ismaiel, A.A., Tharwat, N.A. 2014. Antifungal activity of silver ion on ultrastructure and production of aflatoxin B1 and patulin by two mycotoxigenic strains, *Aspergillus flavus* OC1 and *Penicillium vulpinum* CM. *Journal de Mycologie Médicale* 24, 193–204.
 - Ivić, D., Sever, Z., Kuzmanovska, B. 2012. *In vitro* sensitivity of *Fusarium graminearum*, *F. avenaceum* and *F. verticillioides* to carbendazim, tebuconazole, flutriafol, metconazole and prochloraz. *Journal Pesticides and Phytomedicine (Belgrade)* 26, 35–42.
 - Janić Hajnal, E., Kos, J., Krulj, J., Krstović, S., Jajić, I., Pezo, L., Šarić, B., Nedeljković, N. 2017. Aflatoxins contamination of maize in Serbia: the impact of weather conditions in 2015. *Food Additives and Contaminants Part A* 34, 1999–2010.
 - Jayashree, T., Subramanyam, C. 1999. Antiaflatoxigenic activity of eugenol is due to inhibition of lipid peroxidation. *Letters in Applied Microbiology* 28, 179–183.
 - Jo, Y.K., Byung, H.K., Geunhwa, J. 2009. Antifungal activity of silver ions and nanoparticles on phytopathogenic fungi. *Plant disease* 10, 1037–1043.
 - Jogee, P.S., Ingle, A.P., Mahendra, R. 2017. Isolation and identification of toxigenic fungi from infected peanuts and efficacy of silver nanoparticles against them. *Food Control* 71, 143–151.
 - Jurado, M., Vázquez, C., Patino, B., González-Jaén, M.T. 2005. PCR detection assays for the trichothecene-producing species *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium poae*, *Fusarium equiseti* and *Fusarium sporotrichioides*. *Systematic and Applied Microbiology* 28, 562–568.
 - Kamika, I., Koto-te-Nyiwa Ngbolua, Tekere, M. 2016. Occurrence of aflatoxin contamination in maize throughout the supply chain in the Democratic Republic of Congo. *Food Control* 69, 292–296.
 - Kandile, N.G., Zaky, H.T., Mohamed, M.I., Mohamed, H.M. 2010. Silver nanoparticles effect on antimicrobial and antifungal activity of new heterocycles. *Bulletin of the Korean Chemical Society* 31, 3530–3538.

- Kara, G.N., Ozbey, F., Kabak, B. 2015. Co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in cereal flours commercialised in Turkey. *Food Control* 54, 275–281.
- Karami-Osboo, R., Mirabolfathy, M., Kamran, R., Shetab-Boushehri, M., Sarkari, S. Aflatoxin B1 in maize harvested over 3 years in Iran. 2012. *Food Control* 23, 271–274.
- Karlovsky, P. 2011. Biological detoxification of the mycotoxin deoxynivalenol and its use in genetically engineered crops and feed additives. *Applied Microbiology and Biotechnology* 91, 491–504.
- Katsurayama, A.M., Martins, L.M., Iamanaka, B.T., Fungaro, M.H.P., Silva, J.J., Frisvad, J.C., Pitt, J.I., Taniwaki, M.H. 2018. Occurrence of *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxins in Brazilian rice: from field to market. *International Journal of Food Microbiology* 266, 213–221.
- Keller, L.A.M., González-Pereyra, M.L., Keller, K.M., Alonso, V.A., Oliveira, A.A., Almeida, T.X., Barbosa, T.S., et al. 2013. Fungal and mycotoxins contamination in corn silage: Monitoring risk before and after fermentation. *Journal of Stored Products Research* 52, 42–47.
- Khan, F.A., Zahoor, M. 2014. *In vivo* detoxification of aflatoxin B1 by magnetic carbon nanostructures prepared from bagasse. *BMC Veterinary Research* 10, 255.
- Khan, F.A., Zahoor, M., Jalal, A., Rahman, A.U. 2016. Green synthesis of silver nanoparticles by using *Ziziphus nummularia* leaves aqueous extract and their biological activities. *Journal of Nanomaterials* 2016, 8026843.
- Khodadadi, F., Panjehkeh, N., Ahmadinejad, M., Aminae, M.M. 2011. Genetic variability of toxigenic and nontoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* by RAPD marker. *Journal of Food Safety* 31, 439–444.
- Kim, S.W., Kim, K.S., Lamsal, K., Kim, Y.J., Kim, S.B., Jung, M., Sim, S.J., et al. 2009. An *in vitro* study of the antifungal effect of silver nanoparticles on oak wilt pathogen *Raffaelea* spp. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 19, 760–764.

-
- Kim, S.W., Jung, J.H., Lamsal, K., Kim, Y.S., Min, J.S., Lee, Y.S. 2012. Antifungal effects of silver nanoparticles (AgNPs) against various plant pathogenic fungi. *Mycobiology* 40, 53–58.
 - Kimanya, M.E., Shirima, C.P., Magoha, H., Shewiyo, D.H., De Meulenaer, B., Kolsteren, P., Gong, Y.Y. 2014. Co-exposures of aflatoxins with deoxynivalenol and fumonisins from maize based complementary foods in Rombo, Northern Tanzania. *Food Control* 41, 76–81.
 - Klich, M.A. 2002. Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter. *Mycologia* 94, 21–27.
 - Klich, M.A. 2007. Review: environmental and developmental factors influencing aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Mycoscience* 48, 71–80.
 - Klich, M.A., Pitt, J.I. 1992. A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. CSIRO Division of Food Processing, North Ryde, Australia.
 - Kogaki, E.A., Natskoulis, P.I., Magan, N., Panagou, E.Z. 2015. Effect of interaction between *Aspergillus carbonarius* and non-ochratoxigenic grape-associated fungal isolates on growth and OTA production at different water activities and temperatures. *Food Microbiology* 46, 521–527.
 - Kokkonen, M., Ojala, L., Parikka, P., Jestoi, M. 2010. Mycotoxin production of selected *Fusarium* species at different culture conditions. *International Journal of Food Microbiology* 143, 17–25.
 - Königs, M., Mulac, D., Schwerdt, G., Gekle, M., Humpf, H-U. 2009. Metabolism and cytotoxic effects of T-2 toxin and its metabolites on human cells in primary culture. *Toxicology* 258, 106–115.
 - Kos, J., Mastilovic, J., Janić-Hajnal, E., Šarić, B. 2013. Natural occurrence of aflatoxins in maize harvested in Serbia during 2009–2012. *Food Control* 34, 31–34.

-
- Kos, J., Levi, J., Đuragić, O., Koki, B., Miladinovi, I. 2014. Occurrence and estimation of M₁ exposure in milk in Serbia. *Food Control* 38, 41–46.
 - Kos, J., Janić-Hajnal, E., Šarić, B., Jovanov, P., Mandić, A., Đuragić, O., Kokić, B. 2018. Aflatoxins in maize harvested in the Republic of Serbia over the period 2012–2016. *Food Additives and Contaminants Part B* 11, 246–255.
 - Kosiak, B., Torp, M., Skjerve, E., Thrane, U. 2007. The prevalence and distribution of *Fusarium* species in Norwegian cereals: a survey. *Acta Agriculturae Scandinavica B – Soil Plant Science* 53, 168–176.
 - Kotzybik, K., Gräf, V., Kugler, L., Stoll, D.A., Greiner, R., Geisen, R., Schmidt-Heydt, M. 2016. Influence of different nanomaterials on growth and mycotoxin production of *Penicillium verrucosum*. *PLoS One* 11, e0150855.
 - Kozakiewickz, Z. 1989. *Aspergillus* species on stored products. CAB International Mycological Institute, Kew, Surrey.
 - Kradin, R.L., Mark, E.J. 2008. The pathology of pulmonary disorders due to *Aspergillus* spp. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 132, 606–614.
 - Krska, R. 1998. Performance of modern sample preparation techniques in the analysis of *Fusarium* mycotoxins in cereals. *Journal of Chromatography A* 815, 49–57.
 - Krska, R., Welzig, E., Berthiller, F., Molinelli, A., Mizaikoff, B. 2005. Advances in the analysis of mycotoxins and its quality assurance. *Food Additives and Contaminants* 22, 345–353.
 - Krska, R., Welzig, E., Boudra, H., 2007. Analysis of *Fusarium* toxins in feed. *Animal Feed Science and Technology* 137, 241–264.
 - Krska, R., Schubert-Ullrich, P., Molinelli, A., Sulyok, M., MacDonald, S., Crews, C. 2008. Mycotoxin analysis: an update. *Food Additives and Contaminants Part A* 25, 152–163.

-
- Kuzdraliński, A., Solarska, E., Mazurkiewicz, J., 2013. Mycotoxin content of organic and conventional oats from south-eastern Poland. *Food Control* 33, 68–72.
 - Kvítek, L., Panáček, A., Soukupová, J., Kolář, M., Večeřová, R., Pruček, R., Holecová, M., Zbořil, R. 2008. Effect of surfactants and polymers on stability and antibacterial activity of silver nanoparticles (NPs). *Journal of Physical Chemistry C* 112, 5825–5834.
 - Lai, X., Liu, R., Ruan, C., Zhang, H., Liu, C. 2015. Occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in rice samples from six provinces in China. *Food Control* 50, 401–404.
 - Langseth, W., Bernhoft, A., Rundberget, T., Kosiak, B., Gareis, M. 1998. Mycotoxin production and cytotoxicity of *Fusarium* strains isolated from Norwegian cereals. *Mycopathologia* 144, 103–113.
 - Lattanzio, V.M., Solfrizzo, M., Visconti, A. 2009. Enzymatic hydrolysis of T-2 toxin for the quantitative determination of total T-2 and HT-2 toxins in cereals. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 395, 1325–1334.
 - Le Ouay, B., Stellacci, F. 2015. Antibacterial activity of silver nanoparticles: A surface science insight. *Nano Today* 10 (3), 339–354.
 - Lee, H.S., Nguyen-Viet, H., Lindahl, J., Thanh, H.M., Khanh, T.N. Hien, L.T.T., Grace, D. 2017. A survey of aflatoxin B1 in maize and awareness of aflatoxins in Vietnam. *World Mycotoxin Journal* 10, 195–202.
 - Lee, J., Her, J.Y., Lee, K.G. 2015. Reduction of aflatoxins (B1, B2, G1, and G2) in soybean-based model systems. *Food Chemistry* 189, 45–51.
 - Lewis, L., Onsongo, M., Njapau, H., Schurz-Rogers, H., Lubber, G., Kieszak, S., Nyamongo, J., et al. 2005. Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicoses in Eastern and Central Kenya. *Environmental Health Perspectives* 113, 1763–1767.

-
- Li, F.Q., Yoshizawa, T., Kawamura, O., Lou, X.Y., Li, Y.W. 2001. Aflatoxins and fumonisins in corn from the high-incidence area for human hepatocellular carcinoma in Guangxi, China. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 4122–4126.
 - Li, H.J., Zhang, A.Q., Hu, Y., Sui, L., Qian, D.J., Chen, M. 2012. Large scale synthesis and self-organization of silver nanoparticles with Tween 80 as a reductant and stabilizer. *Nanoscale Research Letters* 7, 612–625.
 - Lima, R., Seabra, A.B., Durán, N. 2012. Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles. *Journal of Applied Toxicology* 32, 867–879.
 - Lin, L., Zhang, J., Wang, P., Wang, Y., Chen, J. 1998. Thin-layer chromatography of mycotoxins and comparison with other chromatographic methods. *Journal of Chromatography A* 815, 3–20.
 - Liu, X., Guan, X., Xing, F., Lv, C., Dai, X., Liu, Y. 2017. Effect of water activity and temperature on the growth of *Aspergillus flavus*, the expression of aflatoxin biosynthetic genes and aflatoxin production in shelled peanuts. *Food Control* 82, 325–332.
 - Liu, Y., Liu, Y., Liao, N., Cui, F., Park, M., Kim, H-Y. 2015. Fabrication and durable antibacterial properties of electrospun chitosan nanofibers with silver nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules* 79, 638–643.
 - Liu, Y., Wu, F. 2010. Global burden of Aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: a risk assessment. *Environmental Health Perspectives* 118, 818–824.
 - Llorens, A., Hinojo, M.J., Mateo, R., González-Jaén, M.T., Valle-Algarra, F.M., Logrieco, A., Jiménez, M. 2006a. Characterization of *Fusarium* spp. isolates by PCR-RFLPs analysis of the intergenic spacer region of the rRNA gene (rDNA). *International Journal of Food Microbiology* 106, 297-306.
 - Llorens, A., Hinojo, M.J., Mateo, R., Medina, A., Valle-Algarra, F.M., González-Jaén, M.T., Jiménez, M. 2006b. Variability and

characterization of *Fusarium* spp. isolates by mycotoxins analysis and PCR-RFLPs of the IGSrDNA region. *Antonie Van Leeuwenhoek* 89, 465–478.

- Logrieco, A., Bottalico, A., Mulè, G., Moretti, A., Perrone, G. 2003. Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. *European Journal of Plant Pathology* 109, 645–667.
- Loi, M., Fanelli, F., Zucca, P., Liuzzi, V., Quintieri, L., Cimmarusti, M., Monaci, L., Haidukowski, M., Logrieco, A., Sanjust, E., Mulè, G. 2016. Aflatoxin B1 and M1 degradation by *Lac2* from *Pleurotus pulmonarius* and redox mediators. *Toxins* 8, 245.
- López-de-Dicastillo, C., Alonso, J.M., Catalá, R., Gavara, R., Hernández-Muñoz, P. 2010a. Improving the antioxidant protection of packaged food by incorporating natural flavonoids into ethylene-vinyl alcohol copolymer (EVOH) films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 10958–10964.
- López-de-Dicastillo, C., Catalá, R., Gavara, R., Hernández-Muñoz, P. 2011. Food applications of active packaging EVOH films containing cyclodextrins for the preferential scavenging of undesirable compounds. *Journal of Food Engineering* 104, 380–386.
- López-de-Dicastillo, C., Gallur, M., Catalá, R., Gavara, R., Hernández-Muñoz, P. 2010b. Immobilization of beta-cyclodextrin in ethylene-vinyl alcohol copolymer for active food packaging applications. *Journal of Membrane Science* 353, 184–191.
- Lukanowski, A., Lenc, L., Sadowski, C. 2008. First report on the occurrence of *Fusarium langsethiae* isolated from wheat kernels in Poland. *Plant Disease* 92, 488.
- Lundqvist, J., Hellman, B., Oskarsson, A. 2016. Fungicide prochloraz induces oxidative stress and DNA damage *in vitro*. *Food and Chemical Toxicology* 91, 36–41.

-
- Magan, N., Hope, R., Cairns, V., Aldred, D. 2003. Post-harvest fungal ecology: impact of fungal growth and mycotoxin accumulation in stored grain. *European Journal of Plant Pathology* 109, 723–730.
 - Magan, N., Aldred, D. 2007. Environmental fluxes and fungal interactions: Maintaining a competitive edge. En: Van West, P., Avery, S., Stratford, M. (Eds.). *Stress in yeast and filamentous fungi*. Amsterdam, Países Bajos, Elsevier Ltd., pp. 19–35.
 - Magan, N., Medina, A., Aldred, D. 2011. Possible climate-change effects on mycotoxin contamination of food crops pre- and postharvest. *Plant Pathology* 60, 150–163.
 - Magan, N., Medina, A. 2016. Integrating gene expression, ecology and mycotoxin production by *Fusarium* and *Aspergillus* species in relation to interacting environmental factors. *World Mycotoxin Journal* 9, 863–874.
 - Mahdavi, R., Nikniaz, L., Arefhosseini, S.R., Vahed Jabbari, M. 2010. Determination of aflatoxin M1 in breast milk samples in Tabriz-Iran. *Maternal and Child Health Journal* 14, 141–145.
 - Mahuku, G., Nzioki, H.S., Mutegi, C., Kanampiu, F., Narrod, C., Makumbi, D. 2019. Pre-harvest management is a critical practice for minimizing aflatoxin contamination of maize. *Food Control* 96, 219–226.
 - Manouras, A., Malissiova, E. 2018. Occurrence of aflatoxins in compound feeds and feed materials for dairy livestock in Central Greece. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society* 66, 169–176.
 - Manso, S., Cacho-Nerin, F., Becerril, R., Nerín, C. 2013. Combined analytical and microbiological tools to study the effect on *Aspergillus flavus* of cinnamon essential oil contained in food packaging. *Food Control* 30, 370–378.
 - Manso, S., Pezo, D., Gómez-Lus, R., Nerín, C. 2014. Diminution of aflatoxin B1 production caused by an active packaging containing cinnamon essential oil. *Food Control* 45, 101–108.

-
- Malik, A., Ali, S., Shahid, M., Bhargava, R. 2014. Occupational exposure to *Aspergillus* and aflatoxins among food-grain workers in India. *International Journal of Occupational and Environmental Health* 20, 189–193.
 - Maragos, C.M. 2004. Emerging technologies for mycotoxin detection. *Toxin Reviews* 23, 317–344.
 - Marasas, W.F., Yagen, B., Sydenham, E., Combrinck, S., Thiel, P.G. 1987. Comparative yields of T-2 toxin and related trichothecenes from five toxicologically important strains of *Fusarium sporotrichioides*. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 693–696.
 - Marasas, W.F.O., Gelderblom, W.C.A., Shephard, G.S., Vismer, H.F. 2008. Mycotoxins: A global problem. En: Leslie, J.F., Bandyopadhyay, R., Visconti, A (Eds.). *Mycotoxins: Detection methods, management, public health and agricultural trade* Wallingford, Oxfordshire, UK. CABI. pp. 29–40.
 - Margulis, L. 1974. Five-kingdom classification and the origin and evolution of cells. *Evolutionary Biology* 7, 45–78.
 - Margulis, L., Schwartz, K. 1998. *Five kingdoms: an illustrated guide to the phyla of life on earth.* (3rd Ed.). New York, W.H. Freeman and Co.
 - Marín, P., De Ory, A., Cruz, A., Magan, N., González-Jaén, M.T. 2013. Potential effects of environmental conditions on the efficiency of the antifungal tebuconazole controlling *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* growth rate and fumonisin biosynthesis. *International Journal of Food Microbiology* 165, 251–258.
 - Marín, S., Ramos, A.J., Cano-Sancho, G., Sanchis, V. 2012. Reduction of mycotoxins and toxigenic fungi in the Mediterranean basin maize chain. *Phytopathologia Mediterranea*, 93–118.
 - Mart, J., Maloy, C. 1996. An epydemiological analysis of the ten plagues of Egypt. *Caduceus* 12, 7–24.

-
- Martin, C., Schöneberg, T., Vogelgsang, S., Mendes Ferreira, C.S., Morisoli, R., Bertossa, M., Bucheli, T.D., et al. 2018. Responses of oat grains to *Fusarium poae* and *F. langsethiae* infections and mycotoxin contaminations. *Toxins* 10, 47.
 - Martínez-Rocha, A.L., Roncero, M.I.G., López-Ramírez, A., Mariné, M., Guarro, J., Martínez-Cadena, G., Di Pietro, A. 2008. Rho1 has distinct functions in morphogenesis, cell wall biosynthesis and virulence of *Fusarium oxysporum*. *Cellular Microbiology* 10,1339–1351.
 - Martini, M., De Carvalho, L.M., Blasco, A., Doménech-Carbó, A. 2015. Screening and authentication of herbal formulations based on microextraction assisted voltammetry of microparticles. *Analytical Methods* 7, 5740–5747.
 - Martins, L.M., Sant’Ana, A.S., Fungaro, M.H.P., Silva, J.J., Nascimento, M.S., Frisvad, J.C., Taniwaki, M.H. 2017. The biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxins in the Brazilian peanut production chain. *Food Research International* 94, 101–107.
 - Mateo, E.M., Medina, A., Mateo, F., Valle-Algarra, F.M., Pardo, I., Jiménez, M. 2010a. Ochratoxin A removal in synthetic media by living and heat-inactivated cells of *Oenococcus oeni* isolated from wines. *Food control* 21, 23–28.
 - Mateo, E.M., Medina, A., Mateo, R., Jiménez, M. 2010b. Effect of ethanol on the ability of *Oenococcus oeni* to remove ochratoxin A in synthetic wine-like media. *Food Control* 21, 935–941.
 - Mateo, E.M., Valle-Algarra, F.M., Mateo, R., Jiménez, M., Magan, N. 2011a. Effect of fenpropimorph, prochloraz and tebuconazole on growth and production of T-2 and HT-2 toxins by *Fusarium langsethiae* in oat-based medium. *International Journal of Food Microbiology* 151, 289–298.
 - Mateo, E.M., Gil-Serna, J., Patiño, B., Jiménez, M. 2011b. Aflatoxins and ochratoxin A in stored barley grain in Spain and impact of PCR-based strategies to assess the occurrence of aflatoxigenic and

ochratoxigenic *Aspergillus* spp. International Journal of Food Microbiology 149, 118-126.

- Mateo, E.M., Valle-Algarra, F.M., Mateo-Castro, R., Jiménez, M. 2011c. Impact of non-selective fungicides on the growth and production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* and *A. carbonarius* in barley-based medium. Food Additives and Contaminants Part A 28, 86–97.
- Mateo, E.M., Valle-Algarra, F.M., Jiménez, M., Magan, N. 2013. Impact of three sterol-biosynthesis inhibitors on growth of *Fusarium langsethiae* and on T-2 and HT-2 toxin production in oat grain under different ecological conditions. Food Control 34, 521–529.
- Mateo, E.M., Gómez, J.V., Gimeno-Adelantado, J.V., Romera, D., Mateo-Castro, R., Jiménez, M. 2017a. Assessment of azole fungicides as a tool to control growth of *Aspergillus flavus* and aflatoxin B1 and B2 production in maize. Food Additives and Contaminants Part A 34, 1039–1051.
- Mateo, E.M., Gómez, J.V., Domínguez, I., Gimeno-Adelantado, J.V., Mateo-Castro, R., Gavara, R., Jiménez, M. 2017b. Impact of bioactive packaging systems based on EVOH films and essential oils in the control of aflatoxigenic fungi and aflatoxin production in maize. International Journal of Food Microbiology 254, 36–46.
- Mateo, E.M., Gómez, J.V., Montoya, N., Mateo-Castro, R., Gimeno-Adelantado, J.V., Jiménez, M., Doménech-Carbó, A. 2018a. Electrochemical identification of toxigenic fungal species using solid-state voltammetry strategies. Food Chemistry 267, 91–100.
- Mateo, E.M., Gómez, J.V., Romera, D., Tarazona, A., Gimeno-Adelantado, J.V., Mateo-Castro, R., Jiménez, M. 2018b. comparative study of different cereals as substrates for T-2 and HT-2 production by *Fusarium langsethiae*. International Journal of Food Engineering 4, 40–45.
- Mateo, J.J., Mateo, R., Jiménez, M. 2002. Accumulation of type A trichothecenes in maize, wheat and rice by *Fusarium*

- sporotrichioides* isolates under diverse culture conditions. International Journal of Food Microbiology 72, 115-123.
- Matumba, L., van Poucke, C., Ediage, E.N., Jacobs, B., De Saeger, S. 2015. Effectiveness of hand sorting, flotation/washing, dehulling and combinations thereof on the decontamination of mycotoxin-contaminated white maize. Food Additives and Contaminants Part A 32, 960–969.
 - McAlpin, C.E. 2001. An *Aspergillus flavus* mutant produces stipitate sclerotia and synnemata. Mycologia 93, 552–565.
 - McLaughlin, C.S., Vaughan, M.H., Campbell, I.M., Wei, C.M., Stafford, M.E., Hansen, B.S. 1977. Inhibition of protein synthesis by trichothecenes. En: Rodericks, J.V., Hesseltine, C.W., Mehlman, M.A. (Eds.). Mycotoxins in human and health. Park Forest South, IL: Pathotox, pp. 263–275.
 - McKenzie, K.S., Kubena, L.F., Denvir, A.J., Rogers, T.D., Hitchens, G.D., Bailey, R.H., Harvey, R.B., et al. 1998. Aflatoxicosis in turkey poult is prevented by treatment of naturally contaminated corn with ozone generated by electrolysis. Poultry Science 77, 1094–1102.
 - McMaster, G.S., White, J.W., Hunt, L.A., Jamieson, P.D., Dhillon, S.S., Ortiz-Monasterio, J.I. 2008. Simulating the influence of vernalization, photoperiod and optimum temperatura on wheat developmental rates. Annals of Botany 102, 561–569.
 - Medina, A., Mateo, R., López-Ocaña, L., Valle-Algarra, F.M., Jiménez, M. 2005. Study of Spanish grape mycobiota and ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus tubingensis* and other members of *Aspergillus* Section *Nigri*. Applied and Environmental Microbiology 71, 4696–4702.
 - Medina, A., Mateo, R., Valle-Algarra, F.M., Mateo, E.M., Jiménez, M. 2007a. Effect of carbendazim and physicochemical factors on the growth and ochratoxin A production of *Aspergillus carbonarius* isolated from grapes. International Journal of Food Microbiology 119, 230–235.

-
- Medina, A., Jiménez, M., Mateo, R., Magan, N. 2007b. Natamycin efficacy for control of growth and ochratoxin production by *Aspergillus carbonarius* isolates under different environmental regimes. *Journal of Applied Microbiology* 103, 2234–2239.
 - Medina, A., Magan, N. 2010. Comparisons of water activity and temperature impacts on growth of *Fusarium langsethiae* strains from northern Europe on oat-based media. *International Journal of Food Microbiology* 142, 365–369.
 - Medina, A., Valle-Algarra, F.M., Jiménez, M., Magan, N. 2010. Different sample treatment approaches for the analysis of T-2 and HT-2 toxins from oats-based media. *Journal of Chromatography B* 878, 2145–2149.
 - Medina, A., Magan, N., 2011. Temperature and water activity effects on production of T-2 and HT-2 by *Fusarium langsethiae* strains from north European countries. *Food Microbiology* 28, 392–398.
 - Medina, A., Rodríguez, A., Sultan, Y., Magan, N. 2015. Climate change factors and *A. flavus*: effects on gene expression, growth and aflatoxin production. *World Mycotoxin Journal* 8, 171–179.
 - Medina, A., González-Jartín, J.M., Sainz, M.J. 2017. Impact of global warming on mycotoxins. *Current Opinion in Food Science* 18, 76–81.
 - Mehl, H.L., Jaime, R., Callicott, K.A., Probst, C., Garber, N.P., Ortega-Beltran, A., Grubisha, L.C., Cotty, P.J. 2012. *Aspergillus flavus* diversity on crops and in the environment can be exploited to reduce aflatoxin exposure and improve health. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1273, 7–17.
 - Meissonnier, G.M., Raymond, I., Laffitte, J., Cossalter, A.M., Pinton, P., Benoit, E., Bertin, G., et al. 2009. Dietary glucomannan improves the vaccinal response in pigs exposed to aflatoxin B1 or T-2 toxin. *World Mycotoxin Journal* 2, 161–172.
 - Méndez-Albores, A., Martínez-Bustos, F., Gaytan-Martinez, M., Moreno-Martinez, E. 2008. Effect of lactic and citric acid on the

- stability of B-aflatoxins in extrusion-cooked sorghum. *Letters in Applied Microbiology* 47, 1–7.
- Meyer, V., Wu, B., Ram, A.F.J. 2011. *Aspergillus* as a multi-purpose cell factory: current status and perspectives. *Biotechnology Letters* 33, 469–476.
 - Miller, J.D. 2008. Mycotoxins in small grains and maize: old problems, new challenges. *Food Additives and Contaminants* 25, 219–230.
 - Miller, N., Miller, C. 2000. *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*. 4th edition, Upper Saddle River, NJ, US, Prentice Hall.
 - Min, J.S., Kim, K.S., Kim, S.W., Jung, J.H., Lamsal, K., Kim, S.B., Jung, M.Y., Lee, Y.S. 2009. Effects of colloidal silver nanoparticles on sclerotium-forming phytopathogenic fungi. *The Plant Pathology Journal* 25, 376–380.
 - Mngqawa, P., Shephard, G.S., Green, I.R., Ngobeni, S.H., de Rijk, T.C., Katerere, D.R. 2016. Mycotoxin contamination of home-grown maize in rural northern South Africa (Limpopo and Mpumalanga Provinces). *Food Additives and Contaminants Part B* 9, 38–45.
 - Modirsanei, M., Mansoori, B., Khosravi, A.R., Kiaei, M.M., Khazraeinia, P., Farkhoy, M., Masoumi, Z. 2008. Effect of diatomaceous earth on the performance and blood variables of broiler chicks during experimental aflatoxicosis. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88, 626–632.
 - Mohale, S., Rodriguez, A., Medina, A., Sulyok, M., Magan, N. 2013. Mycotoxigenic fungi and mycotoxins associated with stored maize from different regions of Lesotho. *Mycotoxin Research* 29: 209–219.
 - Moretti, A., Pascale, M., Logrieco, A.F. 2019. Mycotoxin risks under a climate change scenario in Europe. *Trends in Food Science and Technology* 84, 38–40.
 - Moss, M.O. 2002. Risk assessment for aflatoxins in foodstuffs. *International Biodeterioration and Biodegradation* 50, 137–142.

-
- Mousa, W., Ghazali, F.M., Jinap, S., Ghazali, H.M., Radu, S. 2011. Modelling the effect of water activity and temperature on growth rate and aflatoxin production by two isolates of *Aspergillus flavus* on paddy. *Journal of Applied Microbiology* 111, 1262–1274.
 - Mousavi, S.A.A., Pourtalebi, S. 2015. Inhibitory effects of silver nanoparticles on growth and aflatoxin B1 production by *Aspergillus parasiticus*. *Iranian Journal of Medical Sciences* 40, 501–506.
 - Mudili, V., Siddahi, C.N., Nagesh, M., Garapati, P., Naveen Kumar, K., Murali, H.S., Yli, M.T., Batra, H.V. 2014. Mould incidence and mycotoxin contamination in freshly harvested maize kernels originated from India. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94, 2674–2683.
 - Müllenborn, C., Steiner, U., Ludwig, M., Oerke, E-C. 2008. Effect of fungicides on the complex of *Fusarium* species and saprophytic fungi colonizing wheat kernels. *European Journal of Plant Pathology* 120, 157–166.
 - Murashiki, T.C., Chidewe, C., Benhura, M.A., Maringe, D.T., Dembedza, M.P., Manema, L.R., Mvumi, B.M., Nyanga, L.K. 2017. Levels and daily intake estimates of aflatoxin B1 and fumonisin B1 in maize consumed by rural households in Shamva and Makoni districts of Zimbabwe. *Food Control* 72, 105–109.
 - Muri, S.D., Van der Voet, H., Boon, P.E., Van Klaveren, J.D., Brüsweiler, B.J. 2009. Comparison of human health risks resulting from exposure to fungicides and mycotoxins via food. *Food and Chemical Toxicology* 47, 2963–2974.
 - Muriel-Galet, V., López-Carballo, G., Gavara, R., Hernández-Muñoz, P. 2012. Antimicrobial food packaging film based on the release of LAE from EVOH. *International Journal of Food Microbiology* 157, 239–244.
 - Muriel-Galet, V., Cerisuelo, J.P., López-Carballo, G., Aucejo, S., Gavara, R., Hernández-Muñoz, P. 2013. Evaluation of EVOH-coated PP films with oregano essential oil and citral to improve the shelf-life of packaged salad. *Food Control* 30, 137–143.

-
- Muriel-Galet, V. 2014. Tesis Doctoral. Novel antimicrobial films based on ethylene-vinyl alcohol copolymers for food packaging application. Universitat Politècnica de València.
 - Nakazato, M., Morozumi, S., Saito, K., Fujinuma, K., Nishima, T., Kasai, N. 1990. Interconversion of aflatoxin B₁ and aflatoxicol by several fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 1465–1470.
 - Nasri, T., Hedayati, M.T., Abastabar, M., Pasqualotto, A.C., Taghizadeh-Armaki, M., Hoseinnejad, A., Nabili, M. 2015. PCR-RFLP on β -tubulin gene for rapid identification of the most clinically important species of *Aspergillus*. *Journal of Microbiological Methods* 117, 144–147.
 - Nayak, D., Minz, A.P., Ashe, S., Rauta, P.R., Kumari, M., Chopra, P., Nayak, B. 2016. Synergistic combination of antioxidants, silver nanoparticles and chitosan in a nanoparticle based formulation: characterization and cytotoxic effect on MCF-7 breast cancer cell lines. *Journal of Colloid and Interface Science* 470, 142–152.
 - Nazari, L., Pattori, E., Terzi, V., Morcia, C., Rossi, V. 2014. Influence of temperature on infection, growth, and mycotoxin production by *Fusarium langsethiae* and *F. sporotrichioides* in durum wheat. *Food Microbiology* 39, 19–26.
 - Nazari, L., Manstretta, V., Rossi, V. 2016. A non-linear model for temperature-dependent sporulation and T-2 and HT-2 production of *Fusarium langsethiae* and *Fusarium sporotrichioides*. *Fungal Biology* 120, 562–571.
 - Nazir, S., Muhammad, I., Mazhar, K., Muazzam, A., Ismail, M. 2011. Novel and cost-effective green synthesis of silver nano particles and their in vivo antitumor properties against human cancer cell lines. *Journal of Bioscience and Technology* 2, 425–430.
 - Nelson, P.E., Toussoun, T.A., Marasas, W.F.O. 1983. *Fusarium* species - An illustrated manual for identification. University Park, PA. Pennsylvania State University Press. 193 p.

-
- Nguyen Van Long, N., Joly, C., Dantigny, P. 2016. Active packaging with antifungal activities. *International Journal of Food Microbiology* 220, 73–90.
 - Nielsen, C., Casteel, M., Didier, A., Dietrich, R., Märtlbauer, E. 2009. Trichothecene-induced cytotoxicity on human cell lines. *Mycotoxin Research* 25, 77–84.
 - Nielsen, L.K., Jensen, J.D., Rodríguez, A., Jørgensen, L.N., Justesen, A.F. 2012. TRI12 based quantitative real-time PCR assays reveal the distribution of trichothecene genotypes of *F. graminearum* and *F. culmorum* isolates in Danish small grain cereals. *International Journal of Food Microbiology* 157, 384–392.
 - Nielsen, P.V., Rios, R. 2000. Inhibition of fungal growth on bread by volatile compounds from spices and herbs, and the possible application in active packaging, with special emphasis on mustard essential oil. *International Journal of Food Microbiology* 60, 219–229.
 - Nitschke, L., Henrion, G., Damaschun, F., Scholz, F. 1989. A new technique to study the electrochemistry of minerals. *Naturwissenschaften* 76, 167–168.
 - Nogueira, J.H.C., Gonçalves, E., Galleti, S.R., Facanali, R., Marques, M.O.M., Felício, J.D. 2010. *Ageratum conyzoides* essential oil as aflatoxin suppressor of *Aspergillus flavus*. *International Journal of Food Microbiology* 137, 55–60.
 - Numanoğlu, E., Gökmen, V., Uygun, U., Hoksel, H. 2012. Thermal degradation of deoxynivalenol during maize bread baking. *Food Additives and Contaminants Part A* 29 (3), 423–430.
 - Novo, M., Lahive, E., Díez-Ortiz, M., Matzke, M., Morgan, A.J., Spurgeon, D.J., Svendsen, C., Kille, P. 2015. Different routes, same pathways: Molecular mechanisms under silver ion and nanoparticle exposures in the soil sentinel *Eisenia fetida*. *Environmental Pollution* 205, 385–393.
 - Obuseh, F.A., Jolly, P.E., Kulczycki, A., Ehiri, J., Waterbor, J., Desmond, R.A., Preko, P.O., et al. 2011. Aflatoxin levels, plasma

vitamins A and E concentrations, and their association with HIV and hepatitis B virus infections in Ghanaians: a cross-sectional study. *Journal of the International AIDS Society* 14, 1758–2652.

- O'Neill, K., Damoglou, A.P., Patterson, M.F. 1993. The stability of deoxynivalenol and 3-acetyl deoxynivalenol to gamma irradiation. *Food Additives and Contaminants* 10, 209–215.
- Opoku, N., Back, M., Edwards, S.G. 2013. Development of *Fusarium langsethiae* in commercial cereal production. *European Journal of Plant Pathology* 136, 159–170.
- Opoku, N., Back, M., Edwards, S.G. 2017. Susceptibility of cereal species to *Fusarium langsethiae* under identical field conditions. *European Journal of Plant Pathology* 150, 869–879.
- Ortiz, J., Van Camp, J., Mestdagh, F., Donoso, S., De Meulenaer, B. 2013. Mycotoxin co-occurrence in rice, oat flakes and wheat noodles used as staple foods in Ecuador. *Food Additives and Contaminants Part A* 30, 2165–2176.
- Ortiz-Miranda, A., König, P., Kahlert, H., Scholz, F., Osete-Cortina, I., Doménech-Carbó, M.T., Doménech-Carbó, A. 2016. Voltammetric analysis of *Pinus* needles with physiological, phylogenetic and forensic applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 408, 4943–4952.
- Ortoneda, M., Guarro, J., Madrid, M.P., Caracuel, Z., Roncero, M.I., Mayayo, E., Di Pietro, A. 2004. *Fusarium oxysporum* as a multihost model for the genetic dissection of fungal virulence in plants and mammals. *Infection and Immunity* 72, 1760–1766.
- Pace, J.G. 1983. Effect of T-2 mycotoxin on the rat liver mitochondria electron transport system. *Toxicon* 21, 675–680.
- Pace, J.G., Watts, M.R., Canterbury, W.J. 1988. T-2 mycotoxin inhibits mitochondrial protein synthesis. *Toxicon* 26, 77–85.
- Pallaroni, L., Von Holst, C., Eskilsson, C.S., Björklund, E. 2002. Microwave assisted extraction of zearalenone from wheat and corn. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 374, 161–166.

-
- Palmero, D., González, M. de C., Iglesias, C., Ruíz, G., Tello, J.C. 2008. Effects of water potential on spore germination and viability of *Fusarium* species. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 35, 1411–1418.
 - Panasiuk, L., Jedziniak, P., Pietruszka, K., Piatkowska, M., Bocian, L. 2019. Frequency and levels of regulated and emerging mycotoxins in silage in Poland. *Mycotoxin Research* 35, 17–25.
 - Papagianni, M. 2007. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnology Advances* 25, 244–263.
 - Paramelle, D., Sadovoy, A., Gorelik, S., Free, P., Hobley, J., Fernig, D.G. 2014. A rapid method to estimate the concentration of citrate capped silver nanoparticles from UV-visible light spectra. *Analyst* 139, 4855–4861.
 - Park, H.J., Kim, S.H., Kim, H.J., Choi, S.H. 2006. A new composition of nanosized silica-silver for control of various plant diseases. *The Plant Pathology Journal* 22, 295–302.
 - Park, J., Lim, D.H., Lim, H.J., Kwon, T., Choi, J.S., Jeong, S., Choi, I.H., Cheon, J. 2011. Size dependent macrophage responses and toxicological effects of Ag nanoparticles. *Chemical Communications* 47, 4382–4384.
 - Park, J., Kim, D.H., Moon, J.Y., An, J.A. 2018. Distribution analysis of twelve mycotoxins in corn and corn-derived products by LC-MS/MS to evaluate the carry-over ratio during wet-milling. *Toxins* 10(8), 319.
 - Pascale, M., Panzarini, G., Visconti, A. 2012. Determination of HT-2 and T-2 toxins in oats and wheat by ultra-performance liquid chromatography with photodiode array detection. *Talanta* 89, 231–236.
 - Passone, M.A., Girardi, N.S., Ferrand, C.A., Etcheverry, M. 2012. *In vitro* evaluation of five essential oils as botanical fungitoxicants for the protection of stored peanuts from *Aspergillus flavus* and

Aspergillus parasiticus contamination. International Biodeterioration and Biodegradation 70, 82–88.

- Passone, M.A., Girardi, N.S., Ferrand, C.A., Etcheverry, M. 2013. Antifungal and antiaflatoxic activity by vapor contact of three essential oils, and effects of environmental factors of their efficacy. Food Science and Technology 53, 434–444.
- Paterson, R.R.M., Lima, N. 2010. How will climate change affect mycotoxins in food? Food Research International 43, 1902–1914.
- Peers, F.G., Linsell, C.A. 1973. Dietary aflatoxins and liver cancer - a population based study in Kenya. British Journal of Cancer 27, 473–484.
- Peng, Z., Chen, L., Zhu, Y., Huang, Y., Hu, X., Wu, Q., Nüssler, A.K., et al. 2018. Current major degradation methods for aflatoxins: A review. Trends in Food Science and Technology 80, 155–166.
- Peraica, M, Rašić, D. 2012. The impact of Mycotoxicoses on human history. Archives of Industrial Hygiene and Toxicology 63, 513–518.
- Perrone, G., Mulè, G., Susca, A., Battilani, P., Pietri, A., Logrieco, A. 2006. Ochratoxin A production and amplified fragment length polymorphism analysis of *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus tubingensis*, and *Aspergillus niger* strains isolated from grapes in Italy. Applied and Environmental Microbiology 72, 680–685.
- Peterson, S.W. 2008. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four *loci*. Mycologia 100, 205–226.
- Peterson, S.W., Horn, B.W., Ito, Y., Goto, T. 2000. Genetic variation and aflatoxin production in *Aspergillus tamarii* and *A. caelatus*. En: Samson, R.A., Pitt, J.I., (Eds.). integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. Reading, UK. Harwood Publishers. pp. 447–458.
- Pietri, A., Bertuzzi, T., Pallaroni, L., Piva, G. 2004. Occurrence of mycotoxins and ergosterol in maize harvested over 5 years in Northern Italy. Food Additives and Contaminants 21, 479–487.

-
- Pildain, M.B, Frisvad, J.C., Vaamonde, G., Cabral, D., Varga, J., Samson, R.A. 2008. Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58, 725–735.
 - Pitt, J.I., Hocking, A.D., Bhudhasamai, K., Miscamble, B.F., Wheeler, K.A., Tanboon-Ek, P. 1993. The normal mycoflora of commodities from Thailand. 1. Nuts and oilseeds. *International Journal of Food Microbiology* 20, 211–226.
 - Pitt, J.I., Hocking, A.D. 2009. *Fungi and Food Spoilage*. New York. Springer Science + Business Media, 540 p.
 - Piva, G., Battilani, P., Pietri, A. 2006. Emerging issues in southern Europe: aflatoxins in Italy. En: Barug, D., Bhatnagar, D, (Eds.). *The Mycotoxin factbook, food and feed topics*. Wageningen: Wageningen Academic Publishers, pp. 139–153.
 - Pleadin, J., Vulić, A., Perši, N., Škrivanko, M., Capek, B., Cvetnić, Ž. 2014. Aflatoxin B1 occurrence in maize sampled from Croatian farms and feed factories during 2013. *Food Control* 40, 286–291.
 - Pleadin, J., Vulić, A., Perši, N., Škrivanko, M., Capek, B., Cvetnić, Z. 2015. Annual and regional variations of aflatoxin B1 levels seen in grains and feed coming from Croatian dairy farms over a 5-year period. *Food Control* 47, 221–225.
 - Prakash, B., Mishra, P.K, Kedia, A., Dubey, N.K. 2014. Antifungal, antiaflatoxin and antioxidant potential of chemically characterized *Boswellia carterii* Birdw essential oil and its in vivo practical applicability in preservation of *Piper nigrum* L. fruits. *Food Science and Technology* 56, 240–247.
 - Prakash, B., Kedia, A., Mishra, P.K., Dubey, N.K. 2015. Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities-potentials and challenges. *Food Control* 47, 381–391.
 - Pushvinder, R., Desai, S. 2006. Variability among isolates of *Aspergillus flavus* from groundnut for aflatoxin and cyclopiazonic

acid production. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry* 5, paper 5.

- Qian, Y., Yu, H., He, D., Yang, H., Wang, W., Wan, X., Wan, L. 2013. Biosynthesis of silver nanoparticles by the endophytic fungus *Epicoccum nigrum* and their activity against pathogenic fungi. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 36, 1613–1619.
- Qiu, M., Wang, Y.L., Wang, X.B., Sun, L.J., Ye, R.Y., Xu, D.F., Dai, Z., et al. 2016. Effects of T-2 toxin on growth, immune function and hepatopancreas microstructure of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture* 462, 35–39.
- Querol, A., Barrio, E., Huerta, T., Ramón, D. 1992. Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 2948–2953.
- Rachid, M.A., Vasconcelos, A.C., Nunes, V.A. 2000. Apoptosis in the lymphoid depletion induced by T-2 toxin in broiler chicks. Histophometry of the bursa of Fabricius. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 52, 592–598.
- Radic, B., Fuchs, R., Peraica, M., Lucis, A. 1997. Ochratoxin A in human sera in the área with endemic nephropathy in Croatia. *Toxicology Letters* 91, 105–109.
- Rahmani, A., Jinap, S., Soleimany, F. 2009. Qualitative and quantitative analysis of mycotoxins. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 8, 202–251.
- Rahmani, A., Soleimany, F., Hosseini, H., Nateghi, L. 2011. Survey on the occurrence of aflatoxins in rice from different provinces of Iran. *Food Additives and Contaminants Part B* 4, 185–190.
- Rai, M., Kon, K., Ingle, A., Duran, N., Galdiero, S., Galdiero, M. 2014. Broad-spectrum bioactivities of silver nanoparticles: the emerging trends and future prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98, 1951–1961.
- Rai, P.K., Kumar, V., Lee, S., Raza, N., Kim, K-H., Ok, Y.S., Tsang, D.C.W. 2018. Review article. Nanoparticle-plant interaction:

Implications in energy, environment, and agriculture. *Environment International* 119, 1–19.

- Ramírez, M.L., Chulze, S., Magan, N. 2004. Impact of environmental factors and fungicides on growth and deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* isolates from Argentinian wheat. *Crop Protection* 23, 117–125.
- Ramírez, M.L., Chulze, S., Magan, N. 2006. Temperature and water activity effects on growth and temporal deoxynivalenol production by two Argentinian strains of *Fusarium graminearum* on irradiated wheat grains. *International Journal of Food Microbiology* 106, 291–296.
- Raper, K.B., Fennell, D.I. 1965. The genus *Aspergillus*. Baltimore, MA. Williams and Wilkins. 686 pp.
- Ratnavathi, C.V., Komala, V.V., Kumar, B.S.V., Das, I.K., Patil, J.V. 2012. Natural occurrence of aflatoxin B1 in sorghum grown in different geographical regions of India. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92, 2416–2420.
- Reddy, K.N., Locke, M.A., Koger, C.H., Zablutowicz, R.M., Krutz, L.J. 2006. Cotton and corn rotation under reduced tillage management: impacts on soil properties, weed control, yield, and net return. *Weed Science* 54, 768–774.
- Reddy, K.N., Abbas, H.K., Zablutowicz, R.M., Abel, C.A., Koger, C.H. 2007. Mycotoxin occurrence and *Aspergillus flavus* soil propagules in a corn and cotton glyphosate-resistant cropping systems. *Food Additives and Contaminants Part A* 24, 1367–1373.
- Reddy, K.R.N., Abbas, H.K., Abel, C.A., Shier, W.T., Oliveira, C.A.F., Raghavender, C.R. 2009. Mycotoxin contamination of commercially important agricultural commodities. *Toxin Reviews* 28, 154–168.
- Reddy, K.R.N., Reddy, C.S., Muralidharan, K. 2009. Detection of *Aspergillus* spp. and aflatoxin B1 in rice in India. *Food Microbiology* 26, 27–31.

- Reddy, K.R.N., Farhana, N.I., Salleh, B. 2011. Occurrence of *Aspergillus* spp. and aflatoxin B1 in Malaysian foods used for human consumption. *Journal of Food Science* 76, T99–T104.
- Regnault-Roger, C., Vincent, C., Arnason, J.T. 2012. Essential oils in insect control: low risk products in a high-stakes world. *Annual Review of Entomology* 57, 405–424.
- Resende, D.C., Mendes, S.M., Marucci, R.C., Marucci, R.C., Silva, A.C., Campanha, M.M., Waquil, J.M. 2016. Does *Bt* maize cultivation affect the non-target insect community in the agro ecosystem? *Revista Brasileira de Entomologia* 60, 82–93.
- Restrepo, C.M., Llanes, A., Leonart, R. 2018. Use of AFLP for the study of eukaryotic pathogens affecting humans. *Infection, Genetics and Evolution* 63, 360–369.
- Ribeiro-Santos, R., Andrade, M., Ramos de Melo, N., Sanches-Silva, A. 2017. Use of essential oils in active food packaging: recent advances and future trends. *Trends in Food Science and Technology* 61, 132–140.
- Richard, E., Heutte, N., Sage, L., Pottier, D., Bouchart, V., Lebailly, P., Garon, D. 2007. Toxigenic fungi and mycotoxins in mature corn silage. *Food and Chemical Toxicology* 45, 2420–2425.
- Richard, J.L., Bhatnagar, D., Peterson, S., Sandor, G. 1992. Assessment of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus flavus* isolates from Hungary. *Mycopathologia* 120, 183–188.
- Richard, J.L. 2007. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses – An overview. *International Journal of Food Microbiology* 119, 3–10.
- Riudavets, J., Pons, M.J., Messeguer, J., Gabarra, R. 2018. Effect of CO₂ modified atmosphere packaging on aflatoxin production in maize infested with *Sitophilus zeamais*. *Journal of Stored Products Research* 77, 89–91.

- Rocha, O., Ansari, K., Doohan, F.M. 2005. Effects of trichotecene mycotoxins on eukaryotic cells: A review. *Food Additives and Contaminants* 22, 369–378.
- Rodrigues, P., Santos, C., Venâncio, A., Lima, N. 2011. Species identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolates from Portuguese almonds using phenotypic, including MALDI-TOF ICMS, and molecular approaches. *Journal of Applied Microbiology* 111, 877–892.
- Rodrigues, P., Venâncio, A., Lima, N. 2012. Mycobiota and mycotoxins of almonds and chestnuts with special reference to aflatoxins. *Food Research International* 48, 79–90.
- Rodríguez-Mozaz, S., Lopez de Alda, M.J., Barceló, D.B. 2007. Advantages and limitations of on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry technologies versus biosensors for monitoring of emerging contaminants in water, *Journal of Chromatography A* 1152, 97–115.
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Andrade, M.J., Córdoba, J.J. 2012. Development of a multiplex real-time PCR to quantify aflatoxin, ochratoxin A and patulin producing molds in foods. *International Journal of Food Microbiology* 155, 10–18.
- Rokas, A., Carroll, S.B. 2005. More genes or more taxa? The relative contribution of gene number and taxon number to phylogenetic accuracy. *Molecular Biology and Evolution* 22, 1337–1344.
- Romera, D., Mateo, E.M., Mateo-Castro, R., Gómez, J.V., Gimeno-Adelantado, J.V., Jiménez, M. 2018. Determination of multiple mycotoxins in feedstuffs by combined use of UPLC-ESI-MS/MS and UPLC-QTOF-MS. *Food Chemistry* 267, 140–148.
- Royer, D., Humpf, H.-U., Guy, P.A. 2004. Quantitative analysis of *Fusarium* mycotoxins in maize using accelerated solvent extraction before liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants* 21, 678–692.

- Ruggiero, M.A., Gordon, D.P., Orrell, T.M., Bailly, N., Bourgoin, T., Brusca, R.C., Cavalier-Smith, T., et al. 2015. A higher level classification of all living organisms. PLoS ONE 10, e0119248
- Runa, F., Carbone, I., Bhatnagar, D., Payne, G.A. 2015. Nuclear heterogeneity in conidial populations of *Aspergillus flavus*. Fungal Genetics and Biology 84, 60–72.
- Rushing, B.R., Selim, M.I. 2019. Aflatoxin B1: A review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods. Food and Chemical Toxicology 124, 81–100.
- Saad-Hussein, A., Beshir, S., Moubarz, G., Elserougy, S., Ibrahim, M.I.M. 2013. Effect of occupational exposure to aflatoxins on some liver tumor markers in textile workers. American Journal of Industrial Medicine 56, 818–824.
- Sacchi, C., González, H.H.L., Broggi, L.E., Pacin, A., Resnik, S.L., Cano, G., Taglieri, D. 2009. Fungal contamination and mycotoxin natural occurrence in oats for race horses feeding in Argentina. Animal Feed Science and Technology 152 (3-4), 330–335.
- Sahu, S.C., Zheng, J., Graham, L., Chen, L., Ihrle, J., Yourick, J.J., Sprando, R.L. 2014. Comparative cytotoxicity of nanosilver in human liver HepG2 and colon Caco2 cell in culture. Journal of Applied Toxicology 34, 1155–1166.
- Salem, W., Leitner, D.R., Zingl, F.G., Schratte, G., Prassl, R., Goessler, W., Reidl, J., Schild, S. 2015. Antibacterial activity of silver and zinc nanoparticles against *Vibrio cholerae* and enterotoxic *Escherichia coli*. International Journal of Medical Microbiology 305(1), 85–95.
- Sampietro, D.A., Díaz, C.G., González, V., Vattuone, M.A., Ploper, L.D., Catalán, C.A.N., Ward, T.J. 2011. Species diversity and toxigenic potential of *Fusarium graminearum* complex isolates from maize fields in northwest Argentina. International Journal of Food Microbiology 145, 359–364.

-
- Sanchis, V., Magan, N. 2004. Environmental conditions affecting mycotoxins. En: Magan, N., Olsen, M. (Eds.). *Mycotoxins in food. Detection and control*. Boca Ratón, FL, CRC Press. pp. 174–189.
 - SANTE (2015). Document No. SANTE/11945/2015. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. 46 pp.
 - SANTE (2017). Document No. SANTE/11813/2017. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed, pp. 21–22.
 - Sardiñas, N., Vázquez, C., Gil-Serna, J., González-Jaén, M.T., Patiño, B. 2010. Specific detection of *Aspergillus parasiticus* in wheat flour using a highly sensitive PCR assay. *Food Additives and Contaminants* 27, 853–858.
 - Sardiñas, N., Vázquez, C., Gil-Serna, J., González-Jaén, M.T., Patiño, B. 2011. Specific detection and quantification of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in wheat flour by SYBR® Green quantitative PCR. *International Journal of Food Microbiology* 145, 121–125.
 - Sartori, D., Furlaneto, M.C., Martins, M.K., Ferreira de Paula, M.R., Pizzirani-Kleiner, A.A., Taniwaki, M.H., Fungaro, M.H. 2006. PCR method for the detection of potential ochratoxin-producing *Aspergillus* species in coffee beans. *Research in Microbiology* 157, 350–354.
 - Savi, G.D., Piacentini, K.C., Bittencourt, K.O., Scussel, V.M. 2014. Ozone treatment efficiency on *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol degradation and its effects on whole wheat grains (*Triticum aestivum* L.) quality and germination. *Journal of Stored Products Research* 59, 245–253.
 - Savithramma, N., Rao, M.L., Rukmini, K., Suvarnalatha-Devi, P. 2011. Antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesized by using medical plants. *International Journal of Chemical Technology Research* 3, 1394–1402.

-
- Scampicchio, M., Mannino, S., Zima, J., Wang, J. 2005. Chemometrics on microchips: Towards the classification of wines. *Electroanalysis* 17, 1215–1221.
 - Scauflaire, J., Mahieu, O., Louvieux, J., Foucart, G., Renard, F., Munaut, F. 2011. Biodiversity of *Fusarium* species in ears and stalks of maize plants in Belgium. *European Journal of Plant Pathology* 131, 59–66.
 - Schmidt, H., Niessen, L., Vogel, R.F. 2004a. AFLP analysis of *Fusarium* species in the section *Sporotrichiella*—evidence for *Fusarium langsethiae* as a new species. *International Journal of Food Microbiology* 95, 297–304.
 - Schmidt, H., Adler, A., Holst-Jensen, A., Klemsdal, S.S., Logrieco, A., Mach, R.L., Nirenberg, H.I., et al. 2004b. An integrated taxonomic study of *Fusarium langsethiae*, *Fusarium poae* and *Fusarium sporotrichioides* based on the use of composite datasets. *International Journal of Food Microbiology* 95, 341–349.
 - Schmidt, P., Novinski, C.O., Junges, D., Almeida, R., de Souza, C.M. 2015. Concentration of mycotoxins and chemical composition of corn silage: A farm survey using infrared thermography. *Journal of Dairy Science* 98, 6609–6619.
 - Schmidt-Heydt, M., Magan, N., Geisen, R. 2008. Stress induction of mycotoxin biosynthesis genes by abiotic factors. *FEMS Microbiology Letters* 284, 142–149.
 - Schmidt-Heydt, M., Abdel-Hadi, A., Magan, N., Geisen, R. 2009. Complex regulation of the aflatoxin biosynthesis gene cluster of *Aspergillus flavus* in relation to various combinations of water activity and temperature. *International Journal of Food Microbiology* 135, 231–237.
 - Schmidt-Heydt, M., Rüfer, C.E., Abdel-Hadi, A., Magan, N., Geisen, R. 2010. The production of aflatoxin B₁ or G₁ by *Aspergillus parasiticus* at various combinations of temperature and water activity is related to the ratio of *afIS* to *afIR* expression. *Mycotoxin Research* 26, 241–246.

- Schmidt-Heydt, M., Stoll, D., Geisen, R. 2013. Fungicides effectively used for growth inhibition of several fungi could induce mycotoxin biosynthesis in toxigenic species. *International Journal of Food Microbiology* 166, 407–412.
- Scholz, F., Nitschke, L., Henrion, G. 1989a. A new procedure for fast electrochemical analysis of solid materials. *Naturwissenschaften* 76, 71–72.
- Scholz, F., Nitschke, L., Henrion, G. 1989b. Identification of solid materials with a new electrochemical technique - the abrasive stripping voltammetry. *Fresenius' Zeitschrift für Analytische Chemie* 334, 56–58.
- Scholz, F., Nitschke, L., Henrion, G., Damaschun, F. 1989c. Abrasive stripping voltammetry-the electrochemical spectroscopy for solid state: application for mineral analysis. *Fresenius' Zeitschrift für Analytische Chemie* 335, 189–194.
- Scholz, F., Schröder, U., Gulaboski, R., Doménech-Carbó, A. 2015. *Electrochemistry of immobilized particles and droplets* (2nd ed). Berlin-Heidelberg, Springer. 327 pp
- Schöneberg, T., Jenny, E., Wettstein, F.E., Bucheli, T.D., Mascher, F., Bertossa, M., Musa, T., Seifert, K., Gräfenhan, T., Keller, B. 2018. Occurrence of *Fusarium* species and mycotoxins in Swiss oats - Impacts of cropping factors. *European Journal of Agronomy* 92, 123–132.
- Schwake-Anduschus, C., Langenkämper, G., Unbehend, G., Dietrich, R., Märtilbauer, E., Münzing, K. 2010. Occurrence of *Fusarium* T-2 and HT-2 toxins in oats from cultivar studies in Germany and degradation of the toxins during grain cleaning treatment and food processing. *Food Additives and Contaminants Part A* 27, 1253–1260.
- Schwave, M., Krämer, J. 1995. Influence of water activity on the production of T-2 toxin by *Fusarium sporotrichioides*. *Mycotoxin Research* 11, 48–52.

- Scott, P.M., Trucksess, M.W. 1997. Application of immunoaffinity columns to mycotoxin analysis. *Journal of AOAC International* 80, 941–949.
- Scott, W.J., 1957. Water relations of food spoilage microorganisms. *Advances in Food Research* 7, 83–127.
- Scudamore, K.A., Patel, S., Edwards, S.G. 2009. HT-2 toxin and T-2 toxin in commercial cereal processing in the United Kingdom, 2004–2007. *World Mycotoxin Journal* 2, 357–365.
- Selvaraj, J.N., Zhou, L., Wang, Y., Zhao, Y., Xing, F., Guo., Dai, X., Liu, Y. 2015. Mycotoxin detection - Recent trends at global level. *Journal of Integrative Agriculture* 14, 2265–2281.
- Senyuva, H.Z., Gilbert, J. 2010. Immunoaffinity column clean-up techniques in food analysis: A review. *Journal of Chromatography B* 878, 115–132.
- Serfling, A., Wohlrab, J., Deising, H.B. 2007. Treatment of a clinically relevant plantpathogenic fungus with an agricultural azole causes cross-resistance to medical azoles and potentiates caspofungin efficacy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51, 3672–3676.
- Sheibani, A., Ghaziaskar, H.S. 2009. Pressurized fluid extraction for quantitative recovery of aflatoxins B1 and B2 from pistachio. *Food Control* 20, 124–128.
- Shetty, P.H., Jespersen, L. 2006. *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. *Trends in Food Science Anorexia and Technology* 17, 48–55.
- Sheng, K., Lu, X., Yue, J., Gu, W., Gu, C., Zhang, H., Wu, W. 2019. Role of neurotransmitters 5-hydroxytryptamine and substance P in induction following oral exposure to the trichothecene T-2 toxin. *Food and Chemical Toxicology* 123, 1–8.
- Shukla, R., Kumar, A., Singh, P., Dubey, N.K. 2009. Efficacy of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown essential oil and its monoterpene aldehyde constituents against fungi isolated from some edible

legume seeds and aflatoxin B1 production. *International Journal of Food Microbiology* 135, 165–170.

- Shukla, R., Singh, P., Prakash, B., Dubey, N.K. 2012. Antifungal, aflatoxin inhibition and antioxidant activity of *Callistemon lanceolatus* (Sm.) sweet essential oil and its major component 1,8-cineole against fungal isolates from chickpea seeds. *Food Control* 25, 27–33.
- Shukla, R., Singh, P., Prakash, B., Dubey, N.K. 2013. Efficacy of *Acorus calamus* L. essential oil as a safe plant based antioxidant, aflatoxin B1 suppressor and broad spectrum antimicrobial against food-infesting fungi. *International Journal of Food Science and Technology* 48, 128–135.
- Sinha, K.K., Sinha, A.K. 1992. Impact of stored grain pests on seed deterioration and aflatoxin contamination in maize. *Journal of Stored Products Research* 28, 211–219.
- Snoeijers, S.S., Pérez-García, A., Joosten, M.H., De Wit, P.J. 2000. The effect of nitrogen on disease development and gene expression in bacterial and fungal plant pathogens. *European Journal of Plant Pathology* 106, 493–506.
- Song, H.H., Lee, H.S., Lee, G.P., Ha, S.D., Lee, C. 2009. Structural analysis of enniatin H, I, and MK1688 and beauvericin by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) and their production by *Fusarium oxysporum* KFCC 11363P. *Food Additives and Contaminants Part A* 26, 518–526.
- Spanjer, M. 2006. Theory and criteria for practical sampling. Abstracts of lectures and posters, The World Mycotoxin Forum, The Fourth Conference, Cincinnati, USA, November 6–8, 2006, p. 55.
- Squire, R.A. 1981. Ranking animal carcinogens: a proposed regulatory approach. *Science* 214, 877–880.
- Sriram, M., Kanth, S., Kalishwaralal, K., Gurunathan, S. 2010. Antitumor activity of silver nanoparticles in Dalton's lymphoma ascites tumor model. *International Journal of Nanomedicine* 5, 753–762.

-
- Stack, R.W. 2003. History of fusarium head blight with emphasis on North America. En: Leonard, K.J., Bushnell, W.R. (Eds.). *Fusarium Head Blight of wheat and barley*. St. Paul, MN, USA, The American Phytopathological Society, Chapter 1, pp. 1–34.
 - Stanley, V.G., Ojo, R., Woldesenbet, S., Hutchinson, D.H. 1993. The use of *Saccharomyces cerevisiae* to suppress the effects of aflatoxicosis in broiler chicks. *Poultry Science* 72, 1867–1872.
 - Storm, I.M.L.D., Sørensen, J.L., Rasmussen, R.R., Nielsen, K.F., Thrane, U. 2008. Mycotoxins in silage. *Stewart Postharvest Review* 6, 4.
 - Subhani, M.N., Sahi, S.T., Hussain, S., Ali, A., Iqbal, J., Hameed, K. 2011. Evaluation of various fungicides for the control of gram wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *African Journal of Agricultural Research* 6, 4555–4559.
 - Suhr, K.I., Nielsen, V. 2005. Inhibition of fungal growth on wheat and rye bread by modified atmosphere packaging and active packaging using volatile mustard essential oil. *Journal of Food Science* 70, 37–44.
 - Sultan, Y., Magan, N. 2010. Mycotoxigenic fungi in peanuts from different geographic regions of Egypt. *Mycotoxin Research* 26, 133–140.
 - Sulyok, M., Berthiller, F., Krska, R., Schuhmacher, R. 2006. Development and validation of a liquid chromatography/ tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20, 2649–2659.
 - Summerell, B.A., Leslie, J.F. 2011. Fifty years of *Fusarium*: how could nine species have ever been enough? *Fungal diversity* 50, 135–144.
 - Sun, G., Wang, S., Hu, X., Su, J., Zhang, Y., Xie, Y., Zhang, H., et al. 2011. Co-contamination of aflatoxin B1 and fumonisin B1 in food and human dietary exposure in three areas of China. *Food Additives and Contaminants* 28, 461–470.

-
- Sun, S., Zhao, R., Xie, Y., Liu, Y. 2019. Photocatalytic degradation of aflatoxin B1 by activated carbon supported TiO₂ catalyst. *Food Control* 100, 183–188.
 - Suneja, S.K., Wagle, D.S., Ram, G.C. 1989. Effects of oral administration of T-2 toxin on glutathione shuttle enzymes, microsomal reductase and lipid peroxidation in rat liver. *Toxicon* 27, 995–1001.
 - Tajkarimi, M.M., Ibrahim, S.A., Cliver, D.O. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control* 21, 1199–1218.
 - Tanaka, Y., Nakajima, Y., Maeda, K., Matsuyama, M., Kanamaru, K., Kobayashi, T., Ohsato, S., Kimura, M. 2019. Inhibition of *Fusarium* trichotecene biosynthesis by yeast extract components extractable with ethyl acetate. *International Journal of Food Microbiology* 289, 24–29.
 - Tarazona, A., Gómez, J.V., Gavara, R., Mateo-Castro, R., Gimeno-Adelantado, J.V., Jiménez, M., Mateo, E.M. 2018. Risk management of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in maize grains by bioactive EVOH films containing individual components of some essential oils. *International Journal of Food Microbiology* 269, 107–119.
 - Tarazona, A., Gómez, J.V., Mateo, E.M., Jiménez, M., Mateo, F. 2019. Antifungal effect of engineered silver nanoparticles on phytopathogenic and toxigenic *Fusarium* spp. and their impact on mycotoxin accumulation. *International Journal of Food Microbiology* 306, 1–13.
 - Taye, W., Ayalew, A., Chala, A., Dejene, M. Aflatoxin B1 and total fumonisin contamination and their producing fungi in fresh and stored sorghum grain in East Hararghe, Ethiopia. *Food Additives and Contaminants Part B* 9, 237–245.
 - Tchana, A.N., Moundipa, P.F., Tchouanguep, F.M. 2010. Aflatoxin contamination in food and body fluids in relation to malnutrition and cancer in Cameroon. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 7, 178–188.

- Tejada-Castaneda, Z.I., Avila-Gonzalez, E., Casaubon-Huguenin, M.T., Cervantes-Olivares, R.A., Vásquez-Peláez, C., Hernandez-Baumgarten, E.M., Moreno-Martínez, E. 2008. Biodetoxification of aflatoxin-contaminated chick feed. *Poultry Science* 87, 1569–1576.
- Teniola, O.D., Addo, P.A., Brost, I.M., Farber, P., Jany, K.D., Alberts, J.F., van Zyl, W.H., et al. 2005. Degradation of aflatoxin B(1) by cell-free extracts of *Rhodococcus erythropolis* and *Mycobacterium fluoranthenivorans* spp. nov. DSM44556(T). *International Journal of Food Microbiology* 105, 111–117.
- Thompson, W.L., Wannemacher, R.W Jr. 1990. In vivo effects of T-2 toxin on synthesis of proteins and DNA in rat tissues. *Toxicology and Applied Pharmacology* 105, 482–491.
- Thrane, U., Adler, A., Clasen, P.E., Galvano, F., Langseth, W., Lew, H., Logrieco, A., et al. 2004. Diversity in metabolite production by *Fusarium langsethiae*, *Fusarium poae*, and *Fusarium sporotrichioides*. *International Journal of Food Microbiology* 95, 257–266.
- Tian, J., Ban, X., Zeng, H., He, J., Huang, B., Wang, Y. 2011a. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cicuta virosa* L. var. *latisecta* Celak. *International Journal of Food Microbiology* 145, 464–470.
- Tian, J., Ban, X., Zeng, H., Huang, B., He, J., Wang, Y. 2011b. *In vitro* and *in vivo* activity of essential oil from dill (*Anethum graveolens* L.) against fungal spoilage of cherry tomatoes. *Food Control* 22, 1992–1999.
- Tian, J., Huang, B., Luo, X., Zeng, H., Ban, X., He, J., Wang, Y. 2012. The control of *Aspergillus flavus* with *Cinnamomum jensenianum* Hand-Mazz essential oil and its potential use as a food preservative. *Food Chemistry* 130, 520–527.
- Tibola, C.S., Fernandes, J.M.C., Guarienti, E.M. 2016. Effect of cleaning, sorting and milling processes in wheat mycotoxin content. *Food Control* 60, 174–179.

-
- Torp, M., Adler, A. 2004. The European *Sporotrichiella* project: a polyphasic approach to the biology of new *Fusarium* species. *International Journal of Food Microbiology* 95, 257–266.
 - Torp, M., Nirenberg, H.I. 2004. *Fusarium langsethiae* spp. nov. on cereals in Europe. *International Journal of Food Microbiology* 95, 247–256.
 - Tóth, B., Kótai, É., Varga, M., Pálfi, X., Baranyi, N., Szigeti, G., Kocsubé, S., Verga, J. 2013. Climate change and mycotoxin contamination in Central Europe: an overview of recent findings. *Journal of Agriculture and Rural Development in the Tropics and Subtropics* 2, 461–466.
 - Tullio, V., Nostro, A., Mandras, N., Dugo, P., Banche, G., Cannatelli, M.A., Cuffini, A.M., et al. 2006. Antifungal activity of essential oils against filamentous fungi determined by broth microdilution and vapor contact methods. *Journal of Applied Microbiology* 102 (6), 1544–1550.
 - Trusal, L.R., O'Brien, J.C. 1986. Ultrastructural effects of T-2 toxin on rat hepatocytes in vitro. *Toxicon* 24, 481–488.
 - Twarużec, M., Blajet-Kosicka, A., Wenda-Piesik, A., Palubicki, J., Grajewski, J. 2013. Statistical comparison of *Fusarium* mycotoxins content in oat grain and related products from two agricultural systems. *Food Control* 34, 291–295.
 - Tyagi, A.K., Malik, A. 2011a. Antimicrobial potential and chemical composition of *Eucalyptus globulus* oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. *Food Chemistry* 126, 228–235.
 - Tyagi, A.K., Malik, A. 2011b. Antimicrobial potential and chemical composition of *Mentha piperita* oil in liquid and vapour phase against food spoiling microorganisms. *Food Control* 22, 1707–1714.
 - Tzean, S.S., Chen, J.L., Liou, G.Y., Chen, C.C., Hsu, W.H. 1990. *Aspergillus* and related teleomorphs from Taiwan. Food Industry Research and Development Institute, 113 pp.

- Ueno, Y. 1985. The toxicology of mycotoxins. *Critical Reviews in Toxicology* 14, 99–133.
- Ueno, Y., Ishii, K., Sakai, K., Kanaeda, S., Tsunoda, H., Tanaka, T., Enomoto, T. 1972. Toxicological approaches to the metabolites of *Fusaria*: IV. Microbial survey on bean-hulls poisoning of horses with the isolation of toxic trichothecenes neosolaniol and T-2 toxin of *Fusarium solani*. *Japan Journal of Experimental Medicine* 42, 187–203.
- Urraca, J.L., Carbajo, M.C., Torralvo, M.J., González-Vázquez, J., Orellana, G., Moreno-Bondi, M.C. 2008. Effect of the template and functional monomer on the textural properties of molecularly imprinted polymers. *Biosensors and Bioelectronics* 24, 155–161.
- Valle-Algarra, F.M., Medina, A., Gimeno-Adelantado, J.V., Llorens, A., Jiménez, M., Mateo, R. 2005. Comparative assessment of solid-phase extraction clean-up procedures, GC columns and perfluoroacylation reagents for determination of type B trichothecenes in wheat by GC-ECD. *Talanta* 66, 194–201.
- Valle-Algarra, F.M., Mateo, E.M., Mateo, R., Gimeno-Adelantado, J.V., Jiménez, M. 2011. Determination of type A and type B trichothecenes in paprika and chili pepper using LC-triple quadrupole-MS and GC-ECD. *Talanta* 84, 1112–1117.
- Van der Westhuizen, L., Shephard, G.S., Rheeder, J.P., Burger, H.M., Gelderblom, W.C.A., Wild, C.P., Gong, Y.Y. 2011. Optimising sorting and washing of home-grown maize to reduce fumonisin contamination under laboratory-controlled condition. *Food Control* 22, 396–400.
- Varela, E., Martínez, A.T., Martínez, M.J. 2000. Southern blot screening for lignin peroxidase and aryl-alcohol oxidase genes in 30 fungal species. *Journal of Biotechnology* 83, 245–251.
- Varga, J., Kozakiewicz, Z. 2006. Ochratoxin A in grapes and grapederived products. *Trends in Food Science and Technology* 17, 72–81.

-
- Vary, Z., Mullins, E., Mcelwain, J.C., Doohan, F. 2015. The severity of wheat diseases increases when plants and pathogens are acclimatised to elevated carbon dioxide. *Global Change Biology* 21, 2661–2669.
 - Verheecke-Vaesen, C., Diez-Gutierrez, L., Renaud, J., Sumarah, M., Medina, A., Magan, N. 2019. Interacting climate change environmental factors effects on *Fusarium langsethiae* growth, expression of *Tri* genes and T-2/HT-2 mycotoxin production on oat-based media and in stored oats. *Fungal Biology* 123, 618–624.
 - Viaro, H.P., Silva, J.J., Ferranti, L.S., Bordini, J.G., Massi, F.P., Fungaro, M.H.P. 2017. The first report of *A. novoparasiticus*, *A. arachidicola* and *A. pseudocaelatus* in Brazilian corn kernels. *International Journal of Food Microbiology* 243, 46–51.
 - Vidal, A., Marín, S., Ramos, A.J., Cano-Sancho, G., Sanchis, V. 2013. Determination of aflatoxins, deoxynivalenol, ochratoxin A and zearalenone in wheat and oat based bran supplements sold in the Spanish market. *Food and Chemical Toxicology* 53, 133–138.
 - Viegas, S., Veiga, L., Malta-Vacas, J., Sabino, R., Figueredo, P., Almeida, A., Viegas, C., Carolino, E. 2012. Occupational exposure to aflatoxin (AFB1) in poultry production. *Journal of Toxicology and Environmental Health A* 75, 1330–1340.
 - Viegas, S., Veiga, L., Almeida, A., Dos Santos, M., Carolino, E., Viegas, C. 2015. Occupational exposure to aflatoxin B1 in a Portuguese poultry slaughterhouse. *Annals of Occupational Hygiene* 60, 176–183.
 - Vilela, G.R., de Almeida, G.S., D’Arce, M.A.B.R., Moraes, M.H.D., Brito, J.O., da Silva, M.F.d.G.F., Silva, S.C., et al. 2009. Activity of essential oil and its major compound, 1,8-cineole, from *Eucalyptus globulus* Labill., against the storage fungi *Aspergillus flavus* Link and *Aspergillus parasiticus* Speare. *Journal of Stored Products Research* 45, 108–111.
 - Vinggaard, A.M., Hass, U., Dalgaard, M., Andersen, H.R., Bonefeld-Jørgensen, E., Christiansen, S., Laier, P., Poulsen, M.E. 2006.

- Prochloraz: an imidazole fungicide with multiple mechanisms of action. *International Journal of Andrology* 29, 186–192.
- Visconti, A., Mirocha, C.J., Bottalico, A., Chelkowsky, J. 1985. Trichotecene mycotoxin produced by *Fusarium sporotrichioides* strain P-11. *Mycotoxin Research* 1, 3–10.
 - Vishwanath, V., Sulyok, M., Labuda, R., Bicker, W., Krska, R. 2009. Simultaneous determination of 186 fungal and bacterial metabolites in indoor matrices by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 395, 1355–1372.
 - Walker, S.P., Wachs, T.D., Meeks Gardner, J., Lozoff, B., Wasserman, G.A., Pollitt, E., Carter, J.A. 2016. Child development: risk factors for adverse outcomes in developing countries. *Lancet* 369, 145–157.
 - Wambacq, E., Vanhoutte, I., Audenaert, K., De Gelder, L., Haesaert, G. 2016. Occurrence, prevention and remediation of toxigenic fungi and mycotoxins in silage: A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 96, 2284–2302.
 - Wang, X., Liu, H., Wei, J., Ma, Z. 2010. Effects of oregano oil, carvacrol, cinnamaldehyde, and citral on antimicrobial, mechanical and barrier properties of carrot puree films. *Piageng (Photonics and Imaging for Agricultural Engineering)* 7752.
 - Wang, X., Liu, Q., Ihsan, A., Huang, L.L., Dai, M.H., Hao, H.H., Cheng, G.Y., et al. 2012. JAK/STAT Pathway plays a critical role in the proinflammatory gene expression and apoptosis of RAW264.7 cells induced by trichothecenes as DON and T-2 toxin. *Toxicological Sciences* 127, 412–424.
 - Wang, X.H., Wang, S., 2008. Sensors and biosensors for the determination of small molecule biological toxins. *Sensors* 2008, 6045–6054.
 - Wargenau, A., Fleissner, A., Bolten, C. J., Rohde, M., Kampen, I., Kwade, A. 2011. On the origin of the electrostatic surface potential

- of *Aspergillus niger* spores in acidic environments. *Research in Microbiology* 162, 1011–1017.
- Warrington, I.J., Kanemasu, E.T. 1983. Corn growth response to temperatura and photoperiod. Seedling emergence, tassel initiation and anthesis. *Agronomy Journal* 75, 749–754.
 - Warth, B., Parich, A., Atehnkeng, J., Bandyopadhyay, R., Schuhmacher, R., Sulyok, M., Krska, R. 2012. Quantitation of mycotoxins in food and feed from Burkina Faso and Mozambique using a modern LC-MS/MS multitoxin method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 9352–9363.
 - Wei, L., Lu, J., Xu, H., Patel, A., Chen, Z-S., Chen, G. 2015. Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications. *Drug Discovery Today* 20, 595–601.
 - Weidenborner, M. 2011. Mycotoxins and their metabolites in humans and animals. New York, Springer. 459 pp.
 - Weidner, M., Huwel, S., Ebert, F., Schwerdtle, T., Galla, H.J., Hump, H.U. 2013. Influence of T-2 and HT-2 toxin on the blood-brain barrier in vitro: new experimental hints for neurotoxic effects. *PloS ONE* 8, e60484.
 - Weng, C.Y., Park, D.L., Martinez, A.J. 1994. Efficacy and permanency of ammonia treatment in reducing aflatoxin levels in corn. *Food Additives and Contaminants* 11, 649–658.
 - Whitaker, T.B. 2006. Sampling foods for mycotoxins. *Food Additives and Contaminants* 23, 50–61.
 - Whittaker, R.H. 1969. New concepts of kingdoms of organisms. *Science* 163, 150–160.
 - Wheeler, K.A., Hurdman, B.F., Pitt, J.I. 1991. Influence of pH on the growth of some toxigenic species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. *International Journal of Food Microbiology* 12, 141–149.
 - WHO (World Health Organization). 2018. Resumen sobre inocuidad de los alimentos. Ref. No: WHO/NHM/FOS/RAM/18.1.

-
- Wild, C.P., Turner, P.C. 2002. The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions. *Mutagenesis* 17 (6), 471–481.
 - Williams, J.H., Phillips, T.D., Jolly, P.E., Stiles, J.K., Jolly, C.M., Aggarwal, D. 2004. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *The American Journal of Clinical Nutrition* 80, 1106–1122.
 - Wilson, D.M., Widstrom, N.W., Marti, L.R., Evans, B.D. 1981. *Aspergillus flavus* group, aflatoxin, and bright greenish-yellow fluorescence in insect-damaged corn in Georgia. *Cereal Chemistry* 58, 40–42.
 - Woese, C.R., Balch, W.E., Magrum, L.J., Fox, G.E., Wolfe, R.S. 1977. An ancient divergence among the bacteria. *Journal of Molecular Evolution* 9, 305–311.
 - Wosten, H.A.B., Scholtmeijer, K., de Vries, R.P. 2007. Hyperproduction of enzymes by fungi. En: Dijksterhuis, J., Samson, R.A. (Eds.). *Food Mycology. A multifaceted approach to fungi and food*. Boca Raton, FL, CRC Press, pp. 183–196.
 - Wu, Q., Xu, J., Xu, H. 2019. Discrimination of aflatoxin B₁ contaminated pistachio kernels using laser induced fluorescence spectroscopy. *Biosystems Engineering* 179, 22–34.
 - Wu, X., Murphy, P., Cunnick, J., Hendrich, S. 2007. Synthesis and characterization of deoxynivalenol glucuronide: its comparative immunotoxicity with deoxynivalenol. *Food and Chemical Toxicology* 45, 1846–1855.
 - Xiu, Z.M., Zhang, Q.B., Puppala, H.L., Colvin, V.L., Alvarez, P.J.J. 2012. Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles. *Nano Letters* 12, 4271–4275.
 - Xu, Y., Gao, C., Li, X., He, Y., Zhou, L., Pang, G., Sun, S. 2013. In vitro antifungal activity of silver nanoparticles against ocular pathogenic filamentous fungi. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* 29, 270–274.

-
- Xu, X., Nicholson, P., Ritieni, A. 2007. Effects of fungal interactions among *Fusarium* head blight pathogens on disease development and mycotoxin accumulation. *International Journal of Food Microbiology* 119, 67–71.
 - Xu, X., Madden, L.V., Edwards, S.G. 2014. Modelling the effects of environmental conditions on HT2 and T2 toxin accumulation in field oat grains. *Phytopathology* 104, 57–66.
 - Yagen, B., Joffe, A.Z. 1976. Screening of toxic isolates of *Fusarium poae* and *Fusarium sporotrichioides* involves in causing alimentary toxic aleukia. *Applied and Environmental Microbiology* 32, 423–427.
 - Yassin, M.A., El-Samawaty, A.E.M.A., Dawoud, T.M., Abd-Elkader, O.H., Al Maary, K.S., Hatamieh, A.A., Elgorban, A.M. 2017. Characterization and anti-*Aspergillus flavus* impact of nanoparticles synthesized by *Penicillium citrinum*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24, 1243–1248.
 - Yates, S.G., Tookey, H.L., Ellis, J.J. Burkhardt, H.J. 1968. Mycotoxins produced by *Fusarium nivale* isolated from tall fescue (*Festuca arundinacea* schreb.). *Phytochemistry* 7, 139–146.
 - Yli-Mattila, T., Mach, R.L., Alekhina, I.A., Bulat, S.A. Koskinen, S., Kullnig-Gradinger, C.M., Kubicek, C.P., Klemsdal, S.S. 2004a. Phylogenetic relationship of *Fusarium langsethiae* to *Fusarium poae* and *Fusarium sporotrichioides* as inferred by IGS, ITS, β -tubulin sequences and UP-PCR analysis. *International Journal of Food Microbiology* 95, 267–285.
 - Yli-Mattila, T., Paavanen-Huhtala, S., Parikka, P., Konstantinova, P., Gagkaeva, T.Y. 2004b. Molecular and morphological diversity of *Fusarium* species in Finland and northwestern Russia. *European Journal of Plant Pathology* 110, 573–585.
 - Yu, J., Chang, P-K., Ehrlich, K.C., Cary, J.W., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Payne, G.A., et al. 2004. Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 1253–1262.

-
- Yu, C., Wang, L., Zhu, Z., Bao, N., Gu, H. 2014. Trans-membrane electron transfer in red blood cells immobilized in a chitosan film on a glassy carbon electrode. *Microchemical Journal* 181, 55–61.
 - Yunus, A.W., Razzazi-Fazeli, E., Bohm, J. 2011. Aflatoxin B1 in affecting broiler's performance, immunity, and gastrointestinal tract: a review of history and contemporary issues. *Toxins* 3, 566–590.
 - Zablotowicz, R.M., Abbas, H.K., Locke, M.A. 2007. Population ecology of *Aspergillus flavus* associated with Mississippi Delta soils. *Food Additives and Contaminants Part A* 24, 1102–1108.
 - Zhang, F., Guo, Z., Zhong, H., Wang, S., Yang, W., Liu, Y., Wang, S. 2014. RNA-Seq-based transcriptome analysis of aflatoxigenic *Aspergillus flavus* in response to water activity. *Toxins* 11, 3187–3207.
 - Zhao, Y., Wang, Q., Huang, J., Ma, L., Chen, Z., Wang, F. 2018. Aflatoxin B1 and sterigmatocystin in wheat and wheat products from supermarkets in China. *Food Additives and Contaminants Part B Surveillance* 11, 9-14.
 - Zheng, H., Wei, S., Xu, Y., Fan, M. 2015. Reduction of aflatoxin B1 in peanut meal by extrusion cooking. *LWT - Food Science and Technology* 64, 515–519.
 - Zhou, H., George, S., Hay, C., Lee, J., Qian, H., Sun, X. 2017. Individual and combined effects of aflatoxin B₁, deoxynivalenol and zearalenone on HepG2 and RAW 264.7 cell lines. *Food and Chemical Toxicology* 103, 18–27.
 - Zhou, J.Z., Waszkuc, T., Garbis, S., Mohammed, F. 2002. Liquid chromatographic determination of s-adenosyl-l-methionine in dietary supplement tablets. *Journal of AOAC International* 85, 901–905.
 - Zhu, Y., Hassan, Y.I., Watts, C., Zhou, T. 2016. Innovative technologies for the mitigation of mycotoxins in animal feed and ingredients-A review of recent patents. *Animal Feed Science and Technology* 216, 19–29.

- Zöllner, P., Mayer-Helm, B. 2006. Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography-atmospheric pressure ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1136, 123–169.
 - Zougagh, M., Ríos, A. 2008. Supercritical fluid extraction of macrocyclic lactone mycotoxins in maize flour samples for rapid amperometric screening and alternative liquid chromatographic method for confirmation. *Journal of Chromatography A* 1177, 50–57.
 - <https://www.cotrisa.cl/mercado/avena/internacional/detalle.php>
 - <https://www.cotrisa.cl/mercado/maíz/internacional/detalle.php>
 - <https://www.mapa.gob.es/es>
-