



EDUCACIÓN

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



Instituto Tecnológico de Veracruz

Subdirección Académica

División de Estudios de Posgrado e Investigación

"2020, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria"

OFICIO: ITV/DEPI/No.099/2020

A QUIEN CORRESPONDA PRESENTE

Por medio de la presente el que suscribe Dr. Benigno Ortiz Muñiz, Jefe de la División de Estudios de Posgrado e Investigación del Instituto Tecnológico de Veracruz me permito hacer **CONSTAR** que, de acuerdo a los archivos de esta División de Estudios, el (la) **Dr. Oscar González Ríos** fungió como **Co-Director(a)** de la Tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica titulada: **"Estudio de la capacidad antifúngica y antitoxigénica del ácido clorogénico en comparación con NADES (Natural Deep Eutectic Solvents)"** desarrollada por el (la) **C. Hugo Alejandro Caro Zavaleta**, número de control **M17020002**.

Se extiende la presente a la Ciudad de Veracruz, Veracruz a los cinco días del mes de marzo del año dos mil veinte.

ATENTAMENTE

Excelencia en Educación Tecnológica®
Antorcha y Luz de Fuego Permanente®

BENIGNO ORTIZ MUÑIZ
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE VERACRUZ
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

C.c. Archivo



Calz. Miguel Ángel de Quevedo 2779, Col. Formando Hogar
C.P. 91897, Veracruz, Ver. Tel. (229) 934 1500

www.veracruz.tecnm.mx





ACTA DE EXAMEN DE GRADO DE MAESTRÍA

En la H. Veracruz, Veracruz a los 29 días del mes de mayo de 2019, siendo las 11:00 horas, se reunieron en el Aula Magna del Instituto Tecnológico de Veracruz, clave 30DIT0002U, el jurado integrado por:

Presidente(a): Doctorado en Ciencias de los Alimentos
Mirna Leonor Suárez Quiroz

Secretario(a): Doctorado en Ciencias en Alimentos
Patricia Guillermina Mendoza García

Vocal: Doctorado en Ciencia de Alimentos
Hugo Sergio García Galindo

Y de acuerdo con las disposiciones reglamentarias en vigor, se procedió a efectuar el examen de Grado de Maestría a el (la) C. Hugo Alejandro Caro Zavala número de control 117020002 aspirante al Grado de Maestro en Ciencias en Ingeniería
Bioquímica

Tomando en cuenta el contenido de la tesis cuyo título es:
"Estudio de la capacidad antifúngica y antitoxigénica del ácido aloxogénico en combinación con NADES (Natural Deep Eutectic Solvents)

que fue dirigida por Dra. Mirna Leonor Suárez, Dr. Oscar González Ríos una vez concluido el examen oral, dictaminó que fuera Aprobado

El (la) Presidente(a) del jurado le hizo saber a él (la) sustentante el resultado obtenido, el Código de Ética Profesional y le tomó la Protesta de Ley. Dándose por terminado el Acto a las 13:00 horas, y una vez escrita, leída y aprobada, fue firmada para constancia por las personas que en el acto intervinieron, para los efectos legales a que haya lugar se asienta la presente.

PRESIDENTE (A)

Dra. Mirna Leonor Suárez Quiroz
Cédula de Grado: 5691003



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
TECNOLÓGICO NACIONAL
DE MÉXICO
DIRECCIÓN DE SERVICIOS
ESCOLARES Y ESTUDIANTILES

SECRETARIO (A)

Dra. Patricia Guillermina Mendoza García
Cédula de Grado: 7768863

VOCAL

Dr. Hugo Sergio García Galindo
Cédula de Grado: 3509139



SEP
SECRETARÍA
DE EDUCACIÓN
PÚBLICA



Secretaría de Educación Pública

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
Instituto Tecnológico de Veracruz

Estudio de la capacidad antifúngica y antitoxigénica
del ácido clorogénico en combinación con NADES
(Natural Deep Eutectic Solvents)

Tesis

Que para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias en Ingeniería Bioquímica

Presenta:

I.Q. Hugo Alejandro Caro Zavaleta

Asesores:

Dra. Mirna Leonor Suárez Quiroz
Dr. Oscar González Ríos
Dra. María Cruz Figueroa-Espinoza

H. VERACRUZ, VER. MÉXICO.

Mayo 2019

ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ANTIFÚNGICA Y ANTITOXIGÉNICA DEL
ÁCIDO CLOROGÉNICO EN COMBINACIÓN CON NADES
(NATURAL DEEP EUTECTIC SOLVENTS)

Por:

I.Q. Hugo Alejandro Caro Zavaleta

Tesis propuesta a la

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE ALIMENTOS DEL INSTITUTO
TECNOLÓGICO DE VERACRUZ

Como requerimiento parcial para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA BIOQUÍMICA

Mayo 2019

AGRADECIMIENTOS

Gracias a **Dios** por todo lo que me ha permitido realizar, le agradezco por todas las alegrías y tristezas a lo largo de mi camino, gracias Señor porque nunca me has dejado solo en mis peores y mejores momentos, te agradezco por todo lo que has hecho, por todo lo que haces y por todo lo que harás.

A mi mamá **Paulina Zavaleta Cortes** por ser una gran madre y amiga, por siempre apoyarme y creer en mi aun cuando ni yo mismo creo en mí, gracias por siempre estar conmigo y con mis hermanos, este logro es gracias a ti.

A mis hermanos, **omar, chucho y wichi** por siempre apoyarme y ser los mejores hermanos que Dios me pudo dar, y por todas las lecciones aprendidas gracias a ellos, a mi papá **Jose Luis Caro Ramirez** por haber sido un gran padre por cuidarme en todos mis caminos a donde quiera que yo vaya.

A **Dennis Platas** por ayudarme en la parte final de las experimentaciones, por enseñarme muchas lecciones de vida y por convertirse en una persona muy especial para mí. Por creer en mí y siempre alentarme a ser mejor persona y superarme en todo lo que hago noluqta.

A mis amigos del laboratorio; **Carolina, Jorge, Samuel, Nadia, Lucia, Armando, Karen, Arturo, Samuel**, por su apoyo y orientación en cada duda que surgía. A la **Dra. Claudia**, A la **Dra. Jatiziri Mota** por las charlas inspiradoras, por su apoyo, por sus cuestionamientos y sobre todo por sus consejos que han contribuido al desarrollo de este proyecto.

Al **Dr. Oscar González Ríos** por haberme inspirado con su ejemplo de profesor investigador para siempre superarme, por la confianza depositada, por las lecciones que me ha enseñado en lo personal y lo profesional y por abrirme las puertas de su laboratorio desde el año 2012, gracias por todo Dr.

A la **Dra. Mirna Leonor Suárez Quiroz** por la confianza depositada y por la paciencia brindada, por haberme apoyado en la realización de este proyecto y guiarme a lo largo del mismo.

A la **Dra. María Cruz Figueroa Espinoza** por la confianza depositada para la realización de este proyecto, por el apoyo brindado en la realización de los NADES y por la orientación del mismo.

A mis amigos de la generación **Alejandra, Flor, Kalid, Olga Muñoz, Alfonso**, por todo el apoyo en las clases. Olga muchas gracias por tu apoyo en las clases y por la paciencia y sobre todo por la amistad brindada.

A la **Dra. Francisca Sánchez y al Dr. Alberto Ibañez** por convertirse en mi familia y hacerla más grande, gracias por su apoyo y sus oraciones.

A la **Ingeniero Sandra Luz Vázquez y al Maestro Emilio Vázquez Navas** por su gran apoyo, por sus consejos orientándome en mi formación como ingeniero y por el apoyo y la confianza otorgada a mi familia.

Al **Dr. Andrés Acosta** y Al **Dr. Alejandro Aparicio** investigador de la UNPA por la ayuda al desarrollo de este proyecto

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo económico brindado que hizo posible el desarrollo de este trabajo de investigación y la obtención de mí grado.

RESUMEN

IQ. Caro Zavaleta, Hugo Alejandro MCIB Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Instituto Tecnológico de Veracruz. 3 de mayo del 2019. **Estudio de la capacidad antifúngica y antitoxigénica de ácido clorogénico en combinación con NADES (natural deep eutectic solvents)**. Asesores: Dra. Mirna Leonor Suárez Quiroz, Dra. María Cruz Figueroa-Espinoza, Dr. Oscar González Ríos.

Los NADES son solventes líquidos de una sola fase formados a partir de una mezcla con una relación molar específica en sus compuestos. Algunos NADES y compuestos como el ácido clorogénico (ACG) han manifestado actividad antimicrobiana y antitoxigénica. Por otro lado las toxinas son una problemática presente en los alimentos, siendo producidas mayormente por los géneros *Aspergillus* y *Fusarium*. Estos se encuentran asociados a la producción de micotoxinas como Ocratoxina A (OTA), Aflatoxinas (AF) y Fumonisinias (FUMO). En alternativa a dicha problemática se han estudiado diferentes compuestos químicos que inhiban la producción de las toxinas. Por lo que El objetivo del presente trabajo fue estudiar la actividad antifúngica y antitoxigénica de 7 formulaciones de NADES con y sin ACG, contra cepas de *Aspergillus* y *Fusarium*.; mediante 1) Formular y evaluar la estabilidad de las soluciones de NADES y ACG; 2) Evaluar la actividad antifúngica de las soluciones de NADES y ACG contra *A. flavus*, *A. ochraceus* y *F. moniliforme*; 3) Evaluar la actividad antitoxigénica mediante una prueba ELISA de las soluciones de NADES y ACG contra micotoxinas (Aflatoxinas, Ocratoxinas y Fumonisinias). Se obtuvo que 5 de los 7 NADES formulados, fueron estables a las pruebas realizadas y alcanzaron su punto eutéctico; se realizaron pruebas de actividad antifúngica mediante el método de pocillos en cajas Petri con PDA, se midieron los halos de inhibición cada 24h y se tuvieron resultados favorables para 2 de las 5 formulaciones contra la cepa de *Aspergillus ochraceus* y *Fusarium moniliforme*, no así para *Aspergillus flavus*, ya que mostró una resistencia contra cualquiera de los compuestos que se probaron. Con base en el resultado de la etapa anterior se realizó la cuantificación de micotoxinas, OTA y FUMO en las cuales se notó una disminución para el NADES

elaborado a partir de ácido láctico y cloruro de colina, y para el NADES formulado de ácido láctico y betaina, en la producción de Ocratoxina. Para los mismos NADES en combinación del ACG manifestaron una disminución de la producción de la OTA; sin embargo, no existió una disminución en la producción de Fumonisinias para los NADES con y sin combinación del ACG.

ABSTRACT

IQ. Caro Zavaleta, Hugo Alejandro. M. in C. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos, Instituto Tecnológico de Veracruz, May 2019. **Study of the capacity antifungal and anti-toxigenic of the chlorogenic acid in combination with NADES (natural deep eutectic solvents).** Advisors: Dra. Mirna Leonor Suárez Quiroz, Dra. María Cruz Figueroa-Espinoza, Dr. Oscar González Ríos.

NADES are liquid solvents of a single phase from a mixture with a specific molar ratio in their compounds. Some compounds such as chlorogenic acid (ACG) have shown antimicrobial and antitoxigenic activity. On the other hand toxins are a problem in food, being produced mostly by the genera *Aspergillus* and *Fusarium*. These are associated with the production of mycotoxins such as Ochratoxin A (OTA), Aflatoxin (AF) and Fumonisin (FUMO). As an alternative to this problem, different chemical compounds that inhibit the production of toxins have been studied. Therefore, the objective of the present work was to study the antifungal and antitoxigenic activity of 7 formulations of NADES with and without GCA, against strains of *Aspergillus* and *Fusarium*; by 1) Formulate and evaluate the stability of the NADES and ACG solutions; 2) To evaluate the antifungal activity of the NADES and ACG solutions against *A. flavus*, *A. ochraceus* and *F. moniliforme*; 3) To evaluate the antitoxigenic activity by means of an ELISA test of the NADES and ACG solutions against mycotoxins (Aflatoxins, Ochratoxins and Fumonisins). It was obtained that 5 of the 7 formulated NADES were stable to the tests carried out and reached their eutectic point; antifungal activity tests were carried out using the Petri dishes well method with PDA, the inhibition zones were measured every 24h and favorable results were obtained for 2 of the 5 formulations against the *Aspergillus ochraceus* and *Fusarium moniliforme* strain, but not for *Aspergillus Flavus*, since it showed a resistance against any of the compounds that were tested. Based on the result of the previous stage, the quantification of mycotoxins, OTA and FUMO was performed in which a decrease was noted for the NADES elaborated from lactic acid and choline chloride. And for the NADES formulated from lactic acid and betaine in the production of Ochratoxin. For the same NADES

in combination with the ACG they manifested a decrease in the production of OTA; however, there was no decrease in the production of Fumonisin for the NADES with and without the GCA combination.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	III
RESUMEN	V
ABSTRACT	VII
INDICE DE FIGURAS	XI
ÍNDICE DE TABLAS	XII
ABREVIATURAS	XIII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 HONGOS TOXIGÉNICOS	3
2.1.1 Género <i>Aspergillus</i>	4
2.1.2 Género <i>Fusarium</i>	5
2.2 MICOTOXINAS	7
2.2.1 Aflatoxinas	8
2.2.2 Ocratoxina A	10
2.2.3 Fumonisinias	11
2.3 MECANISMO DE SÍNTESIS	13
2.3.1 Factores que regulan el mecanismo de síntesis	13
2.3.1.1 Factores extrínsecos	14
2.3.1.1.1 Temperatura	14
2.3.1.1.4 Factores nutricionales	14
2.3.1.2 Factores Intrínsecos	15
2.3.1.2.1 Actividad de agua (Aw)	15
2.3.1.2.2 Concentración de Ion Hidrogeno (pH)	15
2.6 IMPACTO EN LA SALUD	16
2.6.2 Estrategias para reducir la exposición a micotoxinas	17
2.5 AGENTES ANTIFUNGÍCOS	18
2.5.1 Mecanismos de acción de los agentes antifungícos	19
2.5.1.1 Compuestos que intervienen en la función de la membrana citoplasmática.	19
2.5.1.2 Compuestos activos frente a la pared celular	21
2.5.1.3 Compuestos activos frente a ácidos nucleicos	22
2.5.1.4 Compuestos que inhiben la síntesis proteica	23
2.5.1.5 Compuestos que inhiben el ensamble de los microtúbulos	23
2.5.1 Agentes antifungícos usados en la industria alimentaria	24
2.5.5 Bio-conservación en alimentos	25
2.7 ÁCIDOS CLOROGÉNICOS	27
2.7.1 Actividad antioxidante de los ácidos clorogénicos	29
2.7.2 Propiedades quelantes y anticancerígenas	31
2.7.3 Reducción del riesgo de Diabetes tipo II	31
2.7.4 Efecto contra la acumulación de grasas	32
2.7.5 Biodisponibilidad del Ácido Clorogénico	32

2.7.6	Propiedades antimicrobianas del ácido clorogénico.....	33
2.8	NADES (SOLVENTES NATURALES EUTÉCTICOS PROFUNDOS).....	35
2.8.1	Preparación de NADES.....	37
2.8.2	NADES en los organismos.....	39
2.8.3	Estructura de los NADES.....	39
3.	JUSTIFICACIÓN	43
4.	HIPÓTESIS	44
5.	OBJETIVOS	45
5.1	OBJETIVO GENERAL.....	45
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
6.	MATERIALES Y MÉTODOS	46
6.1	MATERIALES.....	46
6.1.1	Material biológico.....	46
6.1.2	Medios de cultivo.....	46
6.1.3	Reactivos Químicos.....	46
6.1.4	Equipo de laboratorio.....	47
6.2	MÉTODOS.....	47
6.2.1	Formulación de los NADES.....	48
6.2.2	Pruebas de estabilidad de NADES.....	49
6.2.3	Pruebas de actividad antifúngica.....	50
6.2.4	Conservación y propagación de las cepas fúngicas.....	51
6.2.5	Preparación del inóculo para hongos.....	51
6.2.6	Preparación de los NADES con ACG.....	52
6.2.7	Pruebas de actividad antitoxigénica (FUMO, OTA Y AFLA).....	52
7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
7.1	FORMULACIÓN Y DE ESTABILIDAD DE LOS NADES.....	54
7.2	EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LAS FORMULACIONES DE NADES ...	59
7.3	EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTITOXIGÉNICA DE LAS FORMULACIONES DE NADES69	
7.3.1	Evaluación de actividad antitoxigénica de las formulaciones de NADES con ACG.....	71
	CONCLUSIONES	73
	BIBLIOGRAFIA	74
	ANEXO 1	88

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura somática de hongos.	3
Figura 2. Conidióforos de <i>Aspergillus</i>	5
Figura 3. Forma de las esporas de <i>Fusarios</i>	6
Figura 4. Estructura química de Aflatoxinas.	9
Figura 5. Estructura química de Ocratoxina A.	10
Figura 6. Estructura química de Fumonisina B1.	11
Figura 7. Ácidos fenólicos que conforman a los ACG.	27
Figura 8. Estructura de los principales ácidos clorogénicos.	28
Figura 9. Proporción del ácido 5-cafeoilquínico en café verde.	29
Figura 10. Mecanismo propuesto de la actividad antioxidante por el ácido clorogénico.	30
Figura 11. Esquema de la fase de diagrama para una mezcla eutéctica binaria. .	36
Figura 12. Compuestos naturales comúnmente utilizados para la elaboración de los NADES.	38
Figura 13. Espectro de resonancia magnetica nuclear del 1-2 propanodiol-cloruro de colina-agua.	40
Figura 14. Diagrama de la metodología general.	47
Figura 15. Diluciones para ajustar el número de esporas/mL.	51
Figura 16. Resultados de las pruebas de estabilidad en los NADES.	56
Figura 17. Viscosidades de los NADES.	58
Figura 18. Pocillos realizados en el medio dentro de las cajas Petri.	59
Figura 19. Inhibición de Ácido Láctico frente a <i>Aspergillus ochraceus</i>	61
Figura 20. Halos de inhibición exhibidos por NADES 1 y 2 en <i>Aspergillus ochraceus</i>	62
Figura 21. Halos de inhibición exhibidos por NADES 1 y 2 en <i>Fusarium moniliforme</i>	63
Figura 22. Halos de inhibición del NADES 1 frente a <i>Aspergillus ochraceus</i>	65
Figura 23. Halos de inhibición del NADES 1 frente a <i>Fusarium moniliforme</i>	66
Figura 24. Halos de inhibición del NADES 2 frente a <i>Aspergillus ochraceus</i>	67
Figura 25. Halos de inhibición del NADES 2 frente a <i>Fusarium moniliforme</i>	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Hongos y micotoxinas de importancia mundial.	8
Tabla 2. Tabla de micotoxinas encontrados en alimentos y sus niveles permisibles según la FDA (2004).	12
Tabla 3. Clasificación de los antifúngicos de acuerdo a su estructura y sitio de acción	19
Tabla 4. Ácidos clorogénicos.....	27
Tabla 5. Composición de las diferentes formulaciones de NADES.	49
Tabla 6. Concentraciones para cada NADES dependiendo de la cepa de hongo.	52
Tabla 7. Composiciones de los NADES.....	55
Tabla 9. Resultados de las pruebas de actividad antifúngica NO IN: no inhibición.	60
Tabla 10. Inhibición del NADES 1 y 2 enriquecidos de ACG a diferentes concentraciones. ...	64
Tabla 11. Resultados de pruebas antitoxigénica de NADES 1 y 2.....	69
Tabla 12. Producción de Fumonisina en cepas de Fusarium moniliforme con soluciones del NADES 1 y 2	70
Tabla 13. Producción de OTA en presencia del ACG.	71
Tabla 14. Producción de fumonisinas en presencia de ACG.	72

ABREVIATURAS

ACG	Ácido clorogénico
AF	Aflatoxinas
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
OTA	Ocratoxina A
FUMO	Fumonisinias
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
pH	Potencial de Hidrogeno
OMS	Organización mundial de la salud
JECFA	Comité de expertos en aditivos alimentarios
ARN	Ácido ribonucleico
NADES	Solventes eutécticos naturales profundos
DES	Solventes eutécticos profundos
IL	Líquidos iónicos

1. INTRODUCCIÓN

En el año 2003 fueron descubiertos una nueva clase de solventes naturales, los cuales a comparación de los solventes orgánicos convencionales, poseen características y propiedades totalmente nuevas, estos fueron nombrados como solventes eutécticos naturales profundos (NADES, por sus siglas en ingles). Estos solventes están formados por 2 o más metabolitos primarios producidos en la naturaleza, que al ser mezclados en un radio molar específico y con una determinada concentración de agua, se obtiene un líquido. Exhiben una fuerte depresión en su punto de fusión transformando su estado de solido a líquido. Dichos solventes han sido clasificados en una tercera clase de líquidos en el organismo, después del agua y los lípidos. Estudios recientes han reportado algunas formulaciones de NADES, manifiestan actividad antimicrobiana y antifúngica.

Por otro lado el crecimiento de hongos filamentosos en los alimentos, generan un deterioro en los mismos, dando como resultado una drástica reducción en su calidad. Adicionalmente, algunas especies como *Aspergillus* y *Fusarium* son responsables de generar metabolitos secundarios tóxicos. Dichos metabolitos o micotoxinas son responsables de un 16 % de las enfermedades que son transmitidas a través de los alimentos. Las principales micotoxinas son la Aflatoxina B1, Fumonisina B1 y Ocratoxina A, debido a que son altamente peligrosas para el ser humano ya que son agentes cancerígenos, mutagénicos y teratógenicos pero el efecto más importante es la capacidad de alguna de ellas para obstaculizar la respuesta inmunitaria, reduciendo así la respuesta a enfermedades infecciosas. Los ácidos clorogénicos (CGA) son una familia de ésteres formada por ácidos trans-cinámicos (cafeico, ferúlico, o p-cumárico), siendo el ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA) CGA el más abundante en el café. Este compuesto presenta propiedades biológicas antioxidantes, quelantes, antimicrobianas y anti-carcinógenas. El CGA y sus alquilestéres han demostrado tener un importante efecto antifúngico y antitoxigénico.

Diversos estudios han demostrado que la capacidad antimicrobiana de ciertos compuestos se ve favorecida cuando se encuentran disueltos en algún NADES.

Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo es estudiar la capacidad antifúngica y antitoxigénica del ácido clorogénico *5-cafeoilquínico* utilizando diferentes formulaciones de NADES como disolvente.

2. ANTECEDENTES

2.1 Hongos toxigénicos

Los hongos filamentosos son microorganismos eucariotas multicelulares. Se caracterizan por tener un núcleo verdadero y carecer de pigmentos fotosintéticos, su pared celular está compuesta de celulosa, quitina y N-acetil glucosamina (NAG) (Arroyo-Manzanares *et al.*, 2014)

Poseen un gran número de filamentos llamados hifas, al conjunto de hifas se le conoce como micelio.

Las hifas pueden ser no-septadas, septadas-unicelulares y septadas-multicelulares, vegetativas o reproductivas (Figura 1). Las hifas reproductivas generalmente se extienden en el aire y crean exosporas, ya sea en forma de conidios o esporangios (Arroyo-Manzanares *et al.*, 2014).

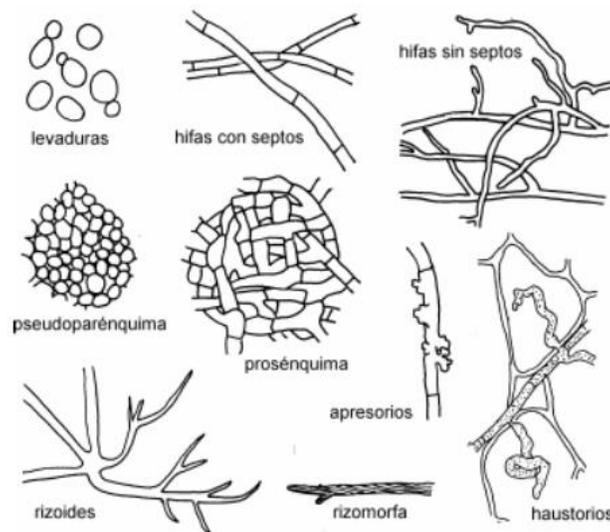


Figura 1. Estructura somática de hongos. Fuente: (Arroyo-Manzanares *et al.*, 2014)

Los metabolitos secundarios producidos reciben el nombre de micotoxinas y a los hongos que las producen hongos toxigénicos. Los hongos toxigénicos producen las toxinas al conjugarse factores apropiados del ambiente y los sustratos que necesitan para desarrollarse. Los hongos toxigénicos en cultivos se pueden clasificar en dos categorías:

- A) Hongos de campo, que encuentran las mejores condiciones para desarrollarse y elaborar sus toxinas antes de la cosecha de las plantas o de sus granos
- B) Hongos de almacén; que hallan las condiciones necesarias al ser guardados en condiciones inapropiadas los productos básicos y los alimentos elaborados con ellos.

Los hongos relacionados con la producción de alimentos son principalmente tres géneros: *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*, los cuales se pueden encontrar en cultivos y en productos almacenados. Los hongos del género *Fusarium* contaminan principalmente cultivos y materias primas antes de la cosecha, mientras que los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* se asocian con la contaminación de materias primas y alimentos durante el secado y almacenamiento (Zain 2011).

2.1.1 Género *Aspergillus*

Los hongos del género *Aspergillus* poseen hifas septadas y hialinas. Los conidióforos se originan en la célula basal, situada en la base de las hifas soporte y terminan en una vesícula en el ápice las cabezas conidiales presentan bajo el microscopio cuatro formas básicas: globosa, radiada, columnar o claviforme y a simple vista las más grandes suelen parecer diminutos alfileres sobre el sustrato (Figura 2). El color es la principal característica macroscópica para la identificación de los grupos de *Aspergillus*, los cuales varían entre distintos tonos de verde, pardo, amarillo, blanco, gris y negro (D'mello y MacDonald, 1997).

Los *Aspergillus* tienen la capacidad para crecer a diferentes temperaturas sobre sustratos con diversas actividades de agua (dependiendo de la especie), la cual va de 0.7-0.94. El rango de temperatura óptimo está entre 30-33°C para la mayoría de las especies (Prange *et al.*, 2005).

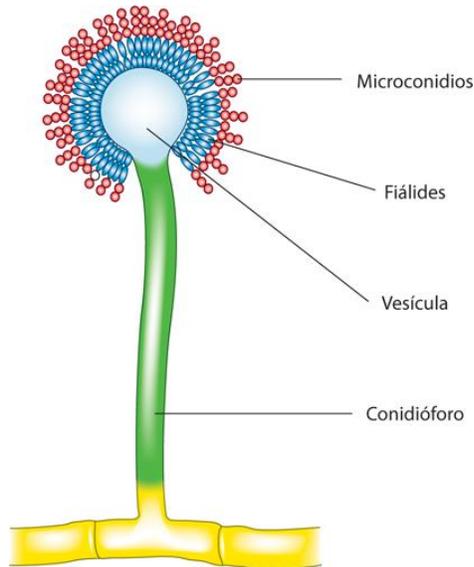


Figura 2. Conidióforos de *Aspergillus*. Fuente: Alexandro Trujillo: Micología médica básica

2.1.2 Género *Fusarium*

El género *Fusarium* es un grupo de hongos filamentosos ampliamente distribuidos en el suelo y plantas. De las más de 100 especies de *Fusarium* descritas, solo 12 e ellas pueden considerarse patógenas para el humano, entre ellas destacan *F. solani*, *F. oxysporum* y *F. verticilloides*, en orden decreciente de frecuencia (Sajid *et al.*, 2018).

La forma y tamaño de las esporas es la característica principal para el reconocimiento de los *Fusarium*. Las esporas están dispersas en el micelio aéreo o en esporodocios o masas limosas (pionotos). Los macroconidios son curvados (3-8 x 11-70 μm), pluriseptados con una apical más o menos puntiaguda; los

microconidios (2-4 x 4-8 μm) son comúnmente unicelulares, elipsoidales (figura 3). Los conidióforos del micelio aéreo en algunos casos solo constan de una célula conidiógena, en otros estas ramificados, a veces en verticilos. Las monofiálides producen conidios desde una sola abertura y en las polifiálides surgen las esporas desde más de una abertura en la misma célula (Glenn, 2007).

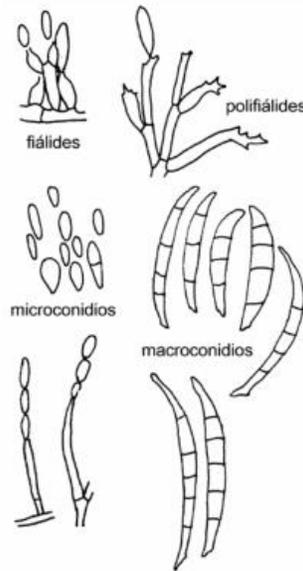


Figura 3. Forma de las esporas de *Fusarios*. Fuente: Glenn, 2007.

Las especies de *Fusarium* se encuentran en los vegetales antes de la cosecha. Se conocen por contaminar cultivos de cereales y granos, principalmente maíz. Algunos, como el *F. solani*, están frecuentemente ligados a cereales y otros cultivos específicos.

La mayoría de las especies de los *Fusarium* son ligeramente xerófilos y requieren de una a_w entre 0.86 y 0.91 (Glenn, 2007).

2.2 Micotoxinas

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos filamentosos, capaces de crecer en gran variedad de sustratos y bajo las más diversas condiciones ambientales, contaminando con frecuencia los alimentos a los cuales se asocian, en especial los de origen vegetal. Son capaces de desencadenar diversas alteraciones y cuadros patológicos en el hombre y los animales. Son moléculas de bajo peso molecular y suelen ser específicas para un grupo de especies de un mismo género (Rodríguez-Carrasco *et al.*, 2013).

Las micotoxinas son altamente estables y no se destruyen fácilmente durante el proceso de elaboración de los alimentos, el mismo compuesto puede ser también elaborado por hongos pertenecientes a géneros distintos. En general, cuanto más compleja es la ruta biosintética de una micotoxina, menor será el número de especies fúngicas capaces de elaborarla. La mayoría de las micotoxinas descritas están producidas por especies de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* (Sulyok *et al.*, 2013).

Las micotoxinas que se encuentran en diversos alimentos y suplementos alimenticios se han relacionado con algunas enfermedades en humanos y animales. La exposición a micotoxinas puede producir micotoxicosis, con resultados que van desde la muerte a efectos nocivos en los sistemas nervioso central, con resultados que van desde la muerte a efectos nocivos en los sistemas nervioso central, el cardiovascular, el respiratorio y en el aparato digestivo. Las micotoxinas pueden ser carcinogénicas, mutagénica, teratogénicas e inmunodepresoras (Cabañes *et al.*, 2000).

Una micotoxina se considera “importante” si se ha demostrado su capacidad para tener efectos considerables sobre la salud de las personas y la productividad de los animales en diversos países (Tabla 1) (Bhunja, 2008).

Tabla 1. Hongos y micotoxinas de importancia mundial.

Especie de hongo	Micotoxinas producidas
<i>Aspergillus parasticus</i>	Aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ y G ₂
<i>Aspergillus flavus</i>	Aflatoxinas B ₁ y B ₂
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	Toxina T-2
<i>Fusarium graminearum</i>	Desoxinivalenol , Zearalenona
<i>Fusarium moniliforme (F. verticillioides)</i>	Fumonisina B ₁
<i>Penicillium verrucosum</i>	Ocratoxina A
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Ocratoxina A

(Bhunia, 2008).

Hasta ahora, más de 300 micotoxinas con diversas estructuras han sido identificadas. Estas contaminan la mayoría de los cereales y alimentos frescos, y afectan directamente a la salud humana y animal, ejerciendo enfermedades transmitidas por alimentos y efectos toxicológicos subagudos y crónicos agudos, y algunos considerados como cancerígenos. Muchas micotoxinas a bajas concentraciones son capaces de inducir la expresión de citocromo P450 y otras enzimas implicadas en la biotransformación (Bhunia, 2008).

Las micotoxinas y sus metabolitos provocan trastornos celulares diferentes y tan específicos como el estrés oxidativo, la inhibición de la traducción, el daño del ADN y la apoptosis en las células huésped, lo que provoca diversos tipos de citotoxicidades (FAO b, 2003).

2.2.1 Aflatoxinas

Las aflatoxinas son las micotoxinas más importantes, se caracterizan por ser sustancias hepatotóxicas, carcinogénicas, teratogénicas y mutagénicas. Son producidas por tres especies de la sección *Flavi*: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus nomius* (Cabañes *et al.*, 2000).

Las principales aflatoxinas son: B₁, B₂, G₁, G₂ y M₁, nombradas así por su fluorescencia bajo luz uv (B: “blue” o G: “green”) (Figura 4). La AFB₁ se considera la aflatoxina mas toxica, ha sido clasificada en el grupo I por la Agencia

Internacional de Investigación del Cáncer (IARC) como carcinógeno cuyo órgano objetivo es el hígado (FAO b, 2003) (Marin *et al.*, 2013)

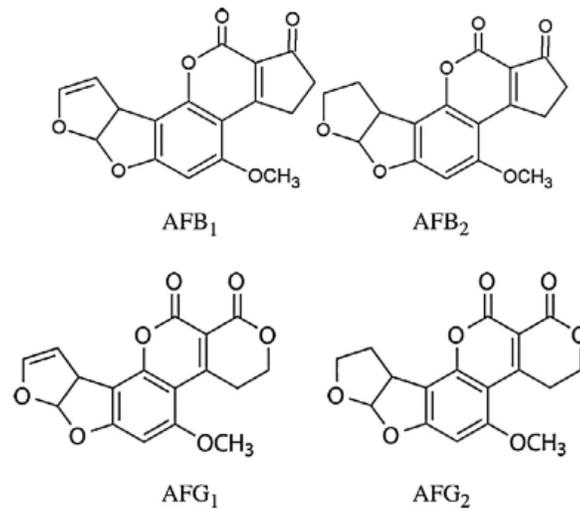


Figura 4. Estructura química de Aflatoxinas. Fuente: Marin *et al.*, 2013

La exposición a las aflatoxinas es difícil de evitar ya que no es fácil prevenir el crecimiento de los hongos en los granos y los productos. La Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de Estados Unidos estableció niveles máximos de 20 mg/kg para granos y otros forrajes destinados a la crianza animal y vacas lecheras, 100 mg/Kg para granos destinados a ganado y cerdos reproductores así como gallinas ponedoras, 200 mg/kg para granos empleados en el engorde de cerdos (FAO b, 2003).

2.2.2 Ocratoxina A

Su nombre se deriva de *A. ochraceus*, el hongo del cual fue aislado la primera vez. Es un derivado dihidro-isocumarínico ligado a fenilamina (Figura 5). La toxina pura es un polvo cristalino blanco con punto de fusión a 169 °C. Emite fluorescencia verde que cambia al celeste en presencia de un álcali. La forma ácida es soluble en solventes orgánicos polares y la sal sódica en agua. Es inestable a la luz, sin embargo la solución etanólica es estable al calor y persiste el 35% de la cantidad inicial luego de tratar cereales contaminados durante 3 horas en autoclave. Los oxidantes fuertes, ácidos fuertes y bases fuertes la degradan químicamente (Marin *et al.*, 2013).

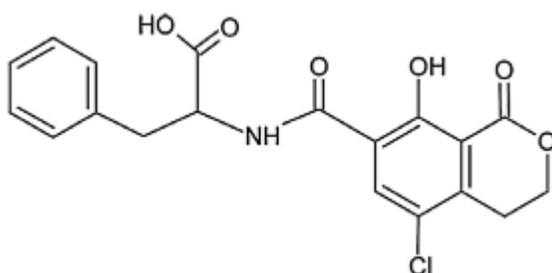


Figura 5. Estructura química de Ocratoxina A. Fuente: Marin *et al.*, 2013.

En áreas cálidas las Ocratoxinas son formadas por especies de *Aspergillus*, pero en climas más fríos por cepas de *Penicillium*. Las especies productoras se encuentran en las secciones *Circumdati* (*A. ochraceus*, *A. westerdijkiae*, *A. melleus*, *A. auricomis*, *A. ostianus*, *A. petrakii*, *A. sclerotiorum*, *A. sulfureus*), *Flavi* (*A. alliaceus*, *A. albertensis*), *Nigri* (*A. niger*, *A. carbonarius*) (Frisvad *et al.*, 2004).

La Ocratoxina A es hepatotóxica y nefrotóxica, además, es un potente agente teratógeno y carcinógeno. Se encuentra presente en el maíz, el arroz, el frijol, el café, las especias, las nueces e higos. Se ha encontrado OTA en la sangre (y leche) de personas de diversos países europeos, como Francia, Italia, Alemania, Dinamarca, Suecia, Polonia, península balcánica, y Bulgaria (FAO b, 2003).

2.2.3 Fumonisin

Las fumonisinas fueron descubiertas en 1989, y son parte de la familia de las micotoxinas con una estructura similar a la esfinganina, precursor de los esfingolipidos. Son producidas principalmente por las especies de *Fusarium* de la sección *Liseola*. El *F. moniliforme* y el *F. napifore*, *F. dlamini*, y *F. nygamai* (Marin *et al.*, 2013).

Se conocen al menos 12 análogos de Fumonisin, sin embargo las más importantes son las de la serie B (FB₁, FB₂ y FB₃). El isómero que predomina es la Fumonisin B₁ (Figura 6), es la más tóxica y se ha reportado que es promotora de tumores en ratas y causa leucoencefalomalacia en caballos y edema pulmonar en cerdos; así también, la FB₁, interactúa con la AB₁ acelerando el proceso de generación de cáncer hepático en animales de experimentación (Zain, 2011).

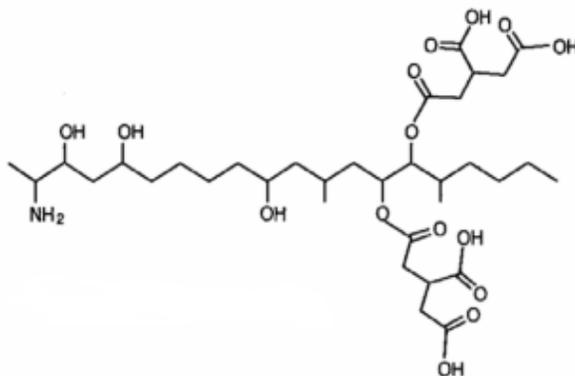


Figura 6. Estructura química de Fumonisin B1. Fuente: Zain, 2011.

Las Fumonisin son estables al calor, y el contenido de toxina se reduce significativamente durante procesos en los que la temperatura excede los 150°C (Marin *et al.*, 2013). Ciertos tratamientos térmicos o extrusión han demostrado reducir en cierta medida la presencia de Fumonisin (FBs) en alimentos. En general, los productos en consumo humano directo como hojuelas de maíz, tienen bajos niveles de FBs (D'mello y MacDonald, 1997).

La contaminación de los alimentos con micotoxinas depende de las condiciones ambientales, que pueden propiciar el crecimiento del hongo y por ende la producción de las toxinas. Se considera que las micotoxinas han contaminado alrededor del 25% de cereales; además, de nueces, especias, frutas, etc. Por tanto, la mayoría de productos agrícolas pueden ser susceptibles de contaminación casi en cualquier momento, desde su producción en el campo, durante la cosecha, en el transporte y en el almacenamiento (Rodríguez-Carrasco *et al.*, 2013)

Tabla 2. Tabla de micotoxinas encontrados en alimentos y sus niveles permisibles según la FDA (2004).

Micotoxina	Alimento	Niveles comunes (mg/kg)	Niveles con episodios tóxicos (mg/kg)	Niveles permisibles de la FDA
aflatoxina	cacahuete	2-6.	30-125	20 ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en alimentos; 0.5 ppb aflatoxina M1 en leche
	mantequilla de cacahuete	10	14-213	
	Cacahuete azucarado	20	30-230	
	Maíz	>10		
fumonisinas	productos de maíz	01-12.	>20,000	2 ppm en germen seco de maíz molido; 3 ppm en el maíz para las palomitas; 4 ppm en los productos derivados del maíz, del salvado del maíz y de la masa parcialmente desgerminada
	Maíz (de varios países)	30-2.000		
	cebada	<3	>25 (riñón del cerdo)	
OTA	Trigo	210-2900 harina del pan (trazas)	3800 (cebada en la republica checa)	Ningún nivel es permisible
	Maíz			

2.3 Mecanismo de síntesis

El metabolismo primario de un organismo es el conjunto de reacciones químicas (degradación síntesis) catalizadas por enzimas, las cuales proporcionan al organismo la energía, los compuestos intermediarios para la síntesis y macromoléculas clave para su desarrollo.

El metabolismo secundario comprende el proceso de síntesis en el que los productos finales, metabolitos secundarios, no juegan un papel primordial para el organismo. Y estos a su vez dan lugar a una gran diversidad de moléculas, tales como las micotoxinas.

Los mecanismos de regulación del metabolismo secundario son muy complejos, ya que estos dependen de la disponibilidad del sustrato y del desequilibrio progresivo entre los nutrientes (Darwish *et al.*, 2014).

2.3.1 Factores que regulan el mecanismo de síntesis

Los hongos toxigénicos crecen mejor bajo ciertas condiciones ambientales, sin embargo, la presencia de estos hongos no implica una síntesis de micotoxinas, puesto que la producción de metabolitos secundarios no es esencial para el microorganismo.

Las condiciones a las cuales son producidas las micotoxinas, son muy específicas e independientes de aquellas requeridas para el crecimiento del hongo. De forma contraria, la ausencia visible de hongos no significa que las micotoxinas no puedan estar presentes, dado que pueden permanecer en el producto tiempo después de que el hongo productor ha desaparecido.

Los principales factores que influyen el crecimiento y producción de toxinas de *Aspergillus* son temperatura, pH y humedad. Sin embargo los factores ambientales también participan, así como los factores químicos y biológicos los cuales juegan un papel importante (Marroquín-Cardona *et al.*, 2014).

2.3.1.1 Factores extrínsecos

2.3.1.1.1 Temperatura

Los hongos son capaces de sobrevivir bajo un amplio rango de temperaturas en los ambientes donde habitan. La temperatura de crecimiento reportada para hongos es de 10-35°C, con excepción de algunas especies que son capaces de crecer fuera de este rango.

En general la temperatura óptima para la producción de micotoxinas es por debajo de la temperatura de crecimiento. Por lo cual este factor puede ser considerado un factor ambiental para controlar o prevenir la producción de micotoxinas en alimentos, principalmente en almacenamiento. Sin embargo la temperatura no es fácilmente controlable, particularmente en productos agrícolas (Miraglia *et al.*, 2009).

2.3.1.1.4 Factores nutricionales

Todas las formas de vida incluyendo los hongos, requieren material exógeno para construir la biomasa. Como heterótrofos, los hongos requieren compuestos orgánicos para la síntesis de la biomasa (metabolismo anabólico) y para producir la energía para producir estas reacciones (metabolismo catabólico). Estos aspectos del metabolismo son frecuentemente referidos como metabolismo primario (Klich, 2007).

Los hongos utilizan un número de fuentes de carbono diferentes para la síntesis de carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos y proteínas. La oxidación de azúcares, alcoholes, proteínas, lípidos y polisacáridos lo proveen de una fuente de energía.

Los hongos requieren de una fuente de nitrógeno para la síntesis de aminoácidos para proteínas, purinas y pirimidinas para ácidos nucleicos, glucosamina para quitina, y varias vitaminas

Los hongos requieren sulfuro, fosforo, magnesio y potasio que pueden estar disponibles en forma de sales. Los elementos traza como hierro, cobre, magnesio,

zinc y molibdeno son requeridos como cofactores para las enzimas pero en grandes cantidades son tóxicos para algunos hongos (Klich, 2007).

2.3.1.2 Factores Intrínsecos

La producción de micotoxinas está influenciada por el genotipo del organismo como por el ambiente fisicoquímico. La producción de cualquier micotoxina depende de la cepa y no solo de la especie (Darwish *et al.*, 2014).

2.3.1.2.1 Actividad de agua (Aw)

Los requerimientos de humedad de hongos que atacan productos alimenticios son relativamente bajos, muchas especies crecen a 0.85Aw o menos, aunque algunas levaduras requieren generalmente una alta actividad de agua. 0.60 Aw es considerada el límite para crecimiento celular, pero las esporas de *Aspergillus* y *Penicillium* por ejemplo, son capaces de sobrevivir a bajos Aw por varios años (Mousa *et al.*, 2013).

2.3.1.2.2 Concentración de Ion Hidrogeno (pH)

La concentración del ion hidrogeno en un medio puede afectar el crecimiento indirectamente por su efecto en la disponibilidad de nutrientes o directamente por su acción en la superficie celular. El requerimiento ácido/alcalino para el crecimiento de levaduras y hongos es muy amplio, el rango va de un pH de 3 hasta 8, con un óptimo alrededor de pH 5, si los requerimientos nutritivos son satisfechos, En general, las especies de *Aspergillus* son más tolerantes a un pH alcalino mientras que las especies en *Penicillium* parecen ser más tolerantes a pH ácido.

En 1991 wheeler et al., observaron que a valores cercanos a un pH neutro, los hongos compiten con bacterias por el espacio, y a altos valores de Aw la mayoría de los hongos no muestran competitividad en el medio. Sin embargo, donde la Aw es menor a 0.90, los hongos se vuelven dominantes independientemente del valor del pH (Mousa *et al.*, 2013).

2.6 Impacto en la salud

La ingestión inhalación y/o absorción de micotoxinas, produce enfermedad e incluso la muerte en animales y personas. Los órganos y sistemas más afectados incluyen el sistema nervioso central, sistema gastrointestinal, sistema inmune, hígado, riñón y piel.

El principal efecto de intoxicación por micotoxinas reportado, es la deterioración del hígado o la función renal, los cuales a largo plazo pueden inducir cáncer. Algunas toxinas afectan la replicación del ADN y representan efectos mutagenos o teratógenos.

Por otro lado, existen micotoxinas, que en bajas dosis, pueden ocasionar temblores incesantes en animales, pero que con una dosis ligeramente más alta, pueden causar daño cerebral e incluso la muerte (Zain, 2011).

Así también existen neurotoxinas, que en bajas dosis, pueden ocasionar temblores incesantes en animales pero con una dosis ligeramente más alta, pueden causar daño cerebral e incluso la muerte. A su vez se ha determinado que existen dos tipos de toxicidad: la aguda y la crónica. En la toxicidad aguda el individuo consume alimentos con una alta carga de micotoxina, por otro lado en la toxicidad crónica el individuo consume alimentos con una baja carga de micotoxina pero de manera repetida a lo largo de un cierto periodo de tiempo (Zain, 2011).

El comité mixto FAO/OMS (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación/ Organización Mundial de la Salud) de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) ha evaluado, en diferentes sesiones, los efectos tóxicos de diversas micotoxinas, concluyendo que el riesgo de intoxicación aguda es entre moderado y bajo en comparación con otras familias de compuestos de origen microbiológico. Sin embargo el riesgo se incrementa, según el organismo de Naciones Unidas, cuando se habla de efectos crónicos (FAO b, 2003).

2.6.2 Estrategias para reducir la exposición a micotoxinas

El principal método para prevenir la exposición a las micotoxinas es evitar el ingerir alimentos contaminados por hongos, a pesar de ellos, gran parte de la población mundial se enfrenta a la falta de seguridad alimentaria por lo que se ven obligados a consumir alimentos contaminados. Las poblaciones que dependen en gran medida de cultivos básicos que son propensos a la contaminación por moho, tienen el mayor riesgo de exposición a las micotoxinas (Marroquín-Cardona *et al.*, 2014).

Por otro lado se han propuesto múltiples estrategias de intervención para prevenir y/o mitigar la exposición a las micotoxinas. Entre ellas figuran las estrategias de prevención primaria, cuyo objetivo es evitar la exposición, y las estrategias de intervención secundaria, que modulan el metabolismo, reduciendo así la dosis interna (Kensler *et al.*, 2011). Se han revisado las estrategias de intervención primaria y secundaria que abordan la exposición a las micotoxinas. Los autores describen ejemplos de estrategias de prevención primaria, incluyendo el uso de la educación comunitaria en ensayos de intervención post-cosecha (Turner *et al.*, 2005).

Se ha propuesto el diseño de productos que contengan cepas de hongos competitivas para algunas micotoxinas (aflatoxinas) y actualmente se utiliza en Benin y Kenia (Klueken *et al.*, 2016). Del mismo modo, el desarrollo de cultivos resistentes a las micotoxinas es una estrategia alternativa para hacer frente a la carga de las micotoxinas. Por ejemplo, en el caso de los tricotecenos, la investigación de los cultivos resistentes se ha centrado en el trigo y la cebada, que son los granos más comúnmente afectados (Foroud y Eudes, 2009). También se ha investigado la cría de cultivos de resistencia *Aspergillus flavus* para reducir la producción de AF.

Una de las alternativas más importantes a nivel mundial, es el uso de compuestos químicos con características antifúngicas, que son utilizados como conservadores en la industria alimentaria como por ejemplo:

- Ácido benzoico y benzoato de sodio
- Ácido sórbico y sorbatos
- Ácido propiónico y propionatos
- Ácido acético y acetatos
- Dióxido de azufre y sulfitos

2.5 Agentes antifúngicos

Un antifúngico o antimicótico engloba cualquier sustancia capaz de producir una alteración tal de las estructuras de una célula fúngica que consiga inhibir su desarrollo, alterando su viabilidad o capacidad de supervivencia (Gregorí-Valdés, 2005).

Los antimicóticos incluyen una amplia variedad de sustancias con diferentes estructuras químicas y mecanismos de acción. La clasificación se realiza según su estructura en: polienos, azoles, alilaminas, entre otros; de acuerdo con su origen de sustancias producidas por organismos vivos o derivados de síntesis químicas; de acuerdo con su espectro de acción en: amplio o restringido y de acuerdo con el sitio de acción (Tabla 3).

Tabla 3. Clasificación de los antifúngicos de acuerdo a su estructura y sitio de acción

Estructura	Antifúngico	Sitio de acción
Antibiótico	Polienos: anfotericina, nistatina y nitamicina	En membrana celular
	No polienos: griseofulvin	
Azoles	Imidazol:miconazol, clotrimazol	En membrana celular
	Triazoles: fluconazol, itraconazol, ketoconazol	
	Triazoles de segunda generación: voriconazol	
	ravuconazol, posaconazol	
Pirimidinas fluoradas	Flucitosina	En el núcleo
Alilaminas	Terbinafina, naftitina	En membrana celular
Lipopéptidos	Papulacandinas	En pared célula
	Triterpenos glicosilados	
	Equinocandinas: caspofungina, anidoulofungina	
	micafungina	
Otros	Yoduro de potasio, ciclopirox tolnaftano	

(Thompson III *et al.*, 2009)

2.5.1 Mecanismos de acción de los agentes antifúngicos

2.5.1.1 Compuestos que intervienen en la función de la membrana citoplasmática.

La actividad de los tres grupos de antifúngicos de mayor uso clínico (polienos, azoles y alilaminas) está dada por la inhibición de la síntesis del ergosterol o interactuando directamente con este. El ergosterol es un biorregulador de los fluidos de la membrana y por tanto de la integridad de la célula fúngica (Gregori-Valdés, 2005).

Desde la década de los 50 hasta el descubrimiento de los azoles, los polienos fueron considerados el estándar en el tratamiento sistémico de las infecciones fúngicas. En la actualidad Amfotericin B continua siendo uno de los más efectivos

dentro de los antifúngicos disponibles, sin embargo su utilidad clínica se ve limitada debido a su alta toxicidad (Palacio *et al.*, 2002).

Existe una marcada asociación entre la susceptibilidad a los polienos y la presencia de esteroides de la membrana celular eucariota.

Todos los organismos sensibles a los polienos (levaduras, algas, protozoos) contienen esteroides en la membrana celular no así los organismos resistentes a estos compuestos (Mikamo *et al.*, 2002).

Para muchos polienos, como Anfotericin B, se ha propuesto que la interacción de los antifúngicos con los esteroides de la membrana produce poros acuosos. Estos consisten en un anillo de 8 moléculas de Anfotericin B unidas hidrofólicamente a los esteroides de la membrana. En esta configuración los residuos hidroxil polieno quedan dirigidos hacia dentro, lo cual altera la permeabilidad de la célula y provoca la salida de componentes vitales del citoplasma trayendo consigo la muerte celular. También se ha sugerido que la anfotericina B causa daños oxidativos a la membrana plasmática y que la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos está implicada en la susceptibilidad de las levaduras a los polienos.

La resistencia a los polienos ocurre por la disminución en el contenido de ergosterol o sustituyendo el ergosterol por otros esteroides con menos afinidad por los polienos (Thompson III *et al.*, 2009).

Las alilaminas son agentes fungicidas sintéticos que producen una inhibición no competitiva de la escualeno epoxidasa, enzima que junto a la escualeno ciclasa convierte el escualeno en lanosterol, la muerte celular es causada en mayor medida por la acumulación del producto intermediario más que por la deficiencia de ergosterol, pues el aumento de los niveles de escualeno puede incrementar la permeabilidad de la membrana (Thompson III *et al.*, 2009).

Los azoles son fármacos lipófilos que actúan alternando funcionalmente la membrana fúngica mediante la inhibición de la síntesis del ergosterol. Aunque los azoles de más reciente aparición son inhibidores de la 14 α -demetilasa, existe una heterogeneidad de acción entre estos antifúngicos. Los más primitivos (Miconazol,

Econazol y Ketoconazol) tienen un complejo modo de acción, inhibiendo varias enzimas que intervienen en la biosíntesis de los lípidos de la membrana (Nosanchuk, 2008).

Varios autores plantean que el sitio primario de acción de estos compuestos es una hemo proteína, dependiente del citocromo p-450, la cual co-cataliza la 14 α -desmetilación del lanosterol: precursor del ergosterol. La inhibición de la 14 α -demetilasa provoca una disminución del contenido de ergosterol en la membrana de la célula fúngica y la acumulación de los precursores lo cual trae como resultado una alteración en la estructura y función de la misma (Yeo y Wong, 2005).

2.5.1.2 Compuestos activos frente a la pared celular

El mecanismo de acción de las aculeacinas, equinocandinas y papulocandinas está basado en la inhibición competitiva de la β -(1,3)-glucano sintetasa viéndose de esta forma afectada la formación de β -glucano. El tratamiento de los hongos con estos compuestos inhibe la síntesis de la estructura del glucano sin afectar los ácidos nucleicos y la síntesis de manano. Los inhibidores de la síntesis de glucano también tienen efecto secundario en otros compuestos de la célula intacta incluyendo una reducción en el contenido de ergosterol y lanosterol y un incremento en el contenido de quitina en la pared celular (Nosanchuk, 2008; Thompson III *et al.*, 2009). La inhibición de la β -(1-3)-glucano sintetasa provoca cambios citológicos y ultraestructurales en el hongo caracterizado por el crecimiento de pseudohifas y espesamiento de la pared celular (Kanafani y Perfect, 2010).

En base a tal mecanismo se ha planteado una homología con penicilina y sus derivados que actúan sobre transpeptidasas y sintetasas en la pared bacteriana (PBP). Dado que las células de mamíferos carecen de pared celular, este blanco de acción es óptimo para los antifúngicos. La consecuente depleción del glucano

de la pared fúngica lleva a un colapso osmótico, balonamiento y finalmente lisis de la célula fúngica (Diomedi, 2004).

El mecanismo de resistencia intrínseco a la caspofungina se ha estudiado en hongos en los que este fármaco es inactivo, como *Saccharomyces cerevisiae*, y parece estar ligado a la sobreexpresión de la proteína SbeP del aparato de Golgi, controlada por el gen GAL1, que regula los mecanismos de transporte de componentes celulares hacia la pared fúngica. Ello explica la resistencia natural de algunos hongos a este antifúngico (Bidart, 2004).

Las polioxinas y nikomicinas se comportan como inhibidores competitivos de la enzima quitina sintetasa debido a que estas sustancias son estructuralmente similares a la uridina difosfato-Nacetilglucosamina, sustrato de la enzima.

Su reducida toxicidad se contrapone a su baja eficacia en modelos animales de candidiasis cuando se suspende el tratamiento, a pesar de que en otras infecciones como coccidioidomicosis y blastomicosis sí se activa (Bidart, 2004).

Las paradimicinas fueron aisladas a partir de un cultivo de *Actinomyces* hibisca, estos antibióticos forman un complejo insoluble con los mananos presentes en la pared celular fúngica en presencia de iones Ca^{2+} lo que altera la permeabilidad de la membrana y conduce a la muerte celular de tipo apoptosis. La resistencia a fosfotransferasa YPD1, así como por mutaciones en el dominio de glicosidación de la proteína osmosensora SLn1 (Hiramoto *et al.*, 2005).

2.5.1.3 Compuestos activos frente a ácidos nucleicos

La 5-Fluorocitocina (Flucitosina) es una pirimidina fluorinada sintetizada en 1957, como un análogo de la citosina, con el objetivo de ser empleada en el tratamiento de leucemia. De forma general actúa inhibiendo el metabolismo de la pirimidina por interferencia en la síntesis de RNA, DNA y proteína en la célula fúngica.

Flucitosina penetra a la célula fúngica ayudada por la enzima citosin permeasa. Una vez en el interior es desaminada a 5-Fluorouracilo el cual es incorporado al RNA. Entonces la uridina 5- monofosfato pirofosforilasa convierte el fluorouracilo

en fluorodeoxyuridina monofosfato la cual inhibe la timidilato sintetasa e interfiere la síntesis de ADN. Esta droga tiene una toxicidad selectiva a los hongos ya que las células de mamíferos carecen de citosina permeasa y de esta forma no se produce el paso de flucitosina a 5-fluorouracilo. La resistencia primaria a flucitosina se debe a mutaciones en cualquiera de las enzimas involucradas en su transporte (citosina permeasa), metabolismo (citosina deaminasa, uracil:fosforibosil transferasa) y/o a su incorporación en el ARN (Thompson III *et al.*, 2009). Flucitosina es esencialmente un agente antilevadura, activa contra candidas y sus especies, *Cryptococcus neoformans* y algunos hongos negros.

En la actualidad su mayor uso está dado por la aplicación de terapias combinadas con otros anifúngicos, sobre todo de aquellos que presentan como sitio de acción la membrana de la célula fúngica (Schwarz *et al.*, 2003).

2.5.1.4 Compuestos que inhiben la síntesis proteica

Las sordarinas son productos naturales aislados originalmente a partir de *Sordaria araneosa*. Las mismas se unen con elevada afinidad al factor de elongación 2 (EF-2) en presencia de los ribosomas e inhiben la síntesis proteica al bloquear el ciclo de elongación en los pasos iniciales de la traslocación, previo a la hidrólisis de GTP, estos compuestos actúan selectivamente sobre los hongos pero no sobre eucariotas superiores (Nosanchuk, 2008). Mutaciones en el factor de elongación EF2 o en las proteínas ribosomales rpP0 confieren resistencia a las sordarinas, aunque el primero es el de mayor especificidad (Nosanchuk, 2008).

2.5.1.5 Compuestos que inhiben el ensamble de los microtúbulos

La griseofulvina es un antibiótico producido por varias especies de *Penicillium* cuyo espectro de acción está restringido exclusivamente a los dermatofitos. Su acción está limitada a bloquear la reproducción del hongo ya que inhibe selectivamente el proceso de la mitosis. Actúa solamente sobre los hongos que se encuentran en fase reproductiva en el caso del ACG este ejerce actividad antimicrobiana al

alterar la estructura y la función de la membrana citoplasmica, lo que altera la fuerza motriz de protones, el flujo de electrones y el transporte activo.

El mecanismo responsable de la toxicidad de los fenoles para los microorganismos también puede incluir la inhibición de enzimas por la oxidación de compuestos, posiblemente a través de la reacción con grupos sulfidrilos o a través de interacciones más inespecíficas con las proteínas (Almeida *et al.*, 2006).

2.5.1 Agentes antifúngicos usados en la industria alimentaria

La calidad y la seguridad de los alimentos son temas que han sido ampliamente estudiados a lo largo del tiempo. El problema de los contaminantes en los alimentos ha sido reconocido en gran parte del mundo, por lo que se han utilizado a lo largo de los años en la industria alimentaria compuestos químicos que poseen características antimicóticas que puedan inhibir el crecimiento de los microorganismos en los alimentos, y en el caso de hongos evitar la producción de toxina para las cepas productoras (Villeda-Moreno, 2010).

Para la prevención del crecimiento de hongos en los alimentos, pueden emplearse diferentes métodos tanto físicos como químicos, dentro de los métodos químicos tenemos el uso de conservadores, los más utilizados en la actualidad por la industria alimentaria son los siguientes;

Ácido sórbico (C₆H₈O₂)

El ácido sórbico y los sorbatos poseen características antifúngicas y a su vez presentan un amplio rango de actividad antimicrobiana, es altamente eficaz para retrasar la toxicidad de *Clostridium botulinum* en pescado fresco.

Sorbato de potasio (C₆H₇O₂K)

El sorbato de potasio es empleado como conservador en alimentos ya que actúa principalmente contra el crecimiento de hongos y levaduras, es principalmente utilizado en productos lácteos y en el pan de centeno.

Sorbato de sodio (C₆H₇O₂Na)

Es un conservante natural o sintético. Es un derivado del ácido sórbico, se utiliza principalmente para prevenir el crecimiento de hongos y levaduras en alimentos.

Sorbato de calcio (C₁₂H₁₄CaO₄)

El sorbato de calcio es empleado como inhibidor de crecimiento de levaduras, mohos y hongos productores de aflatoxinas.

Ácido benzoico (C₆H₅-COOH)

Es utilizado ampliamente por sus características antimicrobianas en los alimentos, su parte no disociada es la responsable de la actividad antimicrobiana, presentando su máxima actividad en el margen de pH 2.5-4.0, por lo tanto son ineficaces en productos cuyo pH tiene un valor superior a 5.

Ácido acético (CH₃-COOH)

El ácido acético es utilizado como conservador en alimentos previniendo el crecimiento de bacterias y hongos. De igual manera es agregado en algunos alimentos como la mayonesa para incrementar un efecto de inactivación contra *Salmonella*, el ácido acético presenta su mayor actividad a niveles bajos de pH. Por lo que suele ser utilizado en alimentos ácidos.

2.5.5 Bio-conservación en alimentos

La Bio-conservación en alimentos consiste en el uso de conservadores naturales como; bacterias, hongos, plantas, animales, que tienen la habilidad de proteger os alimentos debido a que cuentan con actividad antimicrobiana contra un amplio espectro de patógenos presentes en alimentos.

Los metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana pueden ser producidos por frutas, vegetales, semillas, hierbas, especias y microorganismos como microbios y hongos.

Se ha demostrado que diversos compuestos bioactivos que se encuentran en extractos de plantas y vegetales han presentado actividad antioxidante, antimicrobiana, anticancerígena, etc., estos compuestos bioactivos se encuentran divididos en dos categorías: Los aceites esenciales y los extractos (Pisoschi *et al.*, 2018).

Los aceites esenciales son una mezcla de compuestos naturales de hidrocarburos, compuestos oxigenados, y sulfurados. Dentro de los cuales se encuentran presentes compuestos fenólicos, terpenos, alcoholes alifáticos, aldehídos, ácidos orgánicos, saponinas, entre otros (Pisoschi *et al.*, 2018).

La estructura química de los compuestos bioactivos se encuentra directamente relacionada con su actividad antimicrobiana, la cual a su vez se encuentra influenciada por la presencia y la posición del grupo –OH (Pisoschi *et al.*, 2018).

Los compuestos bioactivos más importantes presentes en extractos naturales son;

- Quinonas : quinona, hipericina
- Flavonas y flavonoides: flavona, catequina, crisina
- Taninos: penta galloil glucosa, procianidina
- Cumarinas: cumarina, 7- hidroxycumarina
- Compuestos fenólicos: eugenol , catecol y Acido caféico (Ácido clorogénico)

2.7 Ácidos clorogénicos

Los ácidos clorogénicos son ésteres formados con el ácido quínico y un ácido hidroxicinámico (Figura 7), (ácido caféico, ferúlico o un ácido p-cumárico) y fue obtenido en un forma cristalina por primera vez a partir de granos de café, se pensaba que este compuesto era un glucósido de ácido caféico (Hulme, 1952)

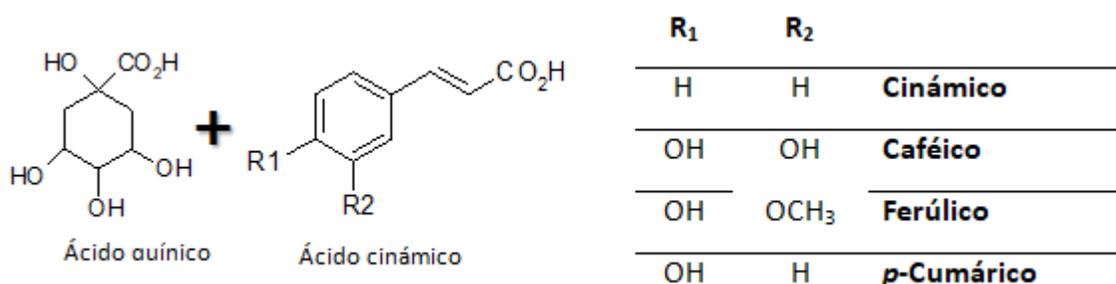


Figura 7. Ácidos fenólicos que conforman a los ACG. Fuente: Hulme, 1952.

Los ácidos clorogénicos se dividen en tres grupos principales: Ácidos cafeoilquínicos, dicafeoilquínicos y feruloilquínicos. Cada uno de estas clasificaciones muestra los sustituyentes en el ácido quínico en la Tabla 4.

Tabla 4. Ácidos clorogénicos.

Ácidos cafeoilquínicos (CQA)	Ácidos dicafeoilquínicos (diCQA)	Ácidos feruloilquínicos (FQA)
Ac. 3-CQA	Ac. 3,4-diCQA	Ac. 3-FQA
Ac. 4-CQA	Ac. 3,5-diCQA	Ac. 4-FQA
Ac. 5-CQA	Ac. 4,5-diCQA	Ac. 5-FQA

(Hulme, 1952)

Los ácidos clorogénicos (ACG) se encuentran ubicados como los mayores componentes fenólicos del café y de algunas otras frutas y verduras. Es importante resaltar que el contenido de ácidos clorogénicos depende la especie y de la variedad de café, los granos de café arábica contienen menos ACG que los granos de café robusta.

El ácido 5-cafeoilquínico es el principal constituyente de los ácidos clorogénicos (Figura 8) encontrados en el café verde, en una proporción de 7-14% según la especie (Figura 9) (Clifford, 1985).

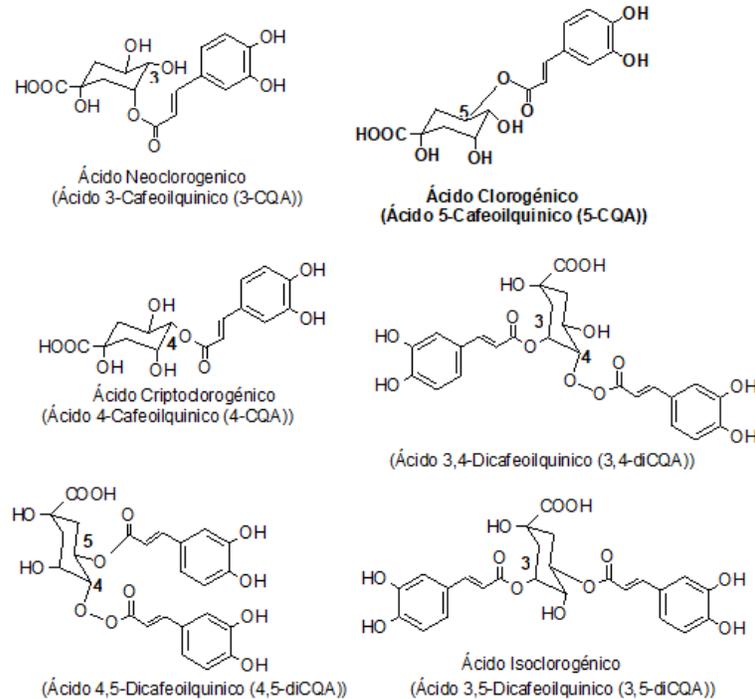


Figura 8. Estructura de los principales ácidos clorogénicos. Fuente: Clifford, 1985.

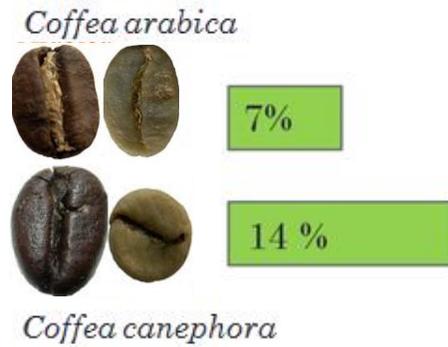


Figura 9. Proporción del ácido 5-cafeoilquínico en café verde. Fuente: Propia

De acuerdo con (Clifford, 1985) y algunos datos cromatográficos, la especie *C. canephora* pierde alrededor de 8-9g de ácidos clorogénicos cuando 100 g de granos de café verde son sometidos a un tostado oscuro, mientras que el género arábica pierde entre 5-6 g. El género robusta pierde ligeramente más ácido 5-cafeoilquínico pero aproximadamente el doble de ácido ferruloilquínico y dicafeoilquínico comparado con el género arábica.

Las pérdidas de los ácidos clorogénicos las cuales son determinadas por colorimetría son bastantes pequeñas, indicando la presencia de productos de degradación.

Así mismo (Oestreich-Janzen, 2013) establece que durante el tostado del café se destruye un porcentaje significativo de ACG creando una serie de productos de transformación que pueden ser únicos para el café como las lactonas, esto explica la diferencia de pH del café comercial con diferentes grados de tostado (Hoffmann y Somoza, 2004).

2.7.1 Actividad antioxidante de los ácidos clorogénicos

Un antioxidante es toda sustancia presente a bajas concentraciones respecto a las de una molécula oxidable, que retarda o previene la oxidación de este sustrato, el antioxidante al colisionar con el radical libre le cede un electrón, se debilita su acción y en algunos casos como la vitamina E, puede regenerarse a su forma primitiva por la acción de otros antioxidantes (Bacallao *et al.*, 2002)

Los ácidos clorogénicos, ferúlico y caféico se ha observado que presentan propiedades antioxidantes *in vitro*, que pudieran contribuir a la prevención de enfermedades cardiovasculares.

Investigaciones *in vitro* han revelado que el ácido caféico y otros compuestos fenólicos como los ácidos cinámicos o ferúlico, incubados en presencia de lipoproteínas de baja densidad (LDL), incrementan la protección de estas lipoproteínas contra la oxidación con la relación caféico > cinámicos > ferúlico.

En 1995 fue reportados por Kido y Morishita que el ACG tiene efecto inhibitorio sobre la actividad lipoxigenasa en el metabolismo de la prostaglandina, inhibición de la oxidación de la vitamina A, protección contra la oxidación de la epinefrina e inhibición de 5,6-epoxidación del ácido retinoico.

La capacidad de atrapar radicales libres DPPH por 5-CQA y 3,5-DCQA fue más alta que la presentada por el α -tocoferol y el ácido ascórbico a 10 μ M, además éstos ACG también inhiben la formación del dieno conjugado en la peroxidación del ácido linoleico mostrando actividad inhibitoria más fuerte que los 3,5-DCQA que el 5-CQA y el ácido ascórbico (Iwai et al., 2004).

En dicho estudio proponen un mecanismo de la actividad antioxidante en el que primero el ACG puede actuar como donador de átomos de H a los radicales peroxi y puede reaccionar con otros radiales peroxi convirtiéndoles en productos menos activos (Figura 10).

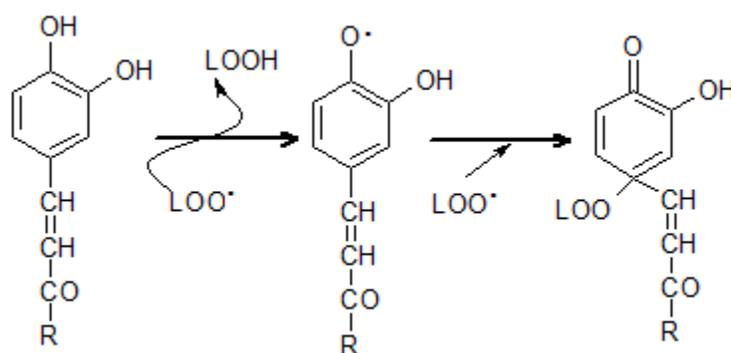


Figura 10. Mecanismo propuesto de la actividad antioxidante por el ácido clorogénico. Fuente: Iwai et al., 2004

2.7.2 Propiedades quelantes y anticancerígenas

La exposición a compuestos N-nitroso incrementa el riesgo de cáncer, los seres humanos están expuestos a éstos compuestos en la comida, agua y aire, además de los compuestos N-nitrosos que se generan de manera endógena por los ácidos del estómago (leaf *et al.*, 1991).

En 1991 Leaf *et al.*, observaron el efecto del café sobre la nitrosiación en humanos y para ello, utilizaron N-nitrosomorfina como marcador, ya que no es mutagénico, carcinogénico o metabolizable y es excretado por la orina, además de administrar nitrato y prolina a voluntarios durante 5 días y café descafeinado instantáneo en tres de los 5 días, la cantidad fue semejante a la contenida en una taza de café, los resultados demostraron que el café no incrementa en altas concentraciones y podrá disminuir potencialmente la nitrosiación endógena en humanos reduciendo así el riesgo de padecer cáncer.

2.7.3 Reducción del riesgo de Diabetes tipo II

Se ha observado que los ACG pueden disminuir la absorción de carbohidratos en el cuerpo, por inhibición del transportador de glucosa; glucosa-6-fosfatasa, enzima que cataliza el final de la reacción de glucogenólisis y gluconeogénesis, las dos principales vías metabólicas hepáticas de la glucosa (Bassoli *et al.*,2001; Clifford b, 1999; McCarty, 2005).

El café instantáneo, el cual contiene ACG, inhibe más del 50% la actividad de la 6-glucosa fosfatasa sobre una fracción microsomal de hepatocitos, donde la enzima se encuentra y el ACG no tiene entrada a la célula (Bassoli *et al.*, 2001). Además el café es buena fuente de magnesio el cual tiene efectos favorables sobre el metabolismo de la glucosa (Greengberg *et al.*,2011).

2.7.4 Efecto contra la acumulación de grasas

Tanto la cafeína como el ACG han mostrado una tendencia a reducir las grasas y los triglicéridos hepáticos. En un estudio *in vitro* en donde se administró extracto de granos de café verde, cafeína y ácido clorogénico en forma oral, durante 14 días a ratones machos, se evaluaron los triglicéridos hepáticos, la absorción de grasa y activación de la enzima carnitina palmitoiltransferasa (CPT), los resultados mostraron una reducción de la grasa visceral y peso corporal con 0.5 y 1% de extracto de granos de café, mientras que con 60 mg/kg día de ACG se reduce el nivel de triglicéridos hepáticos, el ácido neoclorogénico (0.055%) y una mezcla de ácidos feruloilquínicos (0.081%), suministrados durante 6 días, mejoró significativamente la actividad de la carnitina actúa como supresor de la absorción de grasas, mientras que el ACG reduce los niveles de triglicéridos hepáticos (Greengberg *et al.*,2011; Shimoda *et al.*, 2006).

2.7.5 Biodisponibilidad del Ácido Clorogénico

En un estudio realizado por Lafay *et al.*, en el año 2006 el cual fue llevado a cabo con ratas analizando la manera bajo la cual el ACG es absorbido por la mucosa del intestino y el sitio de absorción a lo largo del tracto gastrointestinal, ellos encontraron estable al ACG en el estómago y en el intestino delgado, por otra parte se detectó que después de 1.5 h en el plasma y en la orina, sugiriendo una absorción en la parte alta del tracto gastrointestinal, parte del ACG fue recuperada en el efluente intestinal como ácido caféico mostrando la presencia de actividad de esterases en la mucosa intestinal.

2.7.6 Propiedades antimicrobianas del ácido clorogénico

Suárez-Quiroz *et al.* (2004) probaron al ACG y a la cafeína productos antifúngicos, en donde observan que el ACG tiene poco efecto sobre la velocidad de crecimiento de *Aspergillus ochraceus*; mientras que un incremento en la concentración de cafeína disminuye notablemente el crecimiento, sin embargo, ambos componentes disminuyen la producción de Ocratoxina A (OTA).

La actividad antimicrobiana de los fenoles no depende solamente de su estructura, también de las condiciones ambientales, así lo muestra el ácido caféico, que muestra baja capacidad para inhibir a *Listeria*, comparado con otros ácidos hidroxicinámicos derivados, debido al alto grado de hidroxilación, las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) sobre 5 cepas de *Listeria monocytogenes* se encontraron entre 0.20 % y 0.27 % (p/v) para los ácidos hidroxicinámicos (ácido caféico, ácido p-cumárico y ácido ferúlico) pero ACG no fue efectivo a 1.0 % (p/v). Los ácidos hidroxicinámicos tuvieron un efecto bactericida a pH de 4.5 y un efecto bacteriostático a mayor pH. En contraste, ACG inhibió el crecimiento de *L. monocytogenes* a pH de 6.5 (Wen *et al.*, 2003), por otra parte el pH y el cloruro de sodio son importantes, debido a que producen cambios fisiológicos en el microorganismo, y éstos cambios hacen más susceptible a la célula a los polifenoles (Canillac y Mourey, 2004).

Almajano *et al.* (2007) Encontraron que el ácido caféico muestra efectos antimicrobianos, dependiendo del pH sobre *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *L. monocytogenes* y *Candida albicans*, los valores de la concentración mínima inhibitoria fueron más bajos a valores de pH bajos, lo que indica que el ácido caféico es menos efectivo cuando se encuentra en medios cercanos a pH neutral.

En un estudio para evaluar la acción antimicrobiana de extractos de *Pluchea symphytifolia* se observó que el extracto acuoso poseía un efecto antibacterial y antisecretorio mientras que el extracto lipídico mostró una actividad antihelmíntica. Al aislar y elucidar los compuestos de los extractos, se encontró que el ácido 5-CQA (ACG), 3-CQA, 4-CQA, 4,5-diCQA entre otros ácidos fenólicos, eran responsables, en su mayor parte, de los efectos observados en los extractos; antibacterial y antihelmíntica (Scholz *et al.*, 1994).

Otro efecto antimicrobiano de los ACG que ha sido estudiado es en la protección de los dientes. Investigaciones han mostrado que los ACG forman una película protectora contra la bacterias *Streptococcus mutans* la cual ha sido identificada como el agente causal de la caries dental, debido a su capacidad para adherirse a los dientes y producir ácidos metabólicos. El ACG fue probado contra esta bacteria a 2 mg/mL de concentración, dando un diámetro de inhibición de 7.58 ± 0.38 mm y en ACG + extracto acuoso de café 8.25 ± 0.66 mm (Almeida *et al.*, 2006).

Por otro lado Ruesgas-Ramón. (2019) realizó un estudio en el que caracterizo y valorizo biomoléculas extraídas de granos de café verde y cacao. Entre los compuestos estudiados se encuentran los ACG. Los cuales fueron disueltos en diferentes mezclas de solventes emergentes llamados NADES (solventes eutécticos naturales profundos), los cuales tienen la característica de generar un efecto sinérgico en la actividad antimicrobiana de algunos compuestos (Juneidi, y Hayyan, 2016).

2.8 NADES (Solventes Naturales Eutécticos Profundos)

Los solventes naturales eutécticos profundos o NADES por sus siglas en inglés (Natural Deep Eutectic Solvents) han sido clasificados como un tercer tipo de líquidos, diferentes al agua y lípidos, los cuales se encuentran presentes en todas las células vivas (Choi *et al.*, 2011).

Los NADES pueden ser definidos como la mezcla de dos o más componentes que en su mayoría se encuentran en forma sólida en la naturaleza. Cuando dichos componentes son mezclados en una relación molar específica y son sometidos a agitación con temperaturas por arriba de los 50°C durante 6 horas, es formado un solvente eutéctico con propiedades diferentes a la de los compuestos individuales. Estos solventes naturales eutécticos profundos son capaces de cambiar del estado sólido a líquido, aumentar la viscosidad y temperatura de ebullición (Dai *et al.*, 2013).

Fundamentalmente el termino eutéctico es usado para describir unan mezcla de dos o más componentes los cuales, su composición se encuentra muy bien definida, muestra un único y un mínimo punto de fusión en la fase de diafragma (Figura 11) (Villeneuve y Durand, 2015).

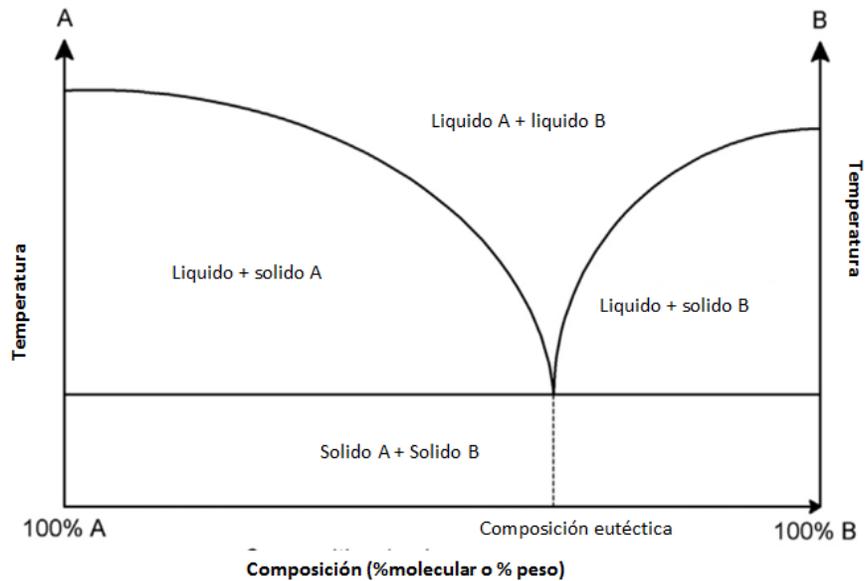


Figura 11. Esquema de la fase de diagrama para una mezcla eutéctica binaria. Fuente : Villeneuve y Durand, 2015.

Este punto mínimo de fusión es típicamente, significativo más bajo que los puntos de fusión de los componentes individuales, y reflejan afinidades no covalentes a un nivel molecular (Villeneuve Y Durand, 2015).

Las interacciones entre los componentes ocurren de manera intermolecular a través de puentes de hidrógeno, entre los cuales es necesario que exista un aceptor de puentes de hidrógeno (HBA por sus siglas en inglés) y un donador de puentes de hidrógeno (HBD por sus siglas en inglés). El proceso de preparación de los NADES es un proceso directo, usualmente estos son obtenidos mediante una mezcla física de los componentes, la cual es acelerada mediante la aplicación de energía en forma de calor, y un vigoroso mezclado (Durand *et al.*, 2013)

La ausencia de reacciones químicas, combinadas con el uso común y la fácil obtención de una gran variedad de materiales presentes en la naturaleza tales como; azúcares, alcoholes, ácidos orgánicos y aminoácidos. Como resultado se obtiene un costo de producción bajo y condiciones seguras de operación debido a la baja (o ausencia) de toxicidad del producto para los trabajadores y para los usuarios finales (Aroso *et al.*, 2017).

2.8.1 Preparación de NADES

Los NADES pueden ser preparados a partir de una gran cantidad de componentes encontrados en la naturaleza, incluyendo Cloruro de colina (ChCl), azúcares, polioles, amino ácidos, y ácidos orgánicos (Figura 12)(Yang, 2018). Estos compuestos en estado sólido se vuelven líquido cuando se mezclan en una combinación específica y una radio molar específico. Existen tres métodos para la preparación de los NADES, los cuales pueden ser ajustados con algunas modificaciones dependiendo de la naturaleza del compuesto.

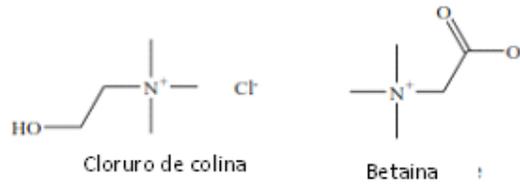
1.- Mezcla con variación de temperatura: los componentes son mezclados alrededor de 80°C de 1-2 h en una parrilla con agitación magnética hasta observar una mezcla homogénea líquida transparente.

2.- Evaporación al vacío: los componentes serán disueltos en agua antes de ser evaporados a 50°C con evaporador rotatorio.

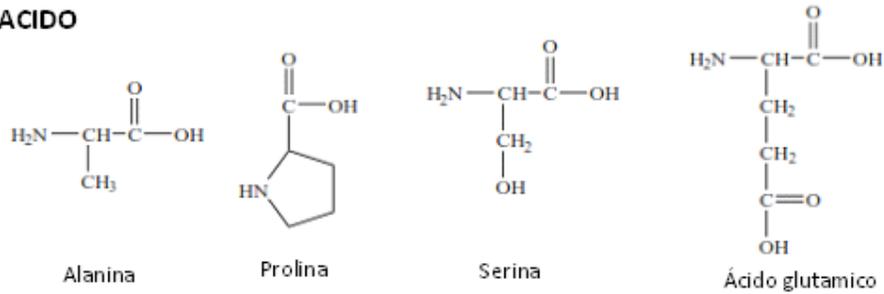
3.- Secado en frío: los componentes serán disueltos en agua y posteriormente serán sujetos a un secador en frío.

Estos tres métodos dan como resultado la formación de los mismos NADES, una de las principales características de los NADES es la formación de puentes de hidrogeno entre sus compuestos, dichas interacciones han sido demostradas por la resonancia magnética nuclear (NMR) (Gutiérrez *et al.*, 2009).

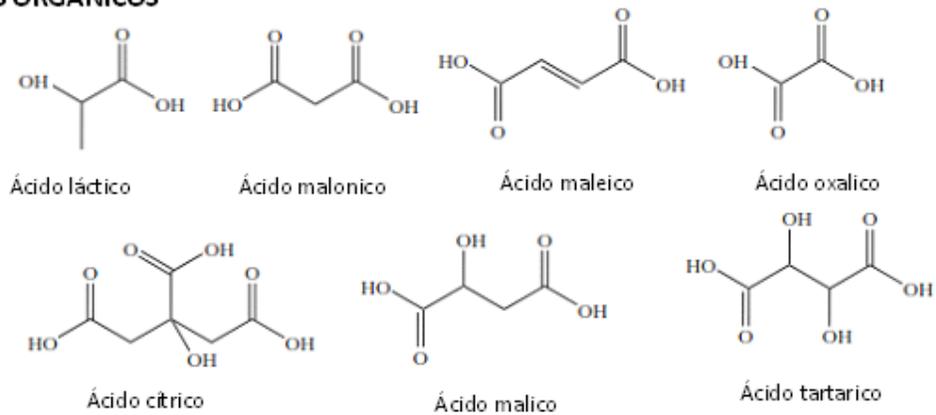
SALES



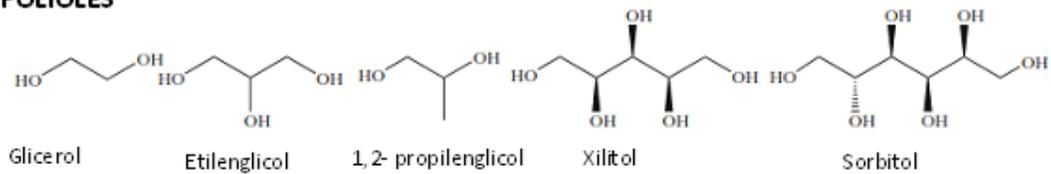
AMINOACIDO



ACIDOS ORGANICOS



POLIOLES



AZUCARES

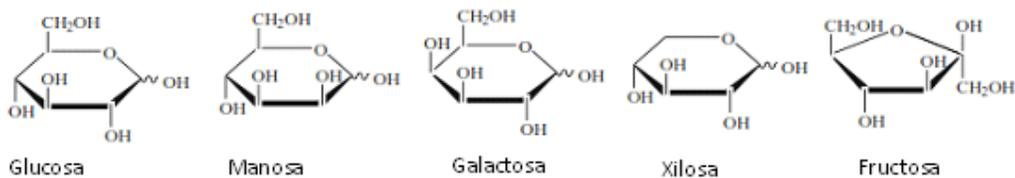


Figura 12. Compuestos naturales comúnmente utilizados para la elaboración de los NADES.
Fuente : Yang, 2018.

2.8.2 NADES en los organismos

Combinaciones similares de compuestos formadores de NADES han sido observadas en secreciones de plantas, y en plantas que pasaban sequia o condiciones de frio.

En 2011 Choi *et al.* estudiaron el espectro del néctar de las flores por RMN y el cual mostró estar compuesto de diferentes azúcares, los cuales normalmente son encontrados en estado sólido a temperatura ambiente pero la composición de la mezcla de azúcares en estas secreciones es un líquido similar a las composiciones propuestas, glucosa- fructosa- sacarosa, y esto mismo se aplica para los componentes encontrados en la miel, la cual está compuesta por glucosa y fructosa. Componentes de NADES fueron también observados en plantas de desierto de las especies *Selagiela*, y en diversos organismos que pueden sobrevivir largos periodos sin el consumo de agua. Así mismo ha sido demostrado en diferentes investigaciones donde se demostró que el nivel de metabolitos primarios incrementa en el caso de escasez agua aun para plantas normales, como es el caso de *Arabidopsis* la cual muestra un incremento en los niveles de azúcar, aminoácidos, ácidos orgánicos y aminos en condiciones de poca agua (Choi *et al.*, 2011; Opsvik *et al.*, 2017).

2.8.3 Estructura de los NADES

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear (NMR) fue aplicada a algunos NADES formados por Cloruro de colina y Urea, en busca de las interacciones moleculares involucradas en estos tipos de solventes.

La existencia de puentes de hidrogeno en estos NADES fueron puestos en evidencia. Abbott *et al.*, en 2003 observaron una correlación cruzada entre el ion fluoruro de colina y protones desde la urea usando heteronuclear overhauser spectroscopy (HOESY). Por otro lado Mele *et al.*, en 2003 observaron una interacción directa intermolecular e intramolecular entre moléculas de 1-n-butyl-3-

methylimidazolium tetrafluoroborato a través H-H nuclear overhauser spectroscopy (NOESY).

En el 2013 Dai *et al.*, determinaron las interacciones entre el 1-2 propanediol – cloruro de colina – H₂O, estos revelaron una señal correspondiente al protón en el grupo metil del 1-2 propanediol interactuando con ambos carbonos del grupo metil y metileno (enlazado al nitrógeno) y al carbono del cloruro de colina. Esto implicó que los protones del grupo hidroxilo del 1-2 propanediol pueden formar puentes de hidrogeno con el cloruro de colina (Figura 12) (Durand *et al.*, 2013).

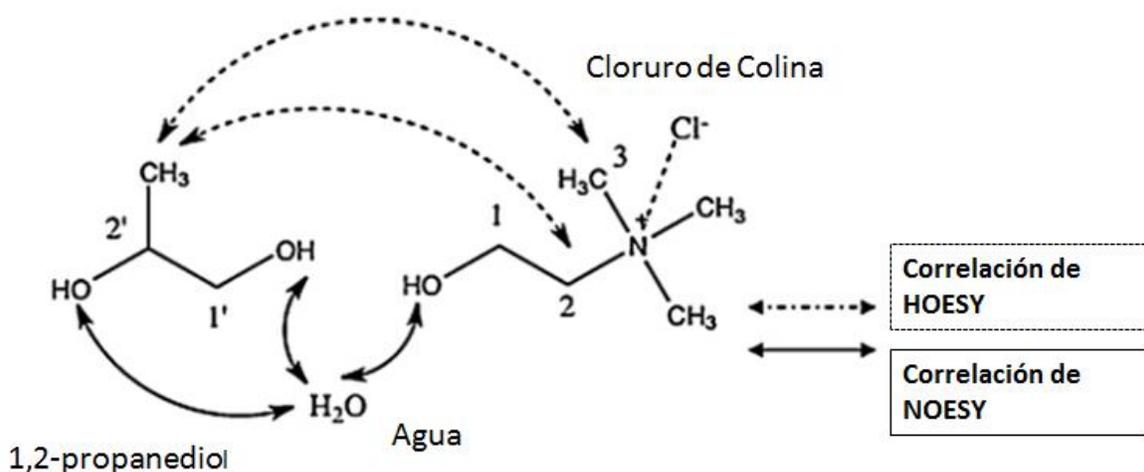


Figura 13. Espectro de resonancia magnética nuclear del 1-2 propanediol-cloruro de colina-agua. Fuente: Durand *et al.*, 2013.

Diferentes relaciones molares de los componentes de los NADES, puede afectar la estabilidad de los NADES en términos de residuos en la mezcla en la fase líquida por periodos largos de tiempo.

Por otra parte el número de donadores o aceptores de puentes de hidrogeno, la estructura espacial de aquellos grupos y la posición de los puentes parece tener una influencia significativa en la formación y la estabilidad de los NADES (Dai *et al.*, 2013).

La característica principal en la estructura de los NADES es la interacción entre los compuestos, formando puentes de hidrogeno los cuales han sido observados usando resonancia magnético nuclear (NMR) (Dai *et al.*, 2013).

Sin embargo los puentes de hidrogeno formados entre los compuestos pueden ser progresivamente desasociados por la adición excesiva de agua, eventualmente la completa desaparición de los puentes de hidrogeno y consecuentemente la perdida de la estructura supramolecular cuando el contenido de agua supere un 50% en volumen (Dai *et al.*, 2013). Adicionalmente, existe una relación inversa entre la viscosidad y la temperatura de los NADES, la viscosidad decrece cuando existe un incremento en la temperatura (Ruesgas-Ramón, 2017).

Los estudios existentes sobre la densidad de algunas mezclas de NADES muestran que los NADES más polares exhiben densidades más altas a las del agua. Por otro lado la densidad de los NADES decrece linealmente con el incremento de la temperatura (Alhassan *et al.*,2016). Los valores de pH de los NADES, dependen de la naturaleza de la estructura química de los componentes y especialmente de aquellos que son los donadores de puentes de hidrógeno (HBD) (Abbott *et al.*, 2003).

Un gran espectro de mezclas diferentes de NADES han sido estudiadas por las propiedades antimicrobianas que poseen. En 2015 Wikene *et al.* Realizaron la caracterización de la fototoxicidad antimicrobiana de curcumina disuelta en NADES, arrojando como resultado que una de las mezclas de NADES por si sola fue capaz de presentar actividad antimicrobiana contra bacterias gram – y +.

En 2017 Wikene *et al.* Realizaron un estudio del efecto antimicrobiano de algunos NADES contra bacterias gram + y gram -, en dicho trabajo ellos describen que los NADES incrementan la permeabilidad de la membrana lipídica de las células eucariotas, lo cual puede estar relacionado por su capacidad de solubilizar un amplio rango de solutos.

Por otro lado Juenidi *et al.*, en 2016 realizaron un estudio de 20 diferentes formulaciones de NADES, contra 4 cepas de hongos (*Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus niger*, *Lentinus tigrinus* and *Candida cylindracea*) para probar su actividad antimicótica. Como resultados obtuvieron que el NADES elaborado por Cloruro de colina y Urea, exhibió una actividad antimicótica muy elevada contra la cepa de *Candida cylindracea*.

3. JUSTIFICACIÓN

Debido al riesgo que existe de ingerir toxinas producidas por hongos toxigénicos presentes en una gran diversidad de alimentos, es de vital importancia desarrollar compuestos químicos capaces de evitar su desarrollo.

En la actualidad, se han estudiado compuestos químicos que poseen propiedades antimicrobianas capaces de inhibir el desarrollo de hongos toxigénicos, como lo es el ácido clorogénico (Ácido 5-cafeoilquinico). Por otro lado, en el año 2003 fue desarrollada una nueva categoría de solventes, elaborada a partir de metabolitos primarios encontrados de manera natural en las plantas mayormente. Estos nuevos solventes fueron nombrados NADES, natural deep eutectic solvents por sus siglas en inglés. Algunas de estas formulaciones manifiestan una actividad antimicrobiana y propiedades diferentes a la de sus compuestos de manera individual.

Sin embargo, no hay estudios donde se reporte la existencia de una sinergia en el efecto inhibitorio ante hongos filamentosos por parte del ácido 5-cafeoilquinico con diferentes formulaciones de NADES.

4. HIPÓTESIS

Existe una sinergia entre el *ácido 5-cafeoilquínico* y las distintas formulaciones de NADES, que provocan un aumento en su actividad antifúngica y antitoxigénica contra hongos productores de micotoxinas de los géneros *Aspergillus* y *Fusarium*.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Estudiar la actividad antifúngica y antitoxigénica de 6 formulaciones de NADES distintas con *ácido 5-cafeoilquínico* contra cepas de los géneros *Aspergillus* y *Fusarium*.

5.2 Objetivos específicos

- ❖ Formular y evaluar la estabilidad de las soluciones de NADES y determinar sus parámetros físicos y químicos.
- ❖ Evaluar la actividad antifúngica de las soluciones de NADES con y sin ácido clorogénico contra cepas de los géneros *Aspergillus* y *Fusarium*.
- ❖ Evaluar la actividad antitoxigénica de las soluciones de NADES y ácido clorogénico contra micotoxinas (*Aflatoxina B1*, *Ocratoxina A*, *Fumonisin B1*)

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Materiales

El material y equipo para el desarrollo del presente trabajo es descrito a continuación

6.1.1 Material biológico

Para las pruebas de actividad antimicrobiana se utilizaron cepas de colección de los siguientes hongos filamentosos: *Aspergillus ochraceus* CBS 108.08, *Aspergillus flavus* SN9 y *Fusarium moniliforme* IB-UNAM.

6.1.2 Medios de cultivo

Medio Agar papa Dextrosa (PDA), (Agar, 15g; Dextrosa, 20g; infusión de papa, 4g; BD®)

6.1.3 Reactivos Químicos

Betaina, cloruro de colina, 1,4 butanediol, glicerol, ácido láctico,(Sigma Aldrich 99.7% de pureza), DMSO; Dimetil sulfoxido, adquiridos por la empresa Sigma Aldrich, Alcohol etílico potable industrial (96 % pureza),Ácido acético, Ácido fórmico, Tween 80 (polisorbato 80, grado NF, JT Baker®), Agua destilada estéril, kit ELISA para *Fumonisina*, *Ocratoxina* y *Aflatoxina* al 95% de exactitud (Veratox®, Neogen Corporation Ltd), Ácido Clorogénico 95 % de pureza (Sigma Aldrich).

6.1.4 Equipo de laboratorio

Lector de micropozos.

El equipo para cuantificar la producción de micotoxinas en medio de cultivo, fue un lector ELISA automático para tiras de pozos. STAT FAX 4700, NEO GEN, con un rango de 0 a 3 Abs , una exactitud fotométrica de $\pm 1.0\%$ y longitud de onda de 300-700 nm.

Cámara de Neubauer

Para el recuento de la suspensión de esporas se utilizó una cámara de recuento de neubauer, marca Propper *lumicyte*, Bright Lined Ruling. (1/400 SD.MM; 1/10 MM deeg).

6.2 MÉTODOS.

La metodología general del presente trabajo constó de diferentes etapas, las cuales se muestran en la Figura.14

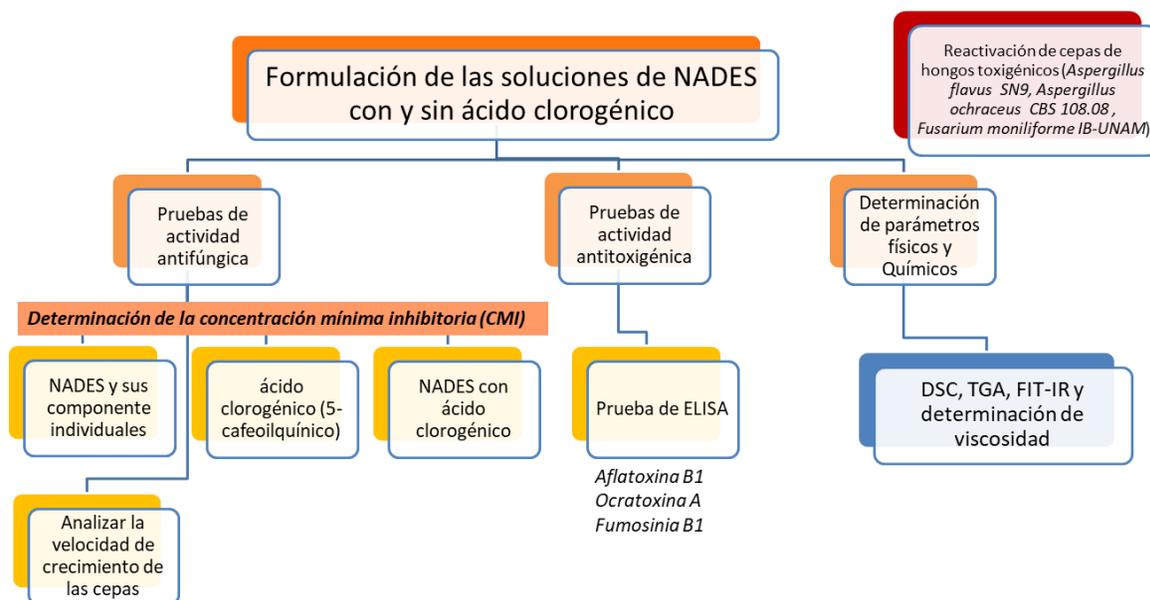


Figura 14. Diagrama de la metodología general.

6.2.1 Formulación de los NADES

Los compuestos sólidos utilizados para la formulación de los nades tales como la betaina y cloruro de colina fueron introducidos a un desecador con silica durante 16 h previo a su uso. Los compuestos presentados en la tabla 5 fueron mezclados en reservorios de 10 mL previamente tarados, los cuales fueron colocados en una incubadora SL Shel Lab shaking incubator con agitación a 60°C y 330 RPM durante 8 h hasta observar una mezcla homogénea transparente (Ruesgas-Ramón *et al.*, 2017).

Se realizaron pruebas de estabilidad a cada uno de los NADES mediante dos etapas; en la primera etapa fueron sometidos cada uno de ellos a una temperatura de -8°C durante 24h, posterior a eso se observó si hubo alguna separación de sus fases.

En la segunda etapa los NADES fueron sometidos a 25°C durante 24 h. De igual manera, se observó si existió alguna separación de fases. Se repitió el ciclo 5 veces.

Tabla 5. Composición de las diferentes formulaciones de NADES.

NADES	RELACIÓN MOLAR DE COMPONENTES	HBD	M (g)	HBA	M (g)
1	2:1	Ácido Láctico	1.29	Cloruro de colina	1.00
2	2:1	Ácido Láctico	1.54	Betaina	1.00
3	2:1	Glicerol	1.32	Cloruro de colina	1.00
4	2:1	Glicerol	1.57	Betaina	1.00
5	3:1	1,4 Butanodiol	1.94	Cloruro de colina	1.00
6	3:1	1,4 Butanodiol	2.31	Betaina	1.00
7	2:1	Urea	0.86	Cloruro de colina	1

HBD: Donador de enlaces de hidrogeno; HBA: Aceptor de enlaces de hidrogeno; M : Masa (Ruesgas-Ramón ,2019).

6.2.2 Pruebas de estabilidad de NADES

Determinación de estabilidad

Se determinó la estabilidad de cada una de las formulaciones de los NADES a partir de una centrifuga modelo espectrofuga 24 D para tubos Eppendorf en los cuales se vertieron 2 mL de cada formulación de NADES y se le aplicaron 3600 RPM durante 30 min para observar si existió alguna separación en sus fases. Posteriormente se aplicaron ciclos de calor y frio (4° y 90°C) a cada una de las muestras que no presentaron separación en sus fases, cada ciclo fue de 24 h.

Determinación de viscosidad y pH

La determinación de viscosidad se llevó a cabo en un reómetro híbrido *TA Instrument Discovery HR-2* mediante el uso de 2 platos paralelos de 40 mm de diámetro cada uno con una separación entre los platos de 500 nm y con un esfuerzo de corte de 0.1 s^{-1} en un rango de temperatura de 25° a 100° C.

La determinación del valor de pH se llevó a cabo mediante un equipo *HANNA INSTRUMENTS HI 2210* a temperatura ambiente de 25°C. Cada medición fue realizada por triplicado.

6.2.3 Pruebas de actividad antifúngica

Las pruebas de actividad antifúngica se realizaron mediante el método de pocillos (Sánchez-García *et al.*, 2016) el cual consistió en realizar pequeños pozos de 6 mm de diámetro en las placas con 25 mL del medio solidificado. Estos pozos fueron realizados con la ayuda de pipetas Pasteur estériles, utilizando la parte superior de las mismas las cuales tenían una superficie circular de 6 mm de diámetro. Con la ayuda de un asa microbiológica se retiraron los cilindros de medio PDA dejando así el espacio de los pocillos, posterior a eso se introdujeron 75 μL en los pocillos de cada uno de los NADES a probar, así también cada uno de los elementos en estado puro. Se vertieron para los compuestos líquidos 75 μL y los compuestos sólidos fueron diluidos en agua destilada en una concentración de 1 mg/mL y se añadieron 75 μL de igual manera. Estas pruebas se realizaron por triplicado y fueron incubadas a 25°C durante 3 días, observando el crecimiento diariamente de cada una de las cepas frente a cada uno de los compuestos a probar.

6.2.4 Conservación y propagación de las cepas fúngicas

Las cepas de *Aspergillus ochraceus* CBS 108.08, *Aspergillus flavus* y *Fusarium moniliforme* IB-UNAM se reactivaron en un tubo inclinado y en placa con medio agar papa dextrosa (PDA) y se incubaron a 25°C de 48 a 72 h en un ambiente aerobio.

6.2.5 Preparación del inóculo para hongos

La preparación del inóculo de cada una de las cepas, se llevó a cabo ajustando a una solución de esporas (Figura 15) de 1×10^6 por mL mediante un conteo en cámara de Neubauer.

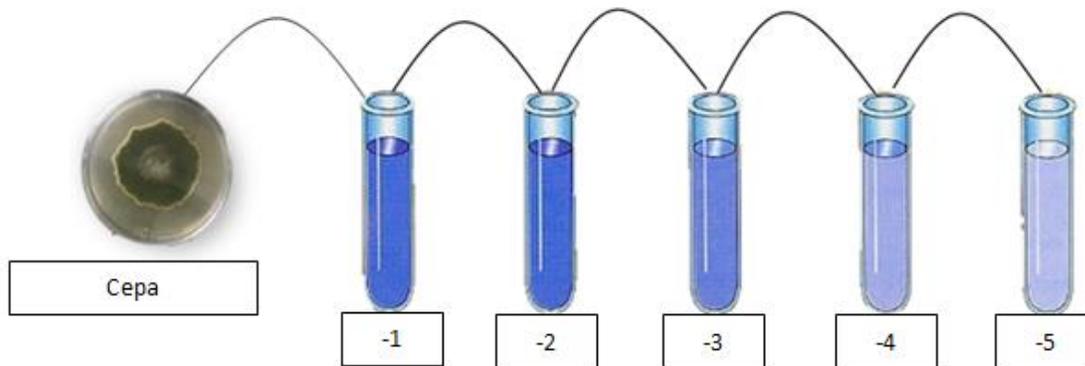


Figura 15. Diluciones para ajustar el número de esporas/mL. Fuente: Propia

6.2.6 Preparación de los NADES con ACG.

Las formulaciones de los NADES con ACG fueron preparados en función de las cepas que se probaron, siendo la cepa de *Aspergillus ochraceus* la más sensible contra este compuesto y las cepas de *Aspergillus flavus* y *Fusarium moniliforme* las más resistentes. Se agregó la cantidad de ACG en mg definida en la tabla 6 dentro de cada una de las formulaciones de NADES por mL, se calentó a 60°C cada formulación de NADES para una mejor dilución del compuesto.

Tabla 6. Concentraciones para cada NADES dependiendo de la cepa de hongo.

	Concentraciones de ACG (mg/mL)				
<i>Aspergillus ochraceus</i>	1	1.25	1.5	1.75	2
<i>Aspergillus flavus</i>	2	1.25	1.5	1.75	2
<i>Fusarium moniliforme</i>	2	1.25	1.5	1.75	2

6.2.7 Pruebas de actividad antitoxigénica (FUMO, OTA Y AFLA)

A partir de cultivos con 3 días de incubación, obtenidos de la evaluación de las pruebas antifúngicas de cada una de las cepas a probar (*Aspergillus ochraceus* CBS 108.08, *Fusarium moniliforme* IB-UNAM y *Aspergillus flavus* SN9) se determinaron mediante un kit ELISA competitivo directo (Veratox®, NeoGen Corporation Ltd) por duplicado, y las concentraciones se expresaron en ng/g.

El ensayo ELISA se realizó de acuerdo al protocolo del fabricante, con una modificación en el paso de la extracción de la micotoxina. A partir de cultivos con 3 días de incubación los cuales fueron previamente sometidos a la pruebas de los micropocillos contra cada uno de los compuestos a probar.

Se realizó una extracción de las micotoxinas en medio PDA y usando el método de Bragulat *et al.* (2001) modificado por Suárez-Quiroz *et al.* (2013).

Con la ayuda de sacabocados estériles de 5mm de diámetro, se tomaron tres botones de cultivo de las orillas de los pocillos donde se depositó la muestra; posteriormente se colocaron en viales previamente tarados y se pesaron en orden para determinar la producción de micotoxina por gramo de medio de cultivo.

Las fumonisinas fueron extraídas de las muestras con 2.5 mL de una solución de extracción (metanol:ácido fórmico 25:1) durante 15 minutos en sonicación.

Los extractos fueron filtrados a través de filtro Millipore Swimex® con una membrana estéril de 0.45 µm.

De acuerdo a las condiciones del fabricante, se colocaron 100 µL de conjugado de cada pozo de mezclado marcado con rojo; a continuación se transfirieron a los pozos 100 µL de controles y de cada muestra.

Utilizando una pipeta de 12 canales, se mezcló el líquido en los pozos pipeteandolos hacia arriba y hacia abajo 3 veces. Se transfirieron 100 µL a los pozos recubiertos de anticuerpos y se mezcló deslizando hacia atrás y hacia adelante el portapozos sobre una superficie plana durante 10-20 segundos.

Se incubaron durante un tiempo específico para cada una de las toxinas, a temperatura ambiente. Después de lavar con agua destilada 5 veces y eliminar el agua restante de los pozos, se añadió el sustrato a incubar durante el tiempo indicado, donde el sustrato fue catalizado por la enzima, produciendo una coloración azul.

Se añadió una solución para terminar la acción enzimática del tiempo indicado para la incubación. Dentro de los siguientes 20 minutos, las pruebas se transfirieron a un espectrofotómetro (STAT FAX 4700 PLUS) y la densidad óptica (DO) se determinó a 650 nm.

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Formulación y de estabilidad de los NADES

En cumplimiento del primero objetivo específico del presente trabajo, se llevó a cabo la elaboración de los NADES propuestos por Ruesgas-Ramón *et al.* (2017).

Los NADES fueron formulados a partir del método de calor y agitación, en una incubadora SL Shel Lab shaking incubator a 60°C y 330 rpm durante 8 h hasta que se logró observar una mezcla homogénea y transparente según lo reportado por Durand *et al.* (2013); Villeneuve Y Durand. (2015); Ruesgas-Ramón *et al.* (2017).

Cuando las soluciones mostraron una sola fase líquida y transparente, fue un indicador que la mezcla había alcanzado el punto eutéctico. Dicho punto es de vital importancia puesto que en él radica la principal característica de manifestar una sola fase líquida con temperaturas de fusión muy por debajo de aquellas mostradas por los compuestos individuales.

Las relaciones molares establecidas se realizaron con base en la siguiente tabla de composiciones establecidas en el trabajo de Ruesgas-Ramón *et al.* (2017). (Tabla 7).

De los 7 NADES formulados, solo 6 de estos solventes pudieron alcanzar su punto eutéctico, debido a que se observó la formación de una sola fase viscosa y transparente, no así para la formulación del NADES 6, ya que al término de la metodología para su elaboración, este dio como resultado una mezcla de dos fases. Lo cual podría atribuirse al hecho de que no se contaba con las relaciones molares debidas, provocando que la mezcla no alcanzara su punto eutéctico. Esto también podría deberse a los parámetros de preparación de la mezcla, ya que se encuentra reportado por Mulia *et al.* (2017) que la formación del NADES que está compuesto por 1,4 butanodiol y betaina, exhiben una variación en el tiempo de agitación y la temperatura a la cual deben someterse los compuestos para que pueda ser alcanzado el punto eutéctico y así la formación de una sola fase.

Tabla 7. Composiciones de los NADES.

NADES	Relación molar	HBD	M (g)	HBA	M (g)	Tiempo de formulación (h)	Observaciones
1	2:1	Ácido Láctico	1.29	Cloruro de colina	1.00	12	Se logró la formación
2	2:1	Ácido Láctico	1.54	Betaina	1.00	12	Se logró la formación
3	2:1	Glicerol	1.32	Cloruro de colina	1.00	12	Se logró la formación
4	2:1	Glicerol	1.57	Betaina	1.00	12	Se logró la formación
5	3:1	1,4 Butanodiol	1.94	Cloruro de colina	1.00	12	Se logró la formación
6	3:1	1,4 Butanodiol	2.31	Betaina	1.00	>12	No se logró la formación
7	2:1	Urea	0.86	Cloruro de colina	1.00	12	No se logró la formación

:

Posteriormente, se evaluó la estabilidad de las 6 formulaciones de NADES resultantes; Nades1, Nades2, Nades3; Nades4, Nades5 y Nades7 (Figura 16),

Los 6 NADES fueron sometidos a una centrifugación de 3600 rpm por 30 minutos y 3 ciclos de temperatura baja (4°C) y 3 ciclos de temperatura alta (90°C). Con la finalidad de analizar si estos procedimientos físicos podrían repercutir en la estabilidad de los NADES. Al término de los tratamientos para cada una de las formulaciones, se logró observar que el NADES7 vio afectada su estabilidad, ya que manifestó 2 fases en su composición, Esto podría deberse a los ciclos de temperatura, ya que al aplicar una temperatura de 4°C fue puesto en evidencia su inestabilidad, debido a que existió una separación de las fases sólidas, dicha inestabilidad podría atribuirse a la temperatura de solidificación de cada uno de los compuestos involucrados (Urea y Cloruro de colina) (Dai *et al.*, 2013).

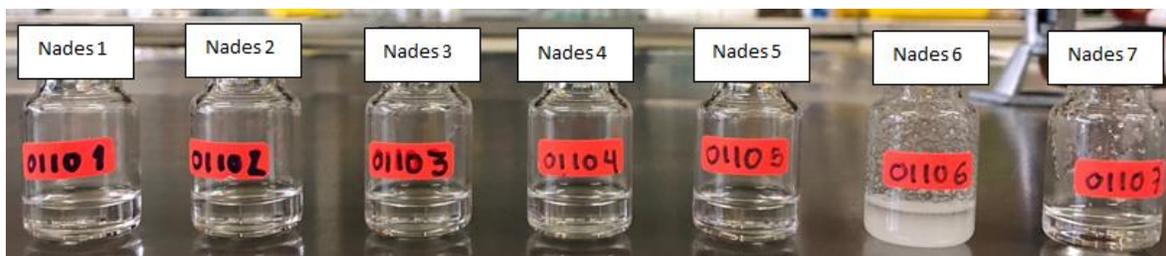


Figura 16. Resultados de las pruebas de estabilidad en los NADES.

Por otro lado también puede ser debido a que en comparación con otras formulaciones, el NADES7 posee menos grupos OH que las otras formulaciones de NADES, por lo que las interacciones para la formación de puentes de hidrogeno fueron menores (Yang, 2018).

Otra explicación a la poca estabilidad exhibida por el NADES7 es la que plantea Dai *et al.* (2013) donde concluyen que el número de grupos de donadores o aceptores de puentes de hidrogeno, la estructura espacial de estos grupos y la posición de los puentes formados, tiene una significativa influencia en la formación y en su estabilidad, por lo que los compuestos como el cloruro de colina y la urea al no poseer una gran cantidad de donadores o aceptores de puentes de hidrogeno, su estabilidad se vio afectada manifestando así una separación de una fase líquida y una sólida.

Como segunda parte en el primer objetivo específico, se determinó la viscosidad de los NADES 1, 2, 3, 4 y 5

Aroso *et al.* (2017) concluye que es importante conocer estos valores de viscosidad para conocer el comportamiento de estos solventes y el tipo de fluido que podrían ser, así también como para establecer mejores metodologías en su aplicación y su manejo. Se encuentra reportado por Aroso *et al.* (2017); Dai *et al.* (2013) Que en una gran variedad de estos NADES manifiestan un comportamiento de un fluido Newtoniano, puesto que la viscosidad fue constante e independiente del valor y la duración de la velocidad de corte aplicada.

Estas mediciones se llevaron a cabo en un reómetro híbrido, mediante 2 platos paralelos de 40 mm de diámetro con una separación de 500 nm y se aplicó una velocidad de corte de 0.1 s^{-1} , en un rango de temperaturas de 25° a 100°C .

Los resultados para la determinación de la viscosidad (Figura 17), demostraron que los primeros 5 NADES poseen viscosidades que van desde 0.09 Pa.s hasta 0.01 Pa.s, dichos valores manifestaron ser dependientes de la temperatura, ya que conforme existió un descenso en la temperatura, la viscosidad fue en aumento, lo cual coincide con lo reportado por algunos autores Aroso *et al.*, (2017); Cui *et al.*, (2017); Kadhom *et al.*, (2017); Khalid *et al.*, (2016); Villeneuve Y Durand 2015; Zhu *et al.*, (2017).

Las mediciones de la viscosidad exhiben una característica importante en estos tipos de solventes eutécticos naturales profundos, Yang *et al.*, (2018) reportó que la extensa presencia de enlaces de puente de hidrogeno existentes en estos solventes da como resultado una baja movilidad de las moléculas, lo que con lleva a una mayor viscosidad, por otra parte Zhu *et al.*, (2017) concluye que los valores de viscosidad altos son debidos a las fuerzas electrostáticas o las interacciones de Van der Waals, ya que estas pueden contribuir a las altas viscosidades exhibidas por estos tipos de solventes.

Yang, (2018) atribuye los valores elevados de viscosidad en estos solventes, a la presencia de grupos hidroxilo los cuales tienen una mayor libertad para la formación de enlaces de puentes de hidrogeno, provocando así una menor movilidad en sus moléculas, Esto dependerá de la naturaleza de cada uno de los compuestos químicos involucrados y la cantidad de grupos OH que presente en su estructura.

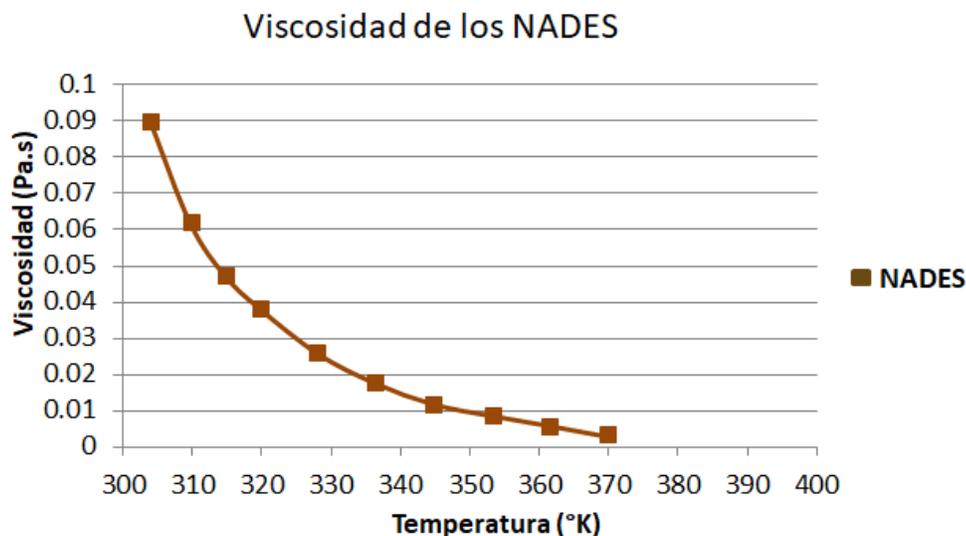


Figura 17. Viscosidades de los NADES.

Los NADES probados manifestaron un comportamiento similar al de los solventes líquidos comunes, por otro lado Craveiro *et al.*, (2016); Dai *et al.*, (2015); Durand *et al.* (2013); Faggian *et al.*, (2017); Villeneuve y Durand., (2015) coinciden en que las viscosidades varían dependiendo de cada uno de los constituyentes de los NADES, de la temperatura y contenido de agua en algunos NADES.

Los NADES con cloruro de colina en su composición presentaron una viscosidad mayor a comparación de aquellos que estaban basado en betaina como un donador de enlaces de hidrógeno (Craveiro *et al.*, 2016a).

7.2 Evaluación de actividad antifúngica de las formulaciones de NADES

Con la finalidad de culminar el segundo objetivo específico del presente trabajo, se realizaron las pruebas para determinar la capacidad antifúngica de cada uno de los componentes de los NADES, estas pruebas fueron realizadas y evaluadas mediante la metodología de pocillos (figura 18) descrita por Sánchez-García *et al.*, (2016) .

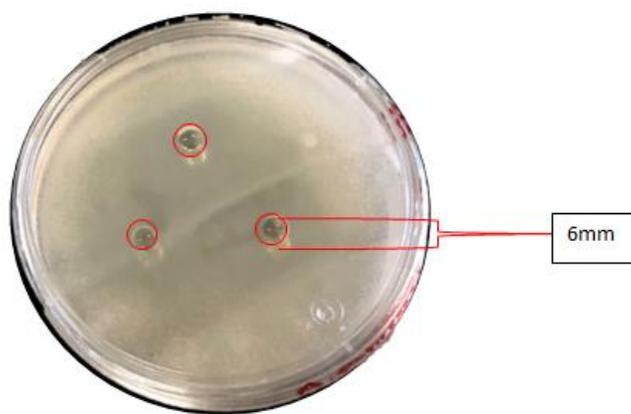


Figura 18. Pocillos realizados en el medio dentro de las cajas Petri.

La Inhibición de cada uno de los compuestos fue medida con base en los datos establecidos por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (NCCLS por sus siglas en ingles). Dicha inhibición fue considerada a partir de un halo de inhibición de 7mm.

Los halos de inhibición presentados por cada uno compuestos en estado puro, así como de los NADES 1, 2, 3, 4, y 5 y las formulaciones de NADES con una concentración establecida de ACG, se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Resultados de las pruebas de actividad antifúngica No IN: no inhibición.

Reactivos individuales	ZONA DE INHIBICIÓN EN MILIMETROS		
	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Fusarium moniliforme</i>
Ácido Láctico	No IN	26.6 ± 2.33	13.5 ± 1.37
1,4 butanodiol	No IN	No IN	No IN
Glicerol	No IN	No IN	No IN
Betaina	No IN	No IN	No IN
Cloruro de colina	No IN	No IN	No IN
ACG	No IN	No IN	No IN
NADES			
N1	No IN	10.83 ± 0.75	11.8 ± 0.40
N2	No IN	15.5 ± 1.97	12 ± 1.26
N3	No IN	No IN	No IN
N4	No IN	No IN	No IN
N5	No IN	No IN	No IN

En los halos de inhibición se observó que el ácido láctico fue el único de los compuestos en estado puro, que exhibió un halo de inhibición frente a las cepas probadas de *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus flavus* y *Fusarium moniliforme*.

El halo de inhibición para *Aspergillus ochraceus* fue de 26.6± 2.33 (Figura 19) y 13.5± 1.37 para *Fusarium moniliforme*.



Figura 19. Inhibición de Ácido Láctico frente a *Aspergillus ochraceus*.

Este efecto puede atribuirse debido a que el ácido láctico al ser un ácido débil, en solución una parte se encuentra disociada $[H^+]$ $[A^-]$ y otra no $[HA]$. El poder antifúngico del ácido láctico yace en estas dos formas, ya que la forma disociada al ser un anión, es altamente polar, y por lo tanto, no atraviesa fácilmente la membrana plasmática de los microorganismos (Davidson *et al.*, 2005), por el contrario, su forma no disociada sí atraviesa la membrana. Una vez en el interior del microorganismo, el ácido puede disociarse y entonces afecta directamente al pH intracelular, lo que daña gravemente a su metabolismo, ya que afecta al gradiente de protones y de carga eléctrica con el exterior, e interfiere con los sistemas de transporte de aminoácidos y fosfatos (Davidson *et al.*, 2005). Además, muchas enzimas esenciales para el metabolismo del microorganismo se inactivan a pH ácido (Mountney y O'Malley, 1964).

De igual manera los NADES 1 y 2 que contaban con el ácido láctico dentro de su composición, fueron los únicos en manifestar un halo de inhibición frente a las cepas de *Aspergillus ochraceus* y *Fusarium moniliforme*, como se muestra en la figura 20 y 21, sin embargo, la inhibición exhibida por cada estos dos NADES fue menor a la mostrada por el ácido láctico en estado puro, por lo que esta reducción es atribuida a la interacción del ácido láctico con el cloruro de colina para el NADES 1 y la interacción con la betaina para el NADES 2. Esto ha sido reportado con anterioridad por Hayyan *et al.*, (2013); Juneidi Y Hayyan, (2016) donde los

compuestos en estado puro manifestaban una mayor inhibición que aquellos que se encontraban dentro de la estructura del NADES, debido a las nuevas interacciones intermoleculares que poseían.

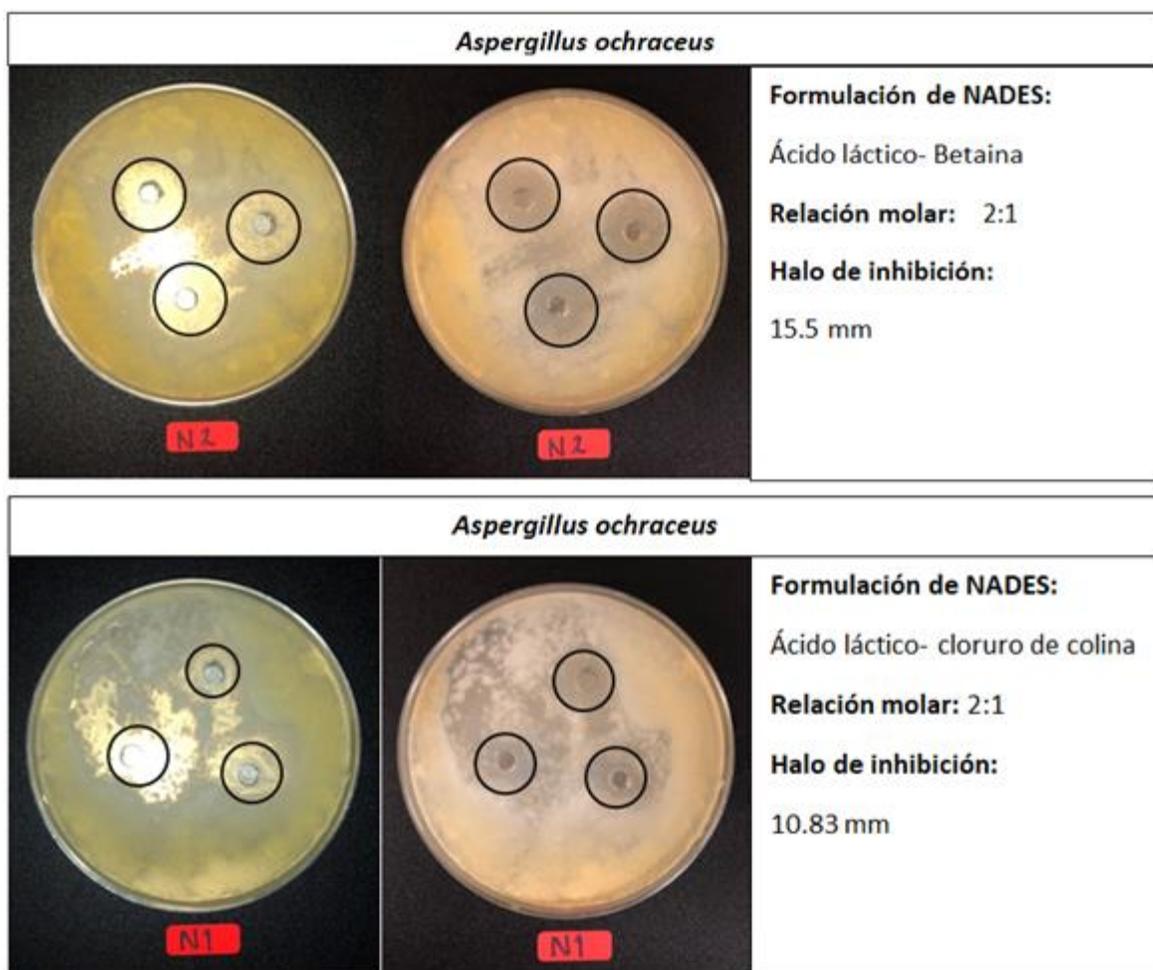
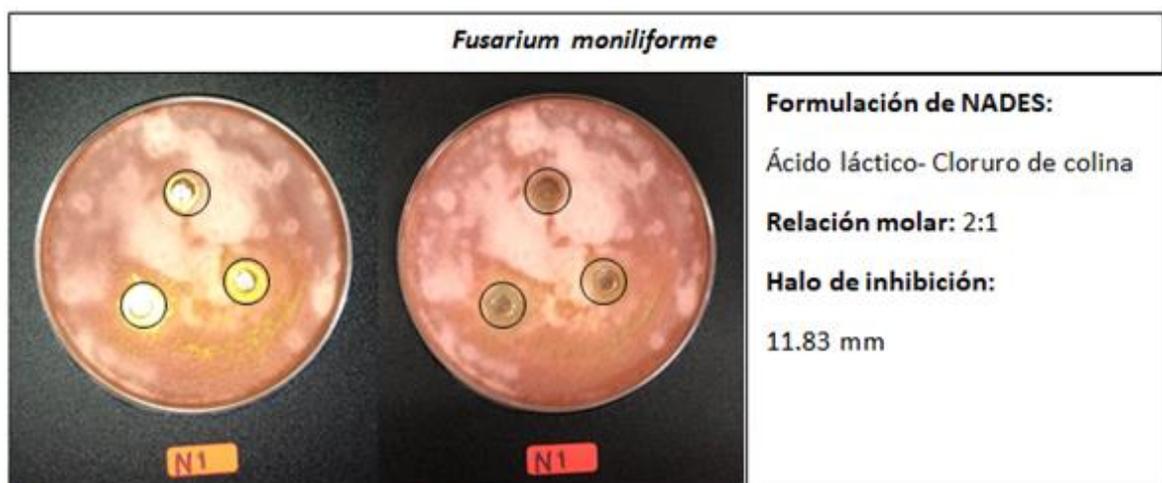


Figura 20. Halos de inhibición exhibidos por NADES 1 y 2 en *Aspergillus ochraceus*.

El NADES1 exhibió un halo de inhibición de 10.83 ± 0.75 mm para *Aspergillus ochraceus* y un halo de 11.8 ± 0.40 mm para *Fusarium moniliforme*. Por su parte el NADES2 mostró un halo de 15.5 ± 1.97 mm para la cepa de *Aspergillus ochraceus* y de 12 ± 1.26 mm para *Fusarium moniliforme*.

Esta inhibición es atribuida a la presencia del ácido láctico en los NADES, sin embargo, existió una disminución en la inhibición cuando el ácido láctico se encontraba en las formulaciones de NADES, esto podría deberse a las interacciones del ácido láctico con los otros compuestos y que las concentraciones de ácido láctico utilizadas en los NADES fueron menores (Juneidi Y Hayyan, 2016).



*Los valores representan el promedio de 6 réplicas \pm d.s.

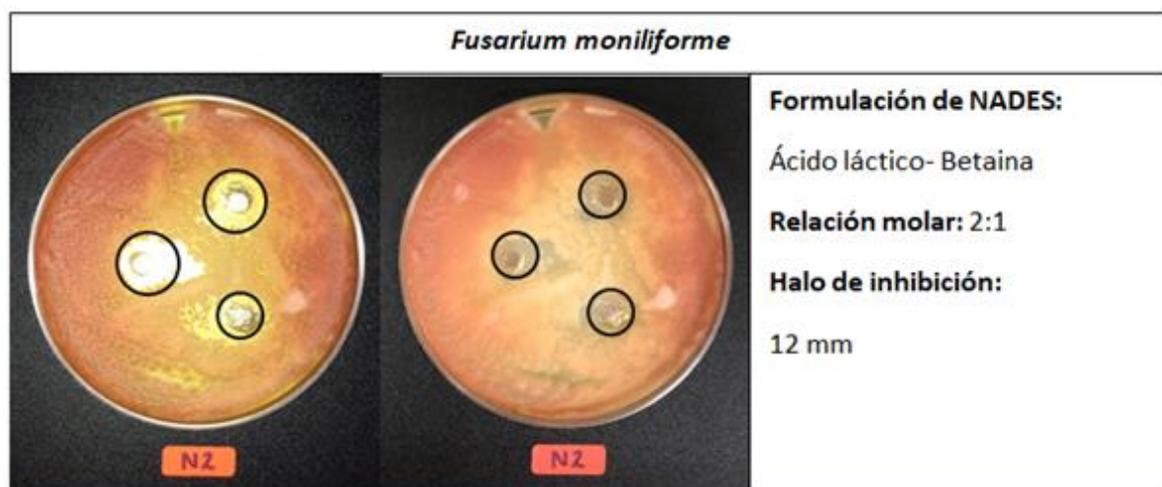


Figura 21. Halos de inhibición exhibidos por NADES 1 y 2 en *Fusarium moniliforme*.

Para la determinación de la actividad antifúngica de los NADES con ACG, se evaluaron únicamente el NADES 1 y 2, debido a que fueron los únicos en manifestar una inhibición contra las cepas de *Aspergillus ochraceus* y *Fusarium moniliforme*. Se determinó su actividad antifúngica con las concentraciones ya establecidas de ACG. Se esperaba que existiera un efecto sinérgico en la inhibición, debido a que tenemos a 2 compuestos químicos que poseen actividad antifúngica (ACG y Ácido láctico) en una misma solución.

Se obtuvieron así los siguientes resultados mostrados en la tabla 9.

Tabla 9. Inhibición del NADES 1 y 2 enriquecidos de ACG a diferentes concentraciones.

NADES + ACG (mg/mL)	ZONA DE INHIBICIÓN EN MILÍMETROS		
	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Fusarium moniliforme</i>
N1 + 1	No IN	8.6 ± 1.3	11.6 ± 0.51
N1 + 1.25	No IN	14 ± 0	10.6 ± 0.81
N1 + 1.5	No IN	11.6 ± 0.51	11.3 ± 0.51
N1 + 1.75	No IN	12.3 ± 0.51	12.6 ± 0.51
N1 + 2	No IN	10.6 ± 1.03	10.8 ± 0.40
N2 + 1	No IN	No IN	10 ± 0
N2 + 1.25	No IN	17.3 ± 0.51	10.5 ± 1.04
N2 + 1.5	No IN	13.83 ± 2.40	10.8 ± 0.98
N2 + 1.75	No IN	18.5 ± 1.97	10.6 ± 1.03
N2 + 2	No IN	18.6 ± 3.14	12.3 ± 0.51

*Las imágenes de los halos de inhibición se encuentran en el ANEXO 1

La solución de NADES 1 con ácido clorogénico no mostró ningún efecto sinérgico en la inhibición del crecimiento de *Aspergillus ochraceus* (figura 22) y *Fusarium moniliforme* (figura 23), por otro lado se encuentra reportado por Suárez-Quiroz *et al.*, (2013) que el ácido clorogénico tiene un efecto contra el crecimiento de *Aspergillus ochraceus* y *Aspergillus flavus*, sin embargo, en el presente estudio el ACG no fue capaz de inhibir el crecimiento de dichas cepas.

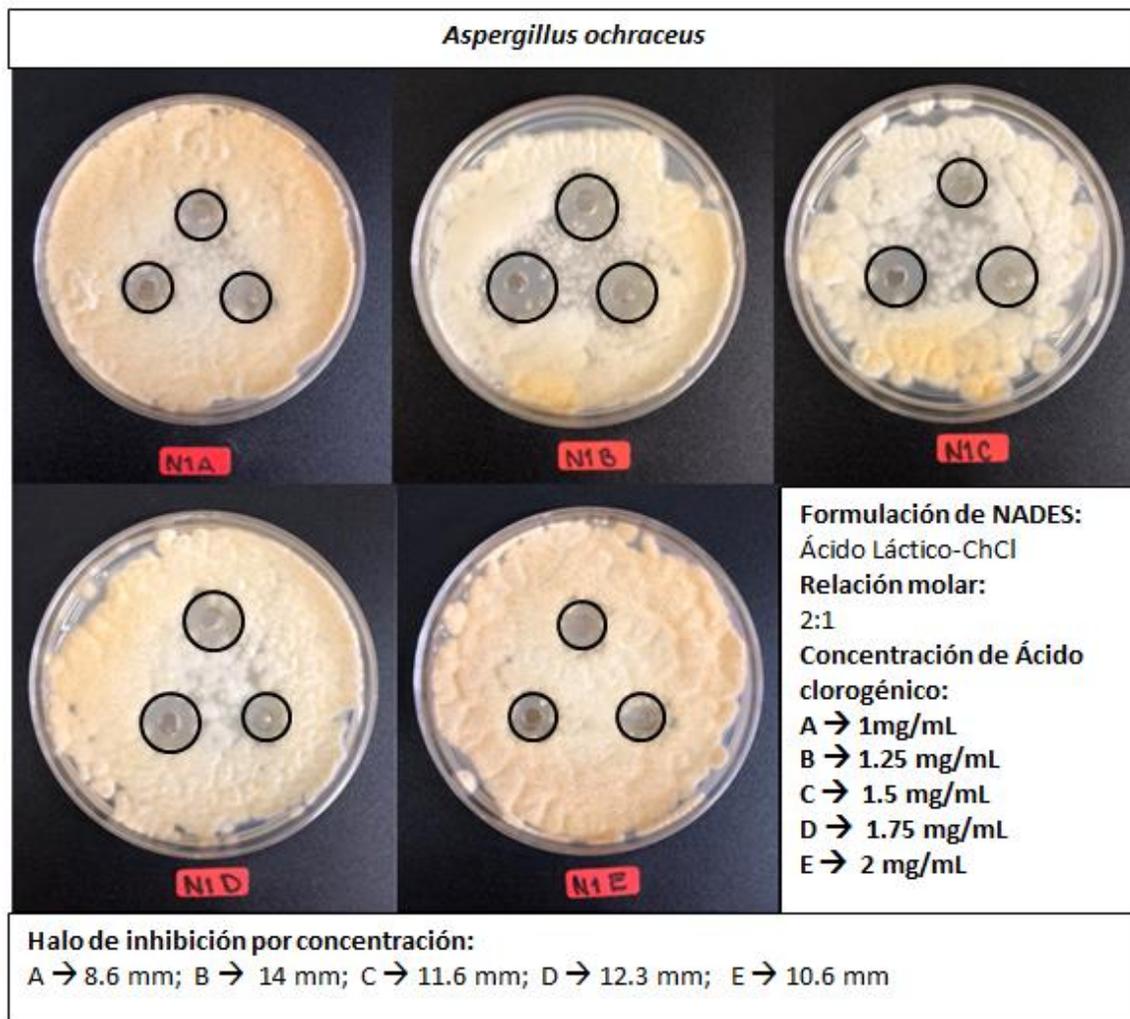


Figura 22. Halos de inhibición del NADES 1 frente a *Aspergillus ochraceus*.

Esto puede deberse a que los NADES al ser solventes muy viscosos no permitieron una difusión idónea del compuesto al medio de cultivo, lo cual tuvo un efecto negativo en el momento de inhibir el crecimiento del hongo, ya que las concentraciones de esporas alcanzadas después de 24 h fueron muy superiores a las concentraciones probadas por Suárez-Quiroz *et al.*, (2013). Por otro lado se encuentra reportado que en medio de agar, los compuestos como los grupos fenólicos y terpenos presentan dificultad en la difusión de los mismos, debido a su baja solubilidad en agua (Gyawali e Ibrahim, 2014).

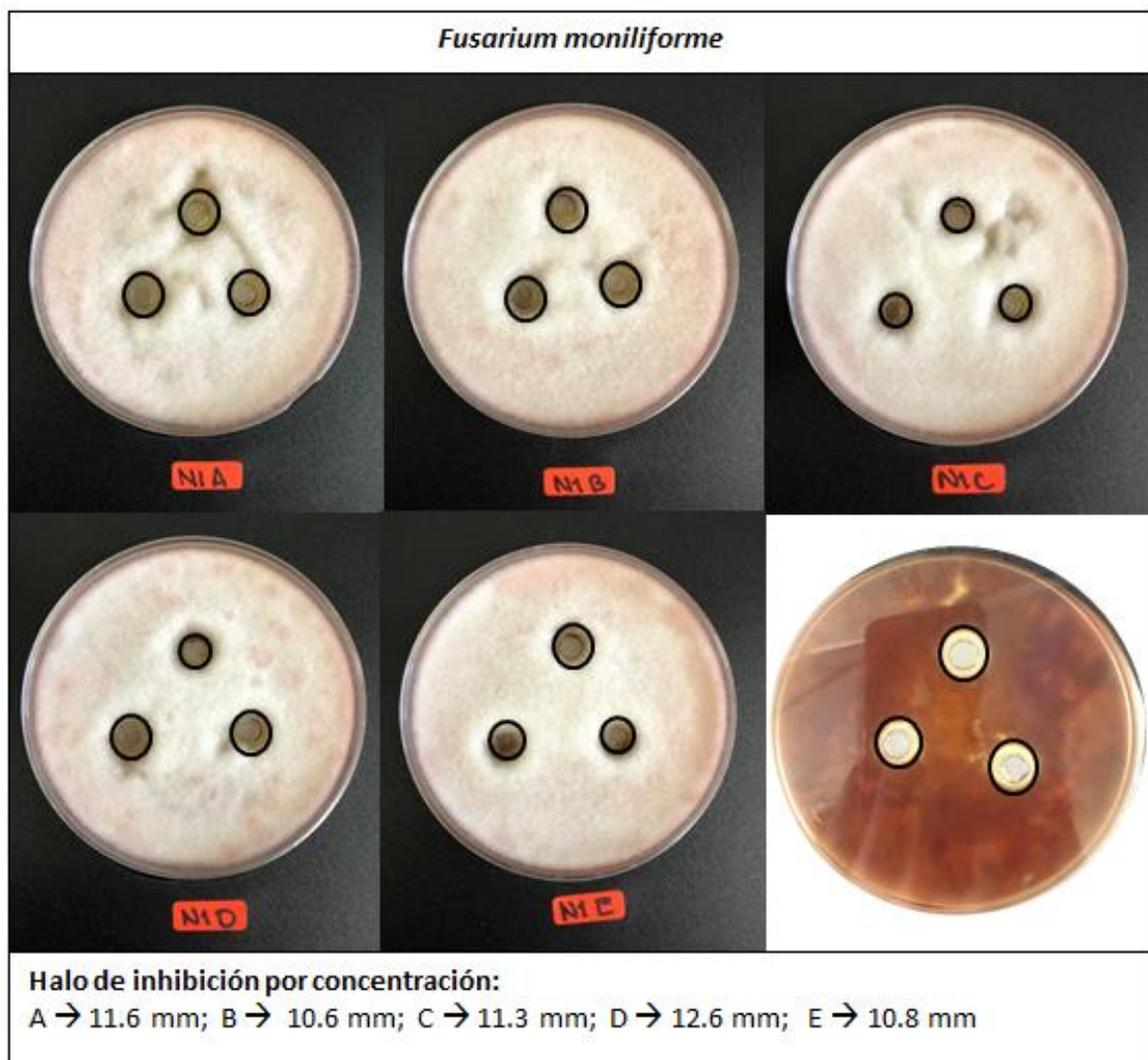


Figura 23. Halos de inhibición del NADES 1 frente a *Fusarium moniliforme*.

La solución de NADES 2 con ácido clorogénico expresó una mayor inhibición en el crecimiento de *Aspergillus ochraceus* en comparación con el mismo NADES sin la presencia del ácido clorogénico. Esto puede ser debido a que la solución de NADES 2 exhibió una viscosidad menor a comparación del NADES 1, por lo que se cree que permitió una mejor difusión del ácido clorogénico en la cepa de *Aspergillus ochraceus*, presentando así halos de inhibición de hasta 18.5 ± 1.97 mm (Figura 24).

Las concentraciones de ACG en compañía del NADES 2, No expresaron una sinergia en la inhibición del crecimiento de la cepa *Fusarium moniliforme*. Por otro lado la cepa de *Aspergillus flavus* demostró ser resistente a las concentraciones probadas de ácido clorogénico.

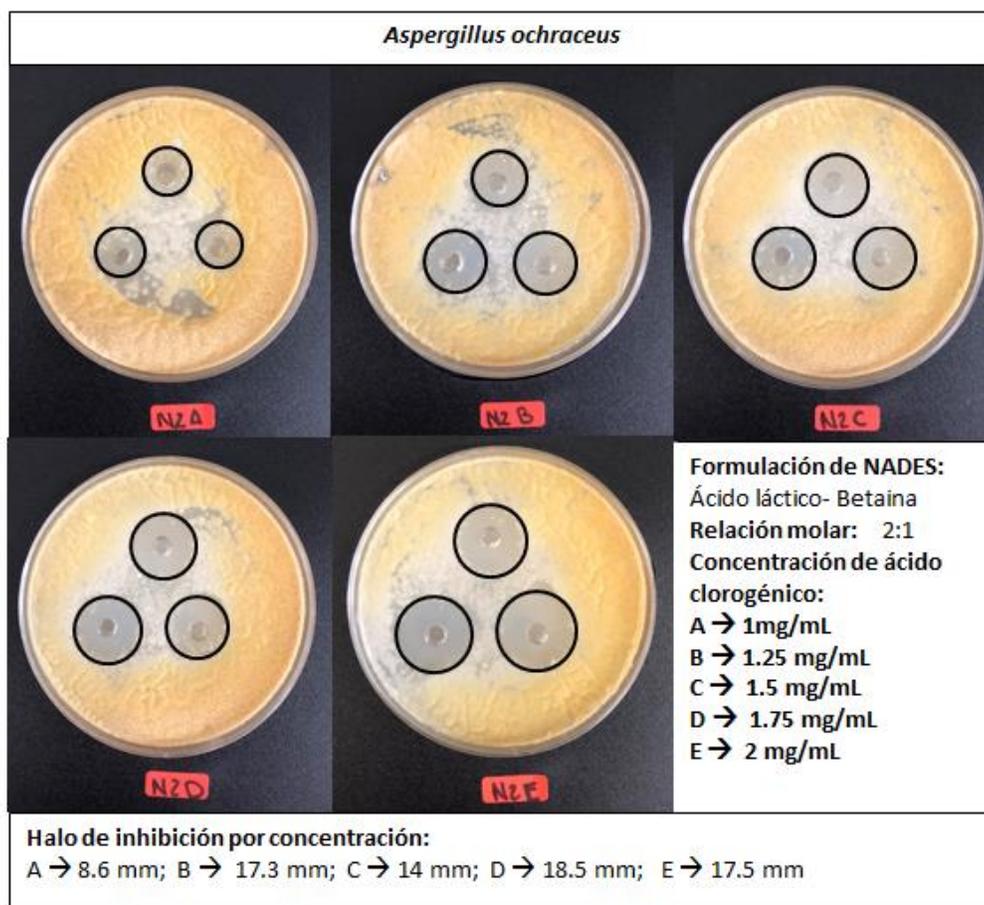


Figura 24. Halos de inhibición del NADES 2 frente a *Aspergillus ochraceus*.

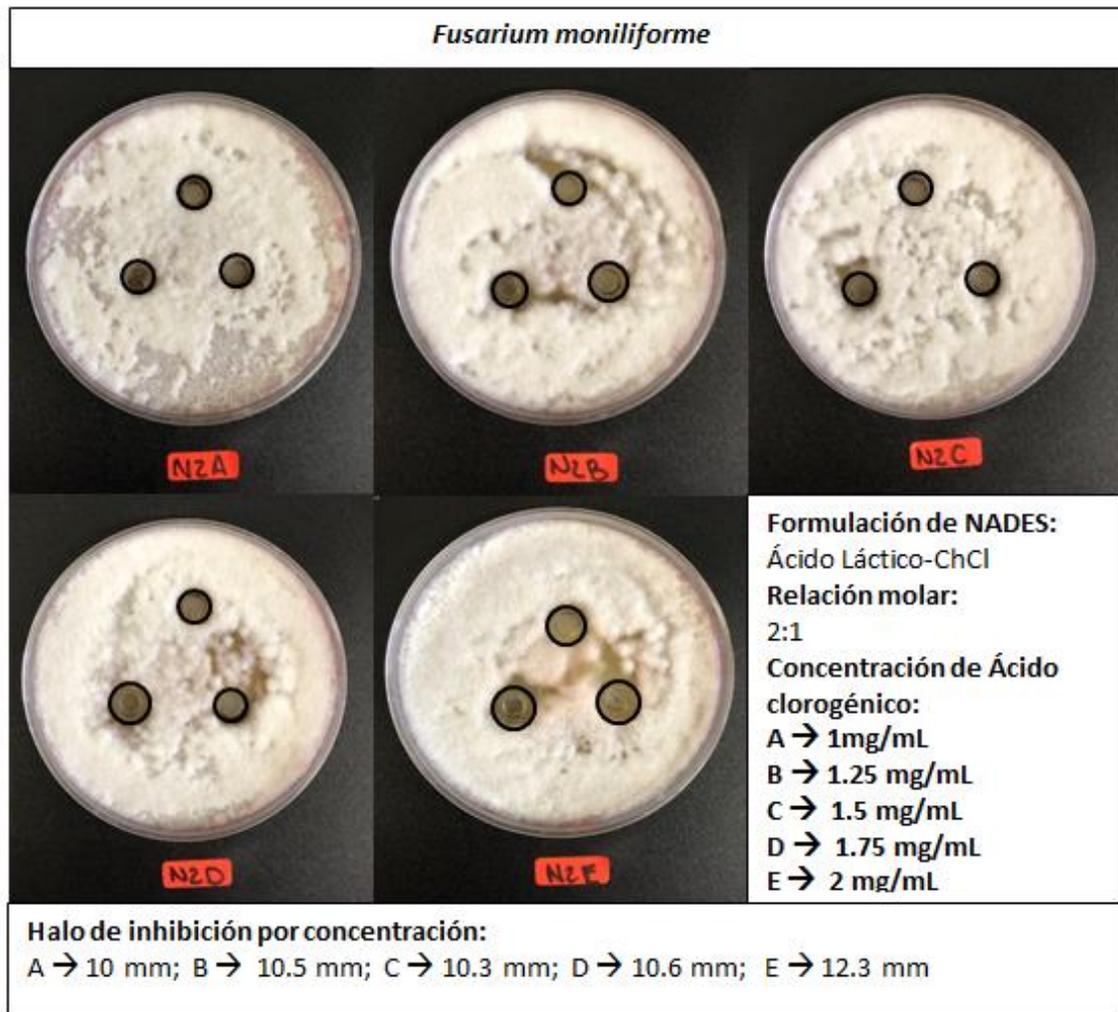


Figura 25. Halos de inhibición del NADES 2 frente a *Fusarium moniliforme*.

Por otro lado se encuentra reportado por Juven *et al.*, (1994) que el incremento de la concentración de los compuestos que inhiben el crecimiento del hongo no es siempre directamente proporcional a la inhibición del mismo. Esto puede ser atribuido a que el comportamiento de los compuestos fenólicos afectan sitios específicos de la membrana, y solo cuando estos sitios se encuentran saturados, es cuando puede existir un daño en la célula (Juven *et al.*, 1994).

7.3 Evaluación de actividad antitoxigénica de las formulaciones de NADES

Para la realización del tercer objetivo específico se llevó a cabo la evaluación de la actividad antitoxigénica se llevó a cabo mediante la prueba de ELISA, en la cual fueron evaluadas las cepas de *Aspergillus ochraceus* y *Fusarium moniliforme*, en la producción de Ocratoxina A y Fumonisinias totales, ya que dichas cepas manifestaron una inhibición frente al NADES 1 y 2.

Las pruebas realizadas para medir la producción de OTA en la cepa pura de *Aspergillus ochraceus* y en presencia del NADES 1 y 2. Fueron realizadas por triplicado y se obtuvieron los resultados mostrados en la tabla 10.

Tabla 10. Resultados de pruebas antitoxigénica de NADES 1 y 2

	Cepa	Producción de OTA ng/g medio
	<i>Aspergillus ochraceus</i> (cepa pura)	32
NADES	Cepa	Producción de OTA ng/g medio
NADES 1	<i>A. ochraceus.</i>	13.35
	<i>A. ochraceus.</i>	14.5
	<i>A. ochraceus.</i>	16.5
	Promedio	14.78 ± 1.59
NADES 2	<i>A. ochraceus.</i>	12
	<i>A. ochraceus.</i>	13.1
	<i>A. ochraceus.</i>	17.2
	Promedio	14.1 ± 2.74

Los resultados obtenidos demuestran que la cepa pura de *Aspergillus ochraceus* tuvo una producción de 32 ng/g de medio. Para las cepas que contenían la solución de NADES 1 mostraron una producción de 14.78 ± 1.59 ng/g medio por lo que hubo una disminución de la producción de OTA de un 54%.

Para la determinación de la producción de OTA en las cepas que contenían la solución de NADES 2 estas exhibieron una producción de 14.1 ± 2.74 ng/g de medio, de igual manera existió una disminución en la producción de OTA de un 56% en comparación con la producción de la cepa pura.

Para las pruebas en la determinación de la producción de *Fumonisina* se obtuvieron los siguientes resultados mostrados en la tabla 11:

Tabla 11. Producción de Fumonisina en cepas de *Fusarium moniliforme* con soluciones del NADES 1 y 2

	Cepa	Producción de FUMO en ppm
	<i>Fusarium moniliforme</i> (cepa pura)	11.6
NADES	Cepa	Producción de FUMO en ppm
N1	<i>F. moniliforme.</i>	10.4
	<i>F. moniliforme.</i>	10.3
	Promedio	10.35 ± 0.070
N2	<i>F. moniliforme.</i>	10.1
	<i>F. moniliforme.</i>	10.1
	Promedio	10.1 ± 0

Las pruebas con las soluciones del NADES 1 y 2 demostraron que no existió una variación en la producción de fumonisinas en las cepas que interactuaron con las soluciones de NADES 1 y 2.

7.3.1 Evaluación de actividad antitoxigénica de las formulaciones de NADES con ACG

La determinación de la producción de OTA de los medios de cultivo en presencia de los NADES 1 y 2 con ácido clorogénico, cuyas concentraciones fueron de 1.75 mg/mL y 2 mg/mL. Arrojaron los siguientes resultados, para *Aspergillus ochraceus*, en las cuales existió un aumento en la producción de OTA en comparación con los NADES sin la presencia del ácido clorogénico. Esto puede ser debido a que la exposición del ácido clorogénico provocó un estrés en el microorganismo el cual aumento la producción de la toxina como mecanismo de defensa.

Tabla 12. Producción de OTA en presencia del ACG.

NADES + ACG (mg/mL)	Cepa	Producción de OTA ng/g medio
N1 + 1.75	<i>A. ochraceus.</i>	18.8
N1 + 2	<i>A. ochraceus.</i>	20.7
N2 + 1.75	<i>A. ochraceus.</i>	17.2
N2 + 2	<i>A. ochraceus.</i>	23.5

Para la producción de Fumonisinas a partir de las cepas de *Fusarium moniliforme* en presencia de las soluciones de NADES 1 y 2 con ácido clorogénico en concentraciones de 1.75 mg/mL y de 2 mg/mL se obtuvieron los siguientes resultados mostrados en la tabla 13.

Tabla 13. Producción de fumonisinas en presencia de ACG.

NADES + ACG (mg/mL)	Cepa	Producción de FUMO en mg/kg de medio
N1 + 1.75	<i>F. moniliforme.</i>	10.1
N1 + 2	<i>F. moniliforme.</i>	10.1
N2 + 1.75	<i>F. moniliforme.</i>	9.4
N2 + 2	<i>F. moniliforme.</i>	9.3

La producción de FUMO en las cepas que contenían al NADES 1 y 2 con ACG no mostraron una variación en la producción de *fumonisinas* en comparación de la cantidad producida por la cepa pura y en presencia de los NADES 1 y 2 sin el ACG.

CONCLUSIONES

De las 7 formulaciones de NADES elaboradas solo 5 de ellos demostraron ser estables a las condiciones a las que fueron sometidas.

Los NADES que contaban con ácido orgánico en su composición, como fue el caso del NADES 1 y 2 que contaban con ácido láctico, manifestaron una actividad antifúngica, sin embargo, no fue así para los NADES 3,4 y 5 que no exhibieron ninguna acción inhibitoria frente a las cepas de hongos probadas.

Los NADES con ACG presentaron inhibición en el crecimiento de las cepas de *Aspergillus ochraceus* y *Fusarium moniliforme*; sin embargo, la cepa de *Aspergillus flavus* demostró ser altamente resistente a los NADES enriquecidos de ácidos orgánicos, ya que no existió inhibición en su crecimiento.

No existió un efecto sinérgico de los NADES con el ácido clorogénico contra la cepa de *Aspergillus ochraceus* en la producción de ocratoxina A y en la producción de FUMO, producido por la cepa de *Fusarium moniliforme*.

BIBLIOGRAFIA

- Abbott, A. P., Boothby, D., Capper, G., Davies, D.L., Rasheed, R. K. 2004. "Deep Eutectic Solvents Formed Between Choline Chloride and Carboxylic Acids." *J. Am. Chem. Soc* 126(9): 9142.
- Abbott, A. P., Boothby, D., Capper, G., Davies, D.L., Rasheed, R. K., Tambyrajah V. 2003. "Novel Solvent Properties of Choline Chloride Urea Mixtures." *Chemical Communication* 0(1): 70–71.
- Alhassan, Y., Kumar, N., Bugaje, I. M. 2016. "Catalytic Upgrading of Waste Tire Pyrolysis Oil via Supercritical Esterification with Deep Eutectic Solvents (Green Solvents and Catalysts)." *Journal of the Energy Institute* 89(4): 683–93.
- Almeida, A. A. P., Farah, A., Silva, D. A. M., Nunan, E. A., Glória, M. B. A. 2006. "Antibacterial Activity of Coffee Extracts and Selected Coffee Chemical Compounds against Enterobacteria." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(23): 8738–43.
- Aroso, I. M., Paiva, A., Reis, R. L., Duarte, A. R. C. 2017. "Natural Deep Eutectic Solvents from Choline Chloride and Betaine – Physicochemical Properties." *Journal of Molecular Liquids* 241: 654–61.
- Aroso, I., Silva, J. C., Mano, F., Ferreira, A.S.D., Diónísio, M., Sá-Nogueira, I., Barreiros, S., Reis, R.L., Paiva, A., Duarte, A.R. 2016. "Dissolution Enhancement of Active Pharmaceutical Ingredients by Therapeutic Deep Eutectic Systems." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 98: 57–66.
- Arroyo-Manzanares, N., Huertas-Pérez, L.G., Gámiz-Gracia, L., García-Campaña, A.M. 2014. "Control de Micotoxinas En Alimentos." *Boletín Graseqa* 7: 16–31.
- Bacallao, L.G., Mercedes-Rojo, D.D., García-Gómez, L.V., Hernández, A.M.. 2002. "Plantas Con Propiedades Antiinflamatorias." *Revista Cubana de Investigaciones Biomedicas* 21(3): 214–16.
- Bakirtzi, C., Triantafyllidou, K., Makris, D.P. 2016. "Novel Lactic Acid-Based Natural Deep Eutectic Solvents: Efficiency in the Ultrasound-Assisted Extraction of Antioxidant Polyphenols from Common Native Greek Medicinal Plants." *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*

- Bassoli, B.K., Cassolla, P., Silva, R.R.S.F. 2001. "Bioassays to Evaluate the Physiological Functional Properties of Chlorogenic Acid and of an Instant Coffee Extract with High Levels of Chlorogenic Acids." *ASIC 21st International Conference on Coffee Science*: 65–72.
- Bhunja, A.K. 2008. *Foodborne Microbial Pathogens Mechanisms and Pathogenesis*.
- Bidart, T.H. 2004. "Rol de Voriconazol Y Caspofungina En Terapia Antifúngica." *Revista chilena de infectología* 21(Supl 1): 13–19.
- Bosiljkov, T., Dujmi, F., Bubalo, M.C., Hribar, J., Vidrih, R. 2016. "Food and Bioproducts Processing Natural Deep Eutectic Solvents and Ultrasound-Assisted Extraction: Green Approaches for Extraction of Wine Lees Anthocyanins." 2: 195–203.
- Bragulat, M. R., Abarca, M. L., Cabañes, F. J. 2001. "An Easy Screening Method for Fungi Producing Ochratoxin A in Pure Culture." *International Journal of Food Microbiology* 71(2–3): 139–44.
- Cabañes, F.j., Abarca, M.L., Bragulat, M.R., Castellá, G. 2000. "Hongos Productores de Micotoxinas Emergentes Hongos Productores de Micotoxinas Emergentes." (January 2000).
- Canillac, N., Mourey, A. 2004. "Effects of Several Environmental Factors on the Anti-Listeria Monocytogenes Activity of an Essential Oil of Picea Excelsa." *International Journal of Food Microbiology* 92(1): 95–103.
- Dai, Y., Witkamp, G.J., Verporte, R., Choi, Y.H. 2013. "Natural Deep Eutectic Solvents as a New Extraction Media for Phenolic Metabolites in Carthamus Tinctorius L." (May).
- Chan, J.G., Egner, P.A., Jacobsom, L.P., Muñoz, A., Wu, F., Kensler, T.W. 2013. "Reduced Aflatoxin Exposure Presages Decline in Liver Cancer Mortality in an Endemic Region of China." *Cancer Prevention Research* 6(10): 1038–45.
- Chemat, F., Anjum, H., Shariff, A.M., Kumar, P., Murugesan, T.. 2016. "Thermal and Physical Properties of (Choline Chloride + Urea + L -Arginine) Deep Eutectic Solvents." *Journal of Molecular Liquids* 218: 301–8.
- Choi, Y.H., Spronsen, J.V., Dai, Y., Veberne, M., Hollmann, F., Verporte, R. 2011. "Are Natural Deep Eutectic Solvents the Missing Link in Understanding Cellular Metabolism and Physiology ? [W]." 156(August): 1701–5.
- Clifford, M.. 1999. "Review Chlorogenic Acids and Other Cinnamates – Nature , Occurrence and Dietary Burden." 372(June 1998): 362–72.

- Clifford, M. 1985. "Coffee, Chlorogenic Acids." In *Coffe*, , 319.
- Copetti, Marina V et al. 2013. "Occurrence of Ochratoxin A in Cocoa by-Products and Determination of Its Reduction during Chocolate Manufacture." *Food Chemistry* 136(1): 100–104.
- Craveiro, R. et al. 2016. "Properties and Thermal Behavior of Natural Deep Eutectic Solvents." *Journal of Molecular Liquids* 215: 534–40..
- Craveiro, R., Aroso, I., Famimia, V., Carvalho, T., Viciosa, M.T., Pava., A. 2016. "Properties and Thermal Behavior of Natural Deep Eutectic Solvents." *Journal of Molecular Liquids* 215: 534–40.
- Cui, Y., Li, C.; Yin, J., Li, S., Jia, Y., Bao, M. 2017. "Design, Synthesis and Properties of Acidic Deep Eutectic Solvents Based on Choline Chloride." *Journal of Molecular Liquids* 236: 338–43.
- Dai, Y., Rozema, E., Verpoorte R., Choi, Y.H. 2016. "Application of Natural Deep Eutectic Solvents to the Extraction of Anthocyanins from *Catharanthus Roseus* with High Extractability and Stability Replacing Conventional Organic Solvents." *Journal of Chromatography A* 1434: 50–56.
- Dai, Y., Spronsen, J.P., Witkamp, G.J.. 2013. "Analytica Chimica Acta Natural Deep Eutectic Solvents as New Potential Media for Green Technology." *Analytica Chimica Acta* 766: 61–68.
- Dai, Y., Spronsen, J.V., Witkamp, G.J., Verpoorte, G.J., 2013. "Ionic Liquids and Deep Eutectic Solvents in Natural Products Research: Mixtures of Solids as Extraction Solvents."
- Dai, Y., Witkamp, G.J., Verpoorte, Choi, Y.H. "Tailoring Properties of Natural Deep Eutectic Solvents with Water to Facilitate Their Applications." *Food Chemistry*"
- Damodaran, S., Parkin, K.L., Fennema, O.R. 2008. "Chapter 16.7 Chemistry of Processed Meats." *Fennema's Food Chemistry*: 961–64.
- Darwish, W.S., Ikenaka, Y., Nakayama, Ishizuka, M. 2014. "An Overview on Mycotoxin Contamination of Foods in Africa." *Journal of Veterinary Medical Science* 76(6): 789–97.
- Davidson, M., Sofos, J., Branen, A.L. 2005. *Antimicrobials in Food*.
- Diomedi, P. 2004. "Nuevos Antifúngicos : Las Equinocandinas." *Revista chilena de infectología* 21(2): 89–101.

- D'mello, J.P.F.D., MacDonald, A.M.C., 1997. "Mycotoxins." *Seed Science And Technology* 19(2): 279–86.
- Drosinos, E.H., Skandamis, P., Panagou, E. 2008. "Evaluating the Combined Effect of Water Activity, pH and Temperature on Ochratoxin A Production by *Aspergillus Ochraceus* and *Aspergillus Carbonarius* On Culture Medium and Corinth Raisins." *Food Control* 20(8): 725–32.
- Duan, L., Dou, L., Guo, L., Ping, L. 2016. "Comprehensive Evaluation of Deep Eutectic Solvents in Extraction of Bioactive Natural Products."
- Durand, E., Lecomte, J., Baréa, B., Piombo, G., Dubreucq, E. 2012. "Evaluation of Deep Eutectic Solvents as New Media for *Candida Antarctica B* Lipase Catalyzed Reactions." *Process Biochemistry* 47(12): 2081–89.
- Durand, E., Villeneuve, P. 2014. "Towards a Better Understanding of How to Improve Lipase-Catalyzed Reactions Using Deep Eutectic Solvents Based on choline chloride"
- Egner, P.A., Wang, J.B., Zhu, Y. 2001. "Chlorophyllin Intervention Reduces Aflatoxin-DNA Adducts in Individuals at High Risk for Liver Cancer." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(25): 14601–14606.
- Espinel-ingroff, A., Cantón, E: "Testing of Filamentous Fungi.": 209–41.
- Estandarizados Metodos Para la Determinación de la sensibilidad antimicrobiana. 2001. "ANIMALES : TEST DE DIFUSION POR DISCOS Y TEST DE Ministerio de Salud." *Test*.
- Faggian, M., Sut, S., Perissutti, B., Baldan, V., Grabnar, I. 2016. "Natural Deep Eutectic Solvents (NADES) as a Tool for Bioavailability Improvement: Pharmacokinetics of Rutin Dissolved in Proline / Glycine after Oral Administration in Rats : Possible Application in Nutraceuticals." : 1–11.
- FAO. 1991. *Estudio Fao: Alimentacion Y nutricion;Manuales Para El Contral En Calidad de Alimentos; Capacitación En Analisis de Micotoxinas.*
- FAO b. 2003. "Reglamentos a Nivel Mundial Para Las Micotoxinas En Los Alimentos Y En Las Raciones En El Año 2003."
- Foroud, N.A., Eudes, F. 2009. "Trichothecenes in Cereal Grains." *International Journal of Molecular Sciences* 10(1): 147–73.
- Frisvad, J. C., Samson, R.A., Kuijpers, A.F.A., Frank, J.M. 2004. "New Ochratoxin A or *Sclerotium* Producing Species in *Aspergillus* Section *Nigri*." *Studies in Mycology* 50(1): 23–43.

- Glenn, A. E. 2007. "Mycotoxigenic Fusarium Species in Animal Feed." *Animal Feed Science and Technology* 137(3–4): 213–40.
- Greengberg, J. A., Boozer, C.N, Gelieber, A. 2011. "Coffe, Diabetes, and Weight Control." : 752–78.
- Gregorí-Valdés, B.S. 2005. "Estructura Y Actividad de Los Antifúngicos." *Revista Cubana de Farmacia* 39(2): 1–15.
- Gu, L., Huang, W., Tang, S., Tian, S. 2015. "A Novel Deep Eutectic Solvent for Biodiesel Preparation Using a Homogeneous Base Catalyst." *Chemical Engineering Journal* 259: 647–52.
- Gutiérrez, C.M., Rojo, F., Del Monte, F. 2013. "Deep Eutectic Solvent-Assisted Synthesis of Biodegradable Polyesters with Antibacterial Properties."
- Gutiérrez, M.C., Ferrer, M.L., Reyes, C.M., Del Monte, F. 2009. "Freeze-Drying of Aqueous Solutions of Deep Eutectic Solvents: A Suitable Approach to Deep Eutectic Suspensions of Self-Assembled Structures." *Langmuir* 25(10): 5509–15.
- Gutiérrez, M.C., Ferrer, M.L., Yuste, L., Del Monte, F. 2010. "Bacteria in Nonaqueous Solution Bacteria Incorporation in Deep-Eutectic Solvents through Freeze- Drying **." : 2158–62.
- Gyawali, R., Ibrahim, S.A. 2014. "Natural Products as Antimicrobial Agents." *Novel Antimicrobial Agents and Strategies* 46: 219–94.
- Hammond, O. S., Bowron, D.T., Jackson, A.J. 2017. "Resilience of Malic Acid Natural Deep Eutectic Solvent Nanostructure to Solidification and Hydration." *Journal of Physical Chemistry B* 121(31): 7473–83.
- Hayyan, M., Hashim, M.A., Al-Saasi, M.A. 2013. "Chemosphere Assessment of Cytotoxicity and Toxicity for Phosphonium-Based Deep Eutectic Solvents." *Chemosphere* 93(2): 455–59.
- Hayyan, M., Hashim, M.A., Al-Saasi, M.A. 2013. "Chemosphere Are Deep Eutectic Solvents Benign or Toxic ?" *Chemosphere* 90(7): 2193–95.
- Hiramoto, F., Nomura, N., Furumai, T. 2005. "Pradimicin Resistance of Yeast Is Caused by a Mutation of the Putative N -Glycosylation Sites of Osmosensor Protein Sln1." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 69(1): 238–41.

- Hulme, C.A. 1952. "The Isolation of Chlorogenic Acid from the Apple Fruit." 53(1943): 337–40.
- Iwahashi, H. 2000. "Some Polyphenols Inhibit the Formation of Pentyl Radical and Octanoic Acid Radical in the Reaction Mixture of Linoleic Acid Hydroperoxide with Ferrous Ions." *The Biochemical journal* 346 Pt 2: 265–73.
- Iwai, K., Kishimoto, N., Kakino, Y. 2004. "Identification of Chlorogenic Acids in Coffee Beans and Their Physiological Activities." *ASIC 20th International Conference on Coffee Science*: 284–88.
- Juarez-Caballero, B.E. 2015. "Estudio de La Actividad Antifúngica Y Antitoxigénica Del Aceite Esencial de Pimienta Gorda (Pimenta Dioica L.) Frente a Cepas de Aspergillus Y Fusarium)."
- Juneidi, I., Hayyan, M. 2016. "Toxicity Profile of Choline Chloride-Based Deep Eutectic Solvents for Fungi and Cyprinus Carpio Fish." : 7648–59.
- Juneidi, I., Hayyan, M. 2016. "Toxicity Profile of Choline Chloride-Based Deep Eutectic Solvents for Fungi and Cyprinus Carpio Fish Toxicity Profile of Choline Chloride-Based Deep Eutectic Solvents for Fungi and Cyprinus Carpio Fish." *Environmental Science and Pollution Research* (January).
- Juven, B. J., Kanner, J., Schved, F., Weisslowicz, H. 1994. "Factors That Interact with the Antibacterial Action of Thyme Essential Oil and Its Active Constituents." *Journal of Applied Bacteriology* 76(6): 626–31.
- Kadhom, M.A., Ghassan H. A., Al-Bayati, N. 2017. "Studying Two Series of Ternary Deep Eutectic Solvents (Choline Chloride–Urea–Glycerol) and (Choline Chloride–Malic Acid–Glycerol), Synthesis and Characterizations." *Arabian Journal for Science and Engineering* 42(4): 1579–89.
- Kanafani, Z.A. Perfect, J.R.. 2010. "Resistance to Antifungal Agents: Mechanisms and Clinical Impact." *Chinese Journal of Infection and Chemotherapy* 10(4): 320.
- Karamać, M., Buciński, A., Pegg, R.B., Amarowicz, R. 2005. "Antioxidant and Antiradical Activity of Ferulates." *Czech Journal of Food Sciences* 23(2): 64–68.
- Kelley, R., Williams, W.P, Myloire, E.J., Boykin, D.L 2012. "Identification of Maize Genes Associated with Host Plant Resistance or Susceptibility to Aspergillus Flavus Infection and Aflatoxin Accumulation." *PLoS ONE* 7(5): e36892.

- Kensler, T.W., Roebuck, R.D, Wogan, G.N., Groopman, J.D. 2011. "Aflatoxin: A 50-Year Odyssey of Mechanistic and Translational Toxicology." *Toxicological Sciences* 120(SUPPL.1): 28–48.
- Khalid, M., Hayyan, M., Abdulhakim, M., Akib, S. 2016. "Glycerol-Based Deep Eutectic Solvents : Physical Properties." *Journal of Molecular Liquids* 215: 98–103.
- Klich, M.A. 2007. "Environmental and Developmental Factors Influencing Aflatoxin Production by *Aspergillus Flavus* and *Aspergillus Parasiticus*." *Mycoscience* 48(2): 71–80.
- Klueken, A. M., Borgemeister, C., Hau, B. 2016. "Field Release of a Non-Toxicogenic *Aspergillus Flavus* L Strain in Central BeninFeldapplikationen von Nicht-Toxischen *Aspergillus Flavus* L Stämmen in Zentralbenin." *Journal of Plant Diseases and Protection* 116(1): 17–22.
- Köller, G., Wichmann, G., Rolle-Kampcczyk, R. 2006. "Comparison of ELISA and Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence Detection in the Analysis of Ochratoxin A in Low Volumes of Human Blood Serum." *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 840(2): 94–98.
- Kono, Y., Shibata, Y., Kodama, Y., Sawa, Y. 1995. "The Suppression of the N-Nitrosating Reaction by Chlorogenic Acid." *The Biochemical journal* 312: 947–53.
- Kranz, Maximilian, and Thomas Hofmann. 2018. "Food-Grade Synthesis of Maillard-Type Taste Enhancers Using Natural Deep Eutectic Solvents (NADES)." *Molecules* 23(2): 1–13.
- Kumar, P., Vijay, S., Suresh, L., Chandramouli, G.V.P. 2017. "Ionic Liquid Catalysed Multicomponent Synthesis , Antifungal Activity , Docking Studies and in Silico ADMET Properties of Novel Fused Chromeno- Pyrazolo-Phthalazine Derivatives." : 306–14.
- Li, G., Deng, D., Chen, Y. 2014. "Solubilities and Thermodynamic Properties of CO₂ in Choline-Chloride Based Deep Eutectic Solvents." *Journal of Chemical Thermodynamics* 75: 58–62. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jct.2014.04.012>.
- Li, Z., Ping I. L. 2016. "Investigation on Drug Solubility Enhancement Using Deep Eutectic Solvents and Their Derivatives." *International Journal of Pharmaceutics* 505(1–2): 283–88.

- Liu, Y., Yuzhi W., Dai, Q., Zhou, Y. 2016. "Magnetic Deep Eutectic Solvents Molecularly Imprinted Polymers for the Selective Recognition and Separation of Protein." *Analytica Chimica Acta* 936: 168–78.
- Mahesh, B, Satish, S. 2008. "Antimicrobial Activity of Some Important Medicinal Plant Against Plant and Human Pathogens." *World Journal of Agricultural Sciences* 4: 839–43.
- Marin, S., Ramos, A.J., Cano-Sancho, G., Sanchis, V. 2013. "Mycotoxins: Occurrence, Toxicology, and Exposure Assessment." *Food and Chemical Toxicology* 60: 218–37.
- Marroquín-Cardona, A. G., Johnson, N.M., Phillips, T.D., Hayes, A.W. 2014. "Mycotoxins in a Changing Global Environment - A Review." *Food and Chemical Toxicology* 69: 220–30
- Mbous, Y.P., Hayyan, M., Wong, W.F. 2017. "Unraveling the Cytotoxicity and Metabolic Pathways of Binary Natural Deep Eutectic Solvent Systems." *Nature Publishing Group* (June 2016): 1–14.
- McCarty, M. F. 2005. "A Chlorogenic Acid-Induced Increase in GLP-1 Production May Mediate the Impact of Heavy Coffee Consumption on Diabetes Risk." *Medical Hypotheses* 64(4): 848–53.
- MLambert, R.J.W., Person, J.2016. "Susceptibility Testing: Accurate and Reproducible Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Non-Inhibitory ... Susceptibility Testing: Accurate and Reproducible Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Non-Inhibitory Concentration." (September): 784–90.
- Mikamo, H., Yasumasaa S., Teruhiko T. 2002. "In Vitro Antifungal Activity of FK463, a New Water-Soluble Echinocandin-like Lipopeptide." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 46(3): 485–87.
- Miraglia, M., Marvin, H.J.P., Battilani, P., Coni, E., Brera, C. 2009. "Climate Change and Food Safety: An Emerging Issue with Special Focus on Europe." *Food and Chemical Toxicology* 47(5): 1009–21.
- Mountney, G. J., O'Malley, J. 1964. "Acids as Poultry Meat Preservatives." *The Educational Forum* 35(2): 172–172.
- Mousa, W., Mohd, F., Jinap, S. 2013. "Modeling Growth Rate and Assessing Aflatoxins Production by *Aspergillus Flavus* as a Function of Water Activity and Temperature on Polished and Brown Rice." *Journal of Food Science* 78(1).

- Mulia, K., Fajri, M., Krisanti, E. 2017. "Extraction of Vitexin from Binahong (Anredera Cordifolia (Ten.) Steenis) Leaves Using Betaine - 1,4 Butanediol Natural Deep Eutectic Solvent (NADES)." *AIP Conference Proceedings* 1823(November).
- Nosanchuk, J. D. 2008. "Current Status and Future of Antifungal Therapy for Systemic Mycoses." *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery* 1(1): 75–84.
- Oestreich-Janzen, S. 2013. Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering *Chemistry of Coffee*. Elsevier Inc.
- Opsvik, K., Bruzell, E., Hanne H. 2015. "Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology Improved Antibacterial Phototoxicity of a Neutral Porphyrin in Natural Deep Eutectic Solvents." 148: 188–96.
- Opsvik, K., Bruzell, E., Hanne H. 2015. "European Journal of Pharmaceutical Sciences Characterization and Antimicrobial Phototoxicity of Curcumin Dissolved in Natural Deep Eutectic Solvents." *PHASCI* 80: 26–32.
- Opsvik, K., Valen, H., Bruzell, E., Hjorth, H. 2017. "Journal of Photochemistry & Photobiology , B: Biology Investigation of the Antimicrobial Effect of Natural Deep Eutectic Solvents (NADES) as Solvents in Antimicrobial Photodynamic Therapy." *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology* 171(March): 27–33.
- Opsvik, K., Valen, H., Bruzell, E., Hanne, H. 2017. "Journal of Photochemistry & Photobiology , B: Biology Investigation of the Antimicrobial Effect of Natural Deep Eutectic Solvents (NADES) as Solvents in Antimicrobial Photodynamic Therapy." 171(March): 27–33.
- Opsvik, K., Bruzell, E., Hanne H. 2016. "European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics Physicochemical Characterisation and Antimicrobial Phototoxicity of an Anionic Porphyrin in Natural Deep Eutectic Solvents." 105: 75–84.
- Palacio, A., Garau, M., Cuétara, M.S.. 2002. "Dermatofungal Infection." : 68–71.
- Paradiso, V.M., Clemente, A., Summo, C. 2016. "Towards Green Analysis of Virgin Olive Oil Phenolic Compounds: Extraction by a Natural Deep Eutectic Solvent and Direct Spectrophotometric Detection." *Food Chemistry* 212: 43–47

- Paul, M. Y., Hayyan, A., Wong, W.F. 2017. "Applications of Deep Eutectic Solvents in Biotechnology and Bioengineering — Promises and Challenges." 35: 105–34.
- Peng, X., Duan, M.H., Yao, X.H., Zhang, Y.H. 2016. "Green Extraction of Five Target Phenolic Acids from *Lonicerae Japonicae* Flos with Deep Eutectic Solvent." *Separation and Purification Technology* 157: 249–57.
- Phillips, T. D., Williams, J., Jhonson, N. 2008. "Reducing Human Exposure to Aflatoxin through the Use of Clay: A Review." *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* 25(2): 134–45.
- Piemontese, L., Logrieco, A., Capriati, V. 2017. "Deep Eutectic Solvents as Novel and Effective Extraction Media for Quantitative Determination of Ochratoxin A in Wheat and Derived Products." *Molecules* 22(1): 1–9.
- Pisoschi, A.M. 2018. "An Overview of Natural Antimicrobials Role in Food." *European Journal of Medicinal Chemistry* 143: 922–35.
- Prange, A. 2005. "Influence of Mycotoxin Producing Fungi (*Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*) on Gluten Proteins during Suboptimal Storage of Wheat after Harvest and Competitive Interactions between Field and Storage Fungi." *Trials*: 6930–38.
- Prat, Soledad. 2005. "Prueba de Suceptibilidad Antimicrobiana Por Difusión En Agar." *Instituto de Salud Pública de Chile*: 40.
- Prescott, L. M, Klein, P.H. 2002. *Schizanthus 5 THE EDITION*.
- Rado, K. 2016. "LWT - Food Science and Technology Natural Deep Eutectic Solvents as Beneficial Extractants for Enhancement of Plant Extracts Bioactivity c Gani." 73: 45–51.
- Rado, K. 2015. "Ecotoxicology and Environmental Safety Evaluation of Toxicity and Biodegradability of Choline Chloride Based Deep Eutectic Solvents." 112: 46–53.
- Rodríguez-Carrasco, Y., Ruiz, M.J., Font, G., Berrada, H. 2013. "Exposure Estimates to *Fusarium* Mycotoxins through Cereals Intake." *Chemosphere* 93(10): 2297–2303.
- Ruesgas-Ramón, B. 2019. "Extraction , Characterization and Valorization of Biomolecules Issued from Coffee and Cacao Transformation."

- Ruesgas-Ramón, M., Figueroa-Espinoza, M.C., Durand, E. 2017. "Application of Deep Eutectic Solvents (DES) for Phenolic Compounds Extraction: Overview, Challenges, and Opportunities." *Agricultural and Chemistry* (April).
- Sajid, A. 2018. "The Epigenetic Mechanisms in Fusarium Mycotoxins Induced Toxicities." *Food and Chemical Toxicology* 123(October 2018): 595–601.
- Sánchez-García, E., Loruhamá, S. García-Palencia, P. 2016. "Actividad Antimicrobiana." : 77–100.
- Scholz, E., Heinrich, M., Hunkler, D. 1994. "Caffeoylquinic Acids and Some Biological Activities of *Pluchea Symphytifolia*." *Planta Med.* 60: 360–64.
- Schwalbe R., Lynn, S.M., Goodwin, A. C. 2007. *Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols*.
- Schwarz, P., Dromer, F., Lortholary, O., Dannaoui, E. 2003. "In Vitro Interaction between Flucytosine and Other Antifungals against *Cryptococcus Neoformans* ." 47(10).
- Serrano, H., Cardona, N. 2015. "Micotoxicosis Y Micotoxinas: Generalidades Y Aspectos Básicos." *Rev Ces Med* 29(1): 10.
- Shimoda, H., Seki, E., Aitani, M. 2006. "Inhibitory Effect of Green Coffee Bean Extract on Fat Accumulation and Body Weight Gain in Mice." *BMC Complementary and Alternative Medicine* 6(1): 9.
- Smith, Emma L, Andrew P Abbott, and Karl S Ryder. 2014. "Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications."
- Suárez-Quiroz, M.L. 2013. "Microbial Pathogenesis Anti- *Aspergillus* Activity of Green Coffee 5- O -Caffeoyl Quinic Acid and Its Alkyl Esters." *Microbial Pathogenesis* 61–62: 51–56.
- Suchodolski, J., Feder-Kubis, J., Krasowska. 2017. "Antifungal Activity of Ionic Liquids Based on (-)-Menthol : A Mechanism Study." 197: 56–64.
- Sulyok, M. 2013. "Deoxynivalenol and Other Selected Fusarium Toxins in Swedish Wheat — Occurrence and Correlation to Specific Fusarium Species." *International Journal of Food Microbiology* 167(2): 284–91.
- Sut, S., 2017. "Natural Deep Eutectic Solvents (NADES) to Enhance Berberine Absorption: An in Vivo Pharmacokinetic Study." *Molecules* 22(11): 1–11.
- Taillefer, W., Villeneuve, P. 2013. "ANTIBACTERIAL ACTIVITY AND ANTIFUNGAL AND ANTI-MYCOTOXIGENIC ACTIVITIES AGAINST

ASPERGILLUS FLAVUS AND A . OCHRACEUS OF GREEN COFFEE CHLOROGENIC ACIDS AND DODECYL CHLOROGENATES.” 33: 360–68.

Taillefer, W., Villeneuve, P. 2013. “ANTI-MYCOTOXIGENIC ACTIVITIES AGAINST ASPERGILLUS FLAVUS AND A . OCHRACEUS OF GREEN COFFEE CHLOROGENIC ACIDS AND DODECYL CHLOROGENATES.” 33: 360–68.

Takenaka, M. 2005. “Characterization of a Metal-Chelating Substance in Coffee.” *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 69(1): 26–30.

Taylor, P., Park, H.A., Tang, B. “Application of Deep Eutectic Solvents as Additives in Ultrasonic Extraction of Two Phenolic Acids from Herba Artemisiae Scopariae.” (September 2014): 37–41.

Thompson III, George R., Patterson, T.F. 2009. “Overview of Antifungal Agents.” *Clinics in Chest Medicine* 30(2): 203–15.

Tomašević, M., Kovac, K., Bubalo, M.C., Natka, M. 2016. “Green Extraction of Grape Skin Phenolics by Using Deep Eutectic Solvents.” 200: 159–66.

Turner, P. C. 2005. “Reduction in Exposure to Carcinogenic Aflatoxins by Postharvest Intervention Measures in West Africa: A Community-Based Intervention Study.” *Lancet* 365(9475): 1950–56.

Westhuizen, V.D. 2011. “Fumonisin B1 as a Urinary Biomarker of Exposure in a Maize Intervention Study among South African Subsistence Farmers.” *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 20(3): 483–89.

Vigier, K.O., Chatel, G., Fran, A. 2015. “Contribution of Deep Eutectic Solvents for Biomass Processing : Opportunities , Challenges , and Limitations.” : 1250–60.

Villeda M.. 2010. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro ““ Conservadores Químicos Utilizados En La Industria Alimentaria .”

Villeneuve, P., Durand, E.. 2015. “Biochimie From Green Chemistry to Nature : The Versatile Role of Low Transition Temperature Mixtures R O.” : 1–5.

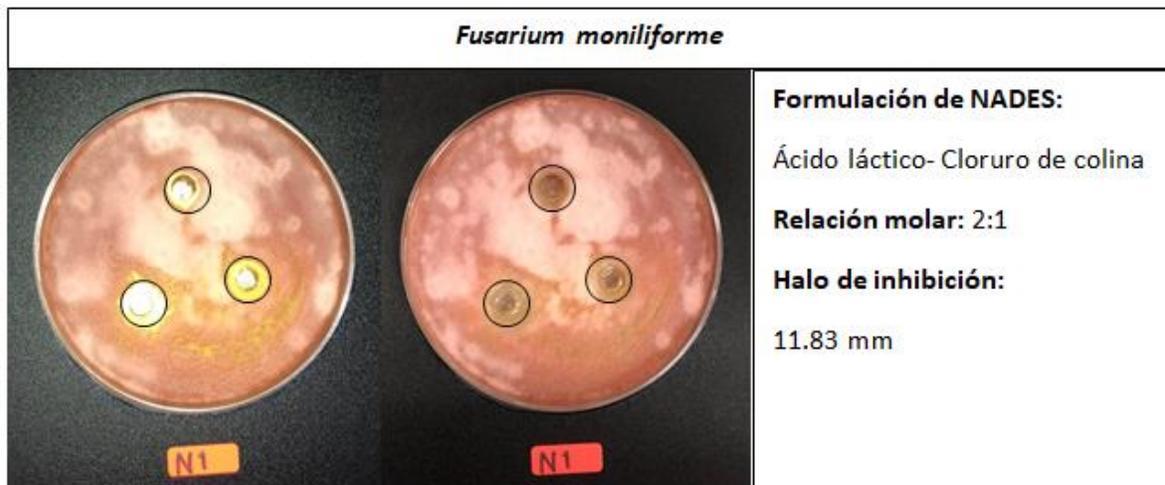
Wei, Z.F. 2015. “Fast and Green Extraction and Separation of Main Bioactive Flavonoids from Radix Scutellariae.” *Industrial Crops and Products* 63: 175–81.

Wei, Z.F. 2015. “Application of Natural Deep Eutectic Solvents for Extraction and Determination of Phenolics in Cajanus Cajan Leaves by Ultra Performance Liquid Chromatography.” *SEPARATION AND PURIFICATION TECHNOLOGY* 149: 237–44.

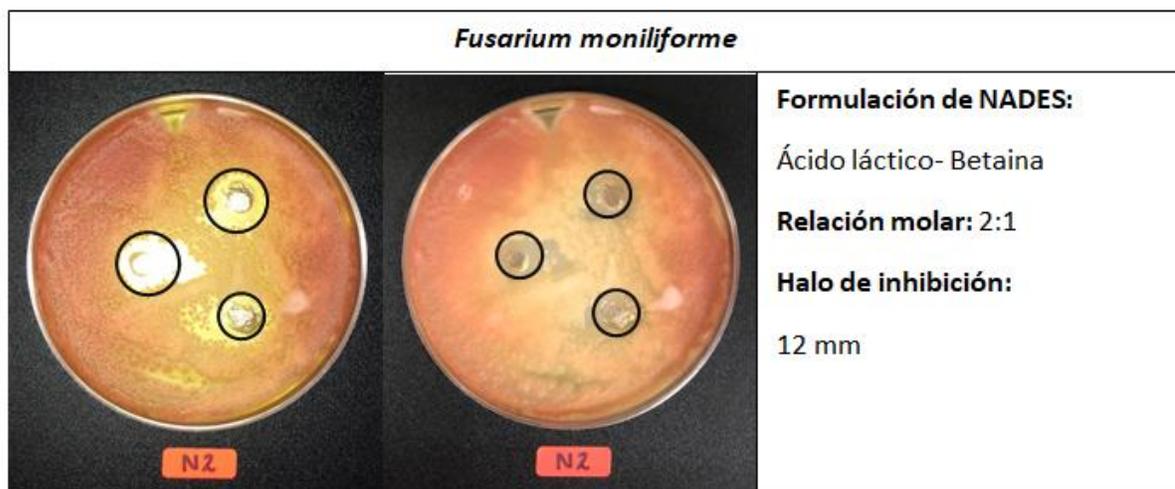
- Wei, Z.F. 2015. "Fast and Green Extraction and Separation of Main Bioactive Flavonoids from Radix Scutellariae." 63: 175–81.
- Wen, A., Delaquis, P., Stanich, K., Toivonen, P. 2003. "Antilisterial Activity of Selected Phenolic Acids." *Food Microbiology* 20(3): 305–11.
- Wen, J., Peiqiang M., Yiqun D.. 2016. "Mycotoxins: Cytotoxicity and Biotransformation in Animal Cells." : 377–87.
- Wen, Q. 2015. "Chemosphere Assessing the Toxicity and Biodegradability of Deep Eutectic Solvents." *Chemosphere* 132: 63–69.
- Wen, Q. 2015. "Chemosphere Assessing the Toxicity and Biodegradability of Deep Eutectic Solvents." *Chemosphere* 132: 63–69.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.02.061>.
- Wiegand, I., Kai H., Hancock, W.E.W. 2008. "Agar and Broth Dilution Methods to Determine the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of Antimicrobial Substances." *Nature Protocols* 3(2): 163–75.
- Wikene, K. 2015. "Characterization and Antimicrobial Phototoxicity of Curcumin Dissolved in Natural Deep Eutectic Solvents." *PHASCI* 80(October): 26–32.
- Wikene, K.O. 2017. "Investigation of Supersaturated and Solubilising Preparations of Poorly Water-Soluble Photosensitisers Intended for Antimicrobial Photodynamic Therapy: Natural Deep Eutectic Solvents and Solid Dispersions."
- Wikene, K.O., Rukke, R.O., Bruzell, E., Hjorth, H. 2016. "Physicochemical Characterisation and Antimicrobial Phototoxicity of an Anionic Porphyrin in Natural Deep Eutectic Solvents." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 105: 75–84.
- Xia, B. "Analytical Methods Determination of Phenolic Acids in Prunella Vulgaris L.: A Safe and Green Extraction Method Using Alcohol-Based Deep Eutectic Solvents." *Analytical Methods* 7: 9354–64.
- Xin, R. 2017. "A Functional Natural Deep Eutectic Solvent Based on Trehalose: Structural and Physicochemical Properties." *Food Chemistry* 217: 560–67.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.012>.
- Yang, Z. 2018. "Natural Deep Eutectic Solvents and Their Applications in Biotechnology." *WO Patent 2,008,102,118*: 1–35.

- Yeo, F., Wong, B. 2005. "Current Status of Nonculture Methods for Diagnosis of Invasive Fungal Infections." 15(3): 202..
- Zain, M. E. 2011. "Impact of Mycotoxins on Humans and Animals." *Journal of Saudi Chemical Society* 15(2): 129–44.
- Zeng, C.X. 2016. "Synergistic Behavior of Betaine-Urea Mixture: Formation of Deep Eutectic Solvent." *Journal of Molecular Liquids* 219: 74–78. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molliq.2016.02.076>.
- Zhekenov, T., Toksanbayev, N., Kazakbayeva, N., Shah, N. 2017. "Fluid Phase Equilibria Formation of Type III Deep Eutectic Solvents and Effect of Water on Their Intermolecular Interactions." *Fluid Phase Equilibria* 441: 43–48.
- Zhu, J., 2017. "Physicochemical Properties of Deep Eutectic Solvents Formed by Choline Chloride and Phenolic Compounds at $T = (293.15 \text{ to } 333.15) \text{ K}$: The Influence of Electronic Effect of Substitution Group." *Journal of Molecular Liquids* 232: 182–87. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molliq.2017.02.071>.
- Zhu, S. 2016. "Vibrational Analysis and Formation Mechanism of Typical Deep Eutectic Solvents: An Experimental and Theoretical Study." *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 68: 158–75. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmglm.2016.05.003>.
- "NADES : Nuevos Solventes Naturales Y Verdes."

ANEXO 1

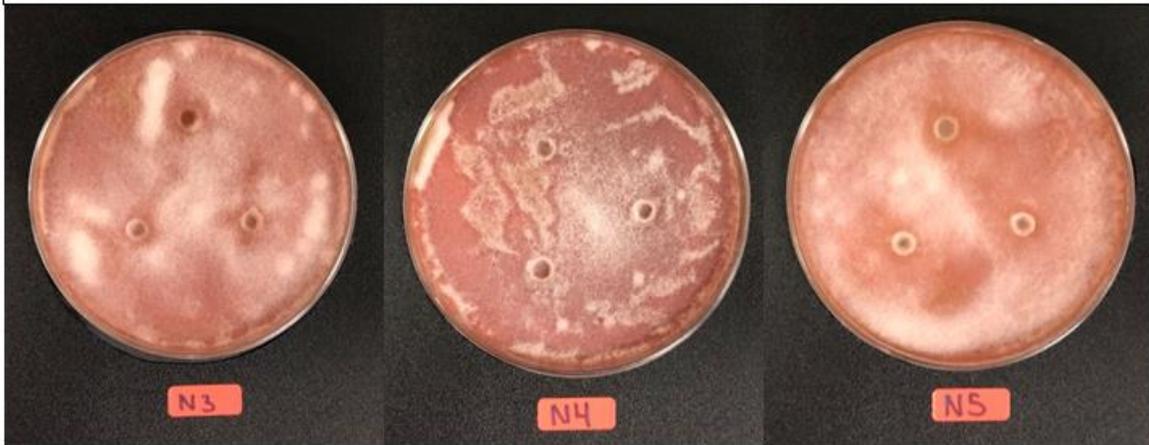


*Los valores representan el promedio de 6 réplicas \pm d.s.



*Los valores representan el promedio de 6 réplicas \pm d.s.

Fusarium moniliforme

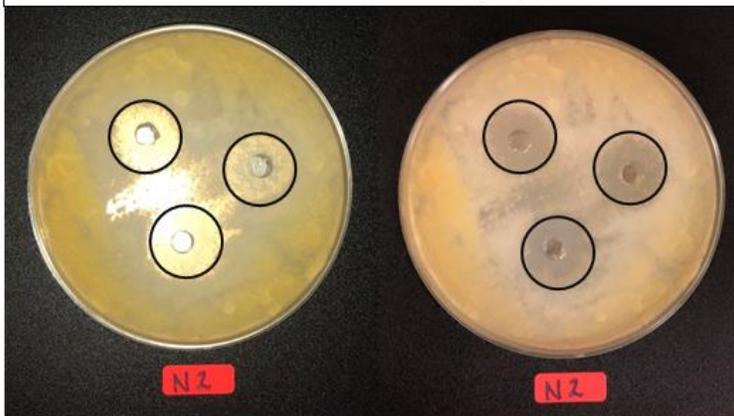


Formulación de NADES: Glicerol- Cloruro de colina (N3), Glicerol- Betaina (N4), 1,4 butanodiol-Cloruro de colina (N5)

Relación molar: 2:1, 2:1, 1:3

Halo de inhibición: No inhibición, No inhibición, No inhibición

Aspergillus ochraceus



Formulación de NADES:

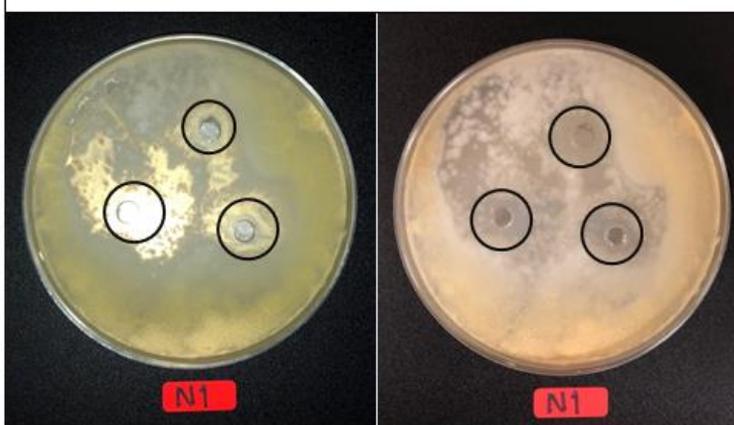
Ácido láctico- Betaina

Relación molar: 2:1

Halo de inhibición:

15.5 mm

Aspergillus ochraceus



Formulación de NADES:

Ácido láctico- cloruro de colina

Relación molar: 2:1

Halo de inhibición:

10.83 mm

Aspergillus ochraceus

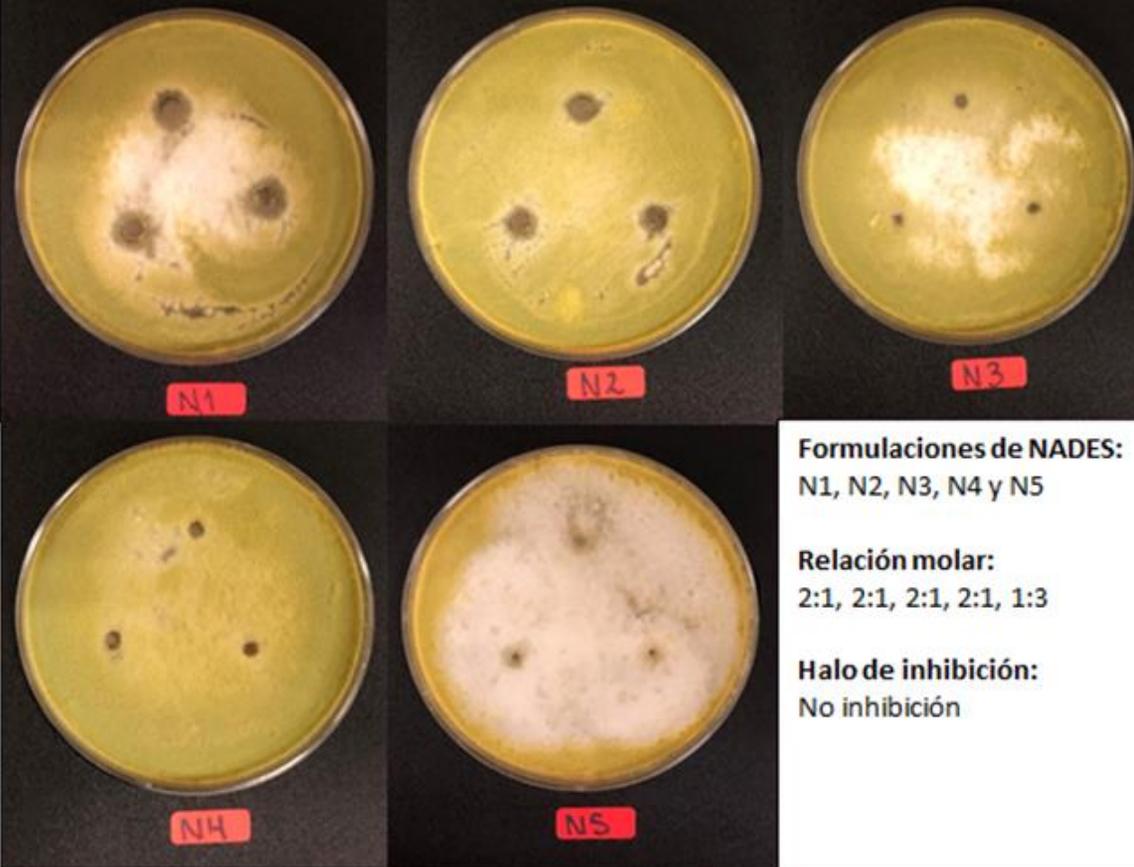


Formulación de NADES: Glicerol-Cloruro de colina (N3), Glicerol- Betaina (N4), 1,4 Butanodiol-Cloruro de colina (N5)

Relación molar: 2:1, 2:1, 1:3

Halo de inhibición: No inhibición

Aspergillus flavus

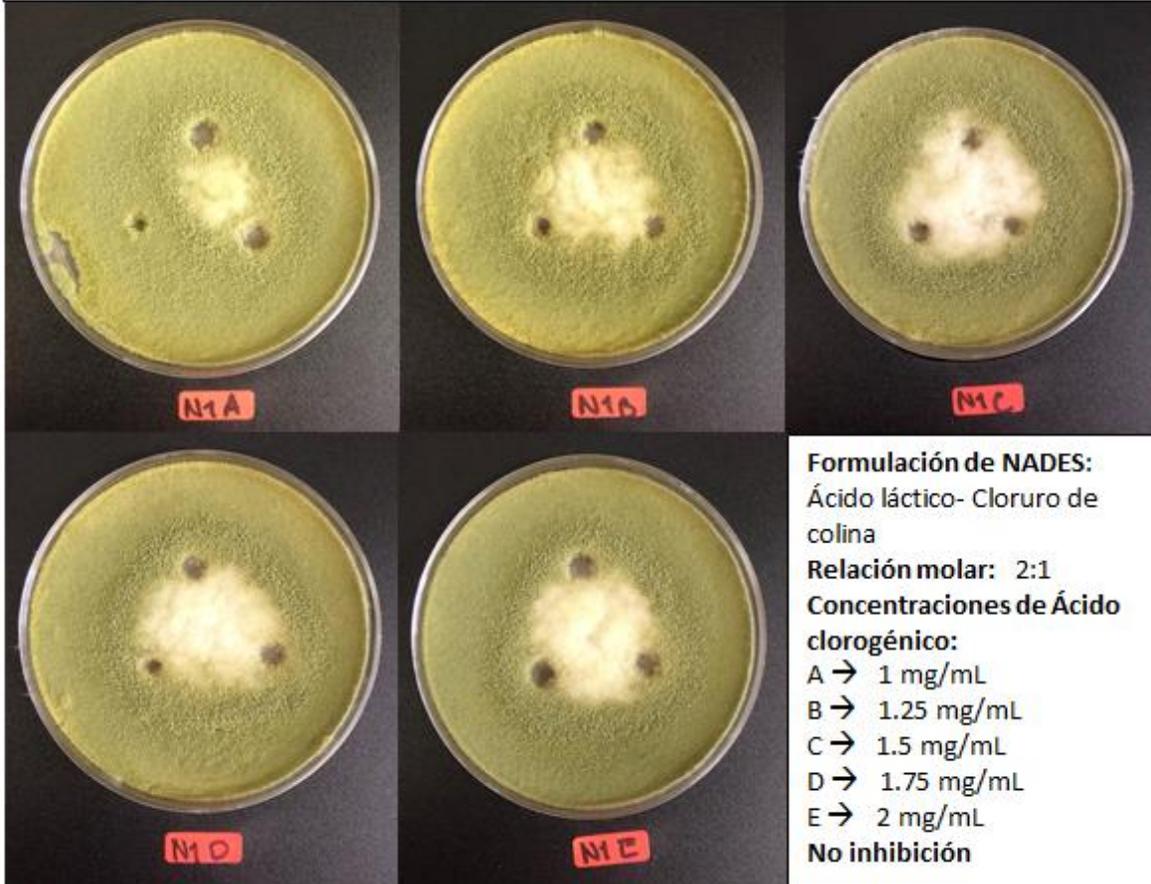


Formulaciones de NADES: N1, N2, N3, N4 y N5

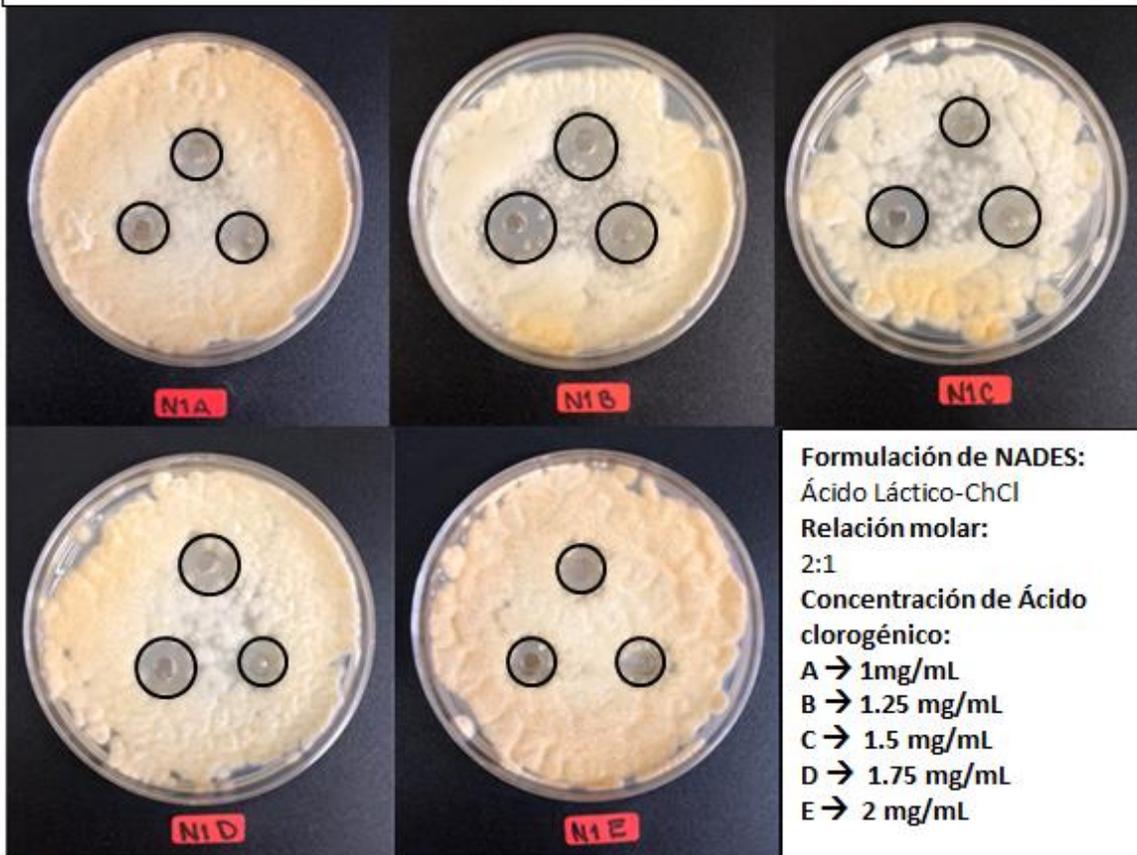
Relación molar: 2:1, 2:1, 2:1, 2:1, 1:3

Halo de inhibición: No inhibición

Aspergillus flavus



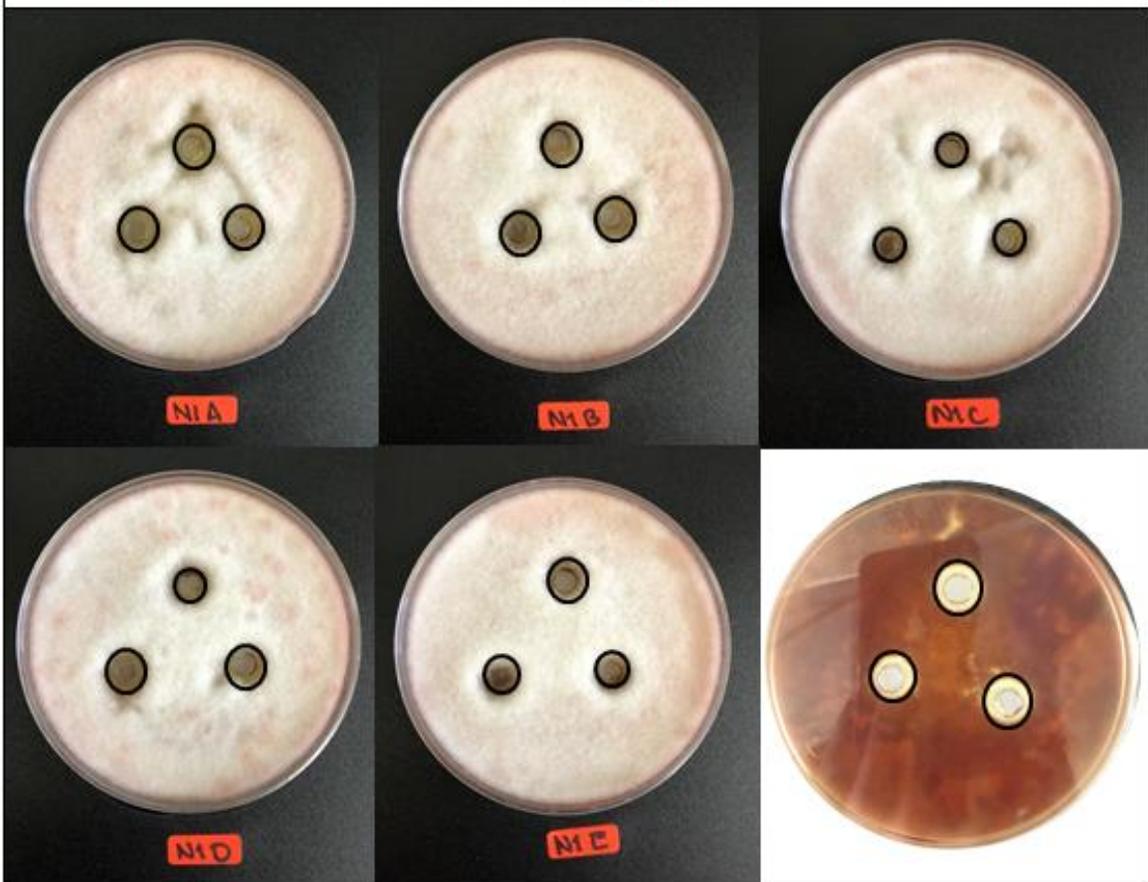
Aspergillus ochraceus



Halo de inhibición por concentración:

A → 8.6 mm; B → 14 mm; C → 11.6 mm; D → 12.3 mm; E → 10.6 mm

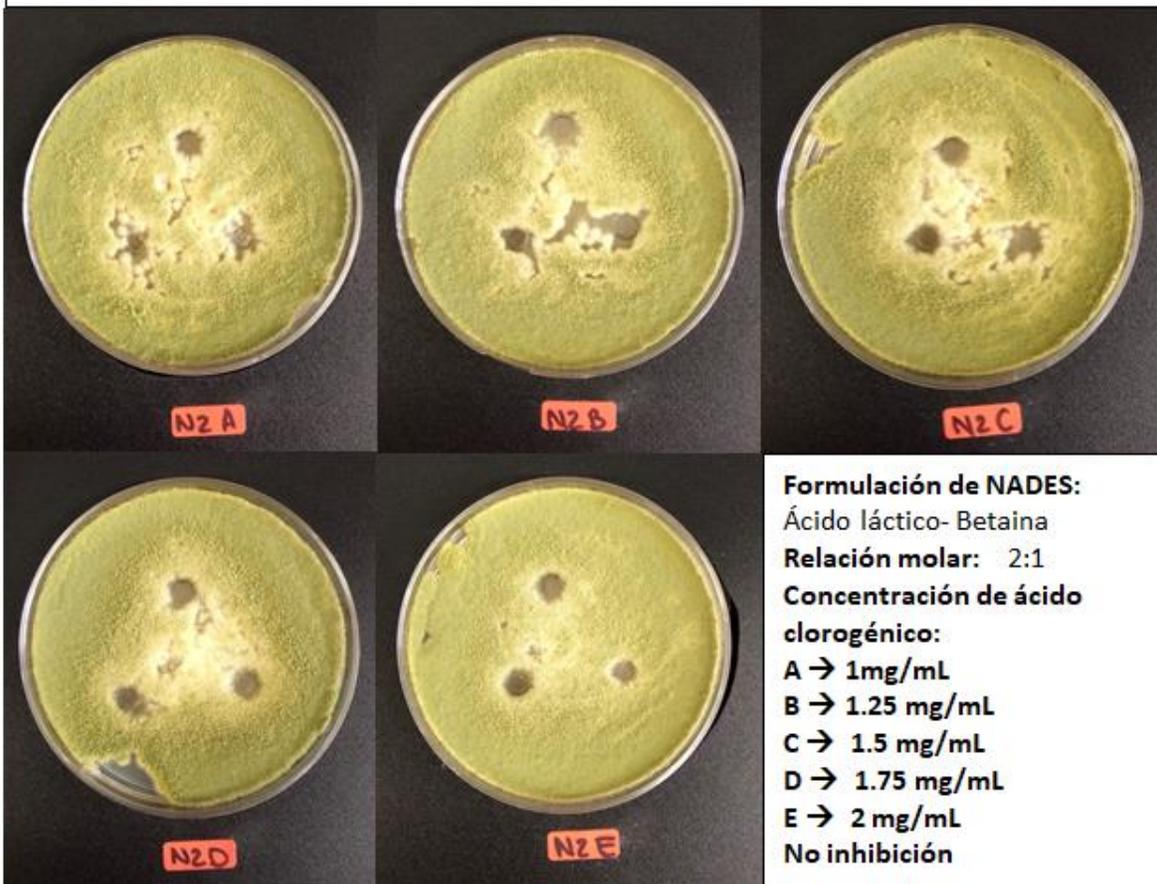
Fusarium moniliforme



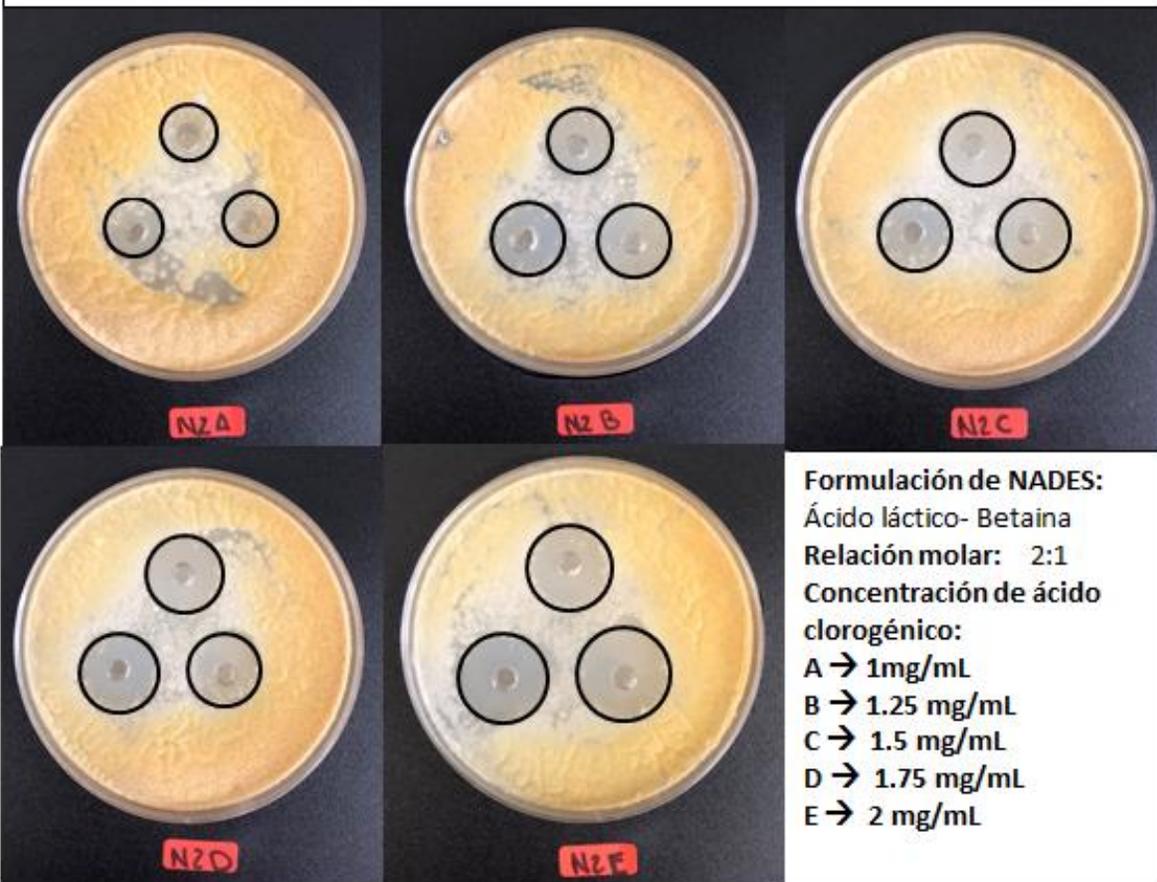
Halo de inhibición por concentración:

A → 11.6 mm; B → 10.6 mm; C → 11.3 mm; D → 12.6 mm; E → 10.8 mm

Aspergillus flavus



Aspergillus ochraceus

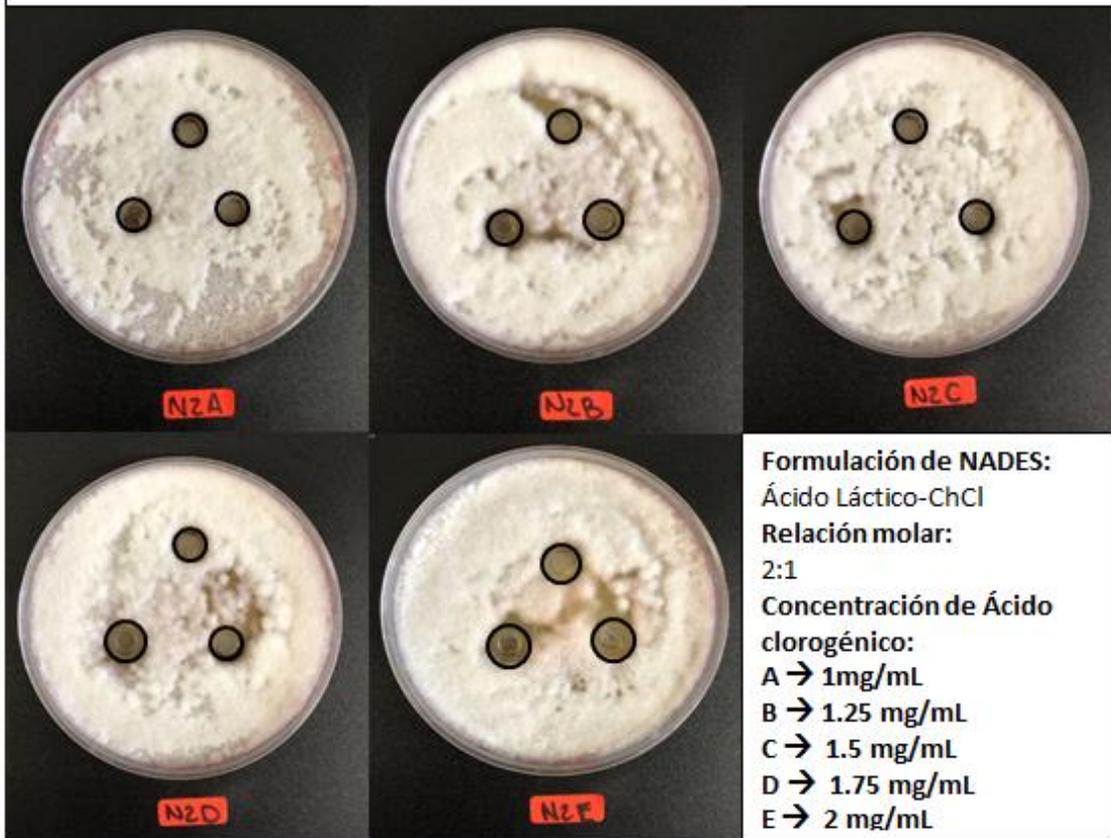


Formulación de NADES:
Ácido láctico- Betaina
Relación molar: 2:1
Concentración de ácido clorogénico:
A → 1mg/mL
B → 1.25 mg/mL
C → 1.5 mg/mL
D → 1.75 mg/mL
E → 2 mg/mL

Halo de inhibición por concentración:

A → 8.6 mm; B → 17.3 mm; C → 14 mm; D → 18.5 mm; E → 17.5 mm

Fusarium moniliforme



Halo de inhibición por concentración:

A → 10 mm; B → 10.5 mm; C → 10.3 mm; D → 10.6 mm; E → 12.3 mm