

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
MORELOS**

FACULTAD DE NUTRICIÓN

**“EFECTO DE PRODUCTOS NATURALES NANOESTRUCTURADOS
SOBRE EL DESARROLLO DE *Aspergillus flavus* EN MAÍZ Y
PRODUCCIÓN DE AFLATOXINAS EN TORTILLA DE MAÍZ”**

T E S I S

PARA OBTENER EL TITUTLO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN

PRESENTA:
L.N. CÉSAR GÓNZALEZ ANDRADE

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. MARGARITA DE LORENA RAMOS GARCIA

CODIRECTORA:
DRA. ROSA ISELA VENTURA AGUILAR

COMITÉ TUTORAL:
DRA. OLLIN CELESTE MARTINEZ RAMIREZ
DRA. SILVIA BAUTISTA BAÑOS

AGRADECIMIENTOS

Dra. Margarita por ser mi tutora y darme la oportunidad de realizar esta maestría, por su gran paciencia y apoyo durante toda mi maestría, sin usted jamás lo habría logrado.

Dra. Rosa por su gran comprensión y apoyo para ayudarme a resolver todos los problemas que fueron surgiendo, además de la paciencia para explicarme todo lo nuevo.

Dra. Silvia por su guía a la hora de llevar a cabo los experimentos además de su comprensión.

Mtra. Mónica por su ayuda durante todos los experimentos, además de su paciencia.

Mtra. María Luisa por su apoyo para incorporarme al laboratorio.

Dra. Zormy por explicarme los conceptos básicos de nanotecnología

A mis compañeros de maestría Ricardo, Karina, Monserrat y Citlali por su ayuda y colaboración.

A mis tutores y maestros: Dra. Celeste, Dra. Azucena, Dra. Ivette, Dra. Terrazas, Dr. Acevedo, por ampliar mis conocimientos.

DEDICATORIAS

A mis padres:

Mi padre por sus consejos para salir a delante y su ejemplo de seguir estudiando.

Mi madre desde el cielo, sé que estarías contenta de verme terminando la maestría.

A mis hijos:

Cesarito por haber llegado al inicio de la maestría y estar conmigo siempre.

Dannita por haber llegado al final para apoyarme.

A mi hermana por escuchar y entender lo difícil que fue la maestría

A mi esposa Sharon por su gran cariño.

ÍNDICE GENERAL

INDICE GENERAL.....	3
ABREVIATURAS.....	6
SIMBOLOGÍAS.....	7
ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
ÍNDICE DE TABLAS.....	10
RESUMEN.....	11
1. INTRODUCCIÓN.....	13
2. ANTECEDENTES.....	15
2.1. Cadena alimentaria de los productos agrícolas.....	15
2.2. Factores que afectan la calidad en los alimentos durante el proceso de la cadena alimentaria.....	16
2.3. Las micotoxinas.....	18
2.4. <i>Aspergillus flavus</i> , aflatoxinas y sus patologías.....	19
2.5. Productos derivados del maíz y su contaminación por <i>Aspergillus flavus</i> ...21	
2.6. Cadena de producción de maíz y tortillas.....	23
2.7. Tratamientos actuales para controlar <i>Aspergillus flavus</i> en maíz.....	24
2.8. Propuesta de tratamientos alternativos con productos naturales como propóleo, quitosano y resina de pino.....	26
3. JUSTIFICACIÓN.....	31
4. HIPÓTESIS.....	32
5. OBJETIVOS.....	33
5.1. Objetivo general.....	33
5.2. Objetivos específicos.....	33
6. MATERIALES Y MÉTODOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	34

6.1. Ensayos <i>in vitro</i>	34
6.1.1. Activación y mantenimiento de la cepa de <i>Aspergillus flavus</i>	34
6.1.2. Obtención de un cultivo monospórico de <i>Aspergillus flavus</i>	34
6.1.3. Formulación y aplicación de tratamientos.....	35
6.1.3.1. Preparación de soluciones de propóleo, quitosano y resina de pino.....	35
6.1.3.2. Preparación de nanopartículas de propóleo, quitosano y resina de pino.....	35
6.1.4. Formulación y aplicación de los tratamientos por la técnica de envenenamiento del medio de cultivo.....	37
6.2. Ensayos en granos de maíz.....	39
6.2.1. Incidencia de infección por <i>Aspergillus flavus</i>	39
6.2.2. Germinación de granos de maíz y crecimiento de la plántula y la radícula.....	40
6.3. Ensayos en tortillas de maíz.....	41
6.3.1. Aplicación de tratamientos en granos para su uso en la elaboración de tortillas Proceso de nixtamalización.....	41
6.3.2. Proceso de nixtamalización.....	42
6.3.3. Proceso de elaboración de las tortillas.....	42
6.3.4. Pruebas de calidad de las tortillas.....	43
6.3.4.1. Porcentaje de humedad.....	43
6.3.4.2. Pérdida de peso.....	44
6.3.4.3. Rolabilidad.....	44
6.3.4.4. Color.....	44
6.3.4.5. Calidad microbiológica.....	45
6.3.5. Incidencia de <i>Aspergillus flavus</i>	46
6.3.6. Concentración de aflatoxinas.....	46
7. RESULTADOS.....	47
7.1. Resultados de ensayos <i>in vitro</i>	47

7.1.1. Crecimiento micelial de <i>Aspergillus flavus</i> en medio Czapeck.....	47
7.1.2. Germinación de esporas de <i>Aspergillus flavus</i>	48
7.2. Resultados de ensayos en granos de maíz.....	51
7.2.1. Incidencia de <i>Aspergillus flavus</i> en granos de maíz.....	51
7.2.2. Germinación de granos de maíz.....	53
7.3. Resultados de ensayos en tortilla de maíz.....	56
7.3.1. Evaluación de aspectos de calidad de la tortilla.....	55
7.3.1.1. Porcentaje de humedad.....	56
7.3.1.2. Pérdida de peso.....	56
7.3.1.3. Rolabilidad.....	57
7.3.1.4. Color.....	58
7.3.1.5. Calidad microbiológica.....	60
7.3.2. Incidencia de <i>Aspergillus flavus</i>	61
7.3.3. Concentración de aflatoxinas.....	62
8. DISCUSIÓN.....	64
9. CONCLUSIONES.....	68
10. REFERENCIAS.....	69

ABREVIATURAS

- OMS Organización Mundial de la Salud
- FAO Food and Agriculture Organization
- AFB1 Aflatoxin B1
- CM Crecimiento Micelial

SIMBOLOGÍAS

DE	Desviación estándar
EP	Extracto de propóleo
μL	Microlitro
rpm	Revoluciones por minuto
pH	Potencial de hidrógeno
nm	Nanómetro
NP	Nanopartículas
NPQ	Nanopartículas de quitosano
NPP	Nanopartículas de propóleo
NPR	Nanopartículas de resina
Mbar	Milibar
R	Resina de pino
$^{\circ}\text{C}$	Grados Centígrados
Ppm	Partes por millón

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fases del desarrollo de <i>A. flavus</i> y sus aflatoxinas: A. Crecimiento de <i>A. flavus</i> . B. Crecimiento de conidióforos. C. Esporulación. D. Producción de aflatoxinas.....	18
Figura 2. Infección de <i>A. flavus</i> en tortilla de maíz y en mazorcas de maíz.....	21
Figura 3. Crecimiento micelial de <i>Aspergillus flavus</i> por efecto de los diferentes tratamientos aplicados.....	47
Figura 4. Germinación de esporas de <i>Aspergillus flavus</i> por efecto de los diferentes tratamientos con compuestos naturales.....	48
Figura 5. Incidencia de infección por <i>Aspergillus flavus</i> en granos de maíz, sin desinfectar (A) y desinfectados con Etanol al 70% (B).....	51
Figura 6. Porcentaje de infección por <i>Aspergillus flavus</i> en granos de maíz, sin desinfectar (A) y desinfectados con Etanol al 70% (B).....	52
Figura 7. Germinación de granos de maíz, por efecto de diferentes tratamientos y un Grupo Testigo, durante 6 días de incubación. *Q (Quitosano), P (Propóleo), NPsP (Nanopartículas de propóleo), NPsQ (Nanopartículas de quitosano) RP (Resina de pino), NPsRP (Nanopartículas de Resina de Pino) y Testigo (Agua).....	53
Figura 8. Germinación de granos de maíz, por efecto de diferentes tratamientos y un Grupo Testigo, durante 6 días de incubación.....	54
Figura 9. Crecimiento de la plántula y radícula de granos de maíz, tratados con quitosano, propóleo y resina de pino, en el 4° día después de la germinación.....	55
Figura 10. Porcentaje de humedad de las tortillas con diferentes tratamientos durante su almacenamiento a 5°C (A) y 28°C (B).....	56



Figura 11. Pérdida de peso de las tortillas con diferentes tratamientos durante 21 días de almacenamiento. A= almacenamiento a 5°C: B= almacenamiento a 28°C.....57

Figura 12. Rolabilidad de las tortillas. A = 5°C/1 día; B = 5°C/21 días; C = 28°C/ 1 día; D = 28°C/21 días. Escala: 0= sin ruptura, 1= 20% de ruptura, 2= 40% de ruptura, 3= 60% de ruptura, 4= 80% de ruptura, 5= 100% de ruptura.....58

Figura 13. Diferencia de color observada en las tortillas con los diferentes tratamientos durante 21 días de almacenamiento, con respecto al día inicial.....59

Figura 14. Infección y crecimiento de *A. flavus* en una tortilla en refrigeración a 5 °C después de 21 días, junto con sus muestras en medio Czapeck.....61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Formulaciones de los tratamientos utilizados en los ensayos <i>in vitro</i> ...	37
Tabla 2. Formulaciones de los tratamientos utilizados en los ensayos en granos de maíz.....	40
Tabla 3. Formulaciones de los tratamientos utilizados en los ensayos en tortillas de maíz.....	41
Tabla 4. Tasa de crecimiento micelial y Germinación de esporas de <i>Aspergillus flavus</i>	49
Tabla 5. Cinética de inhibición de crecimiento micelial de <i>Aspergillus flavus</i> , con respecto al crecimiento del Grupo Testigo en los mismos días de incubación.....	50
Tabla 6. Incidencia de <i>A. flavus</i> en muestras de tortillas colocadas en medio Czapek y almacenadas a 5°C y 28°C.....	60
Tabla 7. Porcentaje de incidencia de <i>A. flavus</i> en tortillas almacenadas a 5°C y 28°C.....	62
Tabla 8. Concentración de aflatoxinas en ppm en muestras de tortillas al momento de su cocción y después de 21 días de almacenamiento.....	63

RESUMEN

El hongo *Aspergillus flavus* infecta granos de maíz, en precosecha y postcosecha, y produce aflatoxinas. Durante la vigilancia de la cadena alimentaria del maíz es de vital importancia detectar los factores que favorecen el desarrollo de este hongo y evitar su desarrollo así como su producción de toxinas. El consumo de maíz contaminado con aflatoxinas es un riesgo para la población ocasionando desde síntomas leves hasta padecimientos crónicos como el cáncer. Actualmente se utilizan fungicidas químicos para el control de *A. flavus*, sin embargo, la permanencia de estos productos en los alimentos causa daños a la salud. El quitosano, propóleo y resina de pino, son productos naturales, seguros, biodegradables y al aplicarlos en solución o como nanopartículas pueden retardar el crecimiento de *A. flavus*; sin embargo, su uso en granos de maíz es limitado. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de sobre el desarrollo de *A. flavus* y su producción de aflatoxinas en granos de maíz y tortilla. Las variables evaluadas fueron: el crecimiento micelial, germinación de esporas e incidencia de *A. flavus* en estudios *in vitro*, mientras que, en los estudios en granos de maíz, se evaluó la incidencia del hongo, así como germinación de los granos de maíz y crecimiento de la plántula y la radícula. En los ensayos *in vitro*: el tratamiento con resina de pino y propóleo mostró el menor crecimiento micelial (33 mm) y la mayor inhibición (76%) con respecto al grupo testigo. Los tratamientos con resina de pino no permitieron el desarrollo de esporas por 7 días. Con relación a los granos de maíz, la mezcla de nanopartículas de resina de pino y propóleo redujo la incidencia del hongo en un

50% durante 7 días. La resina de pino y el propóleo son alternativas para el control de *A. flavus*.

ABSTRACT

The fungus *Aspergillus flavus* infects corn kernels, pre-harvest, and post-harvest, and produces aflatoxins. During the monitoring of the maize food chain, it is of vital importance to detect the factors that favor the development of this fungus and prevent its development as well as its production of toxins. The consumption of corn contaminated with aflatoxins is a risk for the population causing from mild symptoms to chronic conditions such as cancer. Currently chemical fungicides are used for the control of *A. flavus*, however, the permanence of these products in food causes damage to health. Chitosan, propolis and pine resin, are natural, safe, biodegradable products and when applied in solution or as nanoparticles can slow the growth of *A. flavus*; however, its use in grains of energy is limited. The objective of this research was to evaluate the effect on the development of *A. flavus* and its production of aflatoxins in corn and tortilla kernels. The variables evaluated were mycelial growth, spore germination and incidence of *A. flavus* in *in vitro* studies, while, in the studies in corn kernels, the incidence of the fungus was evaluated, as well as germination of corn kernels and seedling and radicle growth. In the *in vitro* tests: the treatment with pine resin and propolis showed the lowest mycelial growth (33 mm) and the highest inhibition (76%) with respect to the control group. Treatments with pine resin did not allow the development of spores for 7 days. Regarding corn kernels, the mixture of pine resin and propolis nanoparticles reduced the incidence of the fungus by 50% for 7 days. Pine resin and propolis are alternatives for the control of *A. flavus*.

1. INTRODUCCIÓN

Aspergillus flavus es un hongo fitopatógeno, que provoca pérdidas económicas en diversos cultivos hortofrutícolas como el cacahuate, el higo, el trigo y el maíz, presentándose en cualquier momento en la cadena de producción. En el cultivo de maíz este hongo crece y se desarrolla de manera óptima, produciendo toxinas (aflatoxinas), las cuales pueden ocasionar riesgos a la salud de las personas que las consumen. Algunos de los riesgos por el consumo de alimentos contaminados por aflatoxinas son, la presencia de aflatoxicosis (intoxicación aguda del hígado y necrosis) y cáncer de hígado, cuando se consume la toxina por largos periodos de tiempo. En México se han presentado más de 200 casos de intoxicación por aflatoxinas en un periodo de 5 años, lo cual se ha atribuido al consumo de tortillas elaboradas con maíz contaminado (1).

Debido a esta problemática se ha intentado controlar el desarrollo de *A. flavus* en el maíz con productos químicos, tales como, tiodiazoles, imidazoles, tiabendazol, propiconazol entre otros, sin embargo, el uso de estos tratamientos químicos ha ocasionado la generación de cepas de hongos resistentes a fungicidas, restricciones en las importaciones y exportaciones de maíz. Además, el uso de estos tratamientos químicos no ha sido efectivo para disminuir la producción de aflatoxinas producidas por *A. flavus*, por el contrario, su aplicación ocasiona en el hongo condiciones de estrés, las cuales aumentan la producción de aflatoxinas (2). Por tal motivo, para evitar el uso de fungicidas químicos convencionales, se ha

propuesto el uso de productos naturales para controlar el desarrollo de *A. flavus* en los granos de maíz.

Los productos naturales como el propóleo, quitosano y resina de pino, han demostrado capacidad efectiva para controlar o inhibir el desarrollo de hongos fitopatógenos incluyendo a *A. flavus*. Sin embargo, para aumentar su capacidad antimicrobiana se puede hacer uso de la nanotecnología y encapsular dichos compuestos, ya que está comprobado que las nanopartículas tienen una mayor superficie de contacto, una mayor dispersión y mejor conservación del producto activo (3,4).

Por tal motivo, es necesario evaluar la eficacia de productos naturales nanoestructurados, tales como, el propóleo, el quitosano y la resina de pino, para controlar el desarrollo de *A. flavus* y la producción de aflatoxinas en granos de maíz, así como en tortillas de maíz elaboradas con estos granos contaminados.

2. ANTECEDENTES

2.1 Cadena alimentaria de los productos agrícolas

La cadena alimentaria de los productos agrícolas es el proceso por el cual los alimentos llegan desde la producción hasta el consumidor; el primer paso consiste en la producción primaria de los alimentos en el campo (donde se realizan todas las prácticas agronómicas necesarias para su crecimiento y desarrollo), posteriormente se cosechan los productos, se almacenan y se comercializan. En algunos casos los productos pasan por procesos de transformación antes de llegar hasta el consumidor final (5,6).

Durante este proceso los productos pueden verse afectados por diversos factores ocasionando pérdidas de producto y por ende pérdidas económicas. La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), informó que se pierden 1300 millones de toneladas de alimentos al año en la cadena alimentaria, lo que representa una tercera parte de la producción mundial, afectando especialmente la seguridad alimentaria (7), por lo tanto, la disposición de alimentos para la población podría verse afectada. Es bien sabido que la producción suficiente de los alimentos es de suma importancia para alimentar a la población, sin embargo, la calidad e inocuidad de estos, es vital para garantizar una adecuada nutrición. En la cadena alimentaria se vigila especialmente los brotes de contaminación por microorganismos en los alimentos, debido a las grandes repercusiones que tienen sobre la salud de los individuos (8). La Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2015 estimó que cada año en el mundo se enferman alrededor de 600

millones de personas por contaminación de los alimentos, de los cuales 420,000 casos terminan en muerte. En la actualidad se han reportado factores que afectan la calidad de los alimentos durante el proceso de la cadena alimentaria, los cuales pueden representar un riesgo a la salud del consumidor (9).

2.2 Factores que afectan la calidad en los alimentos durante el proceso de la cadena alimentaria

Existen diferentes factores que pueden afectar la calidad de los alimentos durante el proceso de la cadena alimentaria, tales como, a) físicos, b) químicos y c) microbiológicos.

- a) Físicos. Los daños físicos en los productos agrícolas pueden ser ocasionados durante su manejo en el campo de cultivo, o bien, por plagas de insectos. Las heridas en los frutos pueden favorecer la incidencia de microorganismos patógenos durante su desarrollo en campo o durante su almacenamiento, el tamaño de la herida puede ser un factor importante en la contaminación de patógenos. También se puede generar una contaminación física de los alimentos, como objetos extraños dentro de los productos, como pedazos de metal, madera o vidrios, que al ser ingeridos puedan causar daños a los órganos internos y la muerte. El daño físico acelera el proceso de senescencia de los frutos, disminuyendo su vida de anaquel (10).

- b) Químicos. Los productos químicos utilizados en los cultivos para controlar plagas permanecen en los alimentos por largos periodos de tiempo aún después de ser cosechados. Cuando estos residuos sobrepasan los límites permitidos pueden ocasionar intoxicaciones agudas o crónicas en los consumidores y poner en riesgo su salud, como el síndrome de Chorea por fungicidas que causa espasmos musculares involuntarios fallas metabólicas y vasculares, además, también se puede generar daño hepático. Por lo tanto, los productos contaminados con agentes químicos no son considerados inocuos y no tienen una buena calidad para su consumo (11).
- c) Microbiológicos. Los principales contaminantes microbiológicos de los productos agrícolas son las bacterias y los hongos. La presencia de bacterias patógenas puede ocasionar enfermedades gastrointestinales. Los hongos, crecen sobre la superficie del alimento causando ablandamientos, pudriciones y coloraciones diferentes en los productos; afectando su calidad, haciéndolos desagradables para su consumo y alterando su contenido nutrimental. Existen hongos fitopatógenos que no causan daños tan graves en el producto, pero pueden producir compuestos tóxicos, los cuales representan un riesgo para el consumidor (12,13).

Se estima que el 25% de los alimentos producidos en el mundo se desechan debido a la contaminación por hongos, y se ha informado que esta cantidad de alimentos contaminados va en aumento (14). La contaminación por hongos tales como, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum* y *Aspergillus*, daña la calidad de los

alimentos. En el caso de los hongos del género *Aspergillus*, como *A. fumigatus*, *A. parasiticus* y *A. flavus*, no solo causa daños físicos, sino que además produce sustancias tóxicas para el consumo humano, denominadas micotoxinas (7,15).

2.3 Las micotoxinas

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos filamentosos para diversas funciones tales como, la maduración del hongo, respuesta al estrés y esporulación (Figura 1). En los últimos años las micotoxinas han sido de gran interés para la investigación debido a su presencia frecuente en alimentos procesados a base de cereales (principalmente maíz).

Las micotoxinas más comunes son las ocratoxinas, fumonisinas y aflatoxinas, siendo estas últimas las que representan un mayor riesgo a la salud humana. Las aflatoxinas son generalmente producidas por hongos del género *Aspergillus*, los cuales crecen y se desarrollan en cultivos agrícolas (16–18).



Figura 1. Fases del desarrollo de *A. flavus* y sus aflatoxinas: A. Crecimiento de *A. flavus*. B. Crecimiento de conidióforos. C. Esporulación. D. Producción de aflatoxinas

2.4 *Aspergillus flavus*, aflatoxinas y sus patologías.

Aspergillus flavus es un hongo filamentosos, fitopatógeno, saprófito no obligado, cosmopolita, que pertenece al filo *Ascomycota* y crece cerca del suelo en material en descomposición. Se ha reportado su presencia en frutos secos, productos hortofrutícolas frescos y en cereales. El maíz es uno de los cereales contaminados con *A. flavus*, de mayor importancia en México por el alto consumo de sus productos y subproductos. *Aspergillus flavus* presenta conidios, los cuales ingresan a través del pedicelo o bien a partir de una herida en el grano, y posteriormente germinan dentro del germen, donde empiezan a crecer las hifas, que son el cuerpo principal del hongo; después de 3 a 7 días de crecimiento genera conidióforos que liberan conidios para que contaminen otros cultivos. *Aspergillus flavus* puede desarrollarse en un pH de 2.1 a 11.2, con humedad relativa entre 60 y 90% y poca luz. El rango de temperatura óptima para su desarrollo oscila entre 10 y 55 °C con un máximo desarrollo a los 33.5 °C. Las aflatoxinas se desarrollan una vez que el hongo empieza a desarrollar conidióforos, aunque también se presentan cuando el hongo se siente estresado, ya sea por un competidor, por la falta de nutrientes y agua o por la presencia de fungicidas químicos (19,20).

En su forma cristalina y pura, es de color blanco, inodora e insípida, manteniendo su estructura química estable hasta los 237 °C. Las principales aflatoxinas son las B1, B2, G1, G2, además, las M1, y M2 que se presentan únicamente en la leche de animales que consumieron granos contaminados con aflatoxinas B1 y B2. La

aflatoxina B1 es el hepatocarcinógeno más potente encontrado en la naturaleza, además es mutagénico y teratogénico, causando malformaciones congénitas (21,22).

Las aflatoxinas producidas por *A. flavus* al ser consumidas, son absorbidas junto con los lípidos en el intestino, posteriormente son llevadas al hígado y dentro de las células se unen al ADN provocando un incorrecto plegamiento de la molécula, lo cual puede provocar cáncer en el hígado, y en altas concentraciones “aflatoxicosis”, que es una falla total del funcionamiento del hígado debido a una necrosis. Los casos de intoxicación por aflatoxinas se han presentado en varios países alrededor del mundo. En 1974, se informó de un brote de hepatitis debido al consumo de aflatoxinas en los estados de Gujrat y Rajasthan en la India, lo que causó la muerte de 106 personas. En África, especialmente en Nigeria y Kenia, es donde se han presentado varios casos de aflatoxicosis masiva debido al poco control que se tiene sobre la contaminación del maíz por *A. flavus*, y los principales síntomas son, malestar general, edema y letargo. En abril del 2004, se produjo una de las mayores contaminaciones por aflatoxinas en las zonas rurales de Kenia, lo que causó 317 casos de aflatoxicosis y 125 muertes (23,24).

El maíz es uno de los cereales más susceptible a contaminarse con aflatoxinas. Esta contaminación puede ocurrir durante la siembra, el manejo del cultivo, durante su cosecha y durante su almacenamiento. Durante el almacenamiento del grano de maíz se presentan las condiciones óptimas para que se desarrolle *A. flavus* y se produzcan altas cantidades de aflatoxinas. Incluso el hongo y sus aflatoxinas

pueden aparecer después de un proceso de nixtamalización para la obtención de tortilla (Figura 2).

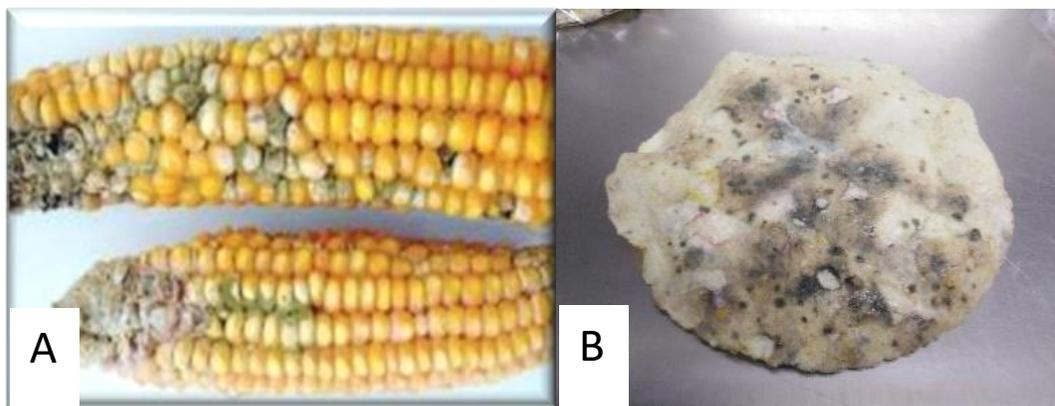


Figura 2. Infección de *A. flavus* en tortilla de maíz y en mazorcas de maíz.

2.5 Productos derivados del maíz y su contaminación por *Aspergillus flavus*

El maíz es un producto de alto consumo en México, debido a su alto contenido nutricional y versatilidad para utilizarse en una gran variedad de alimentos. El subproducto derivado del maíz con mayor consumo en el país es la tortilla; se estima que cada individuo consume alrededor de 325 g/día. Por lo tanto, el consumo diario de tortillas contaminadas con aflatoxinas podría ocasionar intoxicaciones crónicas y perjudicar gravemente la salud de quien las consume (25,26).

En el norte de Tamaulipas, México se han reportado pérdidas por contaminación de *A. flavus* en el cultivo de maíz que ascienden hasta del 50% de su producción, debido a que el producto se encontraba contaminado por *A. flavus* (27). El maíz además de ser utilizado para consumo humano, también se utiliza para consumo



animal. Martínez et al. (2013) (28) reportó que, en el año 2010, el 92% de la leche evaluada en Jalisco contenía entre 4.82 y 24.89 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de aflatoxinas. En el año 2019 se analizaron 55 leches infantiles distribuidas en el área metropolitana de Monterrey, México, de las cuales el 20% presentaba de 40 a 450 ng/L de aflatoxinas, cuando el límite en Europa es de 25 ng/L (29). Además, en México se reportaron 240 casos de intoxicación por aflatoxinas, en un periodo de 5 años, el 53% de estos casos eran hombres de edad media y el 35% fallecieron dentro de las primeras 6 semanas después del diagnóstico (30).

Las tortillas de maíz elaboradas con granos infectados con *A. flavus*, se ven contaminadas con la presencia de aflatoxinas, a pesar de las altas temperaturas de cocción involucradas en su proceso de fabricación ya sea en la pasteurización o nixtamalización. Se ha reportado que las aflatoxinas no se pueden destruir por procesos de cocción normales, ya que pueden resistir temperaturas de hasta 237 °C. Sin embargo, el proceso de nixtamalización puede reducir los niveles de aflatoxinas. En la nixtamalización el 95% de las aflatoxinas se inactivan. Sin embargo, en una alta contaminación de aflatoxinas (520 $\mu\text{g}/\text{kg}$), el porcentaje de inactivación se redujo a 93%, por lo tanto, el 7% permanece en la tortilla, lo que representa un peligro para la salud, porque se estaría ingiriendo 0.95 μg de aflatoxinas por cada tortilla. De acuerdo con estos resultados, el proceso de nixtamalización tradicional no parece ser seguro para detoxificar totalmente la tortilla, ya que un alto contenido de aflatoxinas puede ser revertido a la forma original por medio de un pH ácido. La acidificación de los extractos de aflatoxinas, como



ocurre durante la digestión, daría lugar a una reconstitución de la molécula de aflatoxina (los anillos de lactona de la aflatoxina se abren durante el tratamiento alcalino, en la nixtamalización, pero se cierran cuando la tortilla se acidifica en el estómago (25,26,31).

En México se cuenta con la norma NOM-147-SSA1-1996 (Diario Oficial de la Federación, 1996) para la regulación del contenido de aflatoxinas totales en cereales de origen nacional, o importado para el consumo humano (27,32). Sin embargo, el control de las aflatoxinas en maíz es difícil en países en desarrollo como México, debido a la falta de apego a las normas establecidas para el control de toxinas en cereales (33,34).

2.6 Cadena de producción de maíz y tortillas.

La producción del maíz se inicia con la siembra de los granos en la tierra de cultivo, es en este punto donde se puede llevar a cabo la primera contaminación por *A. flavus*, debido a que se encuentra naturalmente en el suelo. Posteriormente la planta sigue su crecimiento hasta empezar a formar las mazorcas, y durante este tiempo pueden ser dañadas físicamente por insectos, el clima, animales o por un mal manejo, y a través de la herida formada puede ingresar *A. flavus*. Finalmente, a la hora de la cosecha los granos de maíz se separan normalmente de la mazorca y se deja expuesto el pedicelo que es el sitio de entrada de *A. flavus* para infectar los granos de maíz. Una vez almacenados en los silos estos granos de maíz

contaminados por *A. flavus*, pueden infectar el resto de los granos sanos, debido a los largos periodos de tiempo que pueden estar almacenados antes de su consumo o utilización (25).

Para la producción de tortillas se utiliza el proceso de nixtamalización desde épocas prehispánicas, que consiste en la cocción alcalina con 1% de cal con relación al peso del grano de maíz, durante 35 minutos a 95 °C, después se dejan reposar de 8 a 12 horas, terminando este tiempo se enjuagan los granos para quitar el exceso de nejayote (calcio alcalino) y se quita la capa externa de los granos de maíz, generalmente con ayuda de una superficie áspera o frotándolos entre ellos. Posteriormente, se lleva a cabo una molienda húmeda donde se pueden moler más de una vez para obtener la consistencia adecuada para formar la masa. El siguiente paso consiste en formar discos con ayuda de una tortilladora manual o industrial y cocerlas por ambos lados en una superficie caliente (26).

2.7 Tratamientos actuales para controlar *Aspergillus flavus* en maíz

Como control físico, antes de su comercialización se retiran aquellos cargamentos en donde se detecten aflatoxinas y por lo tanto una contaminación por *A. flavus*; también se disminuye la concentración de aflatoxinas mediante una mala práctica, la cual consiste en mezclar granos contaminados con granos sin contaminar, si bien pueden no pasar para consumo humano, puede ser utilizado para consumo animal (10).

Actualmente se utilizan fungicidas químicos sintéticos en forma de aerosoles como los tiodiazoles, imidazoles, tiabendazol, propiconazol etc., que se aplican directamente en el cultivo durante su crecimiento. Estos fungicidas han sido efectivos para controlar el desarrollo del hongo, sin embargo, su aplicación puede aumentar la producción de aflatoxinas debido al estrés que le provocan al hongo. Además, estos tratamientos químicos tienen restricciones para su aplicación en cereales, cuyo destino son los mercados internacionales (Estados Unidos o países Europeos), por lo tanto, la utilización de métodos alternativos de control tiene gran potencial (35).

Boedeker et al. (2020) revisaron las publicaciones de casos de intoxicación por fungicidas entre los años 2006 y 2018, y estimaron una media de 740,000 casos de intoxicación anual con 7446 muertes, además, estimaron que el 44% de los agricultores en el mundo se intoxican anualmente (36). Entre los años 2006 y 2015 se reportaron 448 casos de intoxicación en niños por fungicidas en Zhejiang, China, de los cuales 14 terminaron en muerte, y resaltaron que la intoxicación por fungicidas tenía la tasa de letalidad más alta entre los plaguicidas (11). En el año 2017 una mujer de 35 años en la India desarrollo Chorea por el fungicida propiconazol; está es una manifestación por intoxicación, que se caracteriza por una gran variedad de trastornos degenerativos, vasculares y metabólicos, además, en el reporte también se comenta que en la India es habitual la intoxicación por fungicidas en el ámbito agrícola, aunque la mayoría de las veces no se reporta los casos de intoxicación sino solo el fallecimiento (37).

2.8 Propuesta de tratamientos alternativos con productos naturales.

En la naturaleza encontramos compuestos naturales utilizados por diferentes organismos para evitar la contaminación y el crecimiento de hongos, dichos compuestos han sido desarrollados y probados por estos organismos a través de muchos siglos de evolución, de tal manera que además de ser efectivos, no causan daños al medio ambiente. Además, al ser producidos por organismos vivos, estos productos son fácilmente renovables y hasta cultivables. La efectividad de estos productos naturales ha sido muy estudiada en los últimos años y con ayuda de procesos como la concentración sus propiedades antimicrobianas pueden ser mejoradas significativamente (38–40).

Entre los productos que representan una alternativa para el control de aflatoxinas en diversos productos hortofrutícolas está el propóleo, quitosano y la resina de pino, por mencionar algunos.

2.8.1 Propóleo

El propóleo es un compuesto resinoso creado por las abejas a partir de brotes de plantas, savia de árboles, polen, enzimas de abejas y cera, es rico en compuestos activos como flavonoides, ácidos fenólicos y derivados terpénicos (41,42). Se presenta como un sólido maleable a temperatura ambiente y es utilizado por las abejas para sellar e impermeabilizar la colmena (43). El propóleo se ha utilizado



durante siglos en la medicina popular demostrando su inocuidad. Además, ha demostrado tener propiedades antifúngicas contra hongos patógenos como *Colletotrichum spp.* y *Candida spp.*; su actividad antifúngica depende de su contenido de flavonoides los cuales pueden afectar el metabolismo de los hongos, al evitar la formación de esporas y de hifas (44). Ghaly y colaboradores utilizaron extracto etanólico de propóleo a 3 y 4 g L⁻¹ disminuyendo la masa micelial de un 11 a un 80% y la producción de aflatoxinas de un 34 a un 100% contra *A. flavus* (45). Recientemente, se ha utilizado para cubiertas en alimentos, para protegerlos de hongos como *A. flavus* (20). Córtes-Higareda et al. (2019), utilizó una solución de nanopartículas con propóleo al 40% con inhibición total de *A. flavus* por 10 días, *in vitro* en medio Czapek (46). Aparicio-García et al. (2021) utilizó un recubrimiento de nanopartículas de quitosano y propóleo, inhibió el crecimiento de *A. flavus* en higos en un 30% para el día 12 de almacenamiento (47).

2.8.2 Quitosano

El quitosano es un polímero biocompatible, renovable y biodegradable, que se obtiene del exoesqueleto de crustáceos como los camarones, y reduce el crecimiento de hongos evitando la descomposición de frutas y verduras (48). Se han propuesto varios mecanismos que explican la actividad antimicrobiana del quitosano, así como los factores que afectan sus propiedades; entre ellos, el pH, la concentración y su fuente de procedencia. Se reporta que la actividad fungicida del quitosano se atribuye principalmente a su capacidad para inhibir la síntesis de



proteínas como la β -galactosidasa y posiblemente un efecto menor sobre la membrana (49). Viegas et al. (2013), utilizaron quitosano 0.25 g/L contra *A. flavus in vitro*, inhibiendo completamente su crecimiento (50). Aloui et al. (2014), utilizaron quitosano al 2%, logrando inhibir el crecimiento micelial de *A. flavus in vitro* en un 50% en el día 12 de incubación. Posteriormente, Hernandez-Tellez et al. (2017), utilizaron una solución de quitosano al 0.05% y lisozima al 0.05%, y formaron nanopartículas, que mostraron una disminución del 80% de germinación de esporas para *A. flavus* (51).

2.8.3 Resina de pino

La resina natural es una secreción de las plantas particularmente de las coníferas en sitios de la corteza donde se generaron heridas, que sirve como defensa ante infecciones por microorganismos, con capacidad selectiva para afectar las membranas, provocando lisis, sin afectar las membranas de las células de los mamíferos. Savluchinske-Feio et al. (2006), determinaron a través de la microscopía electrónica que la actividad antimicrobiana de la resina afecta los esteroides de las membranas de los microorganismos (52). Adicionalmente Wang et al. (2012), indicaron que la hidrofobicidad y la estructura de los compuestos químicos de la resina son responsables de su actividad antimicrobiana (53). Además, se han reportado varios compuestos antimicrobianos presentes en los ácidos de resinas naturales. Algunos componentes de la resina de pino son principalmente α -pineno de 21.39% a 25.40%, β -pineno de 9.68% a 9.69% y cariofileno de 4.81% a 9.12%.

Todos estos compuestos son monoterpenos, los cuales son ampliamente reconocidos por su capacidad antimicrobiana (54,55). Ulukanli et al. (2014), reportaron que la resina de pino a concentraciones de 1.25 a 20 mg mL⁻¹ tuvieron la capacidad de inhibir el crecimiento microbiano, y un efecto microbicida a concentraciones de 2.5 a 40 mg mL⁻¹ (54). Actualmente existen pocos estudios con resina de pino en alimentos, sin embargo, el Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos determinó que su ingesta es segura y El Instituto Nacional de Seguridad Ocupacional y Salud de los Estados Unidos (NIOSH, por sus siglas en inglés) reportó una dosis tóxica mínima= 175g/kg. Revisado el año 2018.

2.8.4 Nanopartículas

La nanotecnología es toda tecnología estructurada a nivel nanométrico, que se considera en el rango de 0 a 100 nanómetros, actualmente se utiliza en muchos campos de la medicina, especialmente para transportar o recubrir sustancias importantes a modo de protección hasta que lleguen al sitio específico de acción o para evitar su deterioro, este último punto es el de mayor utilidad a la hora de usar compuestos naturales, pues aumenta su vida útil. El tamaño de las nanopartículas se ha relacionado con una mayor efectividad antimicrobiana (56).

Las nanopartículas de quitosano tienen propiedades físicas y químicas mejoradas con respecto al quitosano en solución, como una mayor superficie, porosidad, resistencia a la tracción, conductividad, y propiedades mecánicas mejoradas (57).

La aplicación de nanopartículas sobre un producto de origen vegetal permite tener mayor cobertura de aplicación, mayor área superficial, porosidad y resistencia mecánica. Se han demostrado efectos significativos en el control del crecimiento de hongos del género *Aspergillus* con productos naturales nanoestructurados, como lo son el propóleo al 1.2% con quitosano. Las nanopartículas aplicadas en ensayos *in vitro* de estos compuestos han demostrado controlar el desarrollo de *A. flavus* y su producción de aflatoxinas, logrando una inhibición del 40% del crecimiento después de 10 días de almacenamiento (46).

3. JUSTIFICACIÓN

La presencia de *A. flavus* en maíz y tortillas de maíz, es un problema de inocuidad alimentaria, debido a que este hongo produce aflatoxinas, las cuales son nocivas para la salud humana. El consumo frecuente de aflatoxinas puede provocar enfermedades tales como aflatoxicosis y cáncer de hígado. Actualmente los métodos de control convencionales para reducir o inhibir el desarrollo de *A. flavus* son los fungicidas químicos sintéticos, sin embargo, estos presentan inconvenientes; como la generación de cepas resistentes a fungicidas, las restricciones en su uso para las exportaciones de maíz, el aumento de las aflatoxinas debido al estrés que producen en el hongo y causan daños a la salud humana. Debido a esta problemática, la búsqueda de alternativas naturales está en aumento. Existe evidencia que varios productos naturales han sido efectivos en el control de hongos fitopatógenos, además si se utiliza la herramienta de la nanotecnología se puede potencializar el efecto fungicida de los productos naturales.

El uso de sustancias naturales nanoestructuradas de quitosano, propóleo y resina de pino, pueden ser una alternativa de control en el desarrollo de *A. flavus* y su producción de aflatoxinas, debido a que estos productos son renovables, biocompatibles, biodegradables e ino cuos para su consumo en humanos y además han mostrado ser efectivos en el control de hongos fitopatógenos incluyendo a *A. flavus*. Por tal motivo pueden ser utilizados en granos de maíz para inhibir o reducir el crecimiento de *A. flavus* y su producción de aflatoxinas.

La aplicación de la resina de pino para evitar el desarrollo de *A. flavus* aun no se ha estudiado, y su aplicación en forma de nanopartículas junto con el quitosano y el propóleo podrían lograra una mayor inhibición del desarrollo de *A. flavus* y de sus aflatoxinas en el maíz.

4. HIPÓTESIS

El desarrollo de *A. flavus* y la producción de aflatoxinas presentes en granos de maíz y tortillas, serán controlados con la aplicación de productos naturales nanoestructurados tales como el propóleo, el quitosano y la resina de pino.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de soluciones y/o nanopartículas de productos naturales sobre el desarrollo de *A. flavus* y su producción de aflatoxinas en granos de maíz y tortilla.

5.2 Objetivos específicos

1. Evaluar la actividad fungicida *in vitro* del propóleo, quitosano y resina de pino en solución y/o nanopartículas en el desarrollo de *A. flavus* y producción de aflatoxinas.

2. Evaluar soluciones de propóleo, quitosano y resina de pino en solución y/o nanopartículas en la incidencia de *A. flavus* en granos de maíz, germinación de la semilla de maíz, crecimiento de la plántula y crecimiento de la radícula.
3. Evaluar soluciones de propóleo, quitosano y resina de pino en solución y/o nanopartículas en desarrollo de *A. flavus*, producción de aflatoxinas y su efecto sobre aspectos de calidad de la tortilla de maíz (humedad, pérdida de peso, roabilidad, color).

6. MATERIALES Y MÉTODOS DE LA INVESTIGACIÓN

6.1 Ensayos *in vitro*

6.1.1 Activación y mantenimiento de la cepa de *Aspergillus flavus*

La cepa de *A. flavus* fue proporcionada por el Laboratorio de Tecnologías Postcosecha de Productos Agrícolas del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional. Esta se sembró en mazorcas de maíz para su reactivación. Previamente las mazorcas de maíz fueron lavadas con una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante un minuto. La inoculación consistió en colocar el micelio de *A. flavus* sobre los granos de la parte inferior de la mazorca utilizando una aguja de disección estéril. Posteriormente las mazorcas se guardaron en una cámara húmeda y se almacenaron durante una semana a 25 ± 3 °C (58). Después de este tiempo, se recuperó el micelio con una aguja de disección y se incubó en medio nutritivo (BD Bioxon/México) adicionado con 1% de Ampicilina (Polymox, México).

6.1.2 Obtención de un cultivo monospórico de *Aspergillus flavus*

Se preparó una solución de esporas 1×10^5 a partir del crecimiento de *A. flavus* en medio Czapeck-dox (BD Bioxon/México), para contabilizar la concentración de esporas se empleó una cámara de Neubauer. Posteriormente se llevó a cabo una dilución de la solución de esporas de 1×10^{-1} a 1×10^{-10} . Se sembraron 250 μ L de cada una de las diluciones en medio Czapek y se incubaron por 24 horas a 28 °C ± 3

°C. Se recuperaron las esporas del medio, usando una aguja de disección y se resembraron en medio Czapek (59).

6.1.3 Formulación y aplicación de tratamientos

6.1.3.1 Preparación de soluciones de quitosano, propóleo y resina de pino

Para preparar la solución de quitosano al 1% (peso molecular medio) se disolvió este compuesto en ácido acético glacial al 1%. El pH de la mezcla se ajustó a 5.6 con NaOH 1N usando un potenciómetro. Por otra parte, el propóleo se adquirió comercialmente de la empresa Rosa Elena Dueños S.A. de C. V, México. Entonces se mezclaron 600µL de propóleo con 99.1 mL de solución de quitosano al 1% y 300µL de glicerol. Por último, la resina de pino se adquirió comercialmente de MS Agros, México y 600µL de esta se mezclaron con 99.1mL de quitosano al 1% y 300µL de glicerol (60).

6.1.3.2 Preparación de nanopartículas de quitosano, propóleo y resina de pino

Para obtener las nanopartículas de quitosano primero se preparó una mezcla formada por 40 mL de etanol (Ethics, México) y 10 µL de tween 20, los cuales se mantuvieron en agitación durante 1 hora, previo a su uso. Posteriormente se adicionó por goteo con una bomba peristáltica (Biorad, México) 2.5 mL de quitosano

peso molecular medio al 0.05% (preparado con 1% de ácido acético, Sigma Aldrich, USA). La mezcla resultante se mantuvo en agitación por 10 minutos y posteriormente se colocó en un rotavapor R-300 (Buchi, América) a 115 mbar y 40 rpm, hasta obtener un volumen final de 2 mL (61) .

Para obtener las nanopartículas de propóleo se mezclaron 40 mL de etanol con 120 μ L de extracto de propóleo al 30%. La mezcla se mantuvo en agitación por 5 minutos y después se añadieron 24 μ L de tween 20 y se agitó por 1 hora la solución. Finalmente, con una bomba peristáltica (Biorad, México), 2.5 mL de una solución de quitosano al 0.05%, se incorporó por goteo y se mantuvo en agitación por 10 minutos. La solución se colocó en un rotavapor R-300 (Buchi, América) a 115 mbar y 40 rpm, hasta obtener un volumen final de 2 mL (61).

En el caso de las nanopartículas de resina de pino se utilizó la metodología propuesta por Cortés-Higareda(62). Para su obtención, se mezclaron 40 mL de etanol, 120 μ L de resina de pino al 30% y 120 μ L de tween 20 durante 1 hora. Posteriormente con una bomba peristáltica (Masterflex, México) se adicionó por goteo 2.5 mL de una solución de quitosano de peso molecular medio al 0.05%, manteniendo la mezcla en agitación constante por 10 min después de finalizar la incorporación del compuesto. La mezcla resultante se colocó en un rotavapor R-300 (Buchi, América) a 115 mbar y 40 rpm, hasta obtener un volumen final de 2 mL.

6.1.4 Formulación y aplicación de los tratamientos por la técnica de envenenamiento del medio *in vitro*

En un medio solidificado de Czapek en cajas Petri de 5 cm, se colocaron 0.25 mL de cada uno de los 10 tratamientos evaluados, como se muestra en el Tabla 1. Estos se dispersaron y se dejaron secar a 28 ± 2 °C. Posteriormente, 10 μ L de una solución de esporas de *A. flavus* a una concentración de 1×10^5 se colocó en el centro de la caja Petri, se dejó secar y se incubaron a 28 °C. Se llevaron a cabo 6 repeticiones por cada tratamiento.

Tabla 1. Formulaciones de los tratamientos utilizados en los ensayos *in vitro*

Tratamientos	Quitosano	Glicerol	Extracto de propóleo	N.P.P.	N.P.Q.	N.P.R.	Resina de pino
Q+P	99.1	0.3	0.6	--	--	--	--
Q+P+NPsP	59.1	0.3	0.6	40	--	--	--
Q+NPsP	59.7	0.3	--	40	--	--	--
Q+P+NPsQ	59.1	0.3	0.6	--	40	--	--
Q+NPsQ	59.7	0.3	--	--	40	--	--
Q+NPsRP	59.7	0.3	--	--	--	40	--
Q+RP	99.1	0.3	--	--	--	--	0.6
Q	99.7	0.3	--	--	--	--	--
Q+P+RP	99.7	0.3	1.2	--	--	--	1.2
Q+NPsP+NPsRP	39.7	0.3	--	30	--	30	--
Testigo	--	--	--	--	--	--	--

*Q (Quitosano), P (Propóleo), NPsP (Nanopartículas de propóleo), NPsQ (Nanopartículas de quitosano) RP (Resina de pino), NPsRP (Nanopartículas de Resina de Pino) y Testigo (Agua).

6.1.5 Evaluación del crecimiento micelial de *Aspergillus flavus*

El crecimiento micelial del hongo se midió como el diámetro radial en cada caja Petri usando un Vernier (Electronics, México). Las determinaciones se detuvieron hasta que el micelio del grupo testigo cubrió en su totalidad el medio Czapeck de la caja Petri. Los resultados se expresaron como la tasa de crecimiento micelial, y el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial con respecto al grupo testigo (63). La tasa de crecimiento micelial corresponde a la pendiente de la recta obtenida por efecto del crecimiento micelial del hongo. Mientras, el porcentaje de inhibición se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{CM \text{ del grupo control} - CM \text{ de la muestra}}{CM \text{ del grupo control}} * 100$$

CM= Crecimiento micelial

6.1.6 Evaluación de la germinación de esporas de *A. flavus*

Para evaluar la germinación de esporas, se recolectaron las esporas de *A. flavus* que crecieron en las cajas Petri del ensayo *in vitro* con los tratamientos, y se realizó una solución de esporas 1×10^5 , y se colocaron en discos de agar de 1cm de diámetro, tres discos por tratamientos se introdujeron en una caja Petri y se detuvo la germinación de las esporas con lactofenol a las 2, 4, 6, 8 y 10 horas. Posteriormente se contabilizaron cien esporas en el microscopio, diferenciando las que presentaban un tubo germinativo y reportándolas como un porcentaje del total de esporas contadas.

6.2 Ensayos en granos de maíz

6.2.1 Incidencia de infección por *Aspergillus flavus*

Para los ensayos en granos de maíz, se utilizaron los tratamientos que obtuvieron los mejores resultados en los ensayos *in vitro*, teniendo un total de 3 tratamientos, además de 2 grupos testigo, uno con herida y otro sin herida que sirve como control negativo, como se muestra en el Tabla 2.

Para este ensayo, se formaron 2 grupos, uno con granos de maíz esterilizados con etanol al 70%, y otro grupo sin esterilizar, debido a que se piensa que la humedad del etanol favorecerá el crecimiento de *A. flavus* en el grano. Posteriormente a la esterilización, de ser el caso, se llevaron a cabo 3 punciones en los granos.

Después, los granos de maíz se sumergieron en los tratamientos durante 30 segundos, posteriormente se dejaron secar durante 15 minutos a temperatura ambiente (28°C), a continuación, se sumergieron en una suspensión de esporas (1×10^6) durante 15 minutos y se dejaron secar durante otros 15 minutos a temperatura ambiente (28°C).

Se colocaron 10 granos en cada caja Petri y se dejaron incubar durante 7 días a 28 °C, al final de este tiempo se contaron los granos que presentaban crecimiento micelial.

Tabla 2. Formulaciones de los tratamientos utilizados en los ensayos en granos de maíz.

Tratamientos	Quitosano	Glicerol	Extracto de propóleo	N.P.P.	N.P.Q.	N.P.R.	Resina de pino
Q+NPsP+NPsRP	99.1	0.3	0.6	--	20	20	--
Q+P+RP	59.1	0.3	0.6	1.2	--	--	1.2
Q+RP	59.7	0.3	--	--	--	--	1.2
Testigo con herida	--	--	--	--	--	--	--
Testigo sin herida	--	--	--	--	--	--	--

*Q (Quitosano), P (Propóleo), NPsP (Nanopartículas de propóleo), NPsQ (Nanopartículas de quitosano) RP (Resina de pino), NPsRP (Nanopartículas de Resina de Pino) y Testigo (Agua).

6.2.2 Germinación de granos de maíz y crecimiento de la plántula y la radícula

Los granos de maíz se sumergieron en los tratamientos durante 30 segundos y se dejaron secar durante 15 minutos a temperatura ambiente (28°C). Posteriormente se envolvieron 20 granos de maíz por unidad experimental en papel humedecido y se colocaron en bolsas. A continuación, se mantuvieron a temperatura ambiente (28-30 °C) y con exposición al sol durante 7 días.

La germinación se evaluó mediante el conteo de los granos de maíz con presencia de una plántula y una radícula, además, se midió su crecimiento en centímetros.

6.3 Ensayos en tortillas de maíz

6.3.1 Aplicación de tratamientos en granos para su uso en la elaboración de tortillas

Para los ensayos en tortillas de maíz, únicamente se utilizaron los tratamientos que obtuvieron los mejores resultados en los ensayos en granos de maíz *in vitro*, además de 2 grupos testigos, uno inoculado con *A. flavus* y otro sin inocular, cuyas formulaciones se pueden apreciar en el Tabla 3.

Tabla 3. Formulaciones de los tratamientos utilizados en los ensayos en tortillas de maíz.

Tratamientos	Temperatura de almacenamiento	Quitosano	Glicerol	Extracto de propóleo	NPSP	NPSPRP	Resina de pino
Q+NPSP+NPSPRP	5°C, 28°C	59.7%	0.3%	--	20%	20%	--
Q+P+RP	5°C, 28°C	87.7%	0.3%	0.6%	--	--	6%
Testigo con <i>A. flavus</i>	5°C, 28°C	--	--	--	--	--	--
Testigo sin <i>A. flavus</i>	5°C, 28°C	--	--	--	--	--	--

*Q (Quitosano), P (Propóleo), NPSP (Nanopartículas de propóleo), NPSPQ (Nanopartículas de quitosano) RP (Resina de pino), NPSPRP (Nanopartículas de Resina de Pino) y Testigo (Agua).

A los granos de maíz, se les realizó una punción con una aguja estéril en el germen y se sumergieron en los tratamientos durante 30 segundos y se dejaron secar durante 30 minutos a temperatura ambiente (28°C), a continuación, se sumergieron en una suspensión de esporas (1×10^6) durante 15 minutos y se dejaron secar durante otros 60 minutos a temperatura ambiente (28°C).

6.3.2 Proceso de nixtamalización

Después de la aplicación de los tratamientos y la inoculación de *A. flavus*, los granos de maíz pasaron al proceso de nixtamalización referido en los estudios de Rodríguez-Martínez en el 2015 (64) y Arámbula-Villa en el 2018 (65), que comienza con una cocción a 95°C durante 35 minutos con un 1% de CaOH_2 y 2.25 veces el volumen en agua, con respecto al peso del grano. Posteriormente siguió una etapa de reposo de 12 horas y un lavado con agua para quitar el resto del nejayote (caldo alcalino de cocción). Finalmente se molió en un molino manual para granos (TORREY, México).

6.3.3 Proceso de elaboración de las tortillas

La masa obtenida del molino fue pesada para separarla en partes de 50 g y prensadas en una tortilladora manual (TORREY, México) para obtener tortillas aproximadamente de 3 mm de espesor y 150 mm de diámetro. La cocción se llevó a cabo en un comal de aluminio a 200°C durante 6 minutos. Una vez obtenidas las

tortillas se almacenaron 210 g después de 15 minutos en bolsas de polietileno para evitar la pérdida de humedad siguiendo la metodología de Sandoval (66) para aumentar la vida de anaquel de las tortillas.

6.3.4 Pruebas de calidad de las tortillas

Existen diferentes aspectos de calidad que se pueden evaluar en la tortilla como lo son la rolabilidad, el porcentaje de humedad, la pérdida de peso durante el almacenamiento, el color y la vida de anaquel. Todos estos aspectos son evaluados debido a la preferencia de los comensales, pero sobre todo para evitar signos de descomposición o presencia de sustancias peligrosas (66,67).

6.3.4.1 Porcentaje de humedad

El porcentaje de humedad es un aspecto importante de la calidad de la tortilla en relación con su vida de anaquel, un porcentaje demasiado alto, por arriba del 30% la haría propensa a infección por hongos y bacterias, mientras que un porcentaje por debajo del 10% afectaría su rolabilidad, su aspecto y su sabor. Para obtener el porcentaje de humedad de las tortillas, se tomó un peso inicial de 6 tortillas 15 minutos después de su cocción, y posteriormente se secaron en un horno de convección a 60°C durante 40 minutos, entonces se determinó su peso final y por diferencia con respecto al inicial se calculó el porcentaje de humedad (64).

6.3.4.2 Pérdida de peso

La pérdida de peso es una medida que se toma normalmente en los alimentos que tienen un tratamiento o han sido inoculados con algún microorganismo para determinar su efecto. Se pesaron las tortillas justo después de su cocción y posteriormente se pesaron nuevamente los días 3, 7, 14 y 21 de almacenamiento, para determinar los cambios en su peso durante el tiempo de almacenamiento que fue a 5°C y a 28°C (64,65,68).

6.3.4.3 Rolabilidad

La rolabilidad es una característica deseada en la tortilla, debido a su uso en la gastronomía mexicana como base para otros muchos guisados de tal manera que sea más fácil enrollarlas, facilitando su manipulación para el comensal. Esta medida de calidad se midió inmediatamente después de la cocción de las tortillas y posteriormente calentándolas en una parrilla eléctrica 1 minuto por cada lado. Para la medición se enrolló la tortilla alrededor de un cilindro de 5mm de diámetro desde un extremo de la tortilla a otro. Se evaluó la ruptura de la tortilla en una escala del 0 al 5, donde 0 es sin ruptura y 5 es la ruptura completa de la tortilla (64).

6.3.4.4 Color

Los cambios en el color de alimentos procesados como las tortillas después de incorporarles el tratamiento a los granos de maíz sirve para determinar que las

tortillas están teniendo una posible descomposición similar o diferente a una tortilla normal. Para poder determinar el color se tomaron 3 mediciones con el colorímetro HunterLab, en 3 partes diferentes de la tortilla, las determinaciones se hicieron en el día 0 y en los días 3, 7, 14 y 21, los resultados se reportaron como una diferencia de color con respecto a la medición inicial (69,70). Utilizando la siguiente ecuación:

$$\Delta E = \sqrt{(L_2 - L_1)^2 + (b_2 - b_1)^2 + (a_2 - a_1)^2}$$

ΔE = diferencia de color, L, b, a

“L” representa luminosidad, L=0 es negro; L=100 es blanco.

“a” representa una coloración del verde al rojo, cuando “a” es negativo indica verde y cuando es positivo indica rojo

“b” representa una coloración del azul al amarillo, cuando “b” es negativo indica azul y cuando es positivo indica amarillo

6.3.4.5 Calidad microbiológica

La calidad microbiológica es un aspecto muy importante para la seguridad alimentaria del comensal, pues determina si el alimento contiene algún microorganismo que pueda dañar la salud, mediante el aumento del microorganismo colocando una muestra del alimento en algún medio de cultivo que permita su crecimiento. Para determinar la calidad microbiológica de las tortillas se colocó en el centro de una caja con medio Czapek un corte de 1cm² de tortilla recuperada de la región donde se aprecia una posible infección por *A. flavus* y mediante apreciación visual se observó el crecimiento micelial en la caja Petri (color verde es característico de *A. flavus*) (66,71,72).

6.3.5 Incidencia de *Aspergillus flavus*

La incidencia de *A. flavus* en las tortillas almacenadas es un indicativo muy importante para determinar su vida de anaquel y por lo tanto el tiempo seguro de su ingesta, además, del tiempo de rotación de productos para el comerciante. Se observaron las tortillas los días 0, 3, 7, 14 y 21 durante su almacenamiento a 5°C y 28°C, para determinar si existía crecimiento micelial del hongo *A. flavus*. El número de tortillas infectadas se reportó como porcentaje del número total de tortillas con su mismo tratamiento (66,71,72).

6.3.6 Concentración de aflatoxinas

La concentración de aflatoxinas en las tortillas de maíz es el aspecto más importante para determinar la seguridad de su consumo, debido a que es el producto final que llega al consumidor. Para su evaluación se utilizó 10 gramos de cada muestra de tortilla y se licuaron con 50 mililitros de etanol al 65%, posteriormente se filtró el sobrenadante para obtener 100 µL de muestra, finalmente se colocó en una copa de dilución junto con 500 µL de diluyente especial para aflatoxinas de la marca Neogen y se detectaban las aflatoxinas por la prueba de Elisa. Los resultados se reportaron en partes por millón (ppm).

6.4 Análisis de los resultados

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el programa Infostat (2019). Los datos se sometieron a un ANOVA y a la comparación de medias por la prueba de Tukey con un $P < 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1 Resultados de ensayo *in vitro*

7.1.1 Crecimiento micelial de *Aspergillus flavus* en medio Czapek

En todas las cajas Petri con los diferentes tratamientos, así como en el grupo testigo se observó un crecimiento micelial que fue más evidente a partir de las 48 horas de incubación a 28°C, mostrando diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos evaluados incluyendo el control. Los tratamientos más efectivos para inhibir el crecimiento micelial del hongo *A. flavus* fueron los que contenían, Q+P+RP (76% inhibición), Q+RP (74% de inhibición), Q+NpsP+NpsRP) (60% de inhibición) y Q+NPsRP (45% de inhibición), mientras que el grupo testigo tuvo el 0% de inhibición (Figura 3).

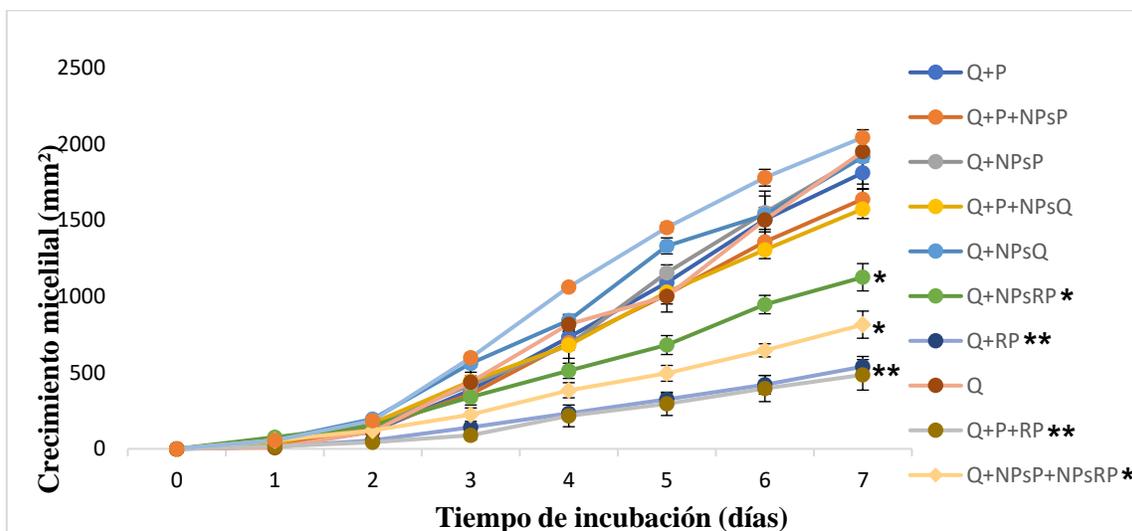


Figura 3. Efecto *in vitro* de productos naturales nanoestructurados sobre el crecimiento micelial de *Aspergillus flavus*. *Q (Quitano), P (Propóleo), NPsP (Nanopartículas de propóleo), NPsQ (Nanopartículas de quitano) RP (Resina de pino), NPsRP (Nanopartículas de Resina de Pino) y Testigo (Agua).

7.1.2 Germinación de esporas de *Aspergillus flavus*

En general, los tratamientos que contenían resina de pino no mostraron germinación debido a que no se presentó esporulación después de 7 días de almacenamiento (Figura 4). Con respecto al resto de los tratamientos, a las 6 h de incubación se observó un aumento en el porcentaje de germinación. Las cajas Petri que contenían extracto de propóleo en solución tuvieron una mayor germinación de esporas (90%) al igual que el tratamiento testigo (95%).

La tasa de crecimiento micelial fue menor en los tratamientos que contenían resina de pino (Tabla 4).

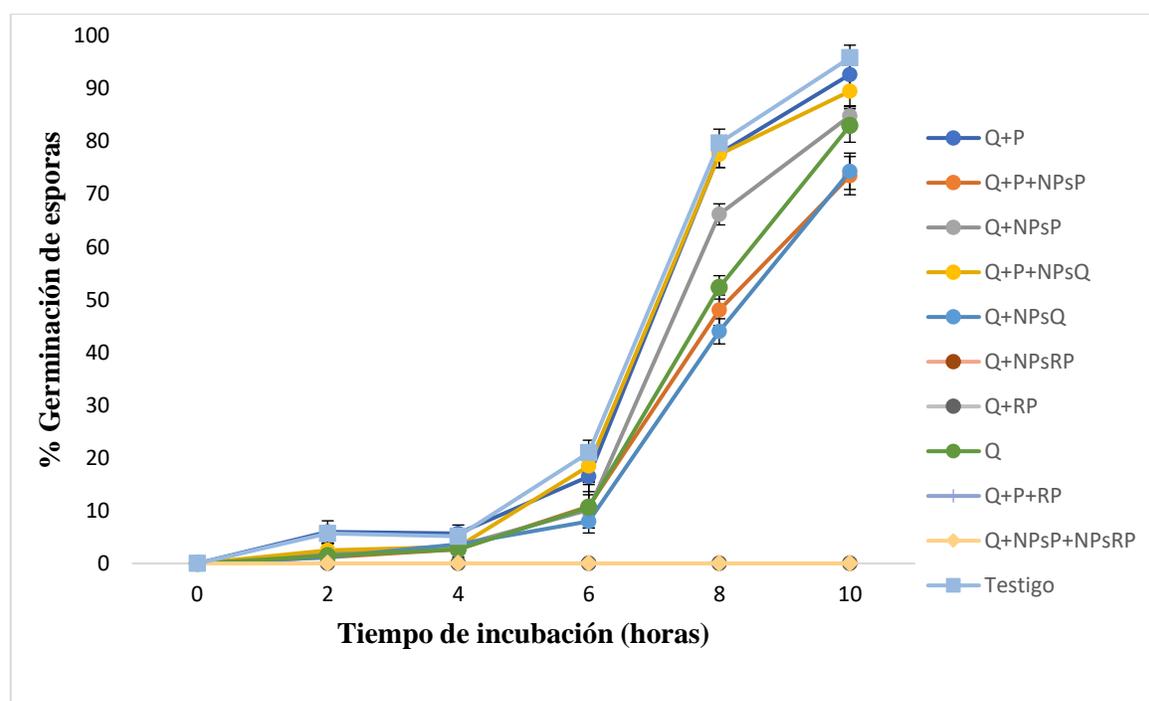


Figura 4. Efecto *in vitro* de productos naturales nanoestructurados sobre la germinación de esporas de *Aspergillus flavus*. *Q (Quitosaño), P (Propóleo), NPsP (Nanopartículas de propóleo), NPsQ (Nanopartículas de quitosaño) RP (Resina de pino), NPsRP (Nanopartículas de Resina de Pino) y Testigo (Agua).

Tabla 4. Tasa de crecimiento micelial y germinación de esporas de *Aspergillus flavus*.

Tratamientos	Crecimiento micelial		Germinación de esporas	
	Tasa	R ²	Tasa	R ²
Q+P	278.59	0.9486	19.69	0.8085
Q+P+NPsP	251.02	0.9552	14.748	0.8027
Q+NPsP	288.17	0.9438	17.814	0.7852
Q+P+NPsQ	240.33	0.9692	19.652	0.8159
Q+NPsQ	291.34	0.969	14.414	0.7781
Q+NPsRP	166.44	0.9738	0	0
Q+RP	79.826	0.9656	0	0
Q	287.74	0.9429	16.443	0.7895
Q+P+RP	73.598	0.9491	0	0
Q+NPsP+NPsRP	118.34	0.9753	0	0
Testigo	323.58	0.9697	20.486	0.8283

*Q (Quitano), P (Propóleo), NPsP (Nanopartículas de propóleo), NPsQ (Nanopartículas de quitosano) RP (Resina de pino), NPsRP (Nanopartículas de Resina de Pino) y Testigo (Agua).

En el Tabla 5 podemos observar la cinética de inhibición entre los tratamientos evaluados durante los 7 días de almacenamiento. El tratamiento que contenía Q+RP, fue el que mantuvo su porcentaje de inhibición durante todos los días de almacenamiento (70 al 76%).

Tabla 5. Cinética de inhibición de crecimiento micelial de *Aspergillus flavus*, con respecto al crecimiento del Grupo Testigo en los mismos días de incubación.

Tratamientos	Días de incubación							
	0	1	2	3	4	5	6	7
Q+P	0	76%	38%	35%	31%	25%	15%	11%
Q+P+NPsP	0	46%	27%	40%	34%	30%	24%	20%
Q+NPsP	0	1%	16%	30%	36%	21%	13%	6%
Q+P+NPsQ	0	37%	8%	26%	36%	29%	27%	23%
Q+NPsQ	0	0%	0%	6%	21%	8%	14%	6%
Q+NPsRP	0	0%	16%	43%	52%	53%	47%	45%
Q+RP	0	73%	70%	76%	78%	78%	76%	74%
Q	0	87%	40%	27%	23%	31%	16%	5%
Q+P+RP	0	2%	7%	14%	34%	46%	62%	76%
Q+NPsP+NPsRP	0	4%	9%	17%	28%	37%	48%	60%
Testigo	0	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

*Q (Quitosano), P (Propóleo), NPsP (Nanopartículas de propóleo), NPsQ (Nanopartículas de quitosano) RP (Resina de pino), NPsRP (Nanopartículas de Resina de Pino) y Testigo (Agua).

7.2 Resultados de ensayos en granos de maíz

7.2.1 Incidencia de *Aspergillus flavus* en granos de maíz

Con respecto a la incidencia de *Aspergillus flavus* en granos de maíz, se observó que los granos desinfectados con etanol al 70% (previo a la aplicación), mostraron un mayor número de granos infectados, comparado con los granos que no fueron desinfectados, durante los 7 días de almacenamiento.

La solución de Q+NPsP+NPsRP, tuvo un menor porcentaje de infección de granos, siendo estadísticamente similar al testigo sin herida, esta constante se observó en los granos desinfectados y no desinfectados (Fig. 5, Fig. 6).

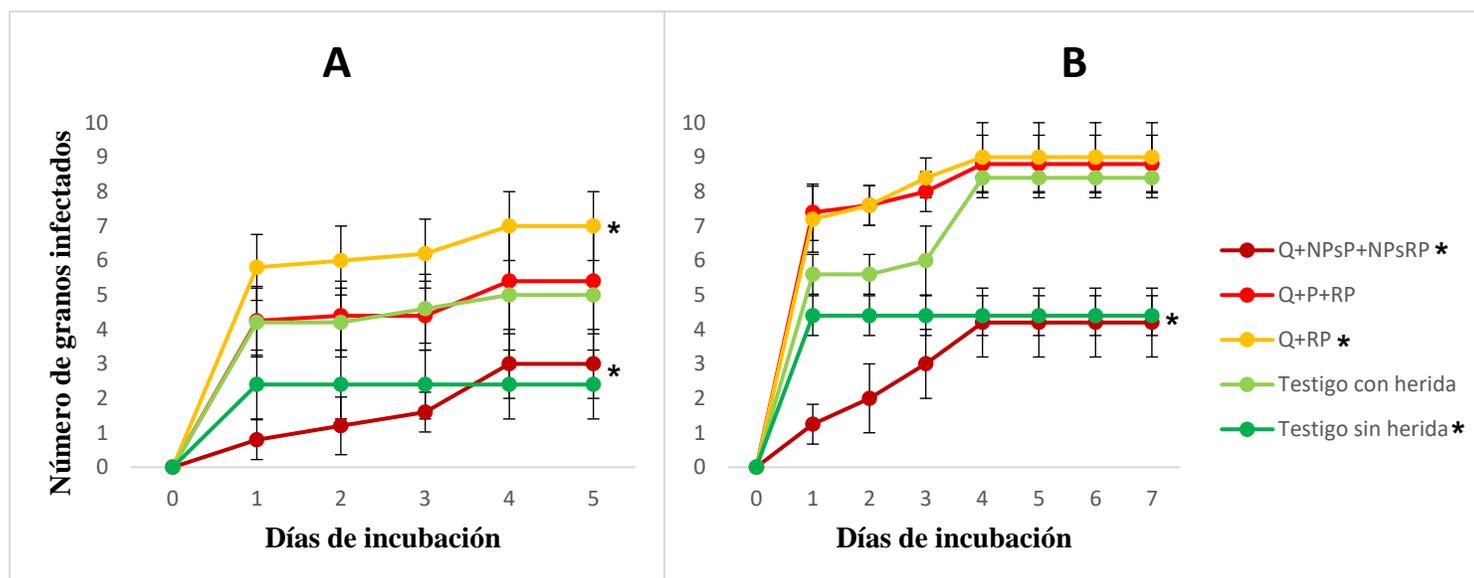


Figura 5. Incidencia de infección por *Aspergillus flavus* en granos de maíz, sin desinfectar (A) y desinfectados con etanol al 70% (B). *Q (Quitosano), P (Propóleo), NPsP (Nanopartículas de propóleo), NPsQ (Nanopartículas de quitosano) RP (Resina de pino), NPsRP (Nanopartículas de Resina de Pino) y Testigo (Agua).

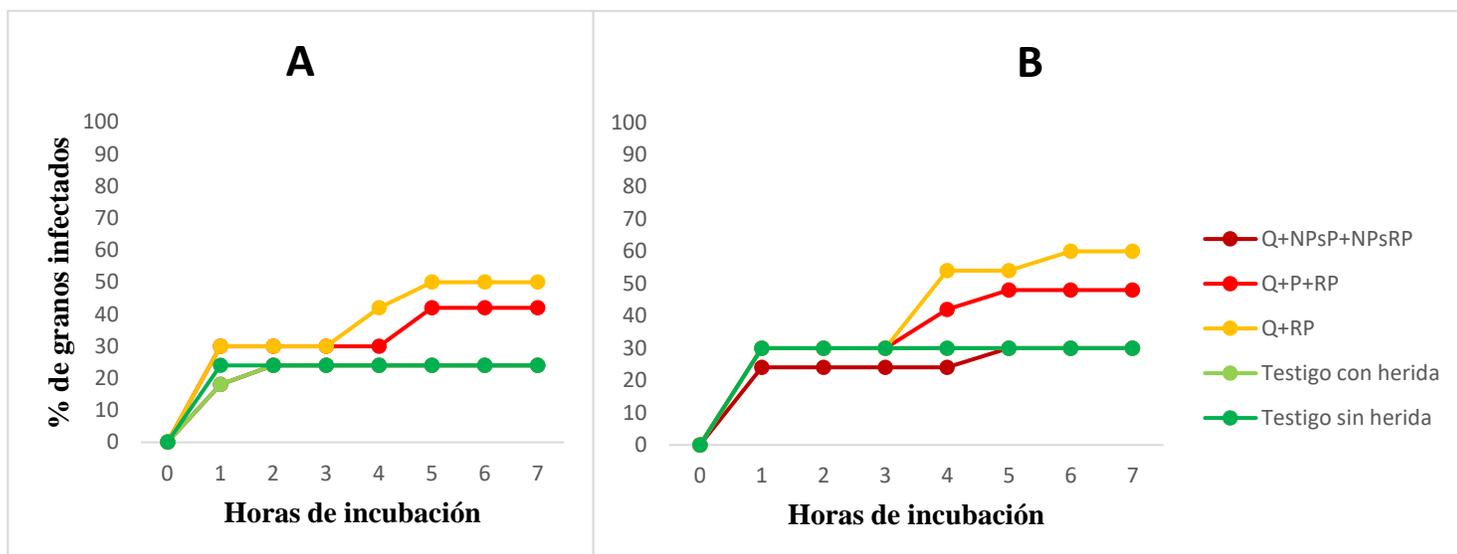


Figura 6. Porcentaje de infección por *Aspergillus flavus* en granos de maíz, sin desinfectar (A) y desinfectados con etanol al 70% (B). *Q (Quitósano), P (Propóleo), NPsP (Nanopartículas de propóleo), NPsQ (Nanopartículas de quitósano) RP (Resina de pino), NPsRP (Nanopartículas de Resina de Pino) y Testigo (Agua).

7.2.2 Germinación de granos de maíz

La germinación de granos maíz se observó en general en todos los tratamientos, a partir del día tres, sin embargo, los granos tratados con Q+P+RP, mostraron un mayor número de granos germinados (14 granos) como se puede observar en la Figura 7. Durante el día 4, 5 y 6 de incubación, los granos que fueron tratados con Q+P+RP y Q+RP mostraron una germinación estadísticamente similar ($P < 0.05$) a los granos testigo (Fig. 8).



Figura 7. Germinación de granos de maíz, por efecto de diferentes tratamientos y un Grupo Testigo, durante 6 días de incubación. *Q (Quitósano), P (Propóleo), NPsP (Nanopartículas de propóleo), NPsQ (Nanopartículas de quitósano) RP (Resina de pino), NPsRP (Nanopartículas de Resina de Pino) y Testigo (Agua).

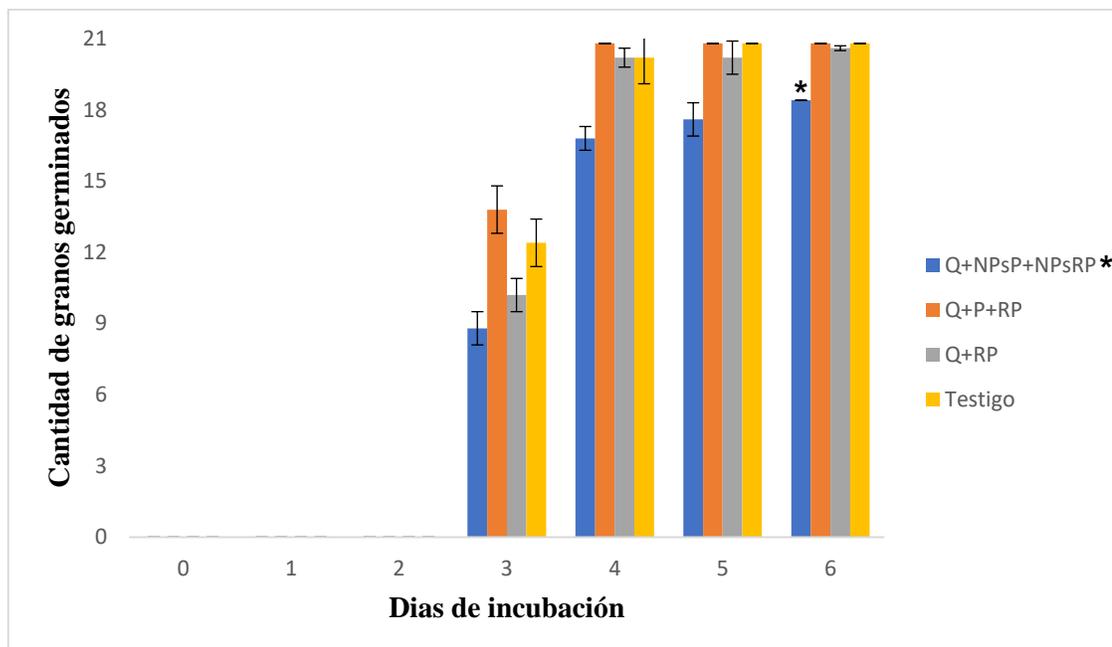


Figura 8. Germinación de granos de maíz, por efecto de diferentes tratamientos y un Grupo Testigo, durante 6 días de incubación. *Q (Quitosa), P (Propóleo), NPpP (Nanopartículas de propóleo), NPpQ (Nanopartículas de quitosa) RP (Resina de pino), NPpRP (Nanopartículas de Resina de Pino) y Testigo (Agua).

El crecimiento de la plántula de maíz fue 50% menor en los granos tratados con la mezcla de NP de resina de pino y NP de propóleo. Mientras que en los demás granos de maíz no hubo una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.01$) en su crecimiento.

Los granos que fueron tratados con Q+P+RP, mostraron un crecimiento de plántula y de radícula mayor (4.5 y 7.4 cm, respectivamente), que el resto de los tratamientos evaluados. El tratamiento que contenía nanopartículas mostró el menor crecimiento de plántula y radícula.

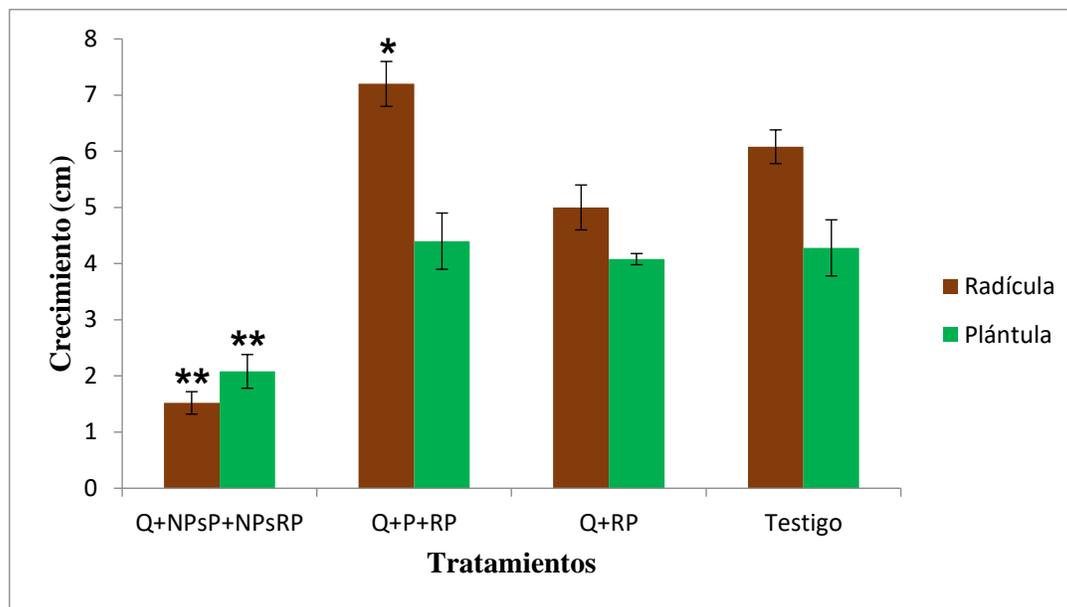


Figura 9. Crecimiento de la plántula y radícula de granos de maíz, tratados con quitosano, propóleo y resina de pino, en el 4° día después de la germinación. *Q (Quitosano), P (Propóleo), NPsP (Nanopartículas de propóleo), NPsQ (Nanopartículas de quitosano) RP (Resina de pino), NPsRP (Nanopartículas de Resina de Pino) y Testigo (Agua).

7.3 Resultados de ensayos en tortilla de maíz

7.3.1 Evaluación de aspectos de calidad de la tortilla

7.3.1.1 Porcentaje de humedad

En general, las tortillas elaboradas con granos tratados con Q+RP, tuvieron el mayor porcentaje de humedad con respecto al resto de los tratamientos mostrando diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) en las dos temperaturas de almacenamiento (5° y 28°C). Sin embargo, las tortillas elaboradas con granos tratados con Q+NPsP+NPsRP, fueron los que mostraron un menor porcentaje de humedad (Figura 9).

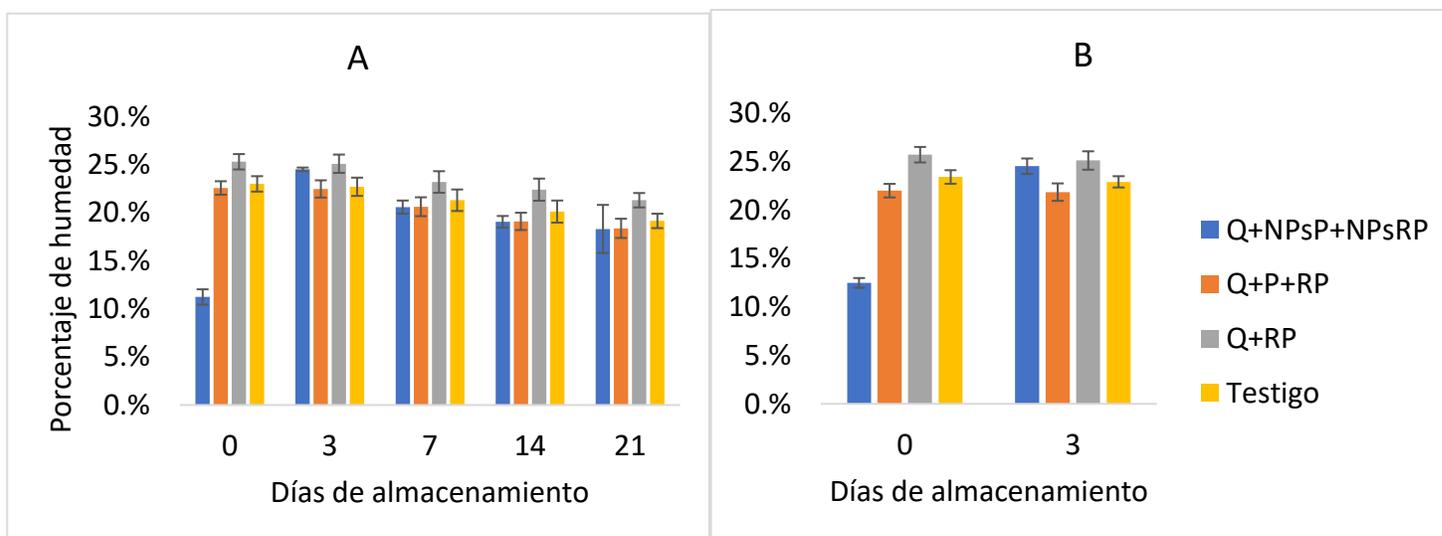


Figura 10. Porcentaje de humedad de las tortillas con diferentes tratamientos durante su almacenamiento a 5°C (A) y 28°C (B). *Q (Quitósano), P (Propóleo), NPsP (Nanopartículas de propóleo), NPsQ (Nanopartículas de quitósano) RP (Resina de pino), NPsRP (Nanopartículas de Resina de Pino) y Testigo (Agua).

7.3.1.2 Pérdida de peso

La pérdida de peso en todos los tratamientos no fue mayor al 1%. En general las tortillas elaboradas con granos testigo, fueron las que mostraron menor pérdida de peso, en las dos temperaturas de almacenamiento siendo estadísticamente diferentes al resto de los tratamientos (Figura 10).

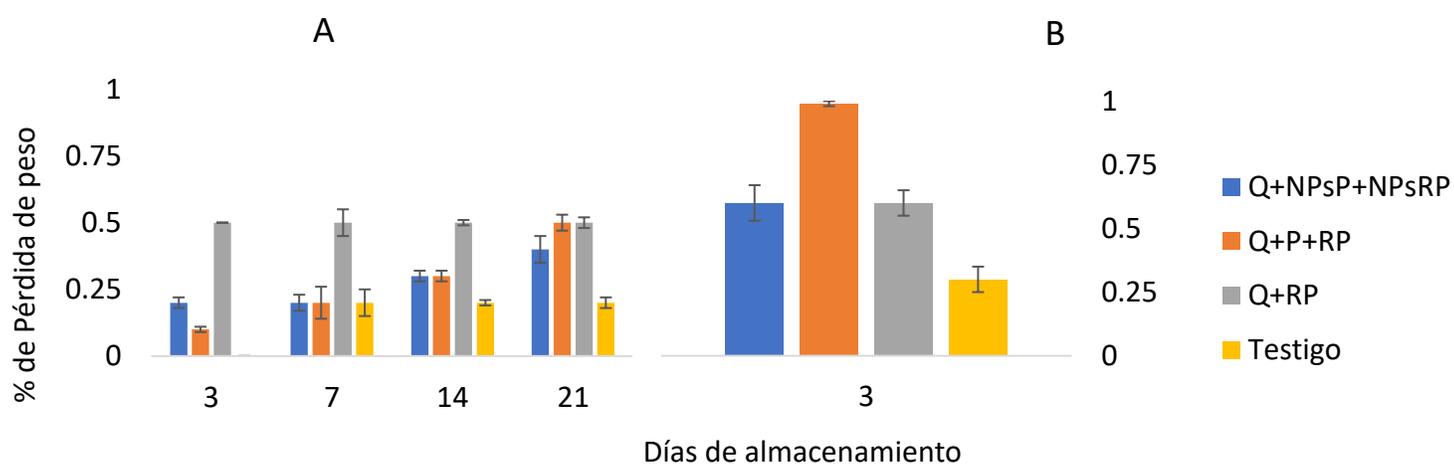


Figura 11. Pérdida de peso de las tortillas con diferentes tratamientos durante 21 días de almacenamiento. A= almacenamiento a 5°C: B= almacenamiento a 28°C. *Q (Quitosa), P (Propóleo), NPsP (Nanopartículas de propóleo), NPsQ (Nanopartículas de quitosa) RP (Resina de pino), NPsRP (Nanopartículas de Resina de Pino) y Testigo (Agua).

7.3.1.3 Rolabilidad

Las tortillas elaboradas con el maíz inoculado con *A. flavus* presentaron la mejor rolabilidad durante el almacenamiento. Mientras que las tortillas elaboradas con los granos de maíz tratados con resina de pino y propóleo en solución tuvieron la menor rolabilidad.

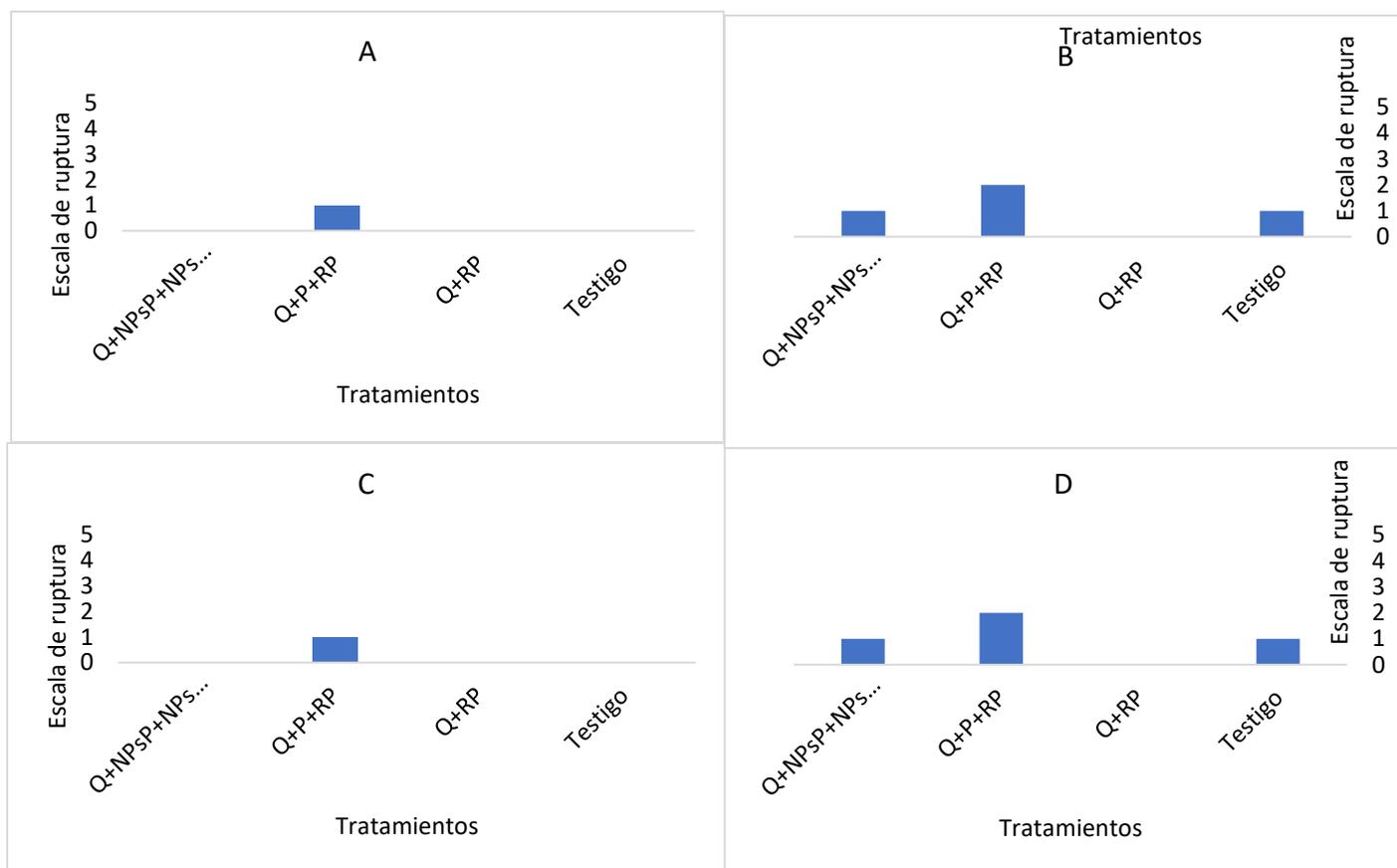


Figura 12. Rolabilidad de las tortillas. A = 5°C/1 día; B = 5°C/21 días; C = 28°C/ 1 día; D = 28°C/21 días. Escala: 0= sin ruptura, 1= 20% de ruptura, 2= 40% de ruptura, 3= 60% de ruptura, 4= 80% de ruptura, 5= 100% de ruptura. *Q (Quitosaño), P (Propóleo), NPsP (Nanopartículas de propóleo), NPsQ (Nanopartículas de quitosaño) RP (Resina de pino), NPsRP (Nanopartículas de Resina de Pino) y Testigo (Agua).

7.3.1.4 Color

La diferencia de color fue significativamente diferente entre todas las tortillas con los diferentes tratamientos y con respecto al día inicial. Específicamente las tortillas elaboradas con los granos de maíz tratados con Q+PR, tuvieron el menor cambio de color durante los 21 días de almacenamiento.

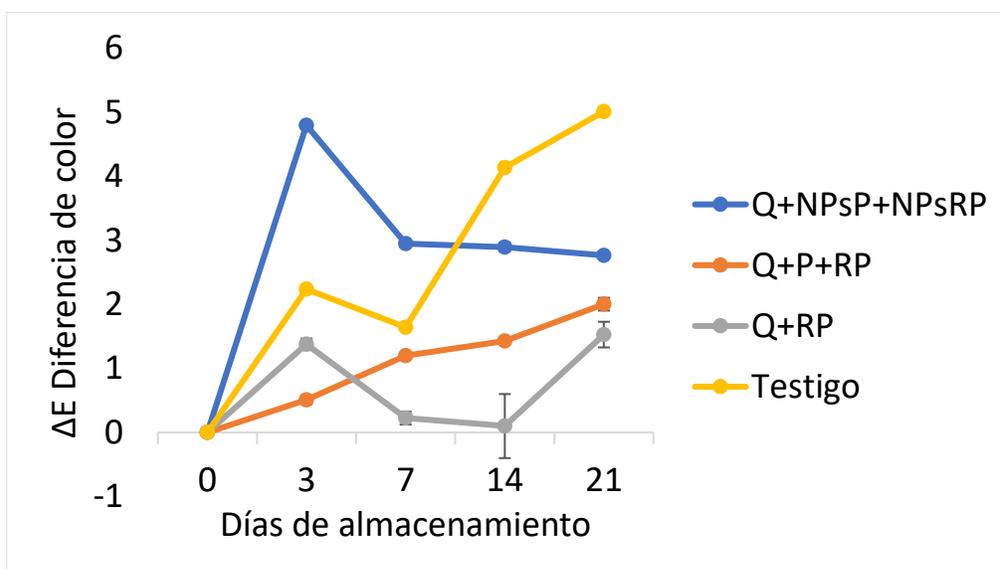


Figura 13. Diferencia de color observada en las tortillas con los diferentes tratamientos durante 21 días de almacenamiento, con respecto al día inicial. *Q (Quitosano), P (Propóleo), NPSP (Nanopartículas de propóleo), NPSPQ (Nanopartículas de quitosano) RP (Resina de pino), NPSPRP (Nanopartículas de Resina de Pino) y Testigo (Agua).

7.3.1.5 Calidad microbiológica

Todas las muestras de tortillas tomadas inmediatamente después de su cocción con exposición al hongo *A. flavus* almacenadas a 28 °C presentaron incidencia de este hongo en el día 3, lo que significa que las esporas pueden sobrevivir al proceso de nixtamalización. Las tortillas elaboradas con los granos inoculados y tratados con Q+NPsP+NPsRP, no mostraron crecimiento durante los 21 días de almacenamiento a 5°C. Las tortillas del grupo testigo sin *A. flavus* no presentaron incidencia de *A. flavus*, durante todos los días de almacenamiento.

Tabla 6. Incidencia de *A. flavus* en muestras de tortillas colocadas en medio Czapek y almacenadas a 5°C y 28°C.

Tratamientos	5°C			28°C			
	Día 0	Día 3	Día 7	Día 14	Día 21	Día 0	Día 3
Q+NPsP+NPsRP	-	-	-	-	-	-	+
Q+P+RP	+	+	+	+	-	+	+
Testigo con <i>A. flavus</i>	+	+	+	+	+	+	+
Testigo sin <i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-

*Q (Quitosano), P (Propóleo), NPsP (Nanopartículas de propóleo), NPsQ (Nanopartículas de quitosano) RP (Resina de pino), NPsRP (Nanopartículas de Resina de Pino) y Testigo (Agua). (+) Presencia de crecimiento micelial de *A. flavus*, (-) Ausencia de crecimiento micelial de *A. flavus*

7.3.2 Incidencia de *Aspergillus flavus*

Las tortillas elaboradas con granos infectados de *A. flavus* y tratados con Q+NPsP*NPsRP, no presentaron incidencia del hongo durante su almacenamiento de 21 días a 5°C, siendo estadísticamente diferente al resto de los tratamientos. sin embargo, en el día tres de almacenamiento a 28°C, no se observaron diferencias estadísticas entre los tratamientos evaluados (Tabla 7). En la Figura 14 se puede observar los cambios en las tortillas con incidencia de *A. flavus* junto con las muestras.

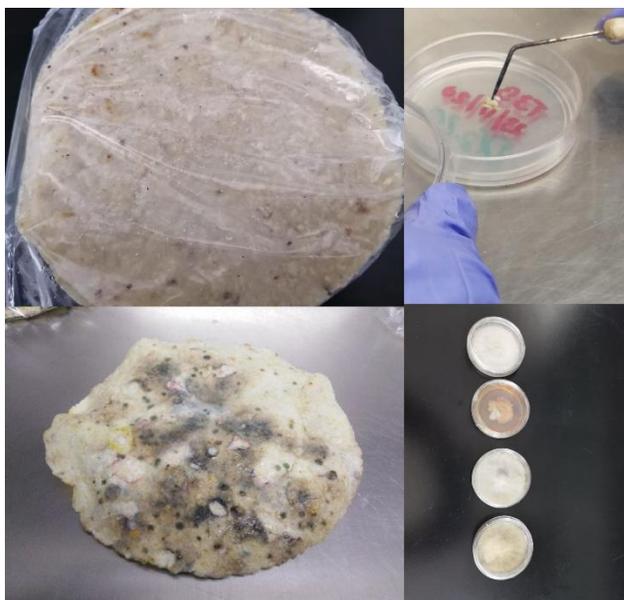


Figura 14. Infección y crecimiento de *A. flavus* en una tortilla en refrigeración a 5 °C después de 21 días, junto con sus muestras en medio Czapeck.

Tabla 7. Porcentaje de incidencia de *A. flavus* en tortillas almacenadas a 5°C y 28°C.

Tratamientos	5°C					28°C	
	Día 0	Día 3	Día 7	Día 14	Día 21	Día 0	Día 3
Q+NPsP+NPsRP	0	0	0	25	25	0	100
Q+P+RP	0	0	0	0	0	0	100
Testigo con <i>A. flavus</i>	0	0	20	50±5	50±3	0	100
Testigo sin <i>A. flavus</i>	0	0	0	15	33±5	0	100

*Q (Quitosano), P (Propóleo), NPsP (Nanopartículas de propóleo), NPsQ (Nanopartículas de quitosano) RP (Resina de pino), NPsRP (Nanopartículas de Resina de Pino) y Testigo (Agua).

7.3.3 Concentración de aflatoxinas

La concentración más baja de aflatoxinas se determinó en las muestras de tortillas elaboradas con Q+NPsP+NPsRP (0.9 ppb), seguida del tratamiento con Q+RP (1.3 ppb). que tenían el tratamiento T1 con nanopartículas de propóleo y nanopartículas de resina de pino, la segunda concentración más baja se observó en las tortillas que tenían el tratamiento 2 que contenía propóleo y resina de pino en solución, la tercera concentración más baja la obtuvo el grupo T4 que se usó como testigo negativo. Finalmente, las muestras de tortillas que presentaban la concentración más alta de aflatoxinas fueron las del grupo T4 que fueron inoculadas con *A. flavus* y no tenían ningún tratamiento.

Tabla 8. Concentración de aflatoxinas en ppb en muestras de tortillas al momento de su cocción y después de 21 días de almacenamiento a 5 °C.

Tratamientos	Concentración de aflatoxinas (ppb) 5°C	
	Día 0	Día 21
	Q+NPsP+NPsRP	0.9
Q+P+RP	1.3	1.8
Testigo con herida	2.4	3.2
Testigo sin herida	1.5	1.7

*Q (Quitosano), P (Propóleo), NPsP (Nanopartículas de propóleo), NPsQ (Nanopartículas de quitosano) RP (Resina de pino), NPsRP (Nanopartículas de Resina de Pino) y Testigo (Agua).

8. DISCUSIÓN

La evaluación de la inhibición del crecimiento micelial de *A. flavus* se realizó en los ensayos *in vitro* en medio Czapeck, mediante la técnica de envenenamiento del medio que utilizó resina de pino, propóleo y quitosano, en solución y en nanopartículas. Estos compuestos naturales se han utilizado previamente en otras investigaciones en las que han demostrado su capacidad antifúngica contra *A. flavus* (45,46,50,51,56,62,73–82). Al momento de la publicación de esta tesis no se han podido encontrar artículos que refieran investigaciones sobre el uso de resina de pino para inhibir el crecimiento micelial de *A. flavus*, o evitar su infección, ya sea *in vitro* o en granos de maíz. Sin embargo, los resultados demostraron que los tratamientos más efectivos eran los que contenían resina de pino en solución, logrando una inhibición del crecimiento micelial de hasta el 76% con respecto al grupo control después de 7 días de incubación a 28°C. Tao y colaboradores (2020), utilizaron un derivado de la resina de pino (5-fluoro-2-tiofeno deshidroabietil amida) para evaluar su actividad antifúngica, y determinaron que tenían excelentes propiedades antifúngicas contra *Botrytis cinerea* y *Fusarium oxysporum*, logrando una inhibición del 50% con una concentración del 0.618 mg/L en el medio (83). Del mismo modo, Mao y colaboradores (2021), utilizaron un derivado de resina de pino [deshidroabietil- (1,3,4-tiadiazol-2-il) -5-nitrotiofeno-2-carboxamida] el cual fue más efectivo que el anterior logrando una inhibición del 50% con una concentración del 0.490 mg/L . Ambos estudios determinaron que su actividad antifúngica se debía a la modificación de la morfología de sus micelios y el aumento de la permeabilidad

de sus membranas celulares, además los compuestos presentes en la resina de pino inhiben la síntesis ergosterol en la membrana celular del hongo (84).

Se evaluó el porcentaje de germinación de esporas obtenidas del ensayo *in vitro*, y se determinó que las cajas Petri que contenían tratamientos con resina de pino en solución o en nanopartículas, no desarrollaron esporas para el día 7 de incubación, este resultado podría deberse a la inhibición del desarrollo de conidios por parte de los monoterpenos (85).

Se evaluó la capacidad de inhibir la infección de *A. flavus*, realizando los ensayos en granos de maíz, mediante el recubrimiento de los granos con el tratamiento, y posteriormente fueron inoculados sumergiéndolos en una solución de esporas 1×10^6 . En estos ensayos, los tratamientos más eficaces fueron los que contenían nanopartículas, sin embargo, se mantenían dos aspectos de los resultados anteriores, los tratamientos que contenían resina de pino, eran más eficaces que los que contenían propóleo o quitosano y, además, la combinación de nanopartículas de resina de pino y nanopartículas de propóleo fue la más efectiva para evitar la infección de los granos por *A. flavus*, para el día 7 de incubación a 28°C.

Esta diferencia en los resultados de los ensayos *in vitro* en medio Czapeck y los resultados en granos de maíz, pudieran deberse a la capacidad que tienen las nanopartículas de adherirse mejor a los alimentos como los granos de maíz (56) y por lo tanto ser más efectivos para evitar la infección por *A. flavus*.

Otro aspecto evaluado, fue la viabilidad para germinar de los granos de maíz recubiertos con los tratamientos. Los granos que tenían un recubrimiento de nanopartículas presentaron un crecimiento menor de la plántula y la radícula, contrariamente, los granos que tenían un recubrimiento de resina de pino y propóleo en solución presentaron un crecimiento mayor de la plántula con respecto al grupo testigo. Una posible explicación para el primer resultado es que las nanopartículas al tener un menor tamaño lograron ingresar al interior de los granos afectando su metabolismo; Mujeebur, (2019), determinó que las nanopartículas afectan la germinación de las semillas, debido a que son absorbidas del medio ambiente a través de las raíces (86), anteriormente Dahui Lin sugirió la fitotoxicidad de las nanopartículas debido a que sus resultados mostraban una posible inhibición de la germinación de las semillas y crecimiento de las raíces(87), de manera similar a los resultados del presente estudio. Sin embargo, Dimitrios Stampoulis en el 2009 investigó la fitotoxicidad de 5 tipos de nanopartículas en 5 diferentes cultivos y determinó que la toxicidad era muy específica entre cada planta y compuesto, así como de la cantidad de nanopartículas (88), posteriormente Tushar (2014), revisó diversos artículos hasta ese momento sobre nanopartículas y recomendó que todos los tratamientos para semillas a base de nanopartículas fueran examinados para determinar su fitotoxicidad (89). Por el contrario, una posible explicación del mayor crecimiento en el segundo resultado podría ser que la resina de pino y el propóleo sirvieron como nutrientes para la planta una vez que germinaron los granos, sin embargo, no se encontraron otros estudios que confirmen estas especulaciones con la excepción de Ordoñez (2011), el cual determinó que el propóleo no afecta

negativamente la germinación de las semillas ni el crecimiento de las raíces de las plantas (90), por lo tanto, se sugiere realizar más investigaciones sobre la germinación de las semillas con recubrimientos de nanopartículas de quitosano, propóleo y resina de pino.

Además, se realizaron los ensayos para evaluar si los tratamientos o la infección de *A. flavus* en los granos de maíz afectaban la calidad de las tortillas elaboradas con estos granos. Los aspectos de calidad de las tortillas que se evaluaron fueron porcentaje de humedad, pérdida de peso, roabilidad y color, buscando que fueran lo más similares posibles al grupo testigo sin inocular y sin tratamiento que sirvió como referencia, siguiendo los lineamientos de calidad de las tortillas propuestos por Rodríguez- Martínez (2015) (64); además, Iuga (2019), determinó que las preferencias de los consumidores de tortillas se alinean con los aspectos de calidad evaluados en el presente estudio denotando que se prefieren las tortillas elaboradas a mano con el proceso original de nixtamalización(91).

La presencia de aflatoxinas en las tortillas de maíz justo después de su cocción fue mucho menor en las que contenían el tratamiento con nanopartículas, además, fue el único grupo que presentó una cantidad sin una diferencia estadísticamente significativa después de 21 días de almacenamiento, esto podría explicarse debido a que las nanopartículas tienen más eficacia al unirse al alimento y por lo tanto resistir al proceso de cocción y al mismo tiempo mantener su utilidad(92). Por otro lado, la presencia de aflatoxinas en todos los grupos podría explicarse debido a que

actualmente en México la presencia de *A. flavus* es habitual en todos los cultivos en menor o mayor medida(27,28,32).

9. CONCLUSIONES

1. La resina de pino en solución fue el tratamiento más efectivo para inhibir el crecimiento micelial de *A. flavus in vitro* en un 78% con respecto al grupo testigo. Además, la resina de pino en nanopartículas o en solución inhibió el desarrollo de esporas al final de los 7 días de incubación.
2. La mezcla de nanopartículas de propóleo y nanopartículas de resina de pino mostraron la menor incidencia de *A. flavus* en granos de maíz en comparación con el resto de los grupos, pero deterioraron el crecimiento de la radícula de los granos de maíz (2cm) con respecto al grupo testigo (6cm).
3. Las tortillas elaboradas con granos de maíz tratados con resina de pino y propóleo en solución no presentaron incidencia de *A. flavus* después de 21 días de almacenamiento a 5°C.

10. REFERENCIAS

1. Dhanasekaran D, Shanmugapriya S, Thajuddin N, Panneerselvam A. 2 Aflatoxins and Aflatoxicosis in Human and Animals [Internet]. [cited 2020 Aug 25]. Available from: www.intechopen.com
2. Ayala Armenta QA, Cortez Mondaca E, Apodaca Sánchez MÁ, Leal León VM, Valenzuela Escoboza FA, Palacios Mondaca CA. Efectividad de fungicidas convencionales y biorracionales sobre *Sclerotinia sclerotiorum* in vitro. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* [Internet]. 2018 Jan 18 [cited 2019 Oct 15];(11):2149. Available from: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S2007-09342015000902149&lng=pt&nrm=iso
3. Sotelo-Boyás M, Correa-Pacheco Z, Bautista-Baños S, Gómez y Gómez Y. Release study and inhibitory activity of thyme essential oil-loaded chitosan nanoparticles and nanocapsules against foodborne bacteria. *International Journal of Biological Macromolecules* [Internet]. 2017 Oct 1 [cited 2019 Sep 1]; 103:409–14. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813016324825?via%3Diuhb>
4. Sotelo-Boyás ME, Correa-Pacheco ZN, Bautista-Baños S, Corona-Rangel ML. Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles and nanocapsules incorporated with lime essential oil and their antibacterial activity against foodborne pathogens. *LWT - Food Science and Technology* [Internet]. 2017 Apr 1 [cited 2019 Sep 1]; 77:15–20. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643816306934>
5. Godfray HCJ, Beddington JR, Crute IR, Haddad L, Lawrence D, Muir JF, et al. Food security: The challenge of feeding 9 billion people. *Vol. 327, Science*. 2010. p. 812–8.
6. Rohm H, Oostindjer M, Aschemann-Witzel J, Symmank C, L. Almlí V, de Hooge I, et al. Consumers in a Sustainable Food Supply Chain (COSUS): Understanding Consumer Behavior to Encourage Food Waste Reduction. *Foods* [Internet]. 2017 Nov 27 [cited 2021 May 19];6(12):104. Available from: [/pmc/articles/PMC5742772/](https://pmc/articles/PMC5742772/)
7. Ishangulyyev R, Kim S, Lee SH. Understanding food loss and waste-why are we losing and wasting food? *Foods* [Internet]. 2019 [cited 2021 Jan 6];8(8). Available from: [/pmc/articles/PMC6723314/?report=abstract](https://pmc/articles/PMC6723314/?report=abstract)
8. Wang J, Diao H, Tou L. Research on the influence mechanism of rational consumers' food safety supervision satisfaction. *International Journal of Environmental Research and Public Health* [Internet]. 2019 Mar 1 [cited 2021 Jan 6];16(5). Available from: [/pmc/articles/PMC6427581/?report=abstract](https://pmc/articles/PMC6427581/?report=abstract)

9. Savelli CJ, Bradshaw A, ben Embarek P, Mateus C. The FAO/WHO International Food Safety Authorities Network in Review, 2004-2018: Learning from the Past and Looking to the Future. *Foodborne Pathogens and Disease* [Internet]. 2019 Jul 1 [cited 2020 Jan 28];16(7):480–8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6653783/>
10. Teller RS, Schmidt RJ, Whitlow LW, Kung L. Effect of physical damage to ears of corn before harvest and treatment with various additives on the concentration of mycotoxins, silage fermentation, and aerobic stability of corn silage. *Journal of Dairy Science* [Internet]. 2012 Mar [cited 2021 Apr 6];95(3):1428–36. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22365225/>
11. Yimaer A, Chen G, Zhang M, Zhou L, Fang X, Jiang W. Childhood pesticide poisoning in Zhejiang, China: A retrospective analysis from 2006 to 2015. *BMC Public Health* [Internet]. 2017 Jun 28 [cited 2020 Dec 30];17(1). Available from: [/pmc/articles/PMC5490151/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5490151/?report=abstract)
12. Francis GA, Gallone A, Nychas GJ, Sofos JN, G, Amodio ML, et al. Factors Affecting Quality and Safety of Fresh-Cut Produce. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [Internet]. 2012 Jul [cited 2021 Apr 6];52(7):595–610. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22530712/>
13. Shuping DSS, Eloff JN. THE USE OF PLANTS TO PROTECT PLANTS AND FOOD AGAINST FUNGAL PATHOGENS: A REVIEW [Internet]. Vol. 14, *African journal of traditional, complementary, and alternative medicines: AJTCAM. Afr J Tradit Complement Altern Med*; 2017 [cited 2021 Apr 6]. p. 120–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28638874/>
14. OMS. Aflatoxinas [Internet]. 2017 [cited 2019 Sep 1]. Available from: https://www.who.int/foodsafety/FSDigest_Aflatoxins_SP.pdf
15. OMS. Marco mundial de vigilancia integral para la prevención y el control de las ENT. WHO. 2015;
16. Battilani P, Barbano C, Logrieco A. Risk Assessment and Safety Evaluation of Mycotoxins in Fruits. In: *Mycotoxins in Fruits and Vegetables* [Internet]. Elsevier Inc.; 2008 [cited 2019 Sep 1]. p. 1–26. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123741264000012>
17. Plascencia-Jatomea M, Susana M, Gómez Y, Velez-Haro JM. *Aspergillus* spp. (Black Mold). Postharvest Decay [Internet]. 2014 Jan 1 [cited 2019 Aug 14];267–86. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124115521000089>
18. Dadzie MA, Oppong A, Ofori K, Eleblu JS, Ifie EB, Blay E, et al. Distribution of *Aspergillus flavus* and aflatoxin accumulation in stored maize grains across three agro-ecologies in Ghana. *Food Control* [Internet]. 2019 Oct 1 [cited 2019 Aug 14];

- 104:91–8. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713519301963?via%3DiHub>
19. Jackson SA, Dobson ADW. Yeasts and Molds: *Aspergillus flavus*. Reference Module in Food Science [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2019 Aug 14]; Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081005965010866>
 20. Barkai-Golan R. *Aspergillus* Mycotoxins. In: Mycotoxins in Fruits and Vegetables [Internet]. Elsevier Inc.; 2008 [cited 2019 Sep 1]. p. 115–51. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123741264000061>
 21. OMS. OMS | Cáncer. WHO [Internet]? 2017 [cited 2019 Nov 12]; Available from:
<https://www.who.int/topics/cancer/es/>
 22. Chen CJ, Yu MW, Liaw YF. Epidemiological characteristics and risk factors of hepatocellular carcinoma. In: Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia) [Internet]. Blackwell Publishing; 1997. Available from:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1440-1746.1997.tb00513.x?sid=nlm%3Apubmed>
 23. Lewis L, Onsongo M, Njapau H, Schurz-Rogers H, Lubber G, Kieszak S, et al. Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in eastern and central Kenya. *Environmental Health Perspectives*. 2005;113(12):1763–7.
 24. Wu F, Khlangwiset P. Health economic impacts and cost-effectiveness of aflatoxin-reduction strategies in Africa: Case studies in biocontrol and post-harvest interventions. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* [Internet]. 2010 Apr [cited 2021 Jan 10];27(4):496–509. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20234965/>
 25. Moreno-Pedraza A, Valdés-Santiago L, en DC, Josefina Hernández-Valadez L, Rodríguez-Sixtos Higuera A, Winkler R, et al. Reduction of aflatoxin B 1 during tortilla production and identification of degradation by-products by direct-injection electrospray mass spectrometry Guzmán-de Peña DL. Reduction of aflatoxin B 1 during tortilla production and the identification of degradation by-products by direct-injection electrospray mass spectrometry (DIESI-MS). *Salud Publica*. Vol. 57, Mex. 2015.
 26. Schaarschmidt S, Fauhl-Hassek C. Mycotoxins during the processes of nixtamalization and tortilla production. Vol. 11, *Toxins*. MDPI AG; 2019.
 27. Hernández-Delgado S, Reyes-López MÁ, García-Olivares JG, Mayek-Pérez N, Reyes-Méndez CA. Incidencia de Hongos Potencialmente Toxígenos en Maíz (*Zea mays* L.) Almacenado y Cultivado en el Norte de Tamaulipas, México. *Revista mexicana de fitopatología* [Internet]. 2007 [cited 2019 Sep 2];25(2):127–33. Available from:

- http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092007000200006&lng=es&nrm=iso&tlng=es
28. Martínez Padrón HY, Hernández Delgado S, Reyes Méndez CA, Vázquez Carrillo G. El Género *Aspergillus* y sus Micotoxinas en Maíz en México: Problemática y Perspectivas. *Revista mexicana de fitopatología* [Internet]. 2013 [cited 2019 Oct 15];31(2):126–46. Available from: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092013000200005&lng=es&nrm=iso&tlng=es
 29. Quevedo-Garza PA, Amador-Espejo GG, Salas-García R, Ramos-Peña EG, Trujillo AJ. Aflatoxin M1 Determination in Infant Formulae Distributed in Monterrey, Mexico. *Toxins (Basel)* [Internet]. 2020 Feb 4 [cited 2021 Jan 6];12(2):100. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6651/12/2/100>
 30. Marina Román-Montes C, Gonzalez-Lara MF, Ponce de Leon A, Valenzuela-Almada MO, Rangel-Cordero A. 1696. Epidemiology, Clinical Characteristics and Outcomes of Invasive Aspergillosis in a Tertiary Care Hospital in Mexico. *Open Forum Infectious Diseases* [Internet]. 2019 Oct 23 [cited 2021 May 19];6(Supplement_2): S621–S621. Available from: </pmc/articles/PMC6810181/>
 31. Shekhar M, Singh N, Dutta R, Kumar S, Mahajan V. Comparative study of qualitative and quantitative methods to determine toxicity level of *Aspergillus flavus* isolates in maize. *PLoS ONE* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2021 Jan 16];12(12). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29244880/>
 32. Arturo Díaz–Franco y Noé Montes–García. La Fitopatología en la Región Semiárida de Tamaulipas, México: Reseña Histórica. *Revista mexicana de fitopatología* [Internet]. 2008 [cited 2019 Sep 2];26(1):62–70. Available from: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092008000100010&lng=es&nrm=iso&tlng=es
 33. Payne GA. Mycotoxins and Product Safety. *Peanuts* [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2019 Aug 14];347–61. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781630670382000125>
 34. Battilani P, Toscano P, van der Fels-Klerx HJ, Moretti A, Camardo Leggieri M, Brera C, et al. Aflatoxin B 1 contamination in maize in Europe increases due to climate change. *Scientific Reports* [Internet]. 2016 Apr 12 [cited 2019 Sep 1];6. Available from: <https://www.nature.com/articles/srep24328>
 35. Sanzani SM, Reverberi M, Geisen R. Mycotoxins in harvested fruits and vegetables: Insights in producing fungi, biological role, conducive conditions, and tools to manage postharvest contamination. *Postharvest Biology and Technology* [Internet]. 2016 Dec 1 [cited 2019 Sep 1]; 122:95–105. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0925521416301405>

36. Boedeker W, Watts M, Clausing P, Marquez E. The global distribution of acute unintentional pesticide poisoning: estimations based on a systematic review. *BMC Public Health* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2020 Dec 30];20(1). Available from: [/pmc/articles/PMC7720593/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30037493/)
37. Paul BS, Paul G, Kaur J, Singh G. Chorea as unusual complication of fungicide poisoning. *Journal of Postgraduate Medicine* [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2020 Dec 17];63(1):53–4. Available from: [/pmc/articles/PMC5394821/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30037493/)
38. Dan WJ, Tuong TML, Wang DC, Li D, Zhang AL, Gao JM. Natural products as sources of new fungicides (V): Design and synthesis of acetophenone derivatives against phytopathogenic fungi in vitro and in vivo. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* [Internet]. 2018 Sep 15 [cited 2021 Apr 7];28(17):2861–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30037493/>
39. Lorsbach BA, Sparks TC, Cicchillo RM, Garizi N v., Hahn DR, Meyer KG. Natural products: a strategic lead generation approach in crop protection discovery. *Pest Management Science* [Internet]. 2019 [cited 2021 Apr 7];75(9):2301–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30672097/>
40. Snini SP, Mathieu F. Biocontrol agents and natural compounds against mycotoxinogenic fungi [Internet]. Vol. 12, *Toxins*. MDPI AG; 2020 [cited 2021 Apr 7]. Available from: [/pmc/articles/PMC7354559/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30672097/)
41. Sforcin JM. Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis [Internet]. Vol. 30, *Phytotherapy Research*. John Wiley and Sons Ltd; 2016 [cited 2019 Sep 1]. p. 894–905. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ptr.5605>
42. Zabaoui N, Fouache A, Trousson A, Baron S, Zellagui A, Lahouel M, et al. biological properties of propolis extracts: Something new from an ancient product [Internet]. Vol. 207, *Chemistry and Physics of Lipids*. Elsevier Ireland Ltd; 2017 [cited 2019 Sep 1]. p. 214–22. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0009308417300257?via%3Dihub>
43. Ramón-Sierra J, Martínez-Guevara JL, Pool-Yam L, Magaña-Ortiz D, Yam-Puc A, Ortiz-Vázquez E. Effects of phenolic and protein extracts from Melipona beecheii honey on pathogenic strains of Escherichia coli and Staphylococcus aureus. *Food Science and Biotechnology* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2021 May 19];29(7):1013–21. Available from: [/pmc/articles/PMC7297938/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30672097/)
44. Mattiuz BH, Ducamp-Collin MN, Mattiuz CFM, Vigneault C, Marques KM, Sagoua W, et al. Effect of propolis on postharvest control of anthracnose and quality parameters of “Kent” mango. *Scientia Horticulturae* [Internet]. 2015 Mar 5 [cited

- 2019 Sep 1]; 184:160–8. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304423814007183>
45. Ghaly MF, Ezzat SM, Sarhan MM. Use of Propolis and Ultrariseofulvin to Inhibit Aflatoxigenic Fungi. *Folia Microbiologica* [Internet]. 1998 [cited 2021 Jan 1];43(2):156–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9721607/>
 46. Cortés-Higareda M, de Lorena Ramos-García M, Correa-Pacheco ZN, del Río-García JC, Bautista-Baños S. Nanostructured chitosan/propolis formulations: characterization and effect on the growth of *Aspergillus flavus* and production of aflatoxins. *Heliyon* [Internet]. 2019 May 1 [cited 2021 Jan 16];5(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31193581/>
 47. Aparicio-García PF, Ventura-Aguilar RI, del Río-García JC, Hernández-López M, Guillén-Sánchez D, Salazar-Piña DA, et al. Edible chitosan/propolis coatings and their effect on ripening, development of *aspergillus flavus*, and sensory quality in fig fruit, during controlled storage. *Plants* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2021 May 19];10(1):1–12. Available from: [/pmc/articles/PMC7827674/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3517674/)
 48. Romanazzi G, Feliziani E, Baños SB, Sivakumar D. Shelf-life extension of fresh fruit and vegetables by chitosan treatment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [Internet]. 2017 Feb 11 [cited 2019 Sep 1];57(3):579–601. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2014.900474?journalCode=bfsn20>
 49. Hosseinnejad M, Jafari SM. Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan [Internet]. Vol. 85, *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V.; 2016 [cited 2019 Sep 1]. p. 467–75. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014181301630023X>
 50. de Souza RHFV, Takaki M, de Oliveira Pedro R, Gabriel JDS, Tiera MJ, de Oliveira Tiera VA. Hydrophobic effect of amphiphilic derivatives of chitosan on the antifungal activity against *aspergillus flavus* and *aspergillus parasiticus*. *Molecules*. 2013 Apr;18(4):4437–50.
 51. Hernández-Téllez CN, Rodríguez-Córdova FJ, Rosas-Burgos EC, Cortez-Rocha MO, Burgos-Hernández A, Lizardi-Mendoza J, et al. Activity of chitosan–lysozyme nanoparticles on the growth, membrane integrity, and β -1,3-glucanase production by *Aspergillus parasiticus*. *3 Biotech*. 2017 Oct 1;7(5).
 52. Savluchinske-Feio S, Curto MJM, Gigante B, Roseiro JC. Antimicrobial activity of resin acid derivatives [Internet]. Vol. 72, *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2006 [cited 2019 Sep 5]. p. 430–6. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00253-006-0517-0>
 53. Wang J, Chen YP, Yao K, Wilbon PA, Zhang W, Ren L, et al. Robust antimicrobial compounds, and polymers derived from natural resin acids. *Chemical*

- Communications [Internet]. 2012 Dec 14 [cited 2020 May 20];48(6):916–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22143352/>
54. Ulukanli Z, Karabörklü S, Bozok F, Ates B, Erdogan S, Cenet M, et al. Chemical composition, antimicrobial, insecticidal, phytotoxic and antioxidant activities of Mediterranean *Pinus brutia* and *Pinus pinea* resin essential oils. *Chinese Journal of Natural Medicines*. 2014 Dec 1;12(12):901–10.
 55. Mitić ZS, Jovanović B, Jovanović S, Mihajilov-Krstev T, Stojanović-Radić ZZ, Cvetković VJ, et al. Comparative study of the essential oils of four *Pinus* species: Chemical composition, antimicrobial, and insect larvicidal activity. *Industrial Crops and Products* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2019 Sep 1]; 111:55–62. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669017306805>
 56. Sotelo-Boyás ME, Bautista-Baños S, Correa-Pacheco ZN, Jiménez-Aparicio A, Sivakumar D. Biological Activity of Chitosan Nanoparticles Against Pathogenic Fungi and Bacteria. In: *Chitosan in the Preservation of Agricultural Commodities* [Internet]. Elsevier Inc.; 2016 [cited 2019 Sep 1]. p. 339–49. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128027356000136>
 57. Shukla SK, Mishra AK, Arotiba OA, Mamba BB. Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review [Internet]. Vol. 59, *International Journal of Biological Macromolecules*. 2013 [cited 2019 Sep 1]. p. 46–58. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813013002262?via%3DiHub>
 58. Falade TDO, Chrysanthopoulos PK, Hodson MP, Sultanbawa Y, Fletcher M, Darnell R, et al. Metabolites identified during varied doses of aspergillus species in zea mays grains, and their correlation with aflatoxin levels. *Toxins (Basel)* [Internet]. 2018 May 1 [cited 2021 Jan 16];10(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29735944/>
 59. Variane ACF, Santos FC dos, Castro FF de, Barbosa-Tessmann IP, Santos GT dos, Pozza MS dos S. The occurrence of aflatoxigenic *Aspergillus* spp. in dairy cattle feed in Southern Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* [Internet]. 2018 Oct 1 [cited 2021 Jan 9];49(4):919–28. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30174202/>
 60. Ahmed TA, Aljaeid BM. Preparation, characterization, and potential application of chitosan, chitosan derivatives, and chitosan metal nanoparticles in pharmaceutical drug delivery [Internet]. Vol. 10, *Drug Design, Development and Therapy*. Dove Medical Press Ltd.; 2016 [cited 2021 Jan 9]. p. 483–507. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26869768/>
 61. Ong TH, Chitra E, Ramamurthy S, Rajinikanth PS, Yuen KH, Ambu SP, et al. Correction: Chitosan-propolis nanoparticle formulation demonstrates anti-bacterial

- activity against *Enterococcus faecalis* biofilms (PLOS ONE (2017) 12:3 (e0174888) DOI: 10.1371/journal.pone.0174888) [Internet]. Vol. 12, PLOS ONE. Public Library of Science; 2017 [cited 2021 Jan 9]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28426772/>
62. Cortés-Higareda M, de Lorena Ramos-García M, Correa-Pacheco ZN, del Río-García JC, Bautista-Baños S. Nanostructured chitosan/propolis formulations: characterization and effect on the growth of *Aspergillus flavus* and production of aflatoxins. *Heliyon*. 2019 May 1;5(5).
 63. Shakeel Q, Lyu A, Zhang J, Wu M, Li G, Hsiang T, et al. Biocontrol of *Aspergillus flavus* on Peanut Kernels using *Streptomyces yanglinensis* 3-10. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2018 May 23 [cited 2021 Jan 9];9(MAY). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29875755/>
 64. Rodríguez-Martínez NA, Salazar-García MG, Ramírez-Wong B, Islas-Rubio AR, Platt-Lucero LC, Morales-Rosas I, et al. Effect of Malting and Nixtamalization Processes on the Physicochemical Properties of Instant Extruded Corn Flour and Tortilla Quality. *Plant Foods for Human Nutrition* [Internet]. 2015 Sep 19 [cited 2020 Sep 10];70(3):275–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26059113/>
 65. Arámbula-Villa G, Figueroa-Rivera MG, Rendón-Villalobos R, Mendoza-Elos M, Figueroa-Cárdenas JD, Castanedo-Pérez R, et al. Chemical acetylation of nixtamalized maize flour and structural, rheological and physicochemical properties of flour, dough and tortillas. *Journal of Food Science and Technology*. 2018 Mar 1;55(3):1065–73.
 66. Sandoval D Y Vázquez S, Lilia C. Vida de Anaquel de tortillas de Maíz Nixtamalizado Shelf Life of Nixtamalized Corn Tortillas. Sánchez Sandoval y Vázquez Chávez. 2018.
 67. Chimimba J, Pratt R, Cuellar M, Delgado E. Quality Parameters of Masa, and Tortillas Produced from Blue Maize (*Zea mays* sp. mays) Landraces. *Journal of Food Science* [Internet]. 2019 Feb 1 [cited 2020 Sep 10];84(2):213–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30726578/>
 68. Rojas-Molina I, Mendoza-Avila M, Cornejo-Villegas MDLÁ, Real-López A del, Rivera-Muñoz E, Rodríguez-García M, et al. Physicochemical properties and resistant starch content of corn tortilla flours refrigerated at different storage times. *Foods* [Internet]. 2020 Apr 1 [cited 2020 Sep 10];9(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32811111/>
 69. Mathias-Rettig K, Ah-Hen K. El color en los alimentos un criterio de calidad medible. *Agro Sur* [Internet]. 2014 Aug 29 [cited 2020 Dec 18];42(2):57–66. Available from: <http://revistas.uach.cl/index.php/agrosur/article/view/4110>
 70. Smith SD. Quantifying Color Variation: Improved Formulas for Calculating Hue with Segment Classification. *Applications in Plant Sciences* [Internet]. 2014 Mar [cited

2020 Dec 18];2(3):1300088. Available from:
[/pmc/articles/PMC4103106/?report=abstract](#)

71. [Conservación y estabilidad de las tortillas de maíz a temperatura ambiente] - PubMed [Internet]. [cited 2021 Jun 13]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8729263/>
72. [Evaluación de la calidad de nixtamal-tortilla de mezclas de maíz (*Zea mays*) y frijoles duros (*Phaseolus vulgaris*)] - PubMed [Internet]. [cited 2021 Jun 13]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9673701/>
73. Iadnut A, Mamoon K, Thammasit P, Pawichai S, Tima S, Preechasuth K, et al. In vitro antifungal and antivirulence activities of biologically synthesized ethanolic extract of propolis-loaded PLGA Nanoparticles against *Candida albicans*. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine [Internet]. 2019 [cited 2020 Aug 27];2019. Available from: [/pmc/articles/PMC6907039/?report=abstract](#)
74. Özcan M. Inhibition of *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 by Pollen and Propolis Extracts. *Journal of Medicinal Food*. 2004 Mar;7(1):114–6.
75. Torlak E, Sert D. Antibacterial effectiveness of chitosan-propolis coated polypropylene films against foodborne pathogens. *International Journal of Biological Macromolecules* [Internet]. 2013 Sep [cited 2019 Sep 5]; 60:52–5. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813013002766?via%3Dihub>
76. Pepeljnjak S, Jalsenjak I, Maysinger D. Inhibition of growth and biosynthesis of ochratoxin A in *Aspergillus sulphureus* NRRL 4077 by propolis extract. *Pharmazie* [Internet]. 1982 Jun [cited 2019 Dec 10];37(6):439–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7122687>
77. Aly SA, Elewa NA. The effect of Egyptian honeybee propolis on the growth of *Aspergillus versicolor* and sterigmatocystin biosynthesis in Ras cheese. *Journal of Dairy Research*. 2007 Feb;74(1):74–8.
78. Hernández-Téllez CN, Rodríguez-Córdova FJ, Rosas-Burgos EC, Cortez-Rocha MO, Burgos-Hernández A, Lizardi-Mendoza J, et al. Activity of chitosan–lysozyme nanoparticles on the growth, membrane integrity, and β -1,3-glucanase production by *Aspergillus parasiticus*. *3 Biotech* [Internet]. 2017 Oct 1 [cited 2019 Nov 12];7(5). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5549029/>
79. Galván Márquez I, Akuaku J, Cruz I, Cheetham J, Golshani A, Smith ML. Disruption of protein synthesis as antifungal mode of action by chitosan. *International Journal of Food Microbiology* [Internet]. 2013 Jun 3 [cited 2020 Aug 27];164(1):108–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23624539/>

80. de Oliveira Pedro R, Takaki M, Gorayeb TCC, Bianchi VL del, Thomeo JC, Tiera MJ, et al. Synthesis, characterization and antifungal activity of quaternary derivatives of chitosan on *Aspergillus flavus*. *Microbiological Research*. 2013 Jan 15;168(1):50–5.
81. de Souza EL, Sales C v., de Oliveira CEV, Lopes LAA, da Conceição ML, Berger LRR, et al. Efficacy of a coating composed of chitosan from *Mucor circinelloides* and carvacrol to control *Aspergillus flavus* and the quality of cherry tomato fruits. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2015 [cited 2021 Jan 15];6(JUL). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26257717/>
82. Aloui H, Khwaldia K, Licciardello F, Mazzaglia A, Muratore G, Hamdi M, et al. Efficacy of the combined application of chitosan and Locust Bean Gum with different citrus essential oils to control postharvest spoilage caused by *Aspergillus flavus* in dates. *International Journal of Food Microbiology*. 2014 Jan 17;170:21–8.
83. Tao P, Wu C, Hao J, Gao Y, He X, Li J, et al. Antifungal Application of Rosin Derivatives from Renewable Pine Resin in Crop Protection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [Internet]. 2020 Apr 8 [cited 2021 Jun 13];68(14):4144–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32191457/>
84. Mao S, Wu C, Gao Y, Hao J, He X, Tao P, et al. Pine Rosin as a Valuable Natural Resource in the Synthesis of Fungicide Candidates for Controlling *Fusarium oxysporum* on Cucumber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [Internet]. 2021 Jun 2 [cited 2021 Jun 13];acs.jafc.1c01887. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.1c01887>
85. Scariot FJ, Foresti L, Delamare APL, Echeverrigaray APLS. Activity of monoterpenoids on the in vitro growth of two *Colletotrichum* species and the mode of action on *C. acutatum*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2021 Jun 13];170. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32980053/>
86. Khan MR, Adam V, Rizvi TF, Zhang B, Ahamad F, Joško I, et al. Nanoparticle–Plant Interactions: Two-Way Traffic [Internet]. Vol. 15, Small. Wiley-VCH Verlag; 2019 [cited 2021 May 31]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31318142/>
87. Lin D, Xing B. Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth. *Environmental Pollution* [Internet]. 2007 Nov [cited 2021 May 31];150(2):243–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17374428/>
88. Stampoulis D, Sinha SK, White JC. Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants. *Environmental Science and Technology* [Internet]. 2009 Dec 15 [cited 2021 May 31];43(24):9473–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19924897/>
89. Yadav T, Mungray AA, Mungray AK. Fabricated nanoparticles: Status and potential phytotoxic threats. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*

- [Internet]. 2014 [cited 2021 May 31];230:83–110. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24609519/>
90. Ordóñez RM, Zampini IC, Moreno MIN, Isla MI. Potential application of Northern Argentine propolis to control some phytopathogenic bacteria. *Microbiological Research* [Internet]. 2011 Oct 20 [cited 2021 May 31];166(7):578–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21237629/>
 91. Iuga M, Ávila Akerberg VD, González Martínez TM, Mironeasa S. Consumer preferences and sensory profile related to the physico-chemical properties and texture of different maize tortillas types. *Foods* [Internet]. 2019 [cited 2020 Sep 10];8(11). Available from: </pmc/articles/PMC6915414/?report=abstract>
 92. Kroker-Lobos MF, Alvarez CS, Rivera-Andrade A, Smith JW, Egner P, Torres O, et al. Association between aflatoxin-albumin adduct levels and tortilla consumption in Guatemalan adults. *Toxicology Reports*. 2019 Jan 1;6:465–71.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FORMATO 3A

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.
Formato. Voto Sinodal.**

**COMISIÓN ACADÉMICA DE
LA MAESTRÍA EN CIENCIAS
DE LA NUTRICIÓN
PRESENTE**

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por el (la) C. César González Andrade, estudiantede la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula 10033873, y que lleva por título “EFECTO DE PRODUCTOS NATURALES NANOESTRUCTURADOS SOBRE EL DESARROLLO DE *Aspergillus flavus* EN MAÍZ Y PRODUCCIÓN DE AFLATOXINAS EN TORTILLA DE MAÍZ” ha sido revisado a satisfacción me permito en mi carácter comiembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:

- I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva prestar a la presente.

A t e n t a m e n t e

Dra. Margarita De Lorena Ramos García

Firmo para lo que resulte conducente, en la ciudad de Cuernavaca Morelos, a los 21 días del mes de junio de 2022.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARGARITA DE LORENA RAMOS GARCIA | Fecha:2022-06-22 13:21:55 | Firmante

1Kbcil1vCyt8dUCVbpZdFeX9f50/bKowbJhtz/5Zr+Grvb2/GjzjY1DWlvvEMLfgOXkPnoXngwjmTC2N2QtspODG0Pp9+IXs7R1F/ZJ0Jp/45Npref7Nq6N7Z13C9wS7PHVJoZDdBIRuQGg+3L13QQ5TbabyLmXXtlfisyBzGodCXNgN0a2NzZS1JFB7JizQYLP/OZjq5qFyAZOXp6vkhBpYmGbzqyrVAGCKCaVICTkrwpD+tpOxeNWPSNcan5VoyDg5irPc5T8aDotiHxotVGt1bZfKKH/iAAv6NftcEFKqg2BjjqC0gxmPz88FjaPZlpzVq47QELOLnqJ0y2g==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[9nBN05MhW](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/Nielbmlls7q9d2fxc9JmTUQzjlfjpgaT>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE NUTRICIÓN



FORMATO 3A

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.
Formato. Voto Sinodal.**

**COMISIÓN ACADÉMICA DE
LA MAESTRÍA EN CIENCIAS
DE LA NUTRICIÓN
PRESENTE**

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por el (la) C. César González Andrade, estudiantede la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula 10033873, y que lleva por título “EFECTO DE PRODUCTOS NATURALES NANOESTRUCTURADOS SOBRE EL DESARROLLO DE *Aspergillus flavus* EN MAÍZ Y PRODUCCIÓN DE AFLATOXINAS EN TORTILLA DE MAÍZ” ha sido revisado a satisfacción me permito en mi carácter comiembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:

- I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva prestar a la presente.

Atentamente


Dra. Ollin Celeste Martínez Ramírez

Firmo para lo que resulte conducente, en la ciudad de Cuernavaca Morelos, a los 21 días del mes de junio de 2022.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE NUTRICIÓN



FORMATO 3A

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.
Formato. Voto Sinodal.**

**COMISIÓN ACADÉMICA DE
LA MAESTRÍA EN CIENCIAS
DE LA NUTRICIÓN
PRESENTE**

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por el (la) C. César González Andrade, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula 10033873, y que lleva por título “EFECTO DE PRODUCTOS NATURALES NANOESTRUCTURADOS SOBRE EL DESARROLLO DE *Aspergillus flavus* EN MAÍZ Y PRODUCCIÓN DE AFLATOXINAS EN TORTILLA DE MAÍZ” ha sido revisado a satisfacción me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:

- I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva prestar a la presente.

A t e n t a m e n t e

Dra.
Sinodal (Rosa Isela Ventura Aguilar).

Firmo para lo que resulte conducente, en la ciudad de Cuernavaca Morelos, a los 22 días del mes de junio de 2022.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE NUTRICIÓN



FORMATO 3A

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.
Formato. Voto Sinodal.**

**COMISIÓN ACADÉMICA DE
LA MAESTRÍA EN CIENCIAS
DE LA NUTRICIÓN
PRESENTE**

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por el (la) C. César González Andrade, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula 10033873, y que lleva por título “EFECTO DE PRODUCTOS NATURALES NANOESTRUCTURADOS SOBRE EL DESARROLLO DE *Aspergillus flavus* EN MAÍZ Y PRODUCCIÓN DE AFLATOXINAS EN TORTILLA DE MAÍZ” ha sido revisado a satisfacción me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:

- I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva prestar a la presente.

A t e n t a m e n t e
Dra. América Ivette Barrera Molina.

Firmo para lo que resulte conducente, en la ciudad de Cuernavaca Morelos, a los 21 días del mes de junio de 2022.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

AMERICA IVETTE BARRERA MOLINA | Fecha:2022-06-23 11:52:20 | Firmante

HyQvHdrawyMqGKo5o4vGAKOE5pl60kP9+SOnixuwr61qWe9hXh0l3o/inWZoYPfVXjLY7PNW2pn0iGn7K14hPiuH4oBJHeR3mUk0TlBqPS2g2AfdB2rHx5V30fue975UaBheDU093SKQd/r6moyT370P4hmbY83b+vDkobwM5iWRUaNk1hTO/WYO39QN/B6zOsSZN9Y9qUjq6zTmc3ngy4Gw4kzObcWm7n1i6ae6eggQuUVHH65T5dT1JuV3XlqKeu9jeVv3GtsTwm+C6ljHRKafIBq6xGy9vKn7aORRR5SY54uBCNBiMNYRVv0ZdDHn+voWhzejSPNTErCg2UNKQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



FZLu0ErBt

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/fj0etpss1rsIOJElgIPYqialeFmSxNhZr>





FORMATO 3A

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.
Formato. Voto Sinodal.**

**COMISIÓN ACADÉMICA DE
LA MAESTRÍA EN CIENCIAS
DE LA NUTRICIÓN
PRESENTE**

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por el C. César González Andrade, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula 10033873, y que lleva por título “EFECTO DE PRODUCTOS NATURALES NANOESTRUCTURADOS SOBRE EL DESARROLLO DE *Aspergillus flavus* EN MAÍZ Y PRODUCCIÓN DE AFLATOXINAS EN TORTILLA DE MAÍZ” ha sido revisado a satisfacción me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:

- I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva prestar a la presente.

A t e n t a m e n t e

Dra.
Dolores Azucena Salazar Piña

Firmo para lo que resulte conducente, en la ciudad de Cuernavaca Morelos, a los 21 días del mes de junio de 2022.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

DOLORES AZUCENA SALAZAR PIÑA | Fecha:2022-06-22 12:06:37 | Firmante

pQPjB5AoAj/QRwTQlyVMgmJSuBKQAnbErtbThqCBr7z/jSNh1DFDdjAAumgM7c/yyH5QYwY4yDV77xRKvxIzk60N9O3hHXmFx+/Bg/DH1pFSX7t351WamjBa2ifTpRreN0SeaKS5qNCOpv5kinu+hjEDVySQ+9T0kqbm/ICNn1kcJzOs8uAkFVxkl2OKkLhwkDMB4tBm/6QIFE5rX7kqRBNnP3z8rSv9QFuM/3wFf0h71gs9+GH7Kg0r1zqZTJZJMo8l3/tZyf9XJ1RKFK9wAEoE272HHSDp1/+CXsgqDRhp7kCkEXCD35s95WP6gvPmlp/4hfp4qyHN17uls4pEgg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[qolVvE5OF](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/xkCsD9JxPp9e8SjJJJaFncWAXGRkvov4i>

