



UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE MORELOS
FACULTAD DE NUTRICIÓN
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN

“EFECTO DE RECUBRIMIENTOS NANOESTRUCTURADOS CON QUITOSANO Y/O PROPÓLEO SOBRE EL DESARROLLO *in vitro* DE *Aspergillus flavus* Y PRODUCCIÓN DE AFLATOXINAS”

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN

P R E S E N T A:

Q.F.B MONICA CORTES HIGAREDA

DIRECTORA DE TESIS

DRA. MARGARITA DE LORENA RAMOS GARCIA

CODIRECTORA

DRA. SILVIA BAUTISTA BAÑOS

CUERNAVACA, MORELOS

ENERO, 2019

AGRADECIMIENTOS

Con el corazón agradecido al creador por todos los retos y bendiciones en mi vida

Dra. Silvia por haber confiado en mí, por su gran dedicación y apoyo en los momentos más difíciles que me tocaron vivir durante mi maestría. Por ser un gran ejemplo a seguir; me siento, muy afortunada de haber podido colaborar con usted.

Dra. Margarita por todo su apoyo durante toda mi maestría.

Dra. Zormy mil gracias por tu apoyo creo que logramos nuestros objetivos.

Mta. Mónica por toda su paciencia, mil gracias

Maria Luisa y a todos mis compañeros de Laboratorio de Tecnología Pos cosecha Lupita, Ale, Selene, Pamela.

A mis compañeros de la maestría Ely, Ely Negrete, Iris, Paola, Dani, Angel y Jorge mil gracias por toda su paciencia, ayuda y cariño.

A mis tutores Dra. Azucena, Dra. Amanda, Dr. Héctor, Dr. Dagoberto y al Dr. Edgar por todas sus aportaciones.

IPN-SIP20180091. 'RECUBRIMIENTOS NANOESTRUCTURADOS CON PROPIEDADES ANTIFÚNGICAS EN HONGOS PROMOTORES DE AFLATOXINAS, PARA SU APLICACIÓN EN PRODUCTOS AGRÍCOLAS'.

PROYECTO CONVOCATORIA DE INVESTIGACIÓN EN FRONTERAS DE LA CIENCIA FC-2015-1. NO. 141 'DESARROLLO DE FIBRAS POLIMÉRICAS ANTIMICROBIANAS EN SISTEMAS PRECOSECHA, PARA LA CONSERVACIÓN DE FRUTAS Y HORTALIZAS'

PROYECTO PRODEP FOLIO UAEMOR-PTC-403. EFECTO DE LA NUTRICIÓN SOBRE EL METABOLISMO DE PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS EN TRABAJADORES AGRICOLAS DEL ESTADO DE MORELOS

DEDICATORIAS

A mis padres:

Mi gordito que tanto extraño, por darme la fuerza de seguir adelante a pesar del gran dolor que me dejó tu partida, por tu gran ejemplo como el gran ser humano que siempre fuiste.

Mi Terequitos por siempre estar por tu amor incondicional por ser una madre ejemplar.

A mis hermanos:

Ale por siempre transmitirme la fortaleza para seguir adelante.

Le Bambine por traer tantas sonrisas aún en los momentos más difíciles.

Max por tu gran apoyo, sé que desde allá junto con mi papá estarán contentos de mis logros.

Fer y Mari por haberme dado la mayor de las bendiciones el poder ser tía.

Mis niños Nando y Bubu por todo su cariño y alegrías.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	XIII
ÍNDICE GENERAL	III
ABREVIATURAS	VI
SIMBOLOGÍAS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE TABLAS	XI
1. INTRODUCCIÓN	
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Principales agentes carcinogénicos	3
2.2. Aflatoxinas	4
2.3. Efecto de las aflatoxinas en la salud humana	7
2.4. Cereales susceptibles a la contaminación por aflatoxinas	8
2.5. <i>Aspergillus flavus</i>	10
2.6. Control y prevención de hongos aflatoxigénicos	12
2.7. Quitosano	16
2.8. Propóleo	20
2.9. Nanotecnología	22
2.10. Recubrimientos comestibles	26
3. JUSTIFICACIÓN	29
4. HIPÓTESIS	
5. OBJETIVOS	29
5.1. Objetivo general	29
.2. Objetivos Específicos.	
6. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	30
6.1. Materiales y métodos	31
6.1.1. Material fúngico	31
6.1.1.2. Preparación de medio de cultivo para el crecimiento de	31

	<i>Aspergillus flavus</i>	
6.1.1.3.	Activación de la patogenicidad de la cepa de <i>Aspergillus flavus</i>	32
6.1.1.4.	Preparación de la solución de esporas de <i>Aspergillus Flavus</i>	33
6.1.2.	Elaboración de nanopartículas por el método de precipitación	34
6.1.2.1	Elaboración de nanopartículas de quitosano	34
6.1.2.2	Elaboración de nanopartículas de propóleo	35
6.1.3.	Elaboración de los recubrimientos nanoestructurados	35
6.1.4.	Estudio de microscopia. Caracterización física de las nanopartículas	37
6.1.4.1.	Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM)	37
6.1.4.2.	Potencial Z	37
6.1.5.	Variables de evaluación de crecimiento de <i>Aspergillus flavus</i>	38
6.1.5.2.	Técnica de pozos	38
6.1.5.2.1.	Variable	
6.1.5.2.1.1.	Halo de inhibición	
6.1.5.3	Técnica del medio envenenado	39
6.1.5.3.1.	Variables	39
6.1.5.3.1.1	Área de inhibición del crecimiento micelial	39
6.1.5.3.1.2.	Germinación de esporas	40
6.1.6.	Determinación de aflatoxinas	41
6.1.6.1.	Preparación de la muestra	42
6.1.6.2.	Extracción de la muestra	42
6.1.6.3.	Determinación de aflatoxinas totales	42
6.1.6.4.	Determinación fluorométrica de las aflatoxinas	42
7.	Resultados	44
7.1	Estudio de microscopia. Caracterización física de las nanopartículas	44

7.1.1 Microscopia TEM	45
7.1.2 Potencial Z	46
7.2 Efecto de los recubrimientos nanoestructurados en el crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Aspergillus flavus</i>	46
7.2.1 Técnica de pozos	46
7.2.2 Crecimiento micelial de <i>Aspergillus flavus</i>	50
7.2.3 Germinación de esporas de <i>Aspergillus flavus</i>	58
7.3 Efecto de los recubrimientos nanoestructurados en la producción de aflatoxinas en <i>Aspergillus flavus</i>	64
7.3.1 Síntesis de aflatoxinas	64
8. Discusión	66
9. Conclusiones	70
10 Referencias	71

ABREVIATURAS

AFB1	Aflatoxina B ₁
CICATA	Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada
CNMM	Centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnologías
IPN	Instituto Politécnico Nacional
HCC	Carcinoma hepatocelular
HACCAP	Sistema de análisis de peligro y puntos críticos de control
IARC	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
OMS	Organización Mundial de la Salud
TEM	Microscopia Electrónica de Transmisión

SIMBOLOGÍAS

DE	Desviación estándar
EE	Extracto de propóleo
kV	Kilovoltio
Mbar	Milibar
mV	Milivoltios
μ L	Microlitro
nm	Nanómetro
NpQ	Nanopartículas de quitosano
NpP	Nanopartículas de propóleo
Q	Quitosano
pH	Potencial de hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto
UV	Luz ultravioleta

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Estructura química de las aflatoxinas más comunes	6
Figura 2.	Factores que influyen en la contaminación de alimentos de origen agrícola.	8
Figura 3.	Formación y reducción de aflatoxinas en el maíz.	9
Figura 4.	Ciclo de vida de <i>Aspergillus flavus</i> en cultivo de maíz	11
Figura 5.	Niveles de prevención de la contaminación de hongos y sus micotoxinas.	11
Figura 6.	Estructura química de la quitina, quitosano y quitosano en su forma protonada	17
Figura 7.	Mecanismos de acción de la actividad fungicida del quitosano	20
Figura 8.	Representación esquemática de la interacción de las nanopartículas y macromoléculas a través de la membrana celular	23
Figura 9.	Métodos generales de obtención de nanopartículas y representación esquemática de una nanopartícula	24
Figura 10.	Variedades de semillas de maíz	31
Figura 11.	Preparación del medio de cultivo y almacenamiento de las cajas Petri	32
Figura 12.	Activación de la patogenicidad de la cepa de <i>A. flavus</i>	33
Figura 13.	Preparación de la solución de esporas de <i>A. flavus</i>	33
Figura 14.	Preparación de las nanopartículas de quitosano y propóleo por el método de precipitación	34
Figura 15.	Caracterización de los recubrimientos por microscopía electrónica de transmisión (TEM).	37
Figura 16.	Determinación del potencial Z de los recubrimientos nanoestructurados	38

Figura 17.	Técnica de pozos	39
Figura 18.	Técnica de medición del crecimiento micelial	39
Figura 19.	Técnica de germinación de esporas	40
Figura 20.	Observación de esporas germinadas	41
Figura 21.	Determinación de aflatoxinas totales	43
Figura 22	Microscopía electrónica de Transmisión de: a) control NpQ (nanopartículas de quitosano), b) T3 NpQ (nanopartículas de quitosano al 40%) y c) T2 NpP (nanopartículas de propóleo al 40%)	45
Figura 23.	Halo de inhibición del recubrimiento T6 con diferentes concentraciones de nanopartículas a) 5, 10 y 20%; b)30, 40 y 50%, sobre <i>A. flavus</i> .	50
Figura 24.	Efecto de recubrimientos nanoestructurados al 20% (propóleo y/o quitosano) en la cinética del crecimiento micelial en el desarrollo <i>in vitro</i> del hongo <i>A. flavus</i> durante 7 días de incubación a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$.	52
Figura 25.	Efecto de los recubrimientos nanoestructurados al 30% (propóleo y/o quitosano) en la cinética del crecimiento micelial en el desarrollo <i>in vitro</i> del hongo <i>A. flavus</i> durante 7 días de incubación a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$.	54
Figura 26.	Efecto de los recubrimientos nanoestructurados al 40% (propóleo y/o quitosano) en la cinética del crecimiento micelial en el desarrollo <i>in vitro</i> del hongo <i>A. flavus</i> durante 7 días de incubación a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$.	56
Figura 27.	Crecimiento micelial de <i>A. flavus</i> en los recubrimientos a diferentes concentraciones de nanopartículas de propóleo y/o quitosano.	57
Figura 28.	Efecto de los recubrimientos nanoestructurados al 20% (propóleo y/o quitosano) en la cinética de germinación de esporas en el desarrollo <i>in vitro</i> del hongo <i>A. flavus</i> durante 10 horas de incubación a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$.	59

- Figura 29. Efecto de los recubrimientos nanoestructurados al 30% (propóleo y/o quitosano) en la cinética de germinación de esporas en el desarrollo *in vitro* del hongo *A. flavus* durante 10 horas de incubación a $28 \pm 2^\circ\text{C}$. 61
- Figura 30. Efecto de los recubrimientos nanoestructurados al 40% (propóleo y/o quitosano) en la cinética de germinación de esporas en el desarrollo *in vitro* del hongo *A. flavus* durante 10 horas de incubación a $28 \pm 2^\circ\text{C}$. 63
- Figura 31. Efecto del recubrimiento T6 al 40% (propóleo y/o quitosano) y T9 (control) en la cinética de germinación de esporas en el desarrollo *in vitro* del hongo *A. flavus* durante 10 horas de incubación a $28 \pm 2^\circ\text{C}$. 64

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Clasificación de agentes carcinógenos para el hombre.	4
Cuadro 2.	Rango de temperatura de crecimiento y producción de aflatoxinas del hongo <i>Aspergillus flavus</i>	11
Cuadro 3.	Métodos de inhibición y descontaminación de toxinas originadas por el género <i>Aspergillus</i>	15
Cuadro 4.	Propiedades del quitosano agente antimicrobiano	18
Cuadro 5.	Propiedades químicas y actividad biológica y antimicrobiana del propóleo	21
Cuadro 6.	Principales mecanismos de acción de las nanopartículas a través de la membrana celular	25
Cuadro 7.	Efecto antimicrobiano de cubiertas a base de quitosano y extracto de propóleo.	27
Cuadro 8.	Componentes de las formulaciones de los recubrimientos nanoestructurados.	36
Cuadro 9.	Efecto de recubrimientos nanoestructurados al 20% (propóleo y/o quitosano) en el desarrollo <i>in vitro</i> del hongo <i>A. flavus</i> mediante la técnica de pozos a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$.	47
Cuadro 10.	Efecto de recubrimientos nanoestructurados al 30% (propóleo y/o quitosano) en el desarrollo <i>in vitro</i> del hongo <i>A. flavus</i> mediante la técnica de pozos a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$	48
Cuadro 11.	. Efecto de recubrimientos nanoestructurados al 40% (propóleo y/o quitosano) en el desarrollo <i>in vitro</i> del hongo <i>A. flavus</i> mediante la técnica de pozos a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$	49
Cuadro 12.	. Efecto de recubrimientos nanoestructurado al 20% de nanopartículas de propóleo y/o quitosano sobre el crecimiento de <i>A. flavus</i> mediante la técnica de envenenamiento del medio	51

Cuadro 13.	Efecto de recubrimientos nanoestructurado al 30% de nanopartículas de propóleo y/o quitosano sobre el crecimiento de <i>A. flavus</i> mediante la técnica de envenenamiento del medio	53
Cuadro 14.	. Efecto de recubrimientos nanoestructurados al 40% de nanopartículas de propóleo y/o quitosano sobre el crecimiento de <i>A. flavus</i> mediante la técnica de envenenamiento del medio	55
Cuadro 15.	Efecto de los recubrimientos nanoestructurados al 20% (propóleo y/o quitosano) en el porcentaje de germinación de esporas en el desarrollo <i>in vitro</i> del hongo <i>A. flavus</i> durante 10 horas de incubación a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$.	58
Cuadro 16.	Efecto de los recubrimientos nanoestructurados al 30% (propóleo y/o quitosano) en el porcentaje de germinación de esporas en el desarrollo <i>in vitro</i> del hongo <i>A. flavus</i> durante 10 horas de incubación a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$.	60
Cuadro 17.	Efecto de los recubrimientos nanoestructurados al 40% (propóleo y/o quitosano) en el porcentaje de germinación de esporas en el desarrollo <i>in vitro</i> del hongo <i>A. flavus</i> durante 10 horas de incubación a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$	62
Cuadro 18.	Determinación de aflatoxinas totales por cromatografía de inmunoafinidad de los recubrimientos nanoestructurados al 40% (propóleo y/o quitosano)	65

RESUMEN

Dentro de los carcinógenos se encuentran las aflatoxinas, las cuales se producen principalmente por los hongos *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*. Una gran diversidad de productos agrícolas son susceptibles a la contaminación causada por *A. flavus*. Para reducir la contaminación fúngica se ha propuesto la aplicación de productos naturales, dentro de los que se incluyen al quitosano y propóleo, debido a su amplia y reconocida actividad antimicrobiana sobre varios hongos fitopatógenos. Actualmente, la aplicación de la nanotecnología permite una mayor actividad al ser éstas más reactivas y eficientes. El objetivo de esta investigación fue determinar la actividad antifúngica *in vitro* del quitosano y extracto de propóleo, solos o combinados e integrados en recubrimientos nanoestructurados sobre el desarrollo de *A. flavus* y su producción de aflatoxinas. Se evaluaron 8 recubrimientos con nanopartículas de quitosano y/o propóleo (20, 30 y 40%) en las siguientes variables: halo de inhibición, crecimiento micelial, porcentaje de germinación de esporas y determinación de aflatoxinas totales. Los datos se analizaron mediante un ANOVA y comparación de medias de Tukey ($p < 0.05$). El mayor halo de inhibición en *A. flavus* (2.50 cm) se observó con la concentración del 20% en el recubrimiento que contenía nanopartículas de propóleo; una inhibición del crecimiento micelial mayor (32.72%) y menor germinación de los conidios (3.78%) correspondió al recubrimiento que contenía nanopartículas de propóleo, nanopartículas de quitosano y extracto de propóleo de la formulación al 40% de nanopartículas. La producción de aflatoxinas se inhibió en un 100% en la misma formulación, pero con el tratamiento de quitosano al 1.0%. Los recubrimientos nanoestructurados de quitosano y propóleo pueden ser una alternativa viable en el control de *A. flavus*; sin embargo, es necesario su evaluación *in situ*.

ABSTRACT

Among the carcinogens that can cause this type of diseases are aflatoxins, which are produced mainly by the fungi *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. A great diversity of agricultural products is susceptible to contamination caused by *A. flavus*. To reduce fungal contamination, the application of natural products has been proposed, including chitosan and propolis, due to its broad and recognized antimicrobial activity on several pathogens that cause infections in a wide variety of agricultural products. Currently, the application of nanotechnology allows greater activity to be more reactive and efficient. The objective of this research was to determine the *in vitro* antifungal activity of chitosan and propolis extract, alone or in combination and integrated in nanostructured coatings on the development of *A. flavus* and its production of aflatoxins. 8 coatings with chitosan and / or propolis nanoparticles (20, 30 and 40%) were evaluated in the following variables: inhibition halo, mycelial growth, percentage of spore germination and determination of total aflatoxins. The data were analyzed by means of an ANOVA and comparison of Tukey means ($p < 0.05$). The highest inhibition halo (2.50 cm) in *A. flavus* was observed with the 20% concentration in the coating containing propolis nanoparticles; a higher mycelial inhibition (32.72%) and lower germination (3.78%) corresponded to the coating containing propolis nanoparticles, chitosan nanoparticles and propolis extract of the 40% nanoparticle formulation. The production of aflatoxins was 100% inhibited in the same formulation, but with the treatment with 1.0% chitosan. Nanostructured coatings of chitosan and propolis may be a viable alternative in the control of *A. flavus*; however, it is necessary to evaluate them *in situ* studies.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades crónicas no transmisibles representan la causa de defunción más importante en el mundo, donde el cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial^{1,2}. Existen más de 10 carcinógenos, dentro de los cuales se encuentran las aflatoxinas relacionadas con el carcinoma hepatocelular³. Las aflatoxinas son toxinas que producen los hongos que pertenecen a los géneros *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium* durante el almacenamiento de granos, semillas y frutos secos deshidratados. Estos hongos ocasionan pérdidas económicas importantes debido a sus efectos sobre la salud humana y animal y en el comercio nacional e internacional de los productos agrícolas. Se han identificado 18 tipos diferentes de aflatoxinas, siendo las más comunes la B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ y M₂. La aflatoxina B₁ es la forma más tóxica, se considera como el carcinoma hepático natural más potente conocido hasta el momento⁴.

De los principales productores de aflatoxinas se encuentra *A. flavus*, un hongo fitopatógeno de importancia económica y toxicológica debido a la producción de aflatoxinas y otros productos químicos con propiedades perjudiciales para la salud⁵.

En los países en desarrollo los alimentos básicos como el maíz, avena, sorgo y arroz, entre otros, son los más susceptibles a la contaminación por este hongo. México se encuentra dentro de las poblaciones en riesgo a la exposición crónica debido a su alto consumo de maíz principalmente como tortillas; Castillo-Urueta *et al.* (2010)⁶ reportaron que a pesar del proceso de nixtamalización, el 21% de las muestras de tortillas evaluadas presentó contaminación, aunque el 90% cumplió con la norma NOM-187-SSA1-2001⁷ (nivel permitido para tortillas es de 12ppb/Kg), aún existe el riesgo de carcinoma hepatocelular debido a la acumulación de aflatoxinas en el ADN debido a la exposición crónica.

Para evitar el efecto nocivo que originan las aflatoxinas, es necesario la prevención del ataque de *A. flavus* en la etapa precosecha, la desintoxicación de los alimentos y productos agrícolas contaminadas con aflatoxinas, y la inhibición de la absorción de aflatoxinas en el consumo de alimentos en el tracto digestivo⁵.

En general, una alternativa natural aún en evaluación, para inhibir a los hongos fitopatógenos es el uso de quitosano, biopolímero antimicrobiano, no tóxico,

biodegradable y biocompatible^{8,9} y extractos de material resinoso recolectado por las abejas con propiedades antisépticas y antimicrobianas¹⁰. Además, estos compuestos al estar en escala nanométrica podrían tener una alta relación superficie-volumen, mostrando características físicas, químicas y biológicas únicas¹¹.

En los últimos años, también se ha estado estudiado la adición de este tipo de nanopartículas en recubrimientos comestibles con el fin de aumentar en los productos agrícolas sus propiedades antimicrobianas, proporcionar una mayor vida de anaquel y mantener sus propiedades nutricionales y funcionales durante el almacenamiento¹².

2. ANTECEDENTES

2.1 Principales agentes carcinogénicos

Las enfermedades crónicas no transmisibles son enfermedades de larga duración y el resultado de la combinación de varios factores: genéticos, fisiológicos, ambientales, conductuales y representan la causa de defunción más importante en el mundo ^{1,2}. Dentro de este grupo de enfermedades, el cáncer es la 2º causa de muerte a nivel mundial, presentándose con mayor incidencia en adultos, seguido de niños y jóvenes¹³.

El cáncer inicia como una alteración celular que provoca un aumento descontrolado de células anormales que crecen de forma invasiva y se propagan a través de los tejidos¹⁴; estas alteraciones son el resultado de la interacción entre los factores genéticos del paciente y los agentes externos ². La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer IARC por sus siglas en inglés¹⁵, ha clasificado los agentes carcinógenos para el ser humano en 4 grupos:

- Grupo 1. Carcinógeno para humanos
- Grupo 2A. Probablemente carcinógeno para humanos
- Grupo 2B. Posiblemente carcinógeno para humanos
- Grupo 3. No clasificable en cuanto su carcinogenicidad para los humanos.
- Grupo 4. Posiblemente no carcinógeno para humanos.

Existen más de 100 agentes carcinógenos, los cuales están clasificados como se muestra en el cuadro 1. Dentro de los carcinógenos químicos (grupo 1) se encuentran las aflatoxinas relacionadas con carcinoma hepatocelular (HCC) con suficientes evidencias en humanos y con una fuerte evidencia de genotoxicidad ³. La incidencia de carcinoma hepatocelular varía dependiendo de la región geográfica, grupos étnicos y al nivel de exposición el cual se asocia con la toxicidad crónica con altos niveles de aflatoxinas en la dieta, cuando se exceden los niveles regulatorios de la Comisión del Codex Alimentario^{16,17}.

Cuadro 1. Clasificación de agentes carcinógenos para el hombre.

Agentes carcinógenos		Tipo de cáncer con el cual se relacionan
Químicos	Aflatoxinas	Hígado (carcinoma hepatocelular)
	Benceno	Leucemia
Laborales	Producción de aluminio	Pulmón, vejiga
	Producción de caucho	Leucemia, linfoma, pulmón estómago, vejiga
Metales	Arsénico	Pulmón, piel, vejiga
	Níquel	Pulmón
Polvos y Fibras	Asbesto	Laringe, pulmón, ovario
	Polvo de sílica	Pulmón
Radiación	Estroncio 90	Leucemia
	Rayos-X, radiación gama	Huesos, cerebro, sistema nervioso central, senos, colón, riñón, pulmón, esófago, estómago.
Agentes biológicos	Virus hepatitis B	Hígado (carcinoma hepatocelular)
	Virus de papiloma humano	Cervical

Fuente: Adaptado de Cogliano *et al.* (2011) ³.

2.2. Aflatoxinas

Las aflatoxinas son toxinas producidas durante el almacenamiento de granos, por los hongos de los géneros *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium*. Las micotoxinas son sustancias tóxicas o contaminantes, que presentan el mayor número de reportes en intoxicaciones, seguidos por los agentes biológicos y algunos plaguicidas. Esto ocasiona importantes pérdidas económicas debido a sus efectos sobre la salud humana, salud animal y el comercio nacional e internacional de los productos agrícolas. La palabra

aflatoxina se deriva de la combinación de 3 palabras: la primera letra de la palabra aflatoxina “A” se deriva del género *Aspergillus* seguida de “fla” de la especie *flavus* y del sustantivo “toxina”. Las aflatoxinas son producidas por las especies de la sección *Flavi* de *Aspergillus* principalmente por los hongos *A. flavus* y *A. parasiticus*. Se han identificado 18 tipos diferentes de aflatoxinas siendo las más comunes las B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ y M₂ (Figura 1); estos nombres son debidos a sus propiedades de fluorescencia azul (B) o verde (G) bajo la luz ultravioleta. Las aflatoxinas M₁ y M₂ son los productos metabólicos de la oxidación de las aflatoxinas B en humanos y animales después de la ingestión y se aislaron por primera vez en la leche. La aflatoxina B₁ (AFB₁) es la forma más tóxica, es el carcinógeno hepático natural más potente conocido hasta el momento^{18,4}.

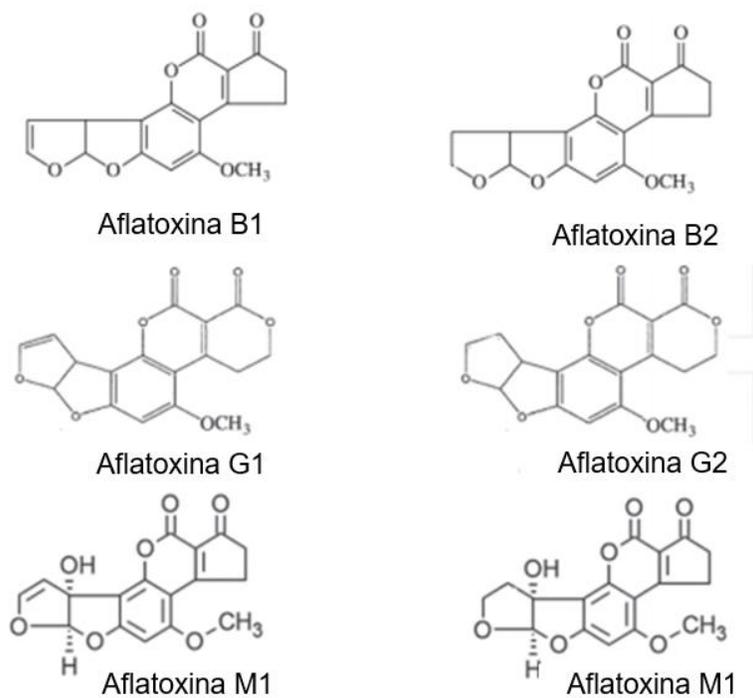


Figura 1. Estructura química de las aflatoxinas más comunes.

Fuente: Saleem *et al.* (2017)⁴.

Las aflatoxinas no son visibles, carecen de sabor y olor; son resistentes al calor, soportan temperaturas extremas (de 260 hasta 320 °C), químicamente son estables en los

alimentos y resistentes a la degradación en tratamientos de cocción normales^{19,20}. Además, son compuestos químicos orgánicos no proteicos, de bajo peso molecular y presenta 2 sitios importantes para su actividad toxicológica:

El primer sitio reactivo, es la posición de su doble enlace entre el carbono 8-9 del anillo de furoruran; donde ocurre la interacción de la aflatoxina con el ADN y las proteínas alterando las funciones bioquímicas normales de estas macromoléculas, originando daño a nivel celular. El segundo sitio reactivo, es el anillo de lactona en la cumarina, la cual se oxida fácilmente volviéndola vulnerable a la degradación⁵.

2.3 Efecto de las aflatoxinas en la salud humana

La exposición a las aflatoxinas, pueden ocasionar intoxicación aguda la cual causa inhibición total de los procesos bioquímicos; ocasionando hemorragias, daño hepático agudo manifestándose como hepatotoxicidad (fiebres leves, malestar en general y anorexia) seguido de dolor abdominal y vómitos. La exposición crónica puede progresar a una hepatitis potencialmente letal con vómitos, dolor abdominal, ictericia, insuficiencia hepática fulminante y la muerte. Los efectos tóxicos dependerán de varios factores: como edad, sexo, estado nutricional, dosis ingerida y tiempo de exposición. Sus efectos son generalmente subclínicos y difíciles de reconocer. La heptocarcinogenicidad de las aflatoxinas se debe principalmente a la peroxidación lipídica y daño oxidativo al ADN⁵.

Una vez que se absorben, por difusión pasiva por el intestino delgado (especialmente en el duodeno) y debido a su alta liposolubilidad, se transportan por los glóbulos rojos y las proteínas plasmáticas hasta el hígado vía portal; aunque el hígado se considera el sitio principal de transformación de aflatoxinas el metabolismo gastrointestinal reduce la exposición del hígado a la aflatoxina B₁ y en términos de toxicidad hepática es un medio importante de desintoxicación^{21, 22}.

2.4 Cereales susceptibles a la contaminación por aflatoxinas

En los países en desarrollo, los alimentos básicos como el maíz, avena, sorgo y arroz, entre otros son los más susceptibles a la contaminación, la cual puede ocurrir por varios factores, tales como, ambientales, biológicos y de manejo (Figura 2).

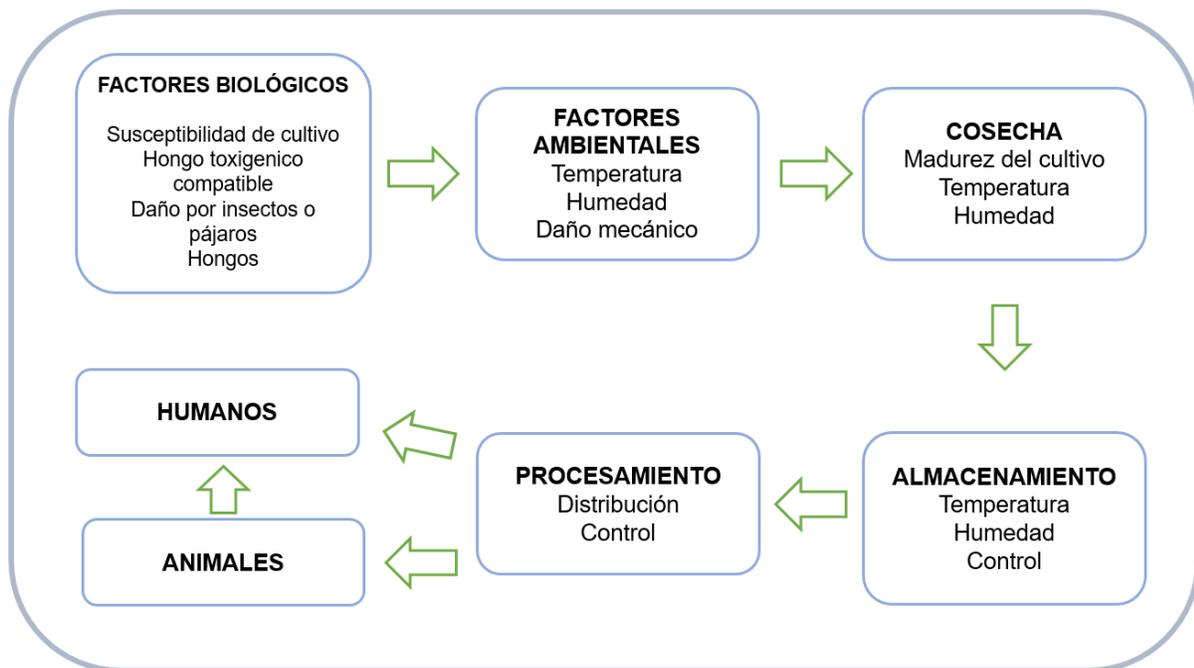


Figura 2. Factores que influyen en la contaminación de alimentos de origen agrícola.

Fuente: Adaptado de Neme y Mohammed (2017) ²³.

De los cereales más susceptibles a las aflatoxinas en México es el maíz (*Zea mays* L.) el cual se encuentra dentro de la canasta básica. El maíz se considera como patrimonio biológico, agrícola, cultural y económico de México; ocupa el 7° lugar en la producción a nivel mundial de acuerdo a lo estimado para el año 2015/2016 del Panorama Agroalimentario Maíz 2016 ²⁴ (23,500 toneladas anuales). Cada 100 g de maíz aportan 265 calorías: 66 g de carbohidratos, 10 g de proteína, 25 g de grasa, 10 g de fibra, vitamina: B₁, B₃, A y minerales como el fósforo, magnesio, hierro, zinc y manganeso. La

nixtamalización mejora el aporte nutritivo de las proteínas del grano de maíz deficiente en lisina y triptófano incrementando la disponibilidad de la mayoría de los aminoácidos esenciales^{25, 26}; Castillo-Urueta *et al.* (2010)⁶ reportaron que disminuye las aflatoxinas en la masa hasta un 97% y 98% en la tortilla. La nixtamalización es un tratamiento térmico que involucra hidróxido de calcio aplicado a los granos de maíz; produce la hidrólisis del anillo de lactona de la aflatoxina formando sales solubles que se pierden cuando se lavan. El cierre del anillo de lactona reactiva las aflatoxinas previamente degradadas y esto es posible a un pH 9.5; sin embargo, la acidificación de la masa aumenta los niveles de aflatoxinas hasta un 18%. En su investigación encontraron que el 21% de las tortillas de maíz en la Ciudad de México estaban contaminadas por aflatoxinas, el 90 % estaba dentro de los niveles permitidos por la norma NOM-187-SSA1-2001⁷, quedando el riesgo por exposición crónica.

El maíz tiene un patrón en el desarrollo de las aflatoxinas durante y después de la cosecha, almacenamiento y proceso de alimentos²⁷ (Figura 3).

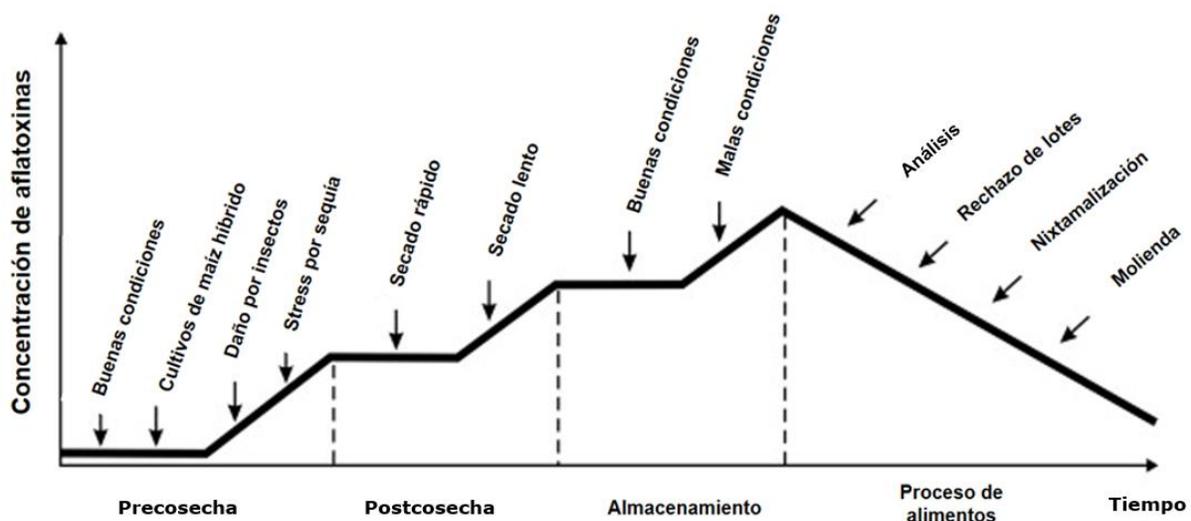


Figura 3. Formación y reducción de aflatoxinas en el maíz.

Fuente: Adaptado de Pitt *et al.* (2013)²⁷.

2.5 *Aspergillus flavus*

Es un hongo de importancia económica y toxicológica debido a la producción de aflatoxinas y productos químicos con propiedades perjudiciales para la salud. Es un hongo saprófito, que se encuentra en los suelos, donde desempeña un papel muy importante en el reciclado de nutrientes por los desechos de plantas y animales. Produce numerosos conidios que se transportan por el aire por lo que se dispersan fácilmente, inverna en residuos de plantas como micelio (hifas) o esclerocios que a su vez sirven como fuente de nuevos conidios (Figura 4). El ciclo de vida de *A. flavus* se puede dividir en 2 fases principales:

Fase 1. La colonización de los residuos de las plantas en los suelos

Fase 2. La infección de los tejidos de los cultivos (granos, semillas) en crecimiento activo. Al inicio de la temporada de crecimiento (primavera y algunas veces a finales del invierno), cuando los esclerocios se exponen a la superficie de los suelos, germinan rápidamente y forman un nuevo inóculo de conidios. Este nuevo inóculo será dirigido por insectos o transportado por el viento para comenzar la colonización e infección de los cultivos recién plantados²⁸.

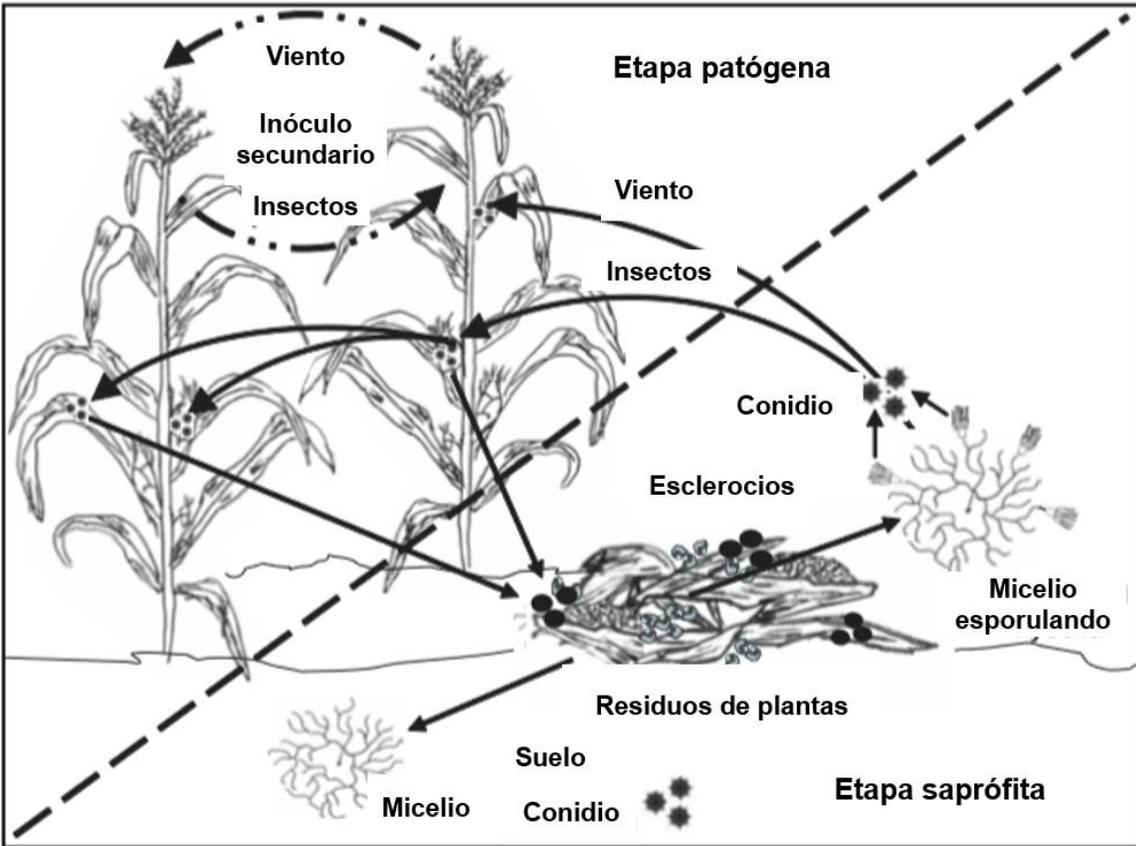


Figura 4. Ciclo de vida de *Aspergillus flavus* en cultivo de maíz.

Fuente: Adaptado de Abbas *et al.* (2009)²⁸.

El hongo *A. flavus* se puede desarrollar en un amplio rango de temperaturas para su crecimiento y producción de aflatoxinas; en general, con una actividad de agua (aw) de 0.86 - 0.9 (Cuadro 2).

Cuadro 2. Rango de temperatura de crecimiento y producción de aflatoxinas del hongo *A. flavus*.

<i>Aspergillus flavus</i>	Temperatura Mínima	Temperatura óptima	Temperatura Máxima
Crecimiento	6 – 8°C	36 – 38°C	44 – 46°C
Producción de aflatoxina	12°C	27 – 30°C	40 – 42°C

Fuente: Bogantes-Ledezma *et al.* (2004)²⁹.

2.6 Control y prevención de hongos aflatoxigénicos

Para evitar el efecto nocivo causado por las micotoxinas es necesario la prevención del ataque del hongo causante de la producción de aflatoxinas en la etapa previa a la cosecha, la desintoxicación de alimentos y productos agrícolas contaminados con aflatoxinas y la inhibición de la absorción de aflatoxinas en el consumo de alimentos en el tracto digestivo.

De acuerdo a Loi *et al.* (2017)³⁰ y Mishra y Das (2003)⁵ la contaminación por aflatoxinas puede prevenirse en el campo mediante la aplicación de buenas prácticas agrícolas las cuales incluyen:

- Uso de semillas sanas
- Riego adecuado
- Rotación de cultivos
- Cosecha en el momento adecuado
- Secado de los cultivos cosechados
- Almacenamiento bajo atmósferas apropiadas
- Prevención de insectos u otros daños al cultivo.
- Uso de variedades resistentes
- Medidas adecuadas de almacenamiento

- Sistema de análisis de peligro y puntos críticos de control (HACCAP)

La prevención de la contaminación de hongos y sus micotoxinas en productos agrícolas se pueden dividir en 3 niveles: la prevención primaria siendo la más importante y efectiva para reducir el crecimiento del hongo y la producción de micotoxinas; la prevención secundaria se presenta cuando inicia la invasión de algunos hongos en productos básicos en una etapa inicial y la prevención terciaria se da una vez que los productos están fuertemente infestados por hongos micotoxigénicos y se deben tomar medidas para evitar la propagación de los mismos³¹ (Figura 5).



Figura 5. Niveles de prevención de la contaminación de hongos y sus micotoxinas.

Para el control de micotoxinas se debe inhibir el crecimiento del hongo, una vez que se han producido las micotoxinas se debe realizar una descontaminación; ya sea, por métodos físico, químicos o biológicos para eliminarlas, inactivarlas o destruirlas^{30,31,32} (Cuadro 3).

Cuadro 3. Métodos de inhibición y descontaminación de toxinas originadas por el género *Aspergillus*.

Inhibición del crecimiento fúngico	Descontaminación de las toxinas
<p>Métodos físicos</p> <ul style="list-style-type: none"> - Secado de semillas a niveles de humedad seguros (maíz < 13.5%) - Irradiación gamma 	<p>Métodos físicos</p> <ul style="list-style-type: none"> - Eliminación por selección manual de las semillas contaminadas - Eliminación por detección fotoeléctrica de las semillas contaminadas - Uso de disolventes orgánicos: cloroformo, acetona, hexano y metanol - Calentamiento o cocción a presión., si es prolongado destruye vitaminas y aminoácidos esenciales - Radiación ionizante: rayos gamma
<p>Métodos químicos</p> <ul style="list-style-type: none"> - Fungicidas sintéticos - Ácidos orgánicos: ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido benzoico, ácido ascórbico, ácido láctico, ácido cítrico. - Cloruro de sodio - Derivados de ácido benzoico - Sulfitos de potasio y fluoruro de potasio - Dicloruros - Fumigantes: amoníaco y fosfina 	<p>Métodos químicos</p> <ul style="list-style-type: none"> - Ácido acético - Gas amoníaco - Hidróxido de calcio - Formaldehído - Peróxido de hidrógeno - Metil-amina - Gas ozono - Ácido fosfórico - Gas fosfina - Bicarbonato de sodio - Bisulfito de sodio - Hipoclorito de sodio

Métodos Biológicos	Métodos Biológicos
<p>Tratamientos con productos naturales de plantas, hierbas y animales:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Alcina y sustancias relacionadas con extracto de ajo y cebolla - Quitosano y sus derivados - Aceites esenciales: tomillo, anís estrella, canela, pimienta blanca y negra etc. - Microorganismos antagónicos - Enzimas biotransformadoras 	<ul style="list-style-type: none"> - Fenilpropanoides: Fenoles simples (eugenol, aceite esenciales de clavo, canela y nuez moscada, ácido ferúlico, cumarinas) - Flavonoides - Isoflavonoides de soya (fitoalexina, glicol) - Taninos - Terpenoides: α caroteno, β caroteno, luteína, zeoxantina (compuestos abundantes en granos de maíz) - Alcaloides: cafeína, alcaloides de pimienta - Ácido fítico, ácidos hidroxámicos - Antibióticos y dipéptidos ácidos

Fuente: Loi *et al.* (2017)³⁰, Suttajit (1989)³¹.

2.7 Quitosano

El quitosano es un biopolímero antimicrobiano, no tóxico, biodegradable y biocompatible, sus propiedades antimicrobianas se limitan a pH inferiores a 6. Está compuesto químicamente por glucosamina y monómeros de N- acetilglucosamina unidos mediante enlaces β -(1-4) glicosídicos. Se obtiene de la desacetilación de la quitina (segundo biopolímero más abundante después de la celulosa), la cual se obtiene del exoesqueleto de insectos y crustáceos como camarones, langostas y cangrejos⁸ (Figura 6).

El quitosano posee un contenido de nitrógeno mayor al 7% y una distribución regular de sus grupos amino libres los cuales pueden ser protonados por ciertos ácidos cargándose positivamente, por lo que, puede enlazarse con sustancias cargadas negativamente como es el caso de los lípidos y proteínas presentes en la membrana celular de los hongos³³.

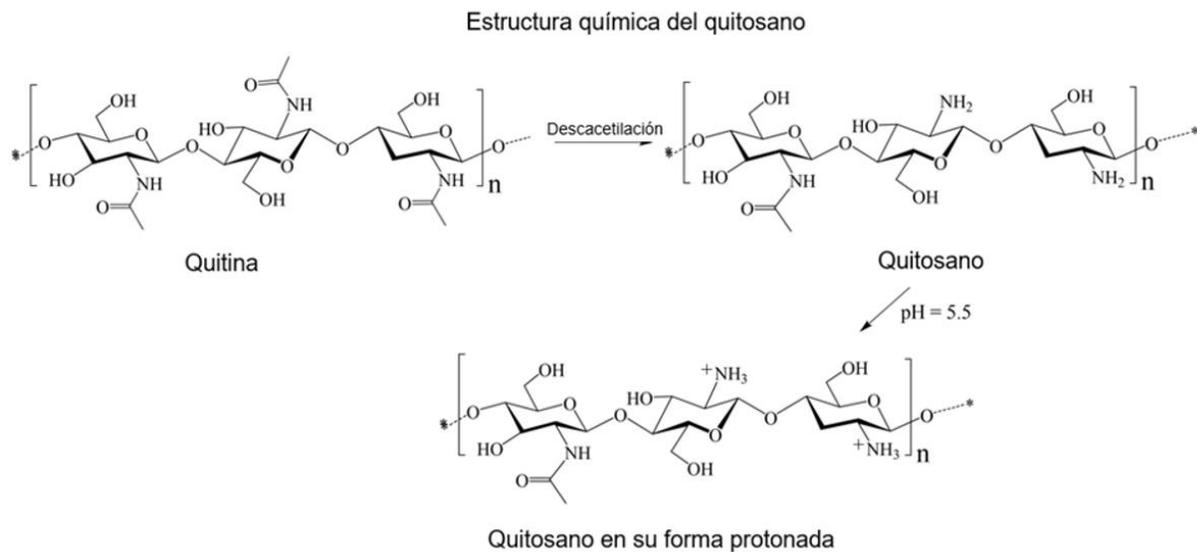


Figura 6. Estructura química de la quitina, quitosano y quitosano en su forma protonada.

Fuente: Adaptado de Sahariah y Masson (2017)⁸.

El quitosano es un biopolímero con estructura y propiedades específicas (Cuadro 4), por ejemplo, reduce el crecimiento *in vitro* de numerosos hongos³⁴. La pared celular es una estructura esencial para los hongos y su eliminación puede considerarse el talón de Aquiles de los hongos siendo el objetivo más importante para la acción de los fungicidas³⁵.

Cuadro 4. Propiedades químicas y actividad biológica y fungicida del quitosano.

QUITOSANO		
Propiedades	Actividad biológica y aplicaciones	Actividad fungicida
<ul style="list-style-type: none"> - Soluble en ácidos orgánicos (ácido acético, ácido fórmico, ácido succínico, ácido láctico y ácido málico) cuando el pH es <6 - Insoluble en agua, en medio alcalino o en solventes orgánicos. - Sus características varían dependiendo del grado de desacetilación y el peso molecular. - La viscosidad de las soluciones que contienen quitosano se ve afectada por el grado de desacetilación, el peso molecular, el pH y la temperatura. 	<ul style="list-style-type: none"> - Posee grupos amino reactivos. - Compuesto antimicrobiano utilizado en la agricultura. - Posible inductor de respuestas de defensas de las plantas. - Aditivo en la industria alimentaria. - Agente hidratante en cosméticos. - Agente biofarmacéutico en biomedicinas. 	<p>Esta influenciada por factores intrínsecos:</p> <ul style="list-style-type: none"> -Tipo de quitosano -Grado de polimerización del quitosano - Hospedero -Condiciones ambientales - pH del medio - Presencia o ausencia de sustancias de interferencia como lípidos y proteínas. <p>Se ha demostrado efecto sobre varios hongos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Botrytis cinérea</i> - <i>Fusarium oxysporum</i> - <i>Drechstera soroklana</i> - <i>Micronectriella nivalis</i> - <i>Piricularia oryzae</i> - <i>Rhizoctonia solani</i> - <i>Thrchophyton equinum</i> - <i>Fusarium solani</i> - <i>Colletotrichum</i> sp - <i>Alternaria alternata</i> - <i>Rhizopus stolonifer</i> - <i>Penicillium</i> sp - <i>Monilia</i> sp - <i>Botryodiplodia theobromae</i>

		<ul style="list-style-type: none"> - <i>Phytophthora infestans</i> - <i>Sclerotium rolfsii</i> - <i>Candida albicans</i> - <i>Alternaria solani</i> - <i>Aspergillus niger</i> - <i>Aspergillus flavus</i> - <i>Penicillium digitatum</i> - <i>Pichia anómala</i> - <i>Pichia membrana efaciens</i> - <i>Sacharomyces cerevisiae</i>
--	--	--

Fuente: Badawy y Rabea (2013)³⁶, Chien *et al.* (2013)³⁷, Elkholy *et al.* (2014)³⁸, Giner *et al.* (2013)³⁹, Kulikov *et al.* (2014)⁴⁰, Oliviera *et al.* (2013)⁴¹, Rabea *et al.* (2003)³⁴, Younes *et al.* (2014)⁴².

Existen varios mecanismos de acción del quitosano (Figura 7) los cuales dependen de la cepa, el peso molecular, el grado de desacetilación y el tipo de quitosano utilizado, entre otros⁹.

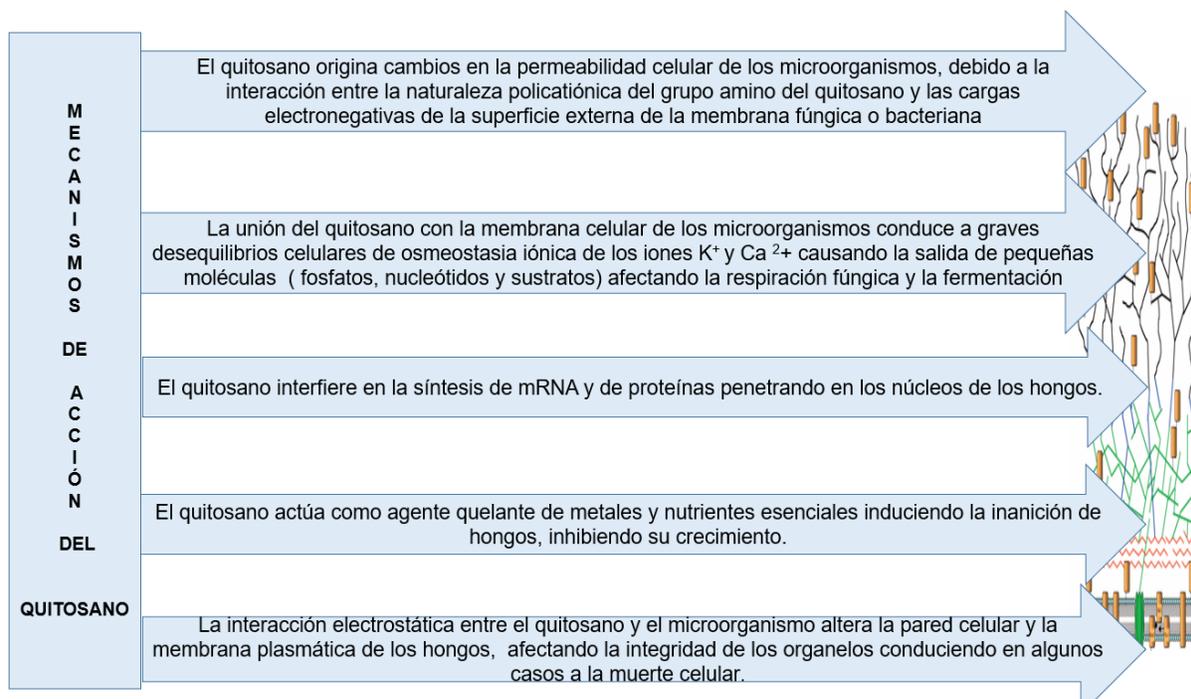


Figura 7. Mecanismos de acción de la actividad fungicida del quitosano.

Fuente: Adaptado de Ramos (2010)⁴³

2.8 Propóleo

Las abejas han existido desde hace 125 millones de años y su éxito evolutivo se debe en gran parte a sus productos (miel, cera de abeja, veneno, propóleo, polen y jalea real), siendo el más importante considerado como “arma química” contra microorganismos patógenos “el propóleo” el cual se ha utilizado como remedio desde la antigüedad; por lo que el propóleo se ha convertido en el tema de investigaciones farmacológicas y químicas en los últimos 30 años⁴⁴. Gracias a sus propiedades como antiséptico, anestésico local, antimicrobiano (siendo más eficaz en bacterias Gram positivas, virus, hongos y parásitos), antiinflamatorio, antitumoral, inmunomodulador, protector (riñón e hígado), radioprotector, estimula la regeneración de tejido, cicatrizante (quemaduras, úlceras varicosas), anticancerígeno y antioxidantes. Propóleo viene de la palabra griega propolis (pro = para o en defensa y polis = la ciudad) que significa defensa de la colmena. El

propóleo es un material resinoso recolectado por las abejas (*Apis mellifera*) de las yemas y exudados de las plantas, el cual se mezcla con las enzimas de las abejas, el polen y la cera. Las abejas lo utilizan para alisar las paredes internas y sellar los agujeros en sus panales, cubrir las carcacas de los intrusos que murieron dentro de la colmena evitando así su descomposición y protege a la colonia de las enfermedades debido a sus propiedades antisépticas y antimicrobianas. En general el propóleo está compuesto por 30% de cera, 50% de resinas y bálsamo vegetal, 10% de aceites esenciales y aromáticos, 5% polen y otras sustancias como polifenoles, flavonoides y componentes activos¹⁰.

La composición química del propóleo varía según su origen botánico y fitogeográfico. La mayoría de los componentes del propóleo son de naturaleza fenólica, principalmente los flavonoides, se sabe que los fenoles simples y los ácidos fenólicos son agentes antimicrobianos activos⁴⁵, responsables de su actividad farmacológica; los terpenos son los responsables del olor y contribuyen a las propiedades biológicas del propóleo⁴⁶.

En el cuadro 5 se resumen algunas propiedades químicas, biológicas, medicinales y antimicrobianas del propóleo.

Cuadro 5. Propiedades químicas y actividad biológica y antimicrobiana del propóleo.

PROPÓLEO		
Propiedades	Actividad biológica y aplicaciones	Actividad antimicrobiana
<ul style="list-style-type: none"> - A temperaturas elevadas el propóleo es suave, flexible y muy pegajoso. - A temperaturas bajas se vuelve duro y quebradizo. - Soluble en etanol, metanol y agua. 	<ul style="list-style-type: none"> - Modulación del sistema inmune. - Efecto antibacterianos y antifúngicos. - Efecto antioxidante (polifenoles). Enfermedades neurodegenerativas y depresivas. 	<u>Bacterias</u> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Pseudomona aeroginosa</i> - <i>Salmonella typhi</i> - <i>Escherichia coli</i> - <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Bacillus subtilis</i> - <i>Enterococcus sp</i>

	<ul style="list-style-type: none"> - Efecto antiproliferativo (flavonoides, terpenos, y compuestos fenólicos). - Adyuvante en terapias contra el cáncer. - Antidiabético - Antiinflamatorio - Antiulceras - Antviral 	<p><u>Hongos</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Candida parapsittosis</i> - <i>Candida tropicalis</i> - <i>Candida albicans</i> <p><u>Parásitos</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Leishmania</i>
--	--	---

Fuente: Sforcin (2016)⁹, Zabaïou *et al.* (2017)⁴⁶.

2.9 Nanotecnología

En los últimos 20 años la nanociencia y la nanotecnología se han desarrollado en las principales áreas del desarrollo científico. La fortaleza de la nanotecnología se basa en hacer productos más eficientes, multifuncionales y ahorradores de materia prima, dentro de sus aplicaciones se encuentra la producción agrícola y de alimentos. Se define como nanociencia al estudio de los fenómenos y la manipulación de materiales a escala atómica, molecular y macromolecular, donde las propiedades difieren de las de mayor escala y tienen aplicaciones funcionales nuevas y únicas. La nanotecnología se define como el diseño, la producción y la aplicación de estructuras, dispositivos y sistemas mediante el control de tamaño y la forma del material a escala nanométrica; el prefijo “nano” viene del griego, el cual significa pequeño, 1 nanómetro es la mil millonésima parte de un metro (10^{-9}). Las propiedades de las nanopartículas se rigen por las leyes físicas de la mecánica cuántica (como color, solubilidad, resistencia, reactividad química y toxicidad)⁴⁷. Al estar en escala nanométrica, tienen una alta relación superficie-volumen; por lo que, muestran características físicas, químicas y biológicas únicas diferentes en comparación con sus homólogos a escala macro¹¹(Figura 8).

Las nanopartículas deben ser lo suficientemente pequeñas para penetrar la membrana celular, la interacción de las nanopartículas con los microorganismos depende del área superficial disponible⁴⁹.

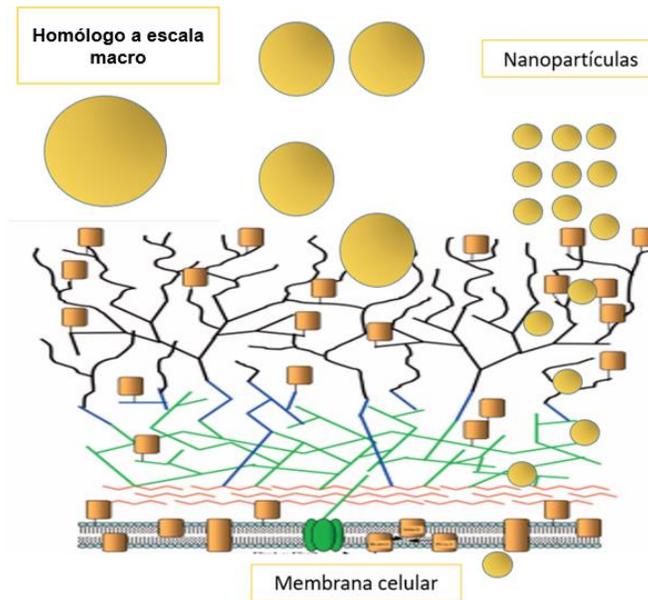


Figura 8. Representación esquemática de la interacción de las nanopartículas y macromoléculas a través de la membrana celular.

En general las nanopartículas se pueden obtener por el método de *top-down* el cual reduce el tamaño de agregación del material hasta obtener un tamaño nanométrico que requiere de un consumo de energía, utilizando métodos físicos (procesos de molienda); y en el método *bottom-up* involucra la obtención de un estado de agregación nanométrico a partir de una dispersión molecular, utilizando métodos químicos en solución coloidal, procesos de formación de nanopartículas a partir de una solución (Figura 9). Es importante la elección del método de obtención de las nanopartículas para garantiza el tamaño de 1-100 nanómetros y el agente estabilizante superficial para mantener el tamaño de las nanopartículas uniforme y la dispersión estable⁴⁸.

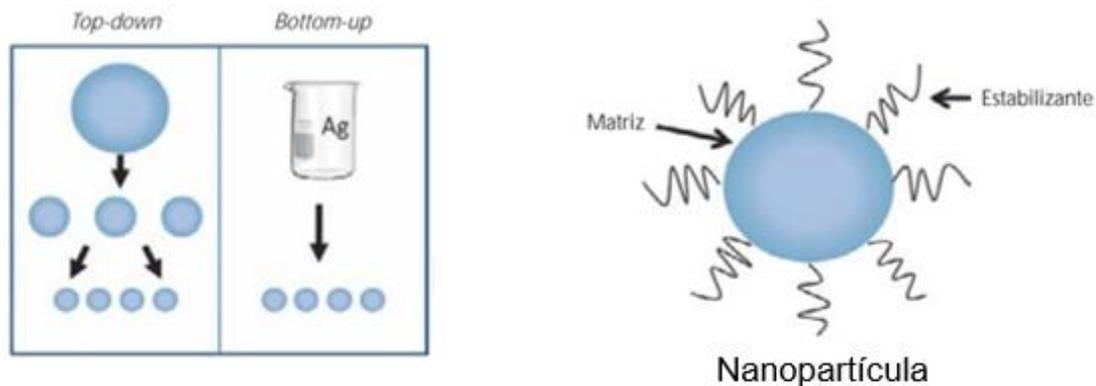
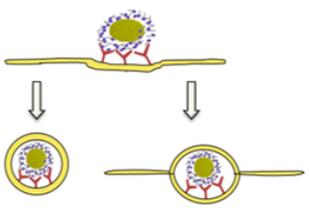
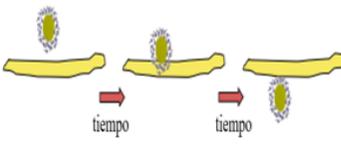
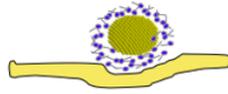


Figura 9. Métodos generales de obtención de nanopartículas y representación esquemática de una nanopartícula. Fuente: Adaptado de Gómez (2013)⁴⁸.

Esta característica puede hacerlas químicamente más reactivas, afectando su resistencia, propiedades eléctricas, magnéticas u ópticas. Las nanopartículas tienen varias aplicaciones en la industria como en el reciclaje de agua (filtros porosos que eliminan 100% virus y bacterias), el sector energético (celdas solares), dispositivos informáticos (nanotransmisores y nanomemorias), agricultura (fertilizantes, herbicidas y plaguicidas), medicina (protectores solares, fungicidas, apósitos para heridas, antibacterianos), ingeniería (sensores químicos, pigmentos, tintas)⁴⁸.

Ortiz (2014)⁴⁹ menciona que puede haber 3 maneras de como traspasan las nanopartículas a la pared celular: endocitosis, semi endocitosis, penetración y adhesión (Cuadro 6).

Cuadro 6. Principales mecanismos de acción de las nanopartículas a través de la membrana celular.

NANOPARTÍCULAS		
Endocitosis y semi endocitosis	Penetración	Adhesión
<p>Endocitosis, la membrana cubre lentamente la nanopartícula hasta ser introducida a la célula.</p> <p>Semi-endocitosis, la nanopartícula es cubierta lentamente pero nunca esta totalmente dentro de la célula, parte de esta permanecerá en la superficie.</p>	<p>Se da cuando la nanopartícula es suficientemente pequeña, los científicos piensan que puede deslizarse a través de la membrana.</p>	<p>Se refiere cuando las nanopartículas se pegan a la membrana.</p>
 <p>Endocitosis Semi - Endocitosis</p>	 <p>tiempo tiempo</p>	

Fuente: Adaptado de Ortiz (2014)⁴⁹.

Las nanopartículas de quitosano se obtienen por el método de *bottom-up*, con esta metodología las sustancias activas (como fármacos, extractos naturales entre otros) se atrapan o ligan a la matriz polimérica. El potencial Z es un factor clave que contribuye al efecto antifúngico del quitosano debido a la interacción con la superficie microbiana por su carga negativa. Las nanopartículas de quitosano policatiónicas con una elevada carga superficial interactúan más eficazmente con el hongo en comparación con la forma libre del polímero de quitosano; además de tener mayor afinidad por unirse a las células de los hongos; debido a su tamaño nanométrico contribuyen a un área de superficie mayor,

lo que permite que las nanopartículas puedan adsorberse más firmemente sobre la superficie de las células fúngicas y alterar la integridad de la membrana⁵⁰.

2.10 Recubrimientos comestibles

Un recubrimiento comestible se define como una capa delgada formada por materiales comestibles depositados sobre la superficie del alimento con el propósito de extender su vida útil y proporcionar una barrera efectiva contra los riesgos que generan las condiciones ambientales existentes. Los principales materiales poliméricos utilizados para producir los recubrimientos son los polisacáridos (quitosano), proteínas (suero de leche) y lípidos (aceite de girasol)⁵¹.

Los recubrimientos comestibles crean una barrera física a los gases produciendo una atmósfera modificada⁴³ al interior del fruto y retardan el proceso de senescencia a un costo más bajo. También, se pueden adicionar a los recubrimientos antioxidantes, agentes antimicrobianos, saborizantes, pigmentos, minerales, bioflavonoides y nutrientes⁵².

En los últimos años se ha estudiado la adición a los recubrimientos comestibles de compuestos naturales como el quitosano y los extractos naturales como el propóleo con el fin de aumentar sus propiedades antimicrobianas (Cuadro7).

Cuadro 7. Efecto antimicrobiano de recubrimientos a base de quitosano/propóleo

Microorganismo	Efecto antimicrobiano	Concentración de quitosano/propóleo	Referencia
<i>Bacillus cereus</i> , <i>Cronobacter sakazakii</i> , <i>Escheria coli</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	La película de quitosano presento inhibición frente a las bacterias Gram + (3.11 – 3.26 Log) siendo mayor en estas que en las bacterias Gram-. La inhibición aumento con la adición del extracto de propóleo, reduciendo el recuento de patógenos entre 3.87 log y 5.58 Log en comparación con el control a las 24 h de incubación.	2% quitosano / 10% propóleo	Torlak y Sert (2013) ⁵³
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Se obtuvo un porcentaje de inhibición del 18.2% al cuarto día de incubación.	1% Quitosano 1% / 5% propóleo	Barrera <i>et al.</i> (2015) ¹²
<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella Enteritidis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Las películas de quitosano no mostraron inhibición; sin embargo, al adicionar el extracto de propóleo se observó su efecto inhibitorio en las bacterias Gram+ (<i>S. aureus</i>).	2% quitosano / 2.5, 5, 10 y 20 % propóleo	Siripatrawan y Vitchayakitti (2016) ⁵⁴
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>In vitro</i> Hubo una reducción significativa de las unidades formadoras de colonias de <i>E. faecalis</i> al adicionar las nanopartículas de quitosano a los 7 días de incubación (2.04±0.57) y a los 14 días (2.51±0.9).	5 mg nanopartículas de quitosano / 5 mg propóleo <i>In vitro e in situ</i>	Del Carpio <i>et al.</i> (2017) ⁵⁵

	<p>Al adicionar el extracto de propóleo fue efectivo sólo en los primeros 7 días (2.04±0.57).</p> <p><i>In situ</i></p> <p>El control presentó un porcentaje de células viables del 96.1%, al adicionar las nanopartículas de quitosano, a los 7 días esta fue de 30.37% y a los 14 días de 12.23%. Con el extracto de propóleo, a los 7 días fue de 23.93% y a los 14 días 59.3%.</p>		
<i>Listeria innocua</i>	<p>Se obtuvo una disminución de <i>L. innocua</i> de 3.38 log ufc g⁻¹ frente a 4.22 log ufc g⁻¹ del control</p>	<p>0.5% quitosano / 15.4 g / 150 ml propóleo</p>	<p>Rollini <i>et al.</i> (2017)⁵⁶</p>

3. JUSTIFICACIÓN

Existe una problemática a nivel mundial asociada con las enfermedades crónicas no transmisibles causada por la exposición continua de aflatoxinas provenientes de varias especies de hongos del género *Aspergillus* incluyendo *A. flavus*. Además, las aflatoxinas, son un metabolito secundario que puede contaminar los cereales durante la cosecha, almacenamiento o procesamiento de los alimentos. Debido a esto, es necesario encontrar soluciones para su control. En los últimos años, se han realizados estudios sobre los recubrimientos comestibles para alargar la vida de anaquel de los productos agrícolas con el uso de compuestos naturales como el quitosano y otros extractos naturales como el propóleo, los cuales poseen propiedades antimicrobianas notables. Por otro lado, el avance de la nanotecnología ha permitido integrar y hacer más eficientes los componentes de los recubrimientos al ser más reactivos y eficientes.

4. HIPÓTESIS

La aplicación de recubrimientos nanoestructurados a base de quitosano y/o propóleo y extracto de propóleo, afectarán el desarrollo *in vitro* y la producción de aflatoxinas del hongo toxicogénico *A. flavus*.

5. OBJETIVOS

5.1 objetivo general

Determinar la actividad antifúngica *in vitro* de quitosano y extracto de propóleo, solos o combinados, e integrados en recubrimientos nanoestructurados sobre *A. flavus* y su producción de aflatoxinas

5.2 Objetivos específicos

1. Desarrollar formulaciones de recubrimientos nanoestructurados con quitosano y /o propóleo y extracto de propóleo.
2. Caracterizar los recubrimientos nanoestructurados mediante Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM) y el Potencial Z.
3. Evaluar el efecto de los recubrimientos nanoestructurados sobre la inhibición y crecimiento micelial y la germinación de *A. flavus*.
4. Evaluar el efecto de los recubrimientos nanoestructurados, sobre la producción de aflatoxinas totales.

6. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

6.1 Materiales y métodos

6.1.1 Material fúngico

6.1.1.2 Preparación de medio de cultivo para el crecimiento de *A. flavus*

Se colocaron 500 mL de agua destilada en un matraz Erlenmeyer de 1000 mL, al cual se adicionaron 25 g del medio Czapek-Dox (BD BIOXON LT 3205865). El medio se colocó en una parrilla de calentamiento con agitación constante hasta su homogenización y se dejó hervir durante 1 min. Posteriormente, se esterilizó durante 15 min a 15 lb de presión en una autoclave marca AESA modelo CV300 mexicana. Una vez que bajó la temperatura del medio, este se vertió en cajas Petri (10 cm de diámetro) en una campana de flujo laminar previamente esterilizada durante 15 min con UV.

Se marcaron las cajas Petri y se guardaron dentro de una bolsa de plástico para utilizarlas posteriormente (Figura 11).



Figura 11. Preparación del medio de cultivo y almacenamiento de las cajas Petri.

6.1.1.3 Activación de la cepa de *A. flavus*

La cepa de *A. flavus* fue proporcionada por el Dr. Miguel Ángel Cornejo Cortés del Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán de la Universidad Autónoma de México

Se preparó una solución de Hipoclorito de sodio (NaClO) al 5% en la cual se sumergieron durante 30 s 10 semillas en las variedades de maíz: ‘elotes cónicos’, ‘maíz ancho’ y ‘maíz amarillo tardío’ las cuales se obtuvieron del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) Valle de México, Estado de México y 2 elotes que se obtuvieron del Mercado Municipal de Yautepec. El material se enjuagó con agua desionizada y se secó en papel absorbente estéril. En la campana de flujo laminar, se inocularon las semillas y elotes con la cepa de *A. flavus*, tomando con una aguja de disección una porción muy pequeña de micelio. Las muestras se colocaron en una cámara húmeda durante 7 días a temperatura ambiente ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$) hasta que los signos del hongo fueron visibles presentando micelio de color verde amarillento.

Se aisló una punta de hifa del hongo, la cual se sembró en una caja Petri con el medio Czapek-Dox. Las cajas se incubaron a 28°C durante 7 días aproximadamente⁵⁷ (Figura 12):



Figura 12. Activación de la patogenicidad de la cepa de *A. flavus*.

6.1.1.4 Preparación de la solución de esporas de *A. flavus*

Se tomó una caja Petri del cultivo de *A. flavus* a la cual se les adicionaron 10 mL de agua desionizada. Con un asa bacteriológica se raspó el contenido el cual se vertió en un matraz Erlenmeyer de 20 mL. Las esporas se contaron en una cámara de Neubauer con la ayuda de un microscopio Nikon (Modelo ALPHAPHOT-2 YS2-H) con el objetivo de 40X y un contador manual de cuatro dígitos. Mediante diluciones se ajustó la solución de esporas a $10^5/\text{mL}$ ⁵⁸ (Figura 13).

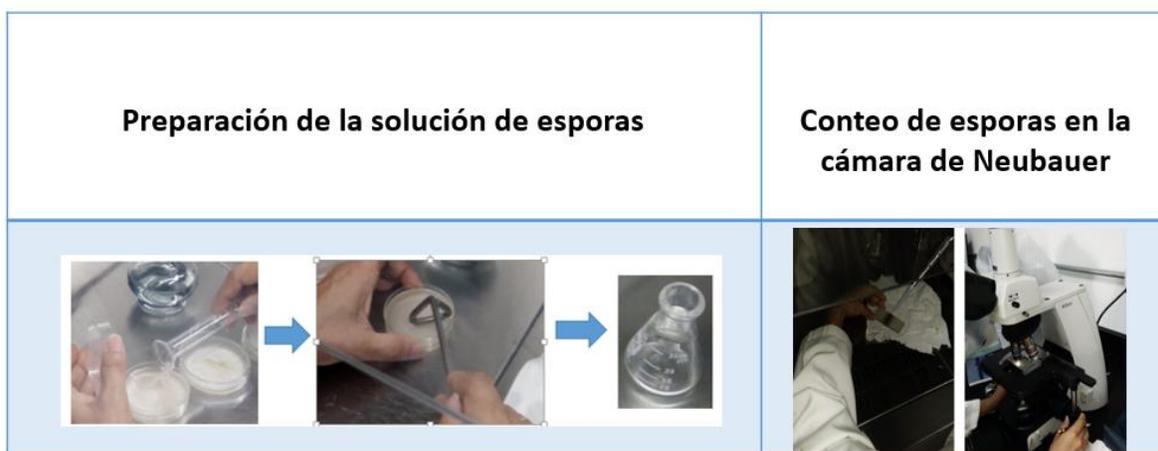


Figura 13. Preparación de la solución de esporas de *A. flavus*.

6.1.2 Elaboración de nanopartículas de quitosano y propóleo por el método de precipitación

6.1.2.1 Elaboración de nanopartículas de quitosano

Se preparó una solución de quitosano al 0.05% (p/v), para lo cual 0.05 g de quitosano comercial (Quitosano de baja densidad, 89.34% grado de des acetilación, con peso molecular de 89,306 g-Mol) se disolvieron en ácido acético 1% (v / v). Se dejó en agitación constante durante 24 h y se ajustó el pH a 5.6 con una solución de NaOH 1N.

Se preparó una solución alcohólica con 480 mL de etanol y 8 mL de tween 20 y se dejó en agitación durante 1h.

Posteriormente, a 40 mL de la solución alcohólica se agregaron 2.5 mL de la solución de quitosano al 0.05%, con agitación constante con una bomba peristáltica (Masterflex C/L Dual-Channel Pump) a una velocidad baja. Una vez que se obtuvo la solución de nanopartículas se removió el etanol en un rotavapor (Rotavapor Buchi R-300) en un baño maría a 40 °C con una velocidad de rotación de 40 rpm a un vacío de 100 mbar, hasta un volumen de 2.5 mL. Las nanopartículas que se obtuvieron se almacenaron en refrigeración ⁵⁹ (Figura 14).



Figura 14. Preparación de las nanopartículas de quitosano y propóleo por el método de precipitación.

6.1.2.2 Elaboración de nanopartículas de propóleo

Se utilizó el extracto fluido de propóleo al 30%, el cual se obtuvo del laboratorio de remedios herbolarios Rosa Elena Dueñas, S.A de C.V. Lote No. EFP008754516. Ahuatepec No.12 Colonia Antonio Barona Cuernavaca, Morelos.

Previo a la definición final en la concentración de propóleo, se evaluaron factores como la temperatura y la luz, quedando la concentración final de 0.6%. La metodología de preparación correspondió también a la de Luque-Alcaráz *et al.* (2012)⁵⁹ (inciso 6.1.2.1).

6.1.3 Elaboración de los recubrimientos nanoestructurados

A una solución de quitosano 1%(v/v), se le agregó ácido acético 1% (v /v) y glicerol 0.3% en agitación constante. Posteriormente, se calentó entre 45-60°C y se adicionó el propóleo (0.6%) lentamente. Ya homogenizada la solución, se adicionaron las nanopartículas de quitosano y propóleo y se homogeneizó nuevamente durante 1 min a 10,000 rpm.

El efecto de las cubiertas en el desarrollo de *A. flavus* se evaluó con las concentraciones 5, 10, 20, 30, 40 y 50%, mediante la técnica de pozos (inciso 6.1.4.1).

Posteriormente se evaluaron 9 tratamientos con las concentraciones 20, 30 y 40% de nanopartículas (Cuadro 8). Se consideraron las variables (halo de inhibición, crecimiento micelial y germinación de esporas) (inciso 6.1.4.1.1)

Cuadro 8. Componentes de las formulaciones de los recubrimientos nanoestructurados.

Formulaciones	Solución de quitosano (1%) %	Glicerol %	Nanopartículas de propóleo %	Nanopartículas de quitosano %	Extracto de propóleo (10%) %
20% Nanoparticulas					
T1	99.7	0.3	-	-	-
T2	79.7	0.3	20	-	-
T3	79.7	0.3	-	20	-
T4	99.1	0.3	-	-	0.6
T5	79.7	0.3	10	10	-
T6	79.1	0.3	10	10	0.6
T7	79.1	0.3	20	-	0.6
T8	79.1	0.3	-	20	0.6
T9	Czapek-Dox				
30% Nanoparticulas					
T1	99.7	0.3	-	-	-
T2	69.7	0.3	30	-	-

T3	69.7	0.3	-	30	-
T4	99.1	0.3	-	-	0.6
T5	69.7	0.3	15	15	-
T6	69.1	0.3	15	15	0.6
T7	67.1	0.3	30	-	0.6
T8	67.1	0.3	-	30	0.6
T9	Czapek-Dox				
40% Nanoparticulas					
T1	99.7	0.3	-	-	-
T2	59.7	0.3	40	-	-
T3	59.7	0.3	-	40	-
T4	99.1	0.3	-	-	0.6
T5	59.7	0.3	20	20	-
T6	59.1	0.3	20	20	0.6
T7	59.1	0.3	40	-	0.6
T8	59.1	0.3	-	40	0.6
T9	Czapek-Dox				

6.1.3 Caracterización física de las nanopartículas

6.1.3.1 Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM)

Para la observación de las muestras en TEM, se colocaron en una rejilla porta muestra (lado oscuro de la rejilla) para TEM Lacey-Carbon, 2 μ L del recubrimiento T2 (40% de nanopartículas de propóleo), T3 (40% de nanopartículas de quitosano) y las nanopartículas de quitosano como control y se dejó secar a temperatura ambiente. Se observó en un Microscopio de Transmisión Electrónica (JEOL-JEM 2100, CNMM-IPN), con un voltaje de operación de 80 kV. El tamaño de las nanopartículas promedio se calculó a partir de las imágenes del TEM utilizando el programa de imágenes J⁶⁰(Figura 15).

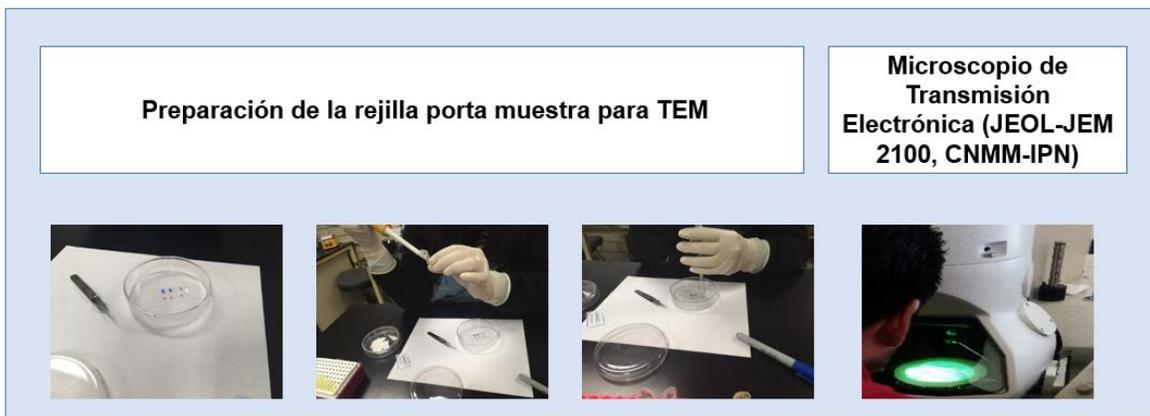


Figura 15. Caracterización de los recubrimientos nanoestructurados por TEM.

6.1.3.2 Potencial Z

Para determinar el Potencial zeta y la distribución de las nanopartículas mediante dispersión dinámica de la luz (DLS), se utilizó un Zetasizer Nano - ZS90 (Instrumentos Malvern). Se colocaron aproximadamente 3 mL de la muestra del recubrimiento T2 (40% de nanopartículas de propóleo), T3 (40% de nanopartículas de quitosano) y T9 (nanopartículas de quitosano), en una celda de cuarzo para su análisis⁶⁰ (Figura 16).

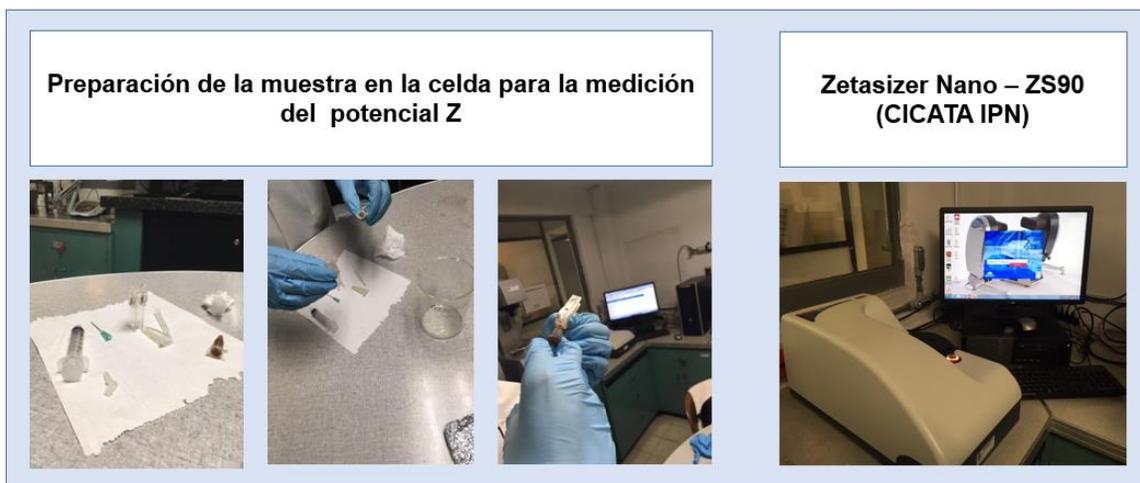


Figura 16. Determinación del potencial Z de los recubrimientos nanoestructurados.

6.1.4 Variables de evaluación del crecimiento de *A. flavus*

6.1.4.1 Técnica de pozos

Se siguió la técnica de pozos para medir el halo de inhibición. En condiciones estériles, a cada caja Petri con agar Czapek-Dox se le adicionaron 0.5 ml de suspensión de esporas 10^5 , la cual se esparció en toda la caja con un asa bacteriológica estéril en forma de L. Se dejó secar la solución fúngica y posteriormente con un horador de 5 mm de diámetro se realizaron 5 orificios a los que se les adicionó 20 μ l de cada tratamiento (formulaciones nanoestructuradas). Las cajas se dejaron a temperatura ambiente. Se realizaron 6 repeticiones de cada tratamiento

6.1.4.1.1 Variables

6.1.4.1.1.1 Halo de inhibición

Se midió el halo de inhibición (mm) diariamente con la ayuda de un vernier digital⁶¹ durante 7 días (Figura 17).



Figura 17. Técnica de pozos para evaluar el crecimiento de *A. flavus*.

6.1.4.2 Técnica de envenenamiento del medio

En cajas Petri con el medio de cultivo (Czapek-Dox) se les adicionaron 0.25 mL del tratamiento, se dejó secar en una campana de flujo laminar y posteriormente se le adicionaron en la parte central 10 μ L de la solución de esporas. Se realizaron 6 repeticiones por cada tratamiento.

6.1.4.2.1 Variables

6.1.4.2.1.1 Crecimiento micelial.

El crecimiento micelial se midió diario con la ayuda de un Vernier a temperatura ambiente 25 ± 2 (Figura 18).



Figura 18. Técnica de envenenamiento del medio para la medición del crecimiento micelial de *A. flavus*.

La inhibición del crecimiento micelial, se evaluó en relación al crecimiento micelial del control con la formula siguiente:

$$\text{Área de inhibición} = \pi (r^2)$$

Donde:

$$\pi = 3.1416$$

r= radio del crecimiento micelial

6.1.4.2.1.2 Germinación de esporas.

Se utilizaron las cajas Petri del ensayo del crecimiento micelial (2 cajas por tratamiento de manera aleatoria), a las cuales se les agregó 20 mL de agua destilada estéril. Se raspó la caja con un asa bacteriológica en forma de L estéril. Discos de Czapek-Dox de 20 mm de diámetro se colocaron sobre un portaobjetos en el interior de una caja Petri de 90 mm de diámetro. A cada uno se les depositó 25 μL de la solución de esporas (10^5). Se sellaron las cajas con parafilm. Se colocó una gota de lactofenol en cada disco a las 2, 4, 6, 8 y 10 h para evaluar la cinética de germinación. Se realizaron 6 repeticiones por tratamiento. Se realizó el conteo de esporas con un hematocitómetro de cada uno de los tratamientos a 40X (Figura 19).



Figura 19. Técnica para evaluar la germinación de esporas de *A. flavus*.

Se evaluaron 100 esporas por disco en el microscopio óptico, objetivo 40X (Nixon alphaptol-2 YS2-H, Japón) y se determinó el porcentaje de germinación (G (%)), donde E_G representa el número de esporas germinadas y T_E el total de esporas. Se consideró que una espора había germinado cuando se observó la presencia del tubo

$$G(\%) = \left(\frac{E_G}{T_E}\right) \times 100$$

germinativo en su fase inicial⁶²(Figura 20).

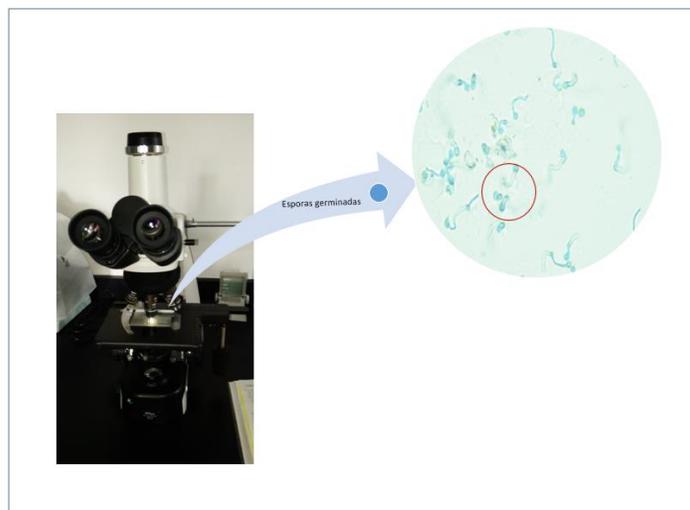


Figura 20. Observación de esporas germinadas de *A. flavus*.

6.1.4.3 Evaluación del contenido de aflatoxinas

El contenido de aflatoxinas totales se determinó en el laboratorio de Alimentos, micotoxinas y micotoxicosis, de la Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán de la Universidad Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Juan Carlos del Río, siguiendo la metodología propuesta por Méndez-Albores *et al.* (2009)⁶³.

6.1.4.3.1 Preparación de la muestra

Se prepararon los nueve recubrimientos que se reportan en el Cuadro 9, los cuales se colocaron en 6 cajas Petri por tratamiento. A cada caja se les depositaron 25 μL de la solución de esporas (10^5) y se incubaron durante 15 días a una temperatura ambiente ($28 \pm 2^\circ\text{C}$).

6.1.4.3.1 Extracción de la muestra

El agar de la caja Petri de cada tratamiento se licuó con 50 mL de una solución de metanol con agua (80/20) durante 1 min. Se filtró la mezcla a través de un papel filtro (Whatman No. 100).

6.1.4.3.2 Determinación de aflatoxinas totales

Se pesaron 10 mL del filtrado por la columna de afinidad monoclonal AflaTest (VICAM Science Technology, Watertown, MA, U.S.A) posteriormente, se filtraron 10 mL de agua ultrafiltrada a través de la columna; se adiciono 1 mL de metanol grado HPLC y se recibió el filtrado en una celda de cristal.

6.1.4.3.2.1 Determinación fluorométrica de las aflatoxinas

Se agregó a la muestra 1mL del revelador (disolución de bromo 0.002%), se mezcló y posteriormente se colocó la celda en el fluorómetro VICAM (Series 4 Fluorometer VICAM) el cual dio la lectura digital después de 1 min⁶⁴ (Figura 21).



Figura 21. Determinación de aflatoxinas totales producidas por *A. flavus* bajo diferentes tratamientos de quitosano y propóleo.

6.2 Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza y comparación de medias de Tukey ($p \geq 0.05$) con el programa Infostat versión estudiantil 2017.

7. RESULTADOS

7.1 Estudio de microscopia. Caracterización física de las nanopartículas

7.1.1 Microscopia TEM

En las imágenes se pudo observar que la morfología de las nanopartículas fue esférica en todos los tratamientos. Las nanopartículas del T2 (NpP) presentaron un tamaño promedio de 2.33 ± 0.36 nm, mientras que las del T3 (NpQ) tuvieron un tamaño promedio de 3.00 ± 0.70 nm, al igual que las nanopartículas de quitosano utilizadas como control (3.00 ± 1.01 nm). Las micrografías mostraron a un aumento de 20 nm que las nanopartículas del T2 (NpP) se encontraban dispersas, mientras que, en el T3 (NpQ) y control a 100 nm de aumento, éstas se observaron en aglomeraciones (Figura 22).

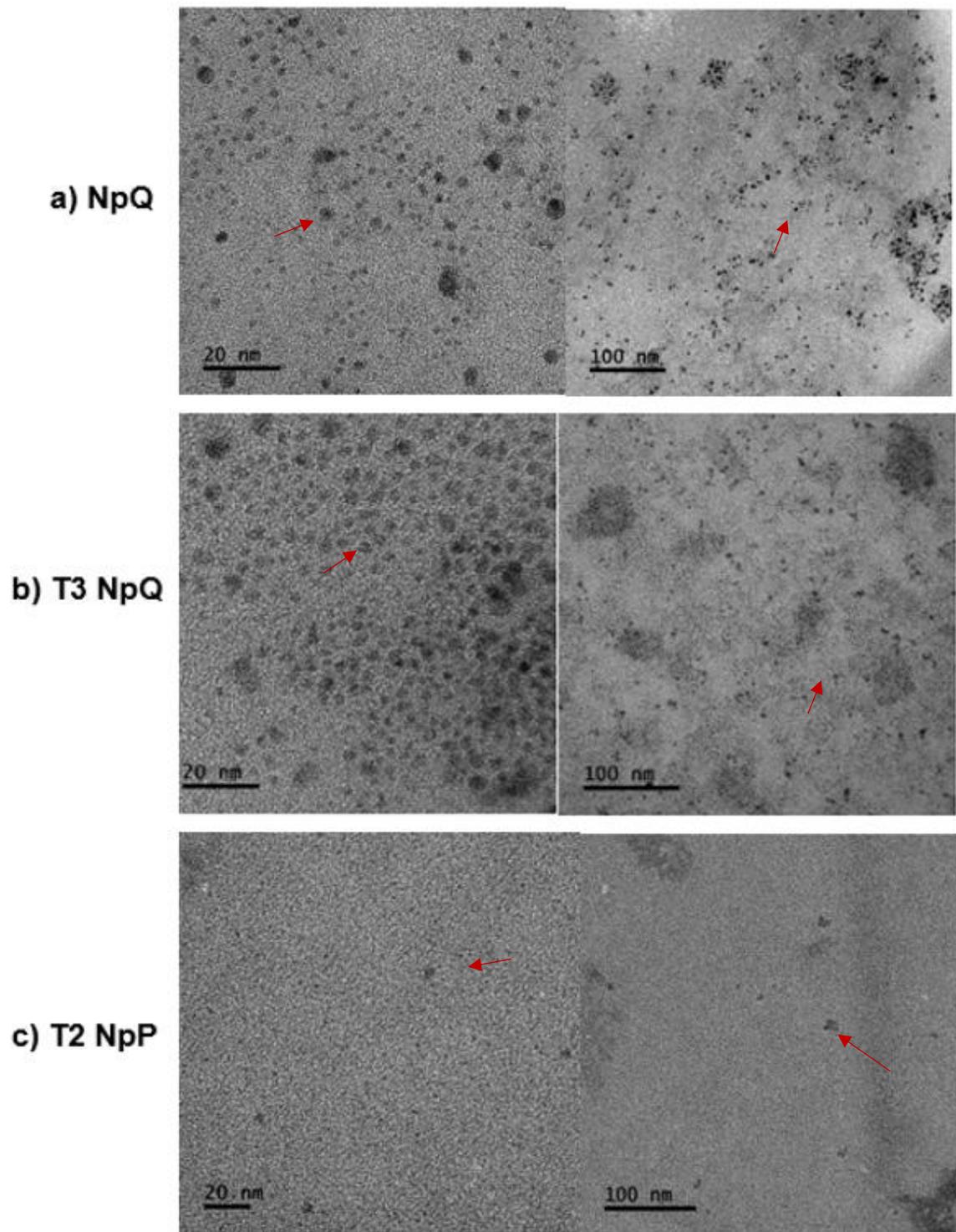


Figura 22. Microscopía Electrónica de Transmisión: a) NpQ (nanopartículas de quitosano), b) T3 NpQ (nanopartículas de quitosano al 40%) y c) T2 NpP (nanopartículas de propóleo al 40%).

7.1.2 Potencial Z

Se pudo observar que a medida que aumentó la magnitud del potencial Z, la repulsión electrostática entre las partículas fue mayor y la dispersión coloidal fue más estable. Los valores del potencial Z fueron los siguientes: T2 (NpP) $+18.5\text{mV} \pm 1.8$, T3 (NpQ) $+116.2\text{mV} \pm 16.4$ y para las nanopartículas de quitosano, $+21.3\text{mV} \pm 0.06$.

En el caso del recubrimiento T2 (NpP), el propóleo no permitió el paso de la luz (TEM) y el láser, por lo que se tuvieron que hacer diluciones para su determinación.

7.2 Efecto de los recubrimientos nanoestructurados en el crecimiento *in vitro* de *A. flavus*

7.2.1 Técnica de pozos

En los cuadros 9, 10 y 11 se presentan los resultados del análisis de varianza y comparación de medias mediante la prueba de Tukey de los tratamientos evaluados. En los resultados se puede observar que el recubrimiento que mostró mayor halo de inhibición a una concentración del 20% en el desarrollo de *A. flavus* fue el T2 (NpP), seguido del T7 (NpP+EP) , T5 (NpP+NpQ) y T6 (NpP+NpQ+EP) (2.50, 2.44, 2.24 y 1.94 cm, respectivamente), mostrando diferencias significativas con respecto al control (0.0 cm) (Cuadro 9).

Cuadro 9. Efecto de recubrimientos nanoestructurados al 20% (propóleo y/o quitosano) en el desarrollo *in vitro* del hongo *A. flavus* mediante la técnica de pozos.

Recubrimientos nanoestructurados	Halo de inhibición (cm) ($\bar{x} \pm D.E$)
T1 Q (1%)	0.00 \pm 0.00 c*
T2 NpP (20%)	2.50 \pm 0.38 a
T3 NpQ (20%)	1.91 \pm 0.48 a
T4 EP (0.6%)	0.82 \pm 0.42 b
T5 NpP (10%) +NpQ (10%)	2.24 \pm 0.35 a
T6 NpP (10%) +NpQ (10%) +EP (0.6%)	1.94 \pm 0.50 a
T7 NpP (20%) +EP (0.6%)	2.43 \pm 0.22 a
T8 NpQ (20%) +EP (0.6%)	2.15 \pm 0.46 a
T9 Control	0.00 \pm 0.00 c

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes. ANOVA y prueba de Tukey ($p > 0.05$). Q (quitosano), NpP (nanopartículas de propóleo), NpQ (nanopartículas de quitosano), EP (extracto de propóleo).

Con respecto a la concentración del 30% de nanopartículas, el recubrimiento que presentó mayor halo de inhibición en el desarrollo de *A. flavus*, fue el T6 (NpP+NpQ+EP) presentado diferencias significativas con respecto al control (T9) (2.02 y 0.0 cm, respectivamente) (Cuadro 10).

Cuadro 10. Efecto de recubrimientos nanoestructurados al 30% (propóleo y/o quitosano) en el desarrollo *in vitro* del hongo *A. flavus* mediante la técnica de pozos.

Recubrimiento nanoestructurado	Halo de inhibición (cm) ($\bar{x} \pm D.E$)
T1 Q (1%)	0.00 \pm 0.00 d*
T2 NpP (30%)	1.57 \pm 0.23 b
T3 NpQ (30%)	0.63 \pm 0.06 c
T4 EP (0.6%)	0.82 \pm 0.42 c
T5 NpP (15%) +NpQ (15%)	0.63 \pm 0.07 c
T6 NpP (15%) +NpQ (15%) +EP (0.6%)	2.02 \pm 0.14 a
T7 NpP (30%) +EP (0.6%)	1.58 \pm 0.21 b
T8 NpQ (30%) +EP (0.6%)	0.70 \pm 0.10 c
T9 Control	0.00 \pm 0.00 d

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes. ANOVA y prueba de Tukey ($p>0.05$). Q (quitosano), NpP (nanopartículas de propóleo), NpQ (nanopartículas de quitosano), EP (extracto de propóleo).

Los resultados mostraron que a una concentración del 40% de nanopartículas, los recubrimientos que presentaron mayor halo de inhibición en el desarrollo de *A. flavus* fueron los tratamientos T2 (NpP) (2.05 cm), T6 (NpP+NpQ+EP) (2.20 cm) y el recubrimiento T7 (NpP+EP) (1.01 cm); presentando diferencias significativas con respecto al control (T9) (0.0 cm) (Cuadro 11).

Cuadro 11. Efecto de recubrimientos nanoestructurados al 40% (propóleo y/o quitosano) en el desarrollo *in vitro* del hongo *A. flavus* mediante la técnica de pozos.

Recubrimientos nanoestructurados	Halo de inhibición (cm) ($\bar{x} \pm D.E$)
T1 Q (1%)	0.00 \pm 0.00 d*
T2 NpP (40%)	2.05 \pm 0.65 a
T3 NpQ (40%)	0.67 \pm 0.08 c
T4 EP (0.6%)	0.82 \pm 0.42 bc
T5 NpP (20%) +NpQ (20%)	1.22 \pm 0.17 b
T6 NpP (20%) +NpQ (20%) +EP (0.6%)	2.20 \pm 0.18 a
T7 NpP (40%) +EP (0.6%)	1.01 \pm 0.18 a
T8 NpQ (40%) +EP (0.6%)	0.73 \pm 0.10 bc
T9 Control	0.00 \pm 0.00 d

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes. ANOVA y prueba de Tukey ($p > 0.05$). Q (quitosano), NpP (nanopartículas de propóleo), NpQ (nanopartículas de quitosano), EP (extracto de propóleo).

En general se observó que el T6 (NpP+NpQ+EP) presentó mayor halo de inhibición en las diferentes concentraciones de nanopartículas (20, 30 y 40%) evaluadas.

Para confirmar el efecto inhibitorio del T6 (NpP+NpQ+EP), en una caja de cultivo se colocó el tratamiento en diferentes concentraciones de nanopartículas. Se observó que a medida que aumenta la concentración de nanopartículas, también se incrementa el efecto inhibitorio. El máximo halo de inhibición se observó a partir de las concentraciones 20, 30, 40 y 50%. a

excepción de las concentraciones al 5 y 10% donde no hubo inhibición en el desarrollo de *A. flavus* (Figura 23).

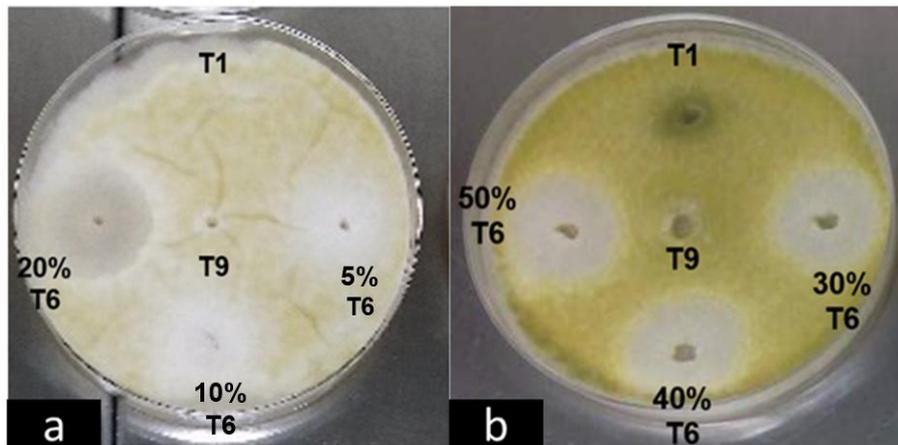


Figura 23. Halo de inhibición del recubrimiento T6 (NpP+NpQ+EP) con diferentes concentraciones de nanopartículas a) 5, 10 y 20%; b) 30, 40 y 50%, sobre *A. flavus*.

7.2.2 Técnica de envenenamiento del medio

7.2.2.1 Crecimiento micelial

En los resultados se pudo observar que el recubrimiento que presentó mayor inhibición a una concentración de nanopartículas del 20% en el crecimiento micelial en el desarrollo de *A. flavus* fue el tratamiento T4 (EP) con una tasa de crecimiento de 0.63 cm/día, una $R^2 = 0.98$, un área de crecimiento micelial de 15.6 cm² y un % de inhibición de 14.25% presentando diferencias significativas con respecto al control (T9) (Cuadro 12) (Figura 24 y 27).

Cuadro 12. Efecto de recubrimientos nanoestructurado al 20% de nanopartículas de propóleo y/o quitosano sobre el crecimiento de *A. flavus* mediante la técnica de envenenamiento del medio.

Recubrimientos Nanoestructurados	Taza de crecimiento (cm/día)	R²	Área de crecimiento (cm²) ($\bar{x} \pm D.E$)	% Inhibición
T1 Q (1%)	0.74	0.9842	21.0 ± 0.00 c*	0.00
T2 NpP (20%)	0.68	0.9955	18.2 ± 0.38 ab	7.70
T3 NpQ (20%)	0.70	0.9939	19.3 ± 0.48 bc	4.62
T4 EP (0.6%)	0.63	0.9892	15.6 ± 0.42 a	14.25
T5 NpP (10%) +NpQ (10%)	0.66	0.9949	17.0 ± 0.35 ab	10.40
T6 NpP(10%)+ NpQ(10%)+EP(0.6%)	0.65	0.9935	16.9 ± 0.50 ab	11.56
T7 NpP (20%) +EP (0.6%)	0.66	0.9970	16.9 ± 0.22 ab	10.59
T8 NpQ (20%) +EP (0.6%)	0.67	0.9962	16.7 ± 0.46 ab	9.63
T9 Control	0.74	0.9842	21.0 ± 0.00 c	0.00

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes. ANOVA y prueba de Tukey ($p>0.05$). Q (quitosano), NpP (nanopartículas de propóleo), NpQ (nanopartículas de quitosano), EP (extracto de propóleo).

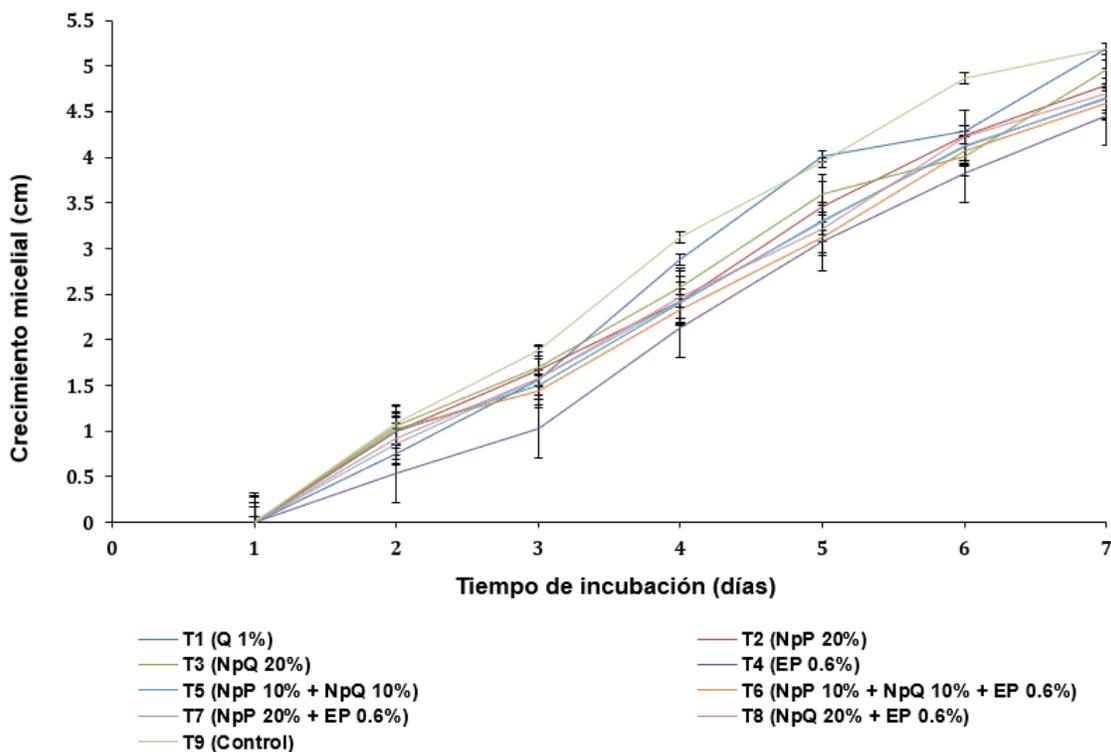


Figura 24. Efecto de recubrimientos nanoestructurados al 20% (propóleo y/o quitosano) en la cinética del crecimiento micelial del hongo *A. flavus*, durante 7 días de incubación a $28 \pm 2^\circ\text{C}$. CV=3.93.

A una concentración del 30 % de nanopartículas los recubrimientos que presentaron mayor inhibición en el crecimiento micelial en el desarrollo de *A. flavus* fueron los tratamientos T2 (NpP) (30%), T5 (NpP+NpQ) y T6 (NpP+NpQ+EP) presentando diferencias significativas en el % de inhibición con respecto al control (T9) (27.20, 27.20, 26.80 y 00.00%, respectivamente) (Cuadro 13) (Figura 25 y 27).

Cuadro 13. Efecto de recubrimientos nanoestructurado al 30% de nanopartículas de propóleo y/o quitosano sobre el crecimiento de *A. flavus* mediante la técnica de envenenamiento del medio.

Recubrimientos Nanoestructurados	Taza de crecimiento (cm/día)	R²	Área de crecimiento (cm²) ($\bar{x} \pm$ D.E)	% Inhibición
T1 Q (1%)	0.71	0.9812	19.50 ± 0.30 b*	00.00
T2 NpP (30%)	0.50	0.4633	07.70 ± 3.63 a	27.20
T3 NpQ (30%)	0.62	0.9556	14.40 ± 9.77 ab	10.60
T4 EP (0.6%)	0.59	0.9892	13.60 ± 2.40 ab	14.50
T5 NpP (15%) +NpQ (15%)	0.50	0.9252	10.00 ± 1.41 a	27.20
T6 NpP(15%) +NpQ(15%)+EP(0.6%)	0.51	0.9800	10.10 ± 1.91 a	26.80
T7 NpP (30%) +EP (0.6%)	0.57	0.9512	13.30 ± 7.09 ab	18.00
T8 NpQ (30%) +EP (0.6%)	0.55	0.9699	12.10 ± 3.13 ab	20.20
T9 Control	0.69	0.9864	18.80 ± 1.45 b	00.00

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes. ANOVA y prueba de Tukey ($p>0.05$). Q (quitosano), NpP (nanopartículas de propóleo), NpQ (nanopartículas de quitosano), EP (extracto de propóleo).

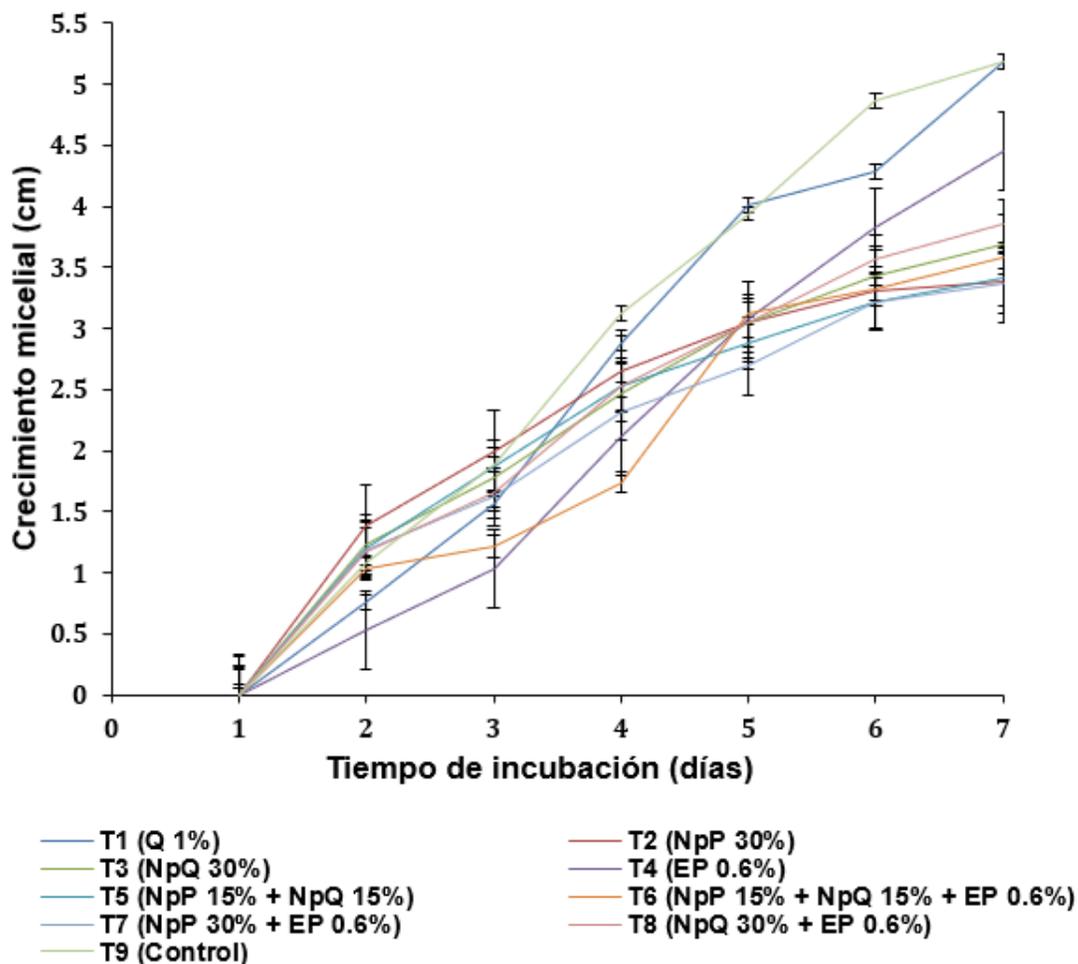


Figura 25. Efecto de los recubrimientos nanoestructurados al 30% (propóleo y/o quitosano) en la cinética del crecimiento micelial en el desarrollo *in vitro* del hongo *A. flavus* durante 7 días de incubación a $28 \pm 2^\circ\text{C}$. CV=3.44.

Los resultados muestran que a una concentración del 40 % de nanopartículas el recubrimiento que presentó mayor inhibición en el crecimiento micelial en el desarrollo de *A. flavus* fue el tratamiento T6 (NpP+NpQ+EP) (32.72%), seguido del T5 (NpP+NpQ) (30.47 %), ambos tratamientos mostraron diferencias significativas con respecto al control (0.0) (Cuadro 14) (Figura 26 y 27).

Cuadro 14. Efecto de recubrimientos nanoestructurados al 40% de nanopartículas de propóleo y/o quitosano sobre el crecimiento de *A. flavus* mediante la técnica de envenenamiento del medio

Recubrimientos Nanoestructurados	Taza de crecimiento (cm/día)	R²	Área de crecimiento (cm²) ($\bar{x} \pm$ D.E)	% Inhibición
T1 Q (1%)	0.71	0.9618	21.0 \pm 0.30 d*	0
T2 NpP (40%)	0.50	0.9589	13.4 \pm 1.92 ab	28.82
T3 NpQ (40%)	0.55	0.9763	15.3 \pm 3.81 bc	21.26
T4 EP (0.6%)	0.59	0.9954	15.6 \pm 2.40 ab	15.33
T5 NpP (20%) +NpQ (20%)	0.48	0.9391	13.9 \pm 2.08 ab	30.47
T6 NpP(20%) +NpQ(20%)+EP(0.6%)	0.53	0.9887	11.0 \pm 1.83 a	32.72
T7 NpP (40%) +EP (0.6%)	0.57	0.9931	12.8 \pm 2.41 ab	18.18
T8 NpQ (40%) +EP (0.6%)	0.56	0.9918	12.5 \pm 1.56 ab	18.60
T9 Control	0.69	0.9792	21.0 \pm 1.45 cd	0

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes. ANOVA y prueba de Tukey ($p > 0.05$). Prueba de Tukey. Q (quitosano), NpP (nanopartículas de propóleo), NpQ (nanopartículas de quitosano), EP (extracto de propóleo).

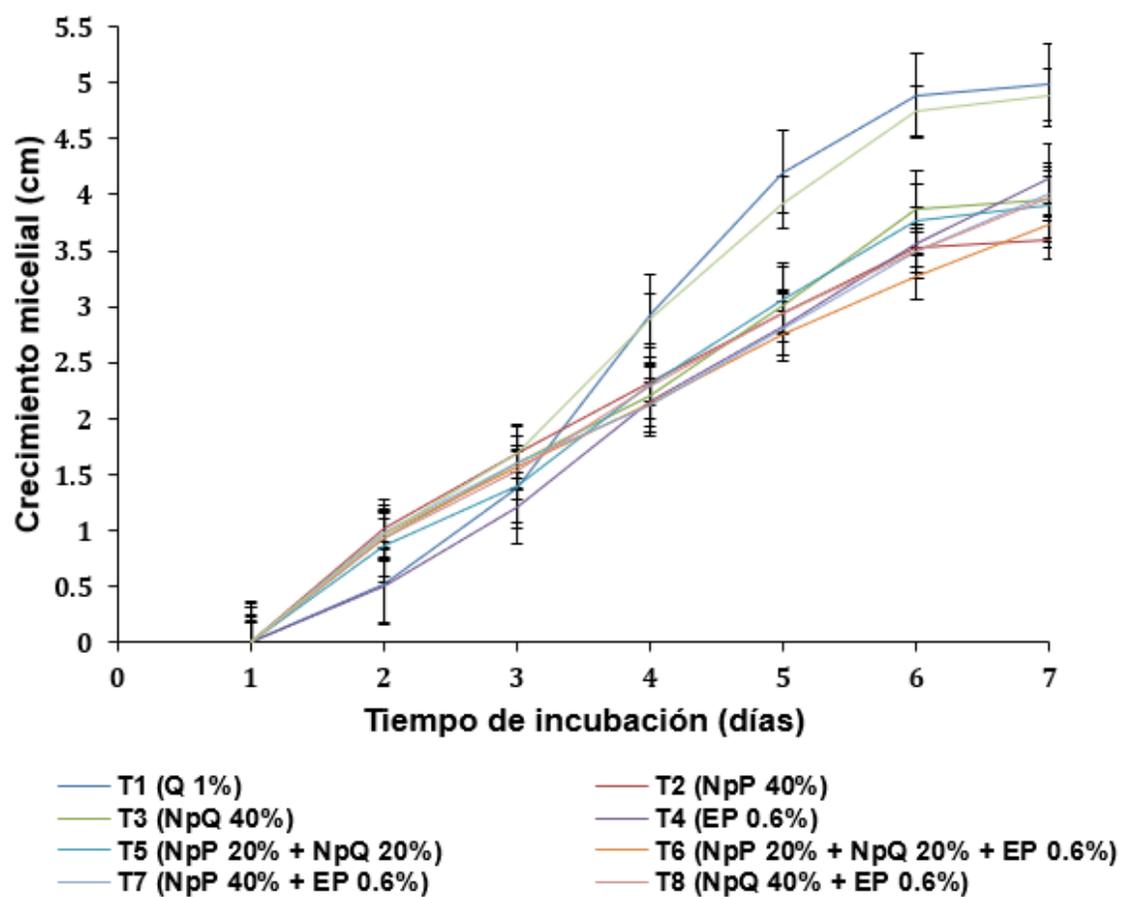


Figura 26. Efecto de los recubrimientos nanoestructurados al 40% (propóleo y/o quitosano) en la cinética del crecimiento micelial *in vitro* del hongo *A. flavus* durante 7 días de incubación a $28 \pm 2^\circ\text{C}$. CV=15.63.

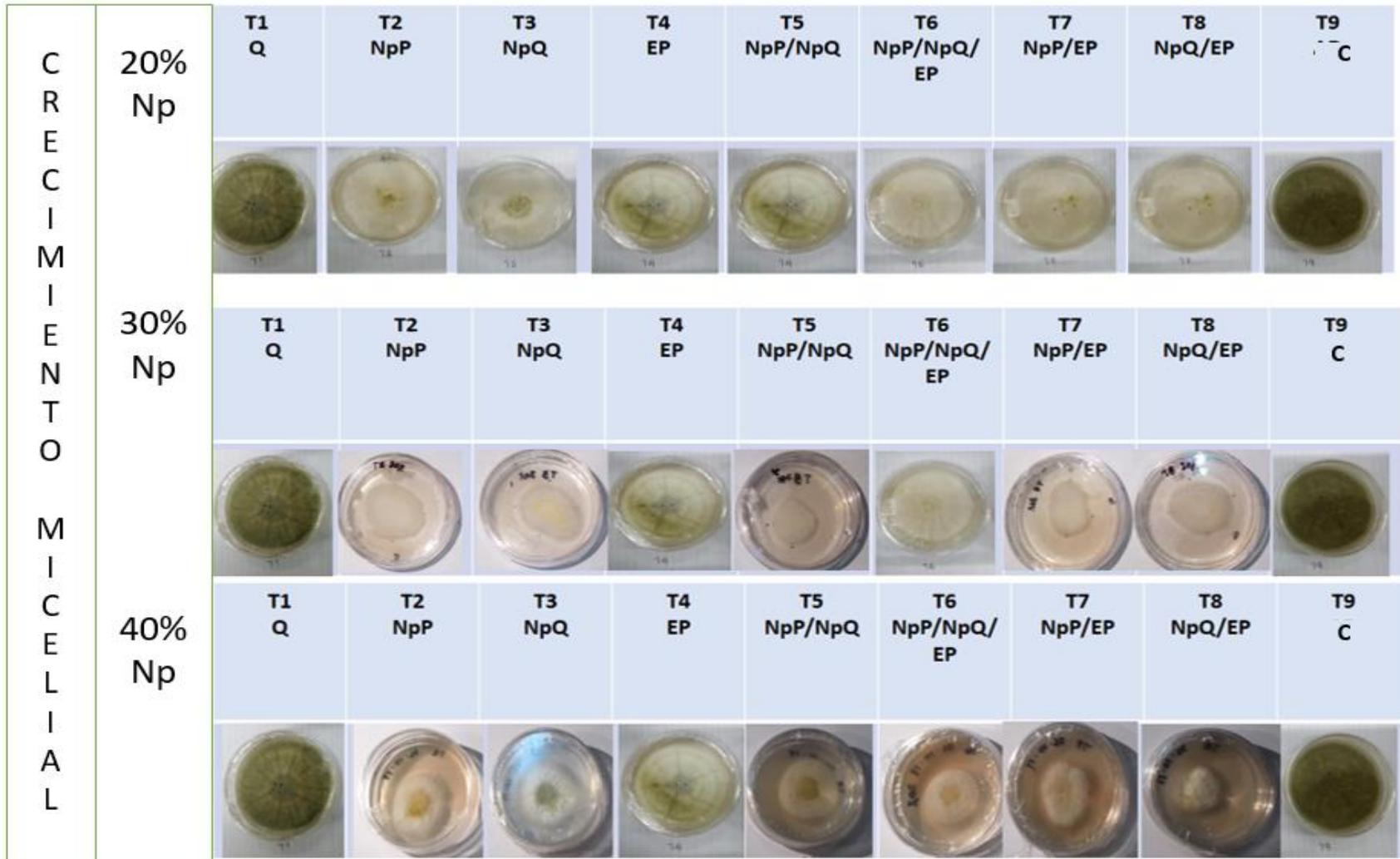


Figura 27. Crecimiento micelial de *A. flavus* incubado en los recubrimientos con diferentes concentraciones de nanopartículas de propóleo y/o quitosano.

7.2.2.2 Germinación de esporas

En los cuadros 15, 16 y 17 se presentan los resultados de la R^2 , análisis de varianza y comparación de medias del porcentaje de las esporas germinadas a las 10 h de incubación y el porcentaje de inhibición de los tratamientos evaluados.

En los resultados se puede observar que el recubrimiento nanoestructurado al 20% que presentó menor porcentaje de germinación de esporas en el desarrollo de *A. flavus* fue el tratamiento T5 (NpP+NpQ) (28%), presentando diferencias significativas con respecto al control (T9) (84%) (Cuadro 15) (Figura 28).

Cuadro 15. Efecto de los recubrimientos nanoestructurados al 20% (propóleo y/o quitosano) en el porcentaje de germinación de esporas en el desarrollo *in vitro* de *A. flavus*.

Recubrimientos Nanoestructurados	R^2	Germinación (%) ($\bar{x} \pm$ D.E)
T1 Q (1%)	0.9700	77.50 \pm 14.77 b*
T2 NpP (20%)	0.8418	93.00 \pm 6.23 cd
T3 NpQ (20%)	0.8638	78.30 \pm 4.68 bc
T4 EP (0.6%)	0.9228	95.50 \pm 1.97 d
T5 NpP (10%) +NpQ (10%)	0.3833	28.00 \pm 7.24 a
T6 NpP(10%) +NpQ(10%)+EP(0.6%)	0.8407	91.33 \pm 3.2 bcd
T7 NpP (20%) +EP (0.6%)	0.8517	90.33 \pm 2.07 bcd
T8 NpQ (20%) +EP (0.6%)	0.9100	85.83 \pm 1.17 bcd
T9 Control	0.8549	84.00 \pm 15.39 bcd

*Valores promedio de 100 observaciones (6 repeticiones por tratamiento). Tiempo de incubación 10 horas. Medias con una letra común no son significativamente diferentes. ANOVA y prueba de Tukey

($p > 0.05$). Prueba de Tukey. Q (quitosano), NpP (nanopartículas de propóleo), NpQ (nanopartículas de quitosano), EP (extracto de propóleo).

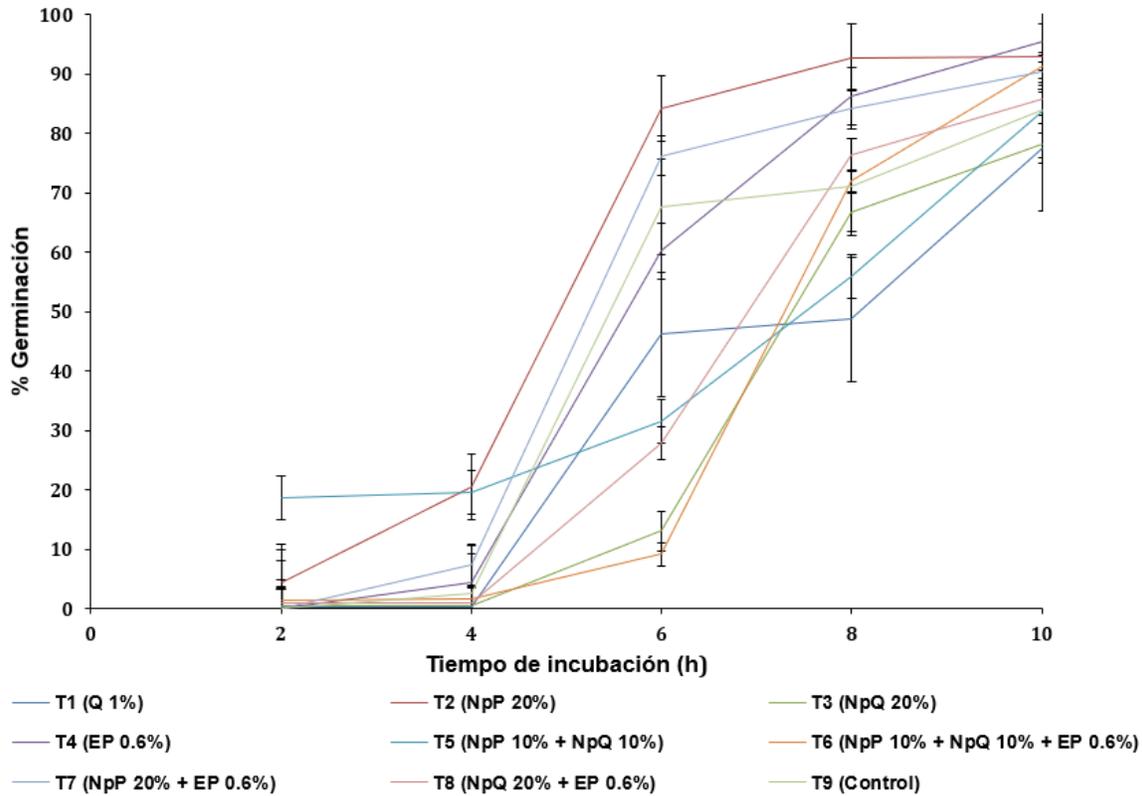


Figura 28. Efecto de los recubrimientos nanoestructurados al 20% (propóleo y/o quitosano) en la cinética de germinación de esporas en el desarrollo *in vitro* de *A. flavus* durante 10 horas de incubación a $28 \pm 2^\circ\text{C}$. CV=10.05.

A una concentración del 30 % de nanopartículas, el recubrimiento que presentó menor porcentaje de germinación de esporas en el desarrollo de *A. flavus* fue el tratamiento T5 (NpP+NpQ) (45.20%), presentando diferencias significativas con respecto al control (T9) (84%). (Cuadro 16) (Figura 29).

Cuadro 16. Efecto de los recubrimientos nanoestructurados al 30% (propóleo y/o quitosano) en el porcentaje de germinación de esporas en el desarrollo *in vitro* de *A. flavus*.

Recubrimientos nanoestructurados	R ²	Germinación (%) ($\bar{x} \pm$ D.E)
T1 Q (1%)	0.9086	77.80 ± 17.77 b*
T2 NpP (30%)	0.6794	98.70 ± 1.21 c
T3 NpQ (30%)	0.9140	77.50 ± 5.01 b
T4 EP (0.6%)	0.9228	95.50 ± 1.97 c
T5 NpP (15%) +NpQ (15%)	0.8794	45.20 ± 6.01 a
T6 NpP (15%) +NpQ(15%) +EP(0.6%)	0.8056	79.00 ± 5.66 b
T7 NpP (30%) +EP (0.6%)	0.9776	90.50 ± 8.62 bc
T8 NpQ (30%) +EP (0.6%)	0.8168	99.20 ± 0.98 c
T9 Control	0.8549	84.00 ± 15.39 bc

*Valores promedio de 100 observaciones (6 repeticiones por tratamiento). Tiempo de incubación 10 horas Medias con una letra común no son significativamente diferentes. ANOVA y prueba de Tukey ($p > 0.05$). Prueba de Tukey. Q (quitosano), NpP (nanopartículas de propóleo), NpQ (nanopartículas de quitosano), EP (extracto de propóleo).

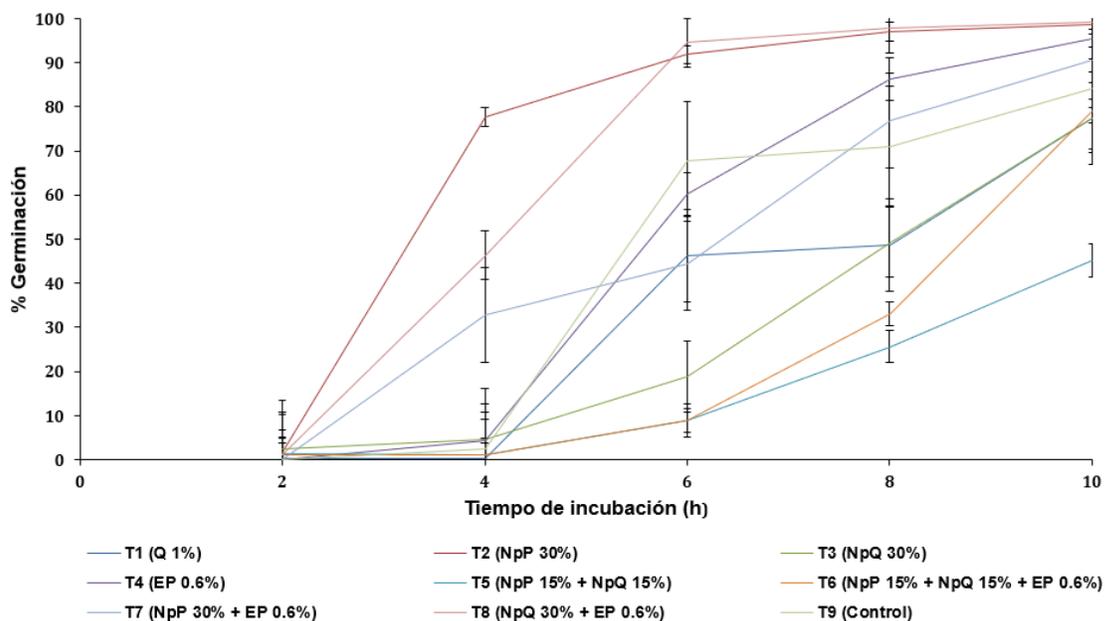


Figura 29. Efecto de los recubrimientos nanoestructurados al 30% (propóleo y/o quitosano) en la cinética de germinación de esporas en el desarrollo *in vitro* de *A. flavus* durante 10 horas de incubación a $28 \pm 2^\circ\text{C}$. CV=10.07.

Con respecto a la concentración del 40% de nanopartículas, el recubrimiento que presentó menor porcentaje de germinación de esporas en el desarrollo de *A. flavus* fue el tratamiento T6 (NpP+NpQ+EP), mostrando diferencias significativas con respecto al control (T9) (3.33 y 84%, respectivamente), así como en el resto de los tratamientos (Cuadro 17) (Figura 30 y 31).

Cuadro 17. Efecto de los recubrimientos nanoestructurados al 40% (propóleo y/o quitosano) en el porcentaje de germinación de esporas en el desarrollo *in vitro* de *A. flavus*.

Recubrimientos nanoestructurados	R²	Germinación (%) ($\bar{x} \pm$ D.E)
1Q (1%)	0.9886	77.5 \pm 14.77 c*
T2 NpP (40%)	0.7917	87.70 \pm 15.24 cd
T3 NpQ (40%)	0.8660	92.00 \pm 5.22 cd
T4 EP (0.6%)	0.9228	95.50 \pm 1.97 cd
T5 NpP (20%) +NpQ (20%)	0.9400	98.67 \pm 1.37 cd
T6 NpP(20%) +NpQ(20%)+EP(0.6%)	0.4790	3.33 \pm 3.78 a
T7 NpP (40%) +EP (0.6%)	0.5229	44.50 \pm 13.84 b
T8 NpQ (40%) +EP (0.6%)	0.8890	93.50 \pm 1.38 cd
T9 Control	0.8549	84.00 \pm 15.39 cd

*Valores promedio de 100 observaciones (6 repeticiones por tratamiento). Tiempo de incubación 10 horas Medias con una letra común no son significativamente diferentes. ANOVA y prueba de Tukey ($p > 0.05$). Q (quitosano), NpP (nanopartículas de propóleo), NpQ (nanopartículas de quitosano), EP (extracto de propóleo).

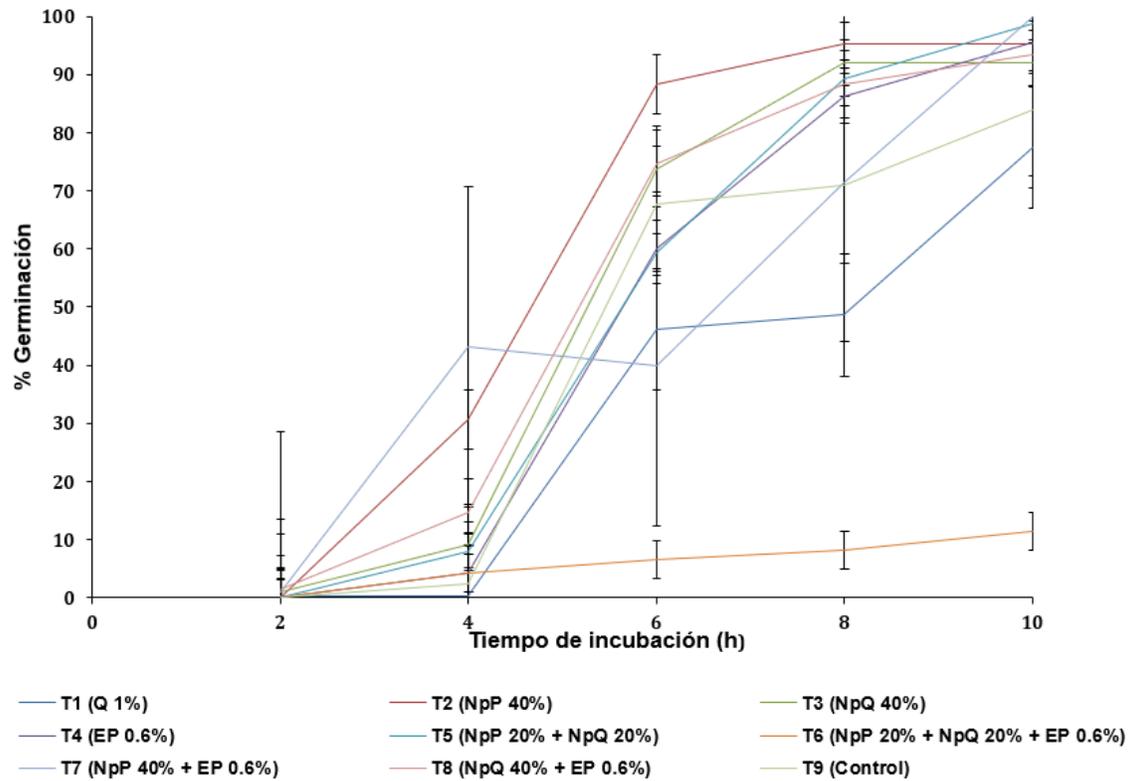


Figura 30. Efecto de los recubrimientos nanoestructurados al 40% (propóleo y/o quitosano) en la cinética de germinación de esporas en el desarrollo *in vitro* del hongo *A. flavus* durante 10 horas de incubación a $28 \pm 2^\circ\text{C}$. CV=13.51.

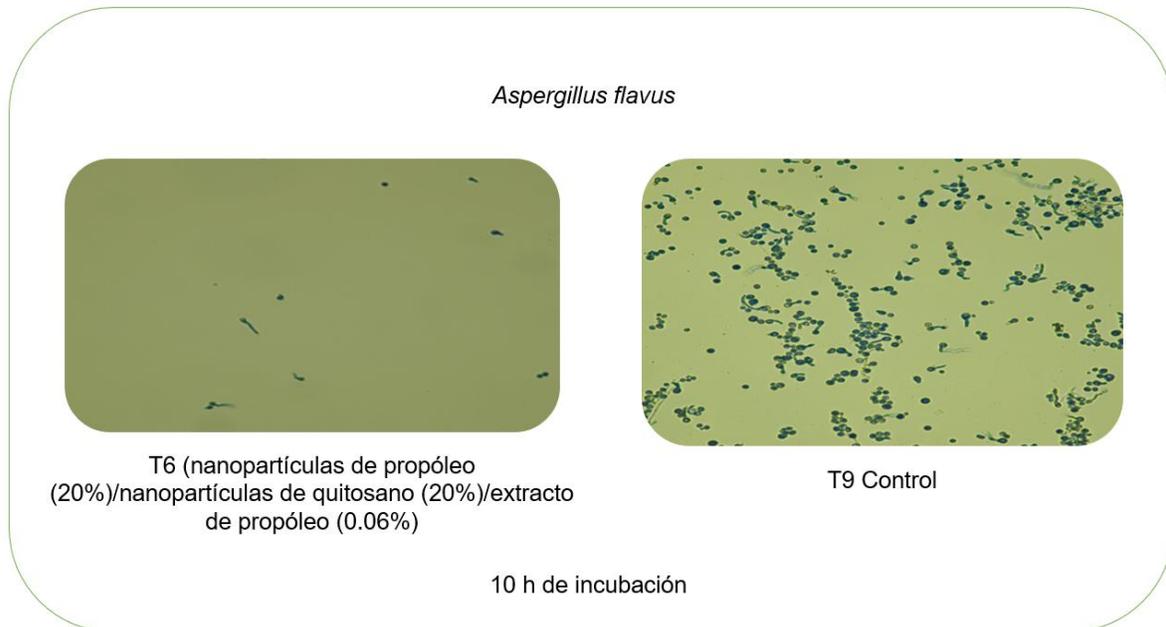


Figura 31. Efecto del recubrimiento T6 al 40% (NpP+NpQ+EP) y T9 (control) en la cinética de germinación de esporas de *A. flavus* durante 10 horas de incubación a $28 \pm 2^\circ\text{C}$.

7.2.3 Efecto de los recubrimientos nanoestructurados sobre la producción de aflatoxinas en *A. flavus*

7.2.3.1 Síntesis de aflatoxinas

En general, todos los tratamientos mostraron diferencias estadísticas significativas con respecto al control (Cuadro 18). Los resultados mostraron que hubo una inhibición total por T1 (Q) en la producción de aflatoxinas, seguido del T3 (NpQ) (1.59 ppb) y T4 (EP) (2.00.ppb).

Cuadro 18. Determinación de aflatoxinas totales por cromatografía de inmunoadinidad de los recubrimientos nanoestructurados al 40% (propóleo y/o quitosano).

Tratamientos	Aflatoxinas totales ppb ($\bar{x} \pm$ D.E)
T1Q (1%)	0.0 a*
T2 NpP (40%)	2.73 \pm 0.68 ab
T3 NpQ (40%)	1.59 \pm 0.80 ab
T4 EP (0.6%)	2.00 \pm 0.61 ab
T5 NpP (20%) +NpQ (20%)	2.87 \pm 0.29 b
T6 NpP(20%) +NpQ(20%) +EP(0.6%)	2.80 \pm 0.35 ab
T7 NpP (40%) +EP (0.6%)	2.63 \pm 0.15 ab
T8 NpQ (40%) +EP (0.6%)	2.53 \pm 0.21 ab
T9 Control	25.00 \pm 2.65 c

*Valores en base a un promedio de 100 observaciones (3 repeticiones por tratamiento). Medias con una letra común no son significativamente diferentes. ANOVA y prueba de Tukey ($p > 0.05$). Q (quitosano), NpP (nanopartículas de propóleo), NpQ (nanopartículas de quitosano), EP (extracto de propóleo).

8. DISCUSIÓN

La caracterización física de los tratamientos T2 (NpP) y T3 (NpQ) al 40% se realizó por TEM y Potencial Z. Se observó en estos tratamientos que las nanopartículas se distribuyeron de manera uniforme, observándose una morfología esférica. Igualmente, las nanopartículas de quitosano y del tratamiento T3 (NpQ), presentaron el mismo tamaño (3.00 nm), el cual disminuyó en el T2 (NpP) (2.33 nm) a diferencia por lo reportado por Afrouzan *et al.* (2012)⁶⁵ en donde el tamaño de las nanopartículas de propóleo fue de 51 a 86 nm. Esto pudo deberse a que el método de elaboración de las nanopartículas fue diferente, por ejemplo, el utilizado por esos autores fue *top-down* (molienda) a diferencia del utilizado en esta investigación (*bottom-up*). Correa *et al.* (2017)⁶⁶ y Valle *et al.* (2016)⁶⁷ reportaron un tamaño de nanopartículas de quitosano de 4.5 nm y 5.9 nm de nanopartículas de quitosano con aceite esencial de tomillo. En relación al potencial Z, el valor fue de +21.3mV para las nanopartículas de quitosano (T3) y de +18.5mV para las nanopartículas de propóleo (T2), coincidiendo con Shukla *et al.* (2013)⁶⁸ lo cuales reportaron que el potencial Z de las nanopartículas de quitosano elaboradas con tripolifosfato de polianión de sodio fue entre +20mV y +60mV. En esta investigación, las nanopartículas de propóleo presentaron menor valor en comparación con las nanopartículas de quitosano, lo cual concuerda con lo reportado por Sotelo *et al.* (2017)⁶⁰ quienes obtuvieron un potencial Z de +20.2 mV para las nanopartículas de quitosano y +10.0 mV para las nanopartículas de quitosano con aceite esencial de limón; ellos argumentan que esto pudo deberse a que el propóleo y el aceite esencial de limón son materiales biológicamente activos, los cuales disminuyen la cantidad de iones $-NH^{3+}$ presentes en el quitosano en su forma protonada, debido a una posible interacción entre el quitosano y el material biológicamente activo.

En esta investigación los tratamientos que contenían nanopartículas de propóleo: T2 (NpP), T6 (NpP+NpQ+EP) y T7(NpP+EP) ejercieron mayor control sobre el hongo estudiado lo cual se reflejó en el mayor halo de inhibición desarrollado, igualmente esta respuesta de inhibición se obtuvo mediante la aplicación de las tres concentraciones de nanopartículas (20%, 30% y 40%), a diferencia del resto de los tratamientos incluyendo al recubrimiento que solo contenía extracto de propóleo.

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Afrouzan *et al.* (2012)⁶⁵ los cuales reportaron que la aplicación de nanopartículas de propóleo, fue más eficaz que el extracto de propóleo para inhibir el desarrollo *Staphilococcus aureus*; evidenciando, que el halo de inhibición de la bacteria fue de 26 mm con nanopartículas, mientras que, con el extracto, el halo de inhibición fue de 13 mm. Del mismo modo, Ong *et al.* (2017)⁶⁹ evaluaron nanopartículas o extractos de propóleo sobre el crecimiento de *Enterococcus faecalis* bajo condiciones *in vitro* y concluyeron, que las nanopartículas de propóleo fueron más efectivas, debido a que la sobrevivencia de esta bacteria disminuyó hasta 8 veces más que el extracto de propóleo. Esto pudo ocurrir debido a que el tamaño nanométrico de la nanopartícula facilitó la captación de propóleo, permitió mayor superficie de acción y por lo tanto hubo un mayor efecto sobre *E. faecalis*. Por su parte, Ong *et al.* (2017)⁶⁹ y Yien *et al.* (2012)⁷⁰ mencionan que las nanopartículas proporcionan una mayor superficie de penetración; lo que permite que sean mejor adsorbidas y distribuidas sobre la superficie de las células fúngicas y por lo tanto alteren la integridad de la membrana.

Por otro lado, el propóleo está constituido por una gran variedad de compuestos químicos, tales como resinas, bálsamos aromáticos, ceras, aceites esenciales, granos de polen y flavonoides⁷¹. En general, la actividad en contra de los microorganismos se relaciona con el efecto sinérgico de los flavonoides más que a la acción de cada uno por separado; como la galangina y la pinocembrina; la acción de estos compuestos puede desorganizar el citoplasma, pared y membrana celular de los microorganismos e inhibir su síntesis de proteínas, además, podría estar actuando sobre la inhibición de la replicación de DNA⁷². Por ejemplo, Cushnie y Lamb (2005)⁷³ investigaron el efecto de la galangina sobre la integridad citoplasmática en *S. aureus* midiendo la pérdida de potasio interno y la sobrevivencia, obteniendo pérdida de hasta 20% de este elemento y una disminución de hasta 60 veces de CFU. Ellos sugieren que la galangina es el compuesto que afectó a la membrana directa e indirectamente, ocasionando daño en la pared celular y lisis osmótica.

Con respecto al crecimiento micelial, los recubrimientos que contenían la formulación, sólo con las nanopartículas de quitosano al 20%, ejercieron la mayor inhibición (22%). A diferencia de lo reportado por Sathiyabama y Parthasathi (2016)⁷⁴ donde muestran que las nanopartículas de quitosano al 0.1%, controlaron el desarrollo de *Fusarium oxysporium*, *Alternaria solani* y *Pyricularia grisea*, inhibiendo su desarrollo 87, 72 y 92%, respectivamente. Del mismo modo Saharan *et al.* (2015)⁷⁵ evaluaron nanopartículas de quitosano con cobre a una concentración de 0.12% y obtuvieron una inhibición en *A. solani* del 70% y en *F. oxysporum* de 73.5%. Yien *et al.* (2012)⁷⁰ mencionan que los hongos del género *Aspergillus*, contienen quitosano como componente en su pared celular, lo cual pudiera haber generado una resistencia directa sobre las nanopartículas de quitosano.

Los recubrimientos que tenían en su formulación nanopartículas de quitosano y propóleo a una concentración de 30 y 40%, mostraron una mayor inhibición sobre el crecimiento micelial de *A. flavus* (entre 26.80 y 32.72%) comparado con el resto de los tratamientos, incluyendo al quitosano y propóleo por separado. Son escasos los estudios que reporten la actividad antimicrobiana de la combinación de nanopartículas de quitosano y propóleo. Sin embargo, de acuerdo con los resultados de esta investigación, varios autores coinciden con la actividad sinérgica de la combinación de quitosano y extracto de propóleo. Sobre este tema, Torlak y Sert (2013)⁵³ reportaron que la actividad antimicrobiana de recubrimientos a base de quitosano mejoró cuando se adicionó el extracto de propóleo. Al aplicar los recubrimientos con quitosano (2%), el crecimiento de la bacteria fue de 3 log CFU, mientras que al combinarlo con propóleo a una concentración del 10%, fue de 1 log CFU. Igualmente, Matei *et al.* (2015)⁷⁶ reportaron que el propóleo (7:3 v/v) redujo hasta 75% el desarrollo del hongo *Diplodia seriata* de la vid mientras que, al utilizar la combinación de quitosano y propóleo (1/1 p/v) la inhibición en el crecimiento fue de 100%.

En el caso de la germinación de esporas de *A. flavus*, la combinación de nanopartículas de quitosano y propóleo presentó diferencias a las concentraciones 20 y 30% comparado con el resto de los tratamientos. En estudios previos, se evaluó

el efecto del quitosano y propóleo individualmente, ambos, a una concentración del 2% sobre la germinación del hongo fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides*, reduciendo el quitosano el porcentaje de germinación 89.3%, mientras que el propóleo redujo la germinación en su totalidad ⁷⁷. A la fecha, no se ha reportado evidencia del efecto sinérgico del quitosano y el propóleo sobre la germinación de conidios en alguna otra especie fúngica.

En este estudio, las nanopartículas de quitosano aplicadas en forma individual, no redujeron la germinación de las esporas de *A. flavus*, reportando valores hasta de un 92% de germinación a la concentración al 30%. A diferencia de nuestro estudio, Saharan *et al.* (2015)⁷⁵ reportaron que las nanopartículas de quitosano al 0.1% inhibieron hasta en 87.1% la germinación de esporas del hongo *A. alternata*. Sin embargo, en esta investigación, se observó una disminución muy notable, con la combinación de las nanopartículas de quitosano, propóleo y el extracto de propóleo al 40%, lo que indica, un efecto sinérgico entre los componentes de esta formulación. Por otro lado, también debe considerarse que la actividad antifúngica del quitosano se ha asociado a diferentes factores tales como, el pH de la formulación, el peso molecular, la concentración, el grado de desacetilación y el tipo de microorganismo evaluado ^{78, 79,80,9}.

Con respecto a la determinación de aflatoxinas totales, el recubrimiento con el quitosano al 1%, se observó una completa inhibición de aflatoxinas, seguido de los tratamientos que contenían nanopartículas de quitosano (1.5 ppb) y el extracto de propóleo (2.0 ppb), valores muy por debajo de los que se obtuvieron con el tratamiento control (25ppb). De acuerdo a la NORMA Oficial mexicana NOM-188-SSA1-2002⁸¹, el límite máximo de aflatoxinas totales es de 20 ppb.

Los resultados de esta investigación, concuerdan con lo reportado por Juárez *et al.* (2017)⁸² donde demostraron experimentalmente que el quitosano es capaz de adsorber la aflatoxina AfB₁; interactuando, las cargas positivas del grupo amino del quitosano, con las cargas negativas de los átomos de oxígeno de las aflatoxinas. Igualmente, estos autores, confirmaron que el quitosano es un candidato para detectar aflatoxinas AfB₁ y AfM₁. Klich (2007)⁸³ menciona que el quitosano actúa

por quelación del zinc en la inhibición de aflatoxinas, lo cual concuerda con lo reportado por Barkai (2011)⁸⁴ donde mencionan que el zinc presente en el medio estimula la producción de aflatoxinas en *A. flavus* y *A. parasiticus*.

En el caso del recubrimiento con las nanopartículas de propóleo, se obtuvo menor producción de aflatoxinas totales en comparación con el recubrimiento que contenía sólo extracto de propóleo. Contrario a estos resultados, Hashem *et al.* (2012)⁸⁵ reportaron una inhibición total en la producción de aflatoxinas sobre *A. parasiticus* mediante la aplicación de la misma concentración de 0.6% de extracto de propóleo, aunque en este caso su origen era de Arabia Saudita. Estos autores, mencionaron que el mecanismo de la actividad del propóleo depende de la sinergia entre los flavonoides, los ácidos fenólicos en el propóleo y su interferencia con la biosíntesis de aflatoxinas, además, explicaron que existe una correlación genética entre la producción de conidios y los metabolitos secundarios. Al respecto, Reverberi *et al.* (2010)⁸⁶ reportaron que los hongos están continuamente sujetos a condiciones ambientales adversas, donde el estrés oxidativo juega un papel muy importante; ya que estimula la biosíntesis de aflatoxinas, con el uso de antioxidantes derivados de plantas como es el caso de los flavonoides contenidos en el extracto de propóleo, ácido cafeico y ácido fenólico, entre otros. Mahoney *et al.* (2010)⁸⁷ lograron reducir la producción de aflatoxinas por *A. flavus* hasta en un 93% sin afectar el crecimiento del hongo con la aplicación de ácido tánico (0.4%) como antioxidante.

Según Schmale y Munkvold (2018)⁸⁸, el impacto económico de las micotoxinas comprende: pérdidas de rendimiento, reducción de los valores de los cultivos, pérdidas en la productividad animal y costos adicionales debido a problemas de salud relacionados en humanos. En este estudio, hemos identificado que los componentes en la formulación basada en quitosano combinados con nanopartículas de quitosano y propóleos, y extracto de propóleos, a la mayor concentración de nanopartículas del 40%, ejercen una notable inhibición en la germinación de las esporas y principalmente sobre la producción de aflatoxinas de *A. flavus*. Sin embargo, dado que estos resultados se encuentran en condiciones cuidadosamente controladas, se debe ampliar la investigación en propuestas *in situ*.

Las aflatoxinas no solo representan un riesgo para la salud humana y animal, también afectan la seguridad alimentaria y la nutrición al reducir el acceso de las personas a alimentos saludables ⁸⁹. Por lo que es necesario garantizar que los niveles de aflatoxinas de los alimentos sean lo más bajo posibles utilizando métodos saludables para la salud y el medio ambiente.

9. CONCLUSIONES

1. Las nanopartículas de quitosano del recubrimiento al 40%, presentaron un diámetro de 3.00 nm y un potencial Z de 116.2 mV, en el caso de las nanopartículas de propóleo, éstas tuvieron un diámetro de 2.33 nm y un potencial Z de +18.5 mV.
2. Con la aplicación del recubrimiento a base de nanopartículas de propóleo a la concentración del 20%, se observó en *A. flavus*, el halo de inhibición mayor (2.5 cm) mientras que, en la concentración del 30% se obtuvo el crecimiento micelial menor.
3. El recubrimiento nanoestructurado de nanopartículas de quitosano, y de propóleo y el extracto de propóleo al 40%, ejerció el mayor efecto fungicida ya que, se observó la inhibición micelial mayor (32.7%) y el porcentaje de germinación de esporas de nanopartículas de quitosano, y de propóleo y el extracto de propóleo (3.3%).
4. El recubrimiento que inhibió en su totalidad la producción de aflatoxinas en *A. flavus* fue el quitosano sólo (0.0ppb), seguido del recubrimiento con nanopartículas de quitosano (T3) al 40% (1.59 ppb) y del extracto de propóleo (T4) al 0.6% (2.00 ppb)

10. REFERENCIAS

1. OMS (Organización Mundial de la Salud) (2017a). *Cancer* nota descriptiva (Febrero, 2017). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
2. OMS (Organización Mundial de la Salud) (2017b). *Enfermedades no transmisibles* nota descriptiva (Junio, 2017). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs355/es>
3. Cogliano, V. J., Baan, R., Straif, K., Grosse, Y., Lauby-Secretan, B., El Ghissassi, F., & Galichet, L. (2011). Preventable exposures associated with human cancers. *Journal of the National Cancer Institute* 103(24): 1827-1839. <https://doi.org/10.1093/jnci/djr483>
4. Saleem, F., Sadia, B., & Awan, F. S. (2017). Control of aflatoxin production using herbal plant extract. En: *Aflatoxin-control, analysis, detection and health risks*. InTech. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.69867>
5. Mishra, H. N., & Das, C. (2003). A review on biological control and metabolism of aflatoxin. *Food Science and Nutrition* 43(3): 245-264. <https://doi.org/10.1080/10408690390826518>
6. Castillo, P., Carvajal, M., Méndez, I., Meza, F., & Gálvez, A. (2011). Survey of aflatoxins in maize tortillas from Mexico City. *Food Additives and Contaminants* 4(1): 42-51. <https://doi.org/10.1080/19393210.2010.533390>
7. Norma Oficial Mexicana NOM-187-SSA1-2001, Productos y servicios. Masa, tortillas, tostadas y harinas preparadas para su elaboración y establecimientos donde se procesan. Especificaciones sanitarias. http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=732899&fecha=07/05/2002
8. Sahariah, P., & Masson, M. (2017). Antimicrobial chitosan and chitosan derivatives: a review of the structure–activity relationship. *Biomacromolecules* 18(11): 3846-3868. <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.biomac.7b01058>

9. Bautista-Baños, S., Ventura-Aguilar, R. I., Correa-Pacheco, Z., & Corona-Rangel, M. L. (2017). Chitosan: a versatile antimicrobial polysaccharide for fruit and vegetables in postharvest—a review. *Revista Chapingo, serie Horticultura* 23(2): 103-121.
<http://www.redalyc.org/pdf/609/60950914004.pdf>
10. Sforcin, J. M. (2016). Biological properties and therapeutic applications of propolis. *Phytotherapy Research* 30(6): 894-905.
<https://doi.org/10.1002/ptr.5605>
11. Hettiarachchi, M.A., & Wickramarachchi, P.A.S.R. (2011). Synthesis of chitosan stabilized silver nanoparticles using Gamma ray irradiation and characterization. *Journal of Science, University of Kelaniya* 6: 65-75.
<http://repository.kln.ac.lk/handle/123456789/5444>
12. Barrera, E., Gil, J., Restrepo, A., Mosquera, K., & Durango, D. (2015). A coating of chitosan and propolis extract for the postharvest treatment of papaya (*Carica papaya* L. cv. Hawaiiiana). *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín* 68(2): 7667-7678.
<http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v68n2/v68n2a08.pdf>
13. OMS (Organización Mundial de la Salud) (2014). *10 datos sobre el cáncer*. (9 de diciembre de 2015). <http://www.who.int/features/factfiles/cancer/es/>
14. INEGI (Instituto Nacional de estadística y Geografía) (2016) Estadísticas a propósito del día mundial de la lucha contra el cáncer (17 Octubre 2016)
http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2016/mama2016_0.pdf
15. IARC. *Agents classified by the IARC Monographs*, (ultima revision 26 enero 2018), 1-20. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>
16. IARC *Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. (2012). A review of human carcinogens. 100F, 225.

<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100F/100F-18-Index-tables.php>

17. Magnussen, A., & Parsi, M. A. (2013). Aflatoxins, hepatocellular carcinoma and public health. *World Journal of Gastroenterology* 19(10): 1508.
<https://dx.doi.org/10.3748%2Fwjg.v19.i10.1508>
18. Manna, M., & Kim, K. D. (2017). Influence of temperature and water activity on deleterious fungi and mycotoxin production during grain storage. *Mycobiology*, 45(4), 240-254.
<https://dx.doi.org/10.5941%2FMYCO.2017.45.4.240>
19. Kumar, V., Basu, M. S., & Rajendran, T. P. (2008). Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. *Crop Protection* 27(6): 891-905. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2007.12.011>
20. Urrego, J. R., & Días, G. J. (2006). Aflatoxinas: mecanismos de toxicidad en la etiología de cáncer hepático celular. *Revista de la Facultad de Medicina* 54(2): 108-116. <http://www.bdigital.unal.edu.co/39279/1/43849-204683-1-PB.pdf>
21. Bolet, M., & Socarrás, M. (2005). Micotoxinas y cáncer. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas* 24(1): 54-59.
http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0864-03002005000100007&script=sci_arttext&tlng=en
22. Fokunang, C. N., Tabi, O. Y., Ndikum, V. N., Tembe-Fokunang, E. A., Kechia, F. A., Ngameni, B., & Torimiro, J. N. (2011). Mycotoxins: quality management, prevention, metabolism, toxicity and biomonitoring. *En: Health Management-Different Approaches and Solutions*. Krzysztof Smigorski (Ed.), ISBN: 978-953-307-296-8, InTech, <http://www.intechopen.com/books/health-management-different-approaches-and-solutions/mycotoxins-qualitymanagement-prevention-metabolism-toxicity-and-biomonitoring>

23. Neme, K., & Mohammed, A. (2017). Mycotoxin occurrence in grains and the role of postharvest management as a mitigation strategy. *Food Control* 78: 412-425. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.03.012>
24. FIRA (Fideicomisos en Relación a la Agricultura (2016) Panorama Agroalimentario (Maíz 2016) www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200637/Panorama_Agroalimentario_Ma_z_2016.pdf
25. Kato, T.A., Mapes, C., Mera, L.M., Serratos, J.A., & Bye, R.A. (2009). Origen y clasificación del maíz, México. <http://www.biodiversidad.gob.mx/genes/pdf/ComentariosLibroKato.pdf>
26. Paredes, O., Guevara, F., & Bello, L.A. (2009). La nixtamalización y el valor nutritivo del maíz. *Ciencias* 92(03): 60-70. <http://revistas.unam.mx/index.php/cns/article/view/14831>
27. Pitt, J. I., Taniwaki, M. H., & Cole, M. B. (2013). Mycotoxin production in major crops as influenced by growing, harvesting, storage and processing, with emphasis on the achievement of food safety objectives. *Food Control* 32(1): 205-215. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.023>
28. Abbas, H. K., Wilkinson, J. R., Zablotowicz, R. M., Accinelli, C., Abel, C. A., Bruns, H. A., & Weaver, M. A. (2009). Ecology of *Aspergillus flavus*, regulation of aflatoxin production, and management strategies to reduce aflatoxin contamination of corn. *Toxin Reviews* 28 (2-3): 142-153. <https://doi.org/10.1080/15569540903081590>
29. Bogantes, P., Bogantes, D., & Bogantes, S. (2004). Aflatoxinas. *Acta Médica Costarricense* 46(4): 174-178. http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-60022004000400004
30. Loi, M., Fanelli, F., Liuzzi, V. C., Logrieco, A. F., & Mulè, G. (2017). Mycotoxin biotransformation by native and commercial enzymes: Present and future perspectives. *Toxins* 9(4): 111. <https://doi.org/10.3390/toxins9040111>

31. Suttajit, M. (1989). Prevention and Control of Mycotoxins. *Mycotoxin Prevention and Control in Food Grains*. www.fao.org/docrep/X5036E/x5036E0q.htm
32. Holmes, R. A., Boston, R. S., & Payne, G. A. (2008). Diverse inhibitors of aflatoxin biosynthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology* 78(4): 559-572. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1362-0>
33. Rodríguez, A. T., Ramírez, M. A., Rivero, D., Bosquez, E., Barrera, L. L., & Bautista, S. (2009). Propiedades químico-estructurales y actividad biológica de la quitosana en microorganismos fitopatógenos. *Revista Chapingo, serie Horticultura* 15(3): 307-317. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1027-152X2009000500012&script=sci_arttext
34. Rabea, E. I., Badawy, M. E. T., Stevens, C. V., Smagghe, G., & Steurbaut, W. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules* 4(6): 1457-1465. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm034130m>
35. Pontón, J. (2008). La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Revista Iberoamericana de Micología* 25(2): 78-82. [https://doi.org/10.1016/S1130-1406\(08\)70024-X](https://doi.org/10.1016/S1130-1406(08)70024-X)
36. Badawy, M. E., & Rabea, E. I. (2013). Preparation and antimicrobial activity of O-(benzoyl) chitosan derivatives against some plant pathogens. *African Journal of Microbiology Research* 7(20): 2259-2268. <https://doi.org/10.5897/AJMR12.1185>
37. Chien, H. F., Chen, C. P., Chen, Y. C., Chang, P. H., Tsai, T., & Chen, C. T. (2013). The use of chitosan to enhance photodynamic inactivation against *Candida albicans* and its drug-resistant clinical isolates. *International Journal of Molecular Sciences* 14(4): 7445-7456. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms14047445>
38. Elkholy, S. S., Salem, H. A., Eweis, M., & Elsabee, M. Z. (2014). Synthesis and characterization of some acyl thiourea derivatives of chitosan and their

- biocidal activities. *International Journal of Biological Macromolecules* 70: 199-207. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.05.068>
39. Giner, M. J., Vegara, S., Funes, L., Martí, N., Saura, D., Micol, V., & Valero, M. (2012). Antimicrobial activity of food-compatible plant extracts and chitosan against naturally occurring micro-organisms in tomato juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92(9): 1917-1923. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5561>
40. Kulikov, S. N., Lisovskaya, S. A., Zelenikhin, P. V., Bezrodnykh, E. A., Shakirova, D. R., Blagodatskikh, I. V., & Tikhonov, V. E. (2014). Antifungal activity of oligochitosans (short chain chitosans) against some *Candida* species and clinical isolates of *Candida albicans*: Molecular weight–activity relationship. *European journal of medicinal chemistry* 74: 169-178. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.12.017>
41. De Oliveira Pedro, R., Takaki, M., Gorayeb, T. C. C., Del Bianchi, V. L., Thomeo, J. C., Tiera, M. J., & de Oliveira Tiera, V. A. (2013). Synthesis, characterization and antifungal activity of quaternary derivatives of chitosan on *Aspergillus flavus*. *Microbiological Research* 168(1): 50-55. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.06.006>
42. Younes, I., Sellimi, S., Rinaudo, M., Jellouli, K., & Nasri, M. (2014). Influence of acetylation degree and molecular weight of homogeneous chitosans on antibacterial and antifungal activities. *International Journal of Food Microbiology* 185: 57-63. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.029>
43. Ramos, M. D. L., Bautista, S., Barrera, L. L., Bosquez, E., Alia, I., & Estrada, M. (2010). Compuestos antimicrobianos adicionados en recubrimientos comestibles para uso en productos hortofrutícolas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28(1): 44-57. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092010000100005

44. Bankova, V. (2005). Recent trends and important developments in propolis research. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2(1): 29-32. <http://dx.doi.org/10.1093/ecam/neh059>
45. Tosi, E. A., Re, E., Ortega, M. E., & Cazzoli, A. F. (2007). Food preservative based on propolis: bacteriostatic activity of propolis polyphenols and flavonoids upon *Escherichia coli*. *Food Chemistry* 104(3): 1025-1029. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.011>
46. Zabaïou, N., Fouache, A., Trousson, A., Baron, S., Zellagui, A., Lahouel, M., & Lobaccaro, J. M. A. (2017). Biological properties of propolis extracts: something new from an ancient product. *Chemistry and Physics of Lipids* 207: 214-222. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2017.04.005>
47. Ravichandran, R. (2010). Nanotechnology applications in food and food processing: innovative green approaches, opportunities and uncertainties for global market. *International Journal of Green Nanotechnology: Physics and Chemistry* 1(2): 72-P96. <https://doi.org/10.1080/19430871003684440>
48. Gómez, G. (2013). Nanopartículas de plata: tecnología para su obtención, caracterización y actividad biológica. *Investigación en Discapacidad* 2(1): 18-22. <http://www.medigraphic.com/pdfs/invisdis/ir-2013/ir131c.pdf>
49. Ortiz, J. (August 19, 2014) [Mensaje en un blog]. "How do nanoparticles enter cells" <http://sustainable-nano.com/2014/08/19/how-do-nanoparticles-enter-cells/>
50. Goycoolea, F.M., Remuñan, C., & Alonso, M.J. (2009). Nanopartículas a base de polisacáridos: quitosano. Santiago de Compostela: *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*. <http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/990/1024>
51. Restrepo Fernández, J. I. (2009). *Conservación de fresa (Fragaria x ananassa duch cv. Camarosa) mediante la aplicación de revestimientos comestibles de gel mucilaginoso de penca de sábila (Aloe barbadensis miller)* (Tesis

- doctoral). Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Pp. 83.
<http://www.bdigital.unal.edu.co/1822/1/98556225.2009.pdf>
52. Pascall, M. A., & Lin, S. J. (2013). The application of edible polymeric films and coatings in the food industry. *Food Processing & Technology 4*: e116.
<https://doi.org/10.4172/2157-7110.1000e116>
53. Torlak, E., & Sert, D. (2013). Antibacterial effectiveness of chitosan–propolis coated polypropylene films against foodborne pathogens. *International Journal of Biological Macromolecules 60*: 52-55.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.05.013>
54. Siripatrawan, U., & Vitchayakitti, W. (2016). Improving functional properties of chitosan films as active food packaging by incorporating with propolis. *Food Hydrocolloids 61*: 695-702. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.06.001>
55. Del Carpio, A., Kishen, A., Felitti, R., Bhagirath, A. Y., Medapati, M. R., Lai, C., & Cunha, R. S. (2017). Antibacterial properties of chitosan nanoparticles and propolis associated with calcium hydroxide against single-and multispecies biofilms: an *in vitro* and *in situ* study. *Journal of Endodontics 43*(8): 1332-1336. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2017.03.017>
56. Rollini, M., Mascheroni, E., Capretti, G., Coma, V., Musatti, A., & Piergiovanni, L. (2017). Propolis and chitosan as antimicrobial and polyphenols retainer for the development of paper based active packaging materials. *Food Packaging and Shelf Life 14*: 75-82. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2017.08.011>
57. Ramos, M. de L. (2012). Recubrimientos biodegradables para el control de microorganismos patógenos y conservación de la calidad de frutos de jitomate (*Lycopersicon esculentum* L.). Tesis Doctoral. Instituto Politécnico Nacional. Morelos, México. p. 163.
<http://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/13429/Tesis%202012%20Margarita%20de%20Lorena%20Ramos%20Garc%C3%ADa.pdf?sequence=1>
58. Hernández, L., M. (2002). Uso potencial del quitosano y extractos vegetales en el control de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium*

digitatum y *Fusarium oxysporum* de la papaya (*Carica papaya*). Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. Morelos, México, p 160.

<http://tesis.ipn.mx/jspui/bitstream/123456789/7241/1/43.pdf>

59. Luque, A. G., Lizardi, J., Goycoolea, F. M., Valdez, M. A., Acosta, A. L., Iloki, S. B., & Argüelles, W. (2012). Characterization and antiproliferative activity of nobiletin-loaded chitosan nanoparticles. *Journal of Nanomaterials*, 2010: Artículo 100, p 10 <http://dx.doi.org/10.1155/2016/6060137>
60. Sotelo, M. E., Correa, Z. N., Bautista, S., & Corona, M. L. (2017). Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles and nanocapsules incorporated with lime essential oil and their antibacterial activity against food-borne pathogens. *LWT-Food Science and Technology* 77: 15-20. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.022>
61. Moreno-Limón, S., Salcedo-Martínez, S. M., Cárdenas-Ávila, M. L., Hernández-Piñero, J. L., & Núñez-González, M. A. (2012). Efecto antifúngico de capsaicina y extractos de chile piquín (*Capsicum annum* L. var *aviculare*) sobre el crecimiento *in vitro* de *Aspergillus flavus*. *Polibotánica* 34: 191-204. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1405-27682012000200009&script=sci_arttext
62. Black, J., Ventura, R. I., Barrera, L. L., & Bautista, S. (2017). Caracterización química, variabilidad composicional y modelamiento matemático del efecto de aceites esenciales en *Alternaria alternata*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35: 204-226. <http://dx.doi.org/10.18781/r.mex.fit.1612-5>.
63. Méndez, A., Martínez, F., Véles, J. J., Moreno, C., Del Río, J.C., Moreno, E. (2009). Efecto de la adición de ácido cítrico sobre la degradación de las aflatoxinas y las propiedades funcionales de productos extruídos de sorgo. *Interciencia* 34(4): 252-258. http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0378-18442009000400007&script=sci_arttext
64. Science Technology VICAM (1999). AlfaTest Instruction Manual, (ed.) Watertown, M.A.: VICAM, L. P.

65. Afrouzan, H., Amirinia, C., Mirhadi, S. A., Ebadollahi, A., Vaseji, N., & Tahmasbi, G. (2012). Evaluation of antimicrobial activity of propolis and nanopropolis against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. *African Journal of Microbiology Research* 6(2): 421-425. <https://doi.org/10.5897/AJMR11.1183>
66. Correa, Z. N., Bautista, S., Valle, M. Á., & Hernández, M. (2017). The effect of nanostructured chitosan and chitosan-thyme essential oil coatings on *Colletotrichum gloeosporioides*. Growth *in vitro* and on cv Hass avocado and fruit quality. *Journal of Phytopathology* 165(5): 297-305. <https://doi.org/10.1111/jph.12562>
67. Valle, M.A. (2016). Formulación y caracterización de un recubrimiento antifúngico con nanopartículas de quitosano-aceite esencial de tomillo o de limón para productos hortofrutícolas. Tesis de licenciatura. Instituto Tecnológico de Zacatepec. Morelos. México. 140 p
68. Shukla, S. K., Mishra, A. K., Arotiba, O. A., & Mamba, B. B. (2013). Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review. *International Journal of Biological Macromolecules* 59: 46-58. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.04.043>
69. Ong, T. H., Chitra, E., Ramamurthy, S., Siddalingam, R. P., Yuen, K. H., Ambu, S. P., & Davamani, F. (2017). Chitosan-propolis nanoparticle formulation demonstrates anti-bacterial activity against *Enterococcus faecalis* biofilms. *PloS One* 12(3): e0174888. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174888>
70. Yien, L., Zin, N. M., Sarwar, A., & Katas, H. (2012). Antifungal activity of chitosan nanoparticles and correlation with their physical properties. *International Journal of Biomaterials* 2012: Artículo ID 632698. 9p <http://dx.doi.org/10.1155/2012/632698>

71. Grange, J. M., & Davey, R. W. (1990). Antibacterial properties of propolis (bee glue). *Journal of the Royal Society of Medicine* 83(3): 159. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1292560/>.
72. Talero, C. A. (2014). Actividad anti-gérmenes *in vitro* de extractos etanólicos de propóleos obtenido de abejas (*Apis mellifera*) en tres áreas geográficas de Colombia. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. pp 68. <https://core.ac.uk/download/pdf/77269256.pdf>
73. Cushnie, T. T., & Lamb, A. J. (2005). Detection of galangin-induced cytoplasmic membrane damage in *Staphylococcus aureus* by measuring potassium loss. *Journal of Ethnopharmacology* 101(1-3): 243-248. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.04.014>
74. Sathiyabama, M., & Parthasarathy, R. (2016). Biological preparation of chitosan nanoparticles and its *in vitro* antifungal efficacy against some phytopathogenic fungi. *Carbohydrate Polymers* 151: 321-325. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.033>
75. Saharan, V., Sharma, G., Yadav, M., Choudhary, M. K., Sharma, S. S., Pal, A., & Biswas, P. (2015). Synthesis and *in vitro* antifungal efficacy of Cu–chitosan nanoparticles against pathogenic fungi of tomato. *International Journal of Biological Macromolecules* 75: 346-353. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.01.027>
76. Matei, P. M., Martín-Ramos, P., Sánchez-Báscones, M., Hernández-Navarro, S., Correa-Guimaraes, A., Navas-Gracia, L. M., ... & Martín-Gil, J. (2015). Synthesis of chitosan oligomers/propolis/silver nanoparticles composite systems and study of their activity against *Diplodia seriata*. *International Journal of Polymer Science* 2015: Artículo ID 864729. 11 p. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/864729>
77. Mattiuz, B. H., Ducamp, M. N., Mattiuz, C. F. M., Vigneault, C., Marques, K. M., Sagoua, W., & Montet, D. (2015). Effect of propolis on postharvest control of

- anthracnose and quality parameters of 'Kent' mango. *Scientia Horticulturae* 184: 160-168. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.12.035>
78. Hosseinejad, M., & Jafari, S. M. (2016). Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules* 85: 467-475. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.022>
79. Bautista-Baños, S., Hernandez-Lauzardo, A. N., Velazquez-Del Valle, M. G., Hernández-López, M., Barka, E. A., Bosquez-Molina, E., & Wilson, C. L. (2006). Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop protection* 25(2): 108-118. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2005.03.010>
80. Bautista-Baños, S., Sivakumar, D., Bello-Pérez, A., Villanueva-Arce, R., & Hernández-López, M. (2013). A review of the management alternatives for controlling fungi on papaya fruit during the postharvest supply chain. *Crop Protection* 49: 8-20. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.02.011>
81. NORMA Oficial mexicana NOM-188-SSA1-2002, Productos y servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Especificaciones sanitarias. <http://www.cofepris.gob.mx/Documents/Bibliografias/188ssa1.pdf>
82. Juárez, L. A., Hernandez, H., Chigo, E., Aguila, E., & Tenorio, M. G. (2017). Chitosan-aflatoxins B1, M1 interaction: A computational approach. *Current Organic Chemistry* 21(28): 2877-2883.
<https://doi.org/10.2174/1385272821666170511165159>
83. Klich, M. A. (2007). Environmental and developmental factors influencing aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Mycoscience* 48(2): 71-80. <https://doi.org/10.1007/S10267-006-0336-2>
84. Barkai, G. R. (2011). *Aspergillus* Mycotoxins. p 115-124 En: *Mycotoxins in fruits and vegetables*. Barkai-Golan, R., & Paster, N. (Eds). ISBN 978-0-12-37 Elsevier. San Diego, CA. Pp 395.

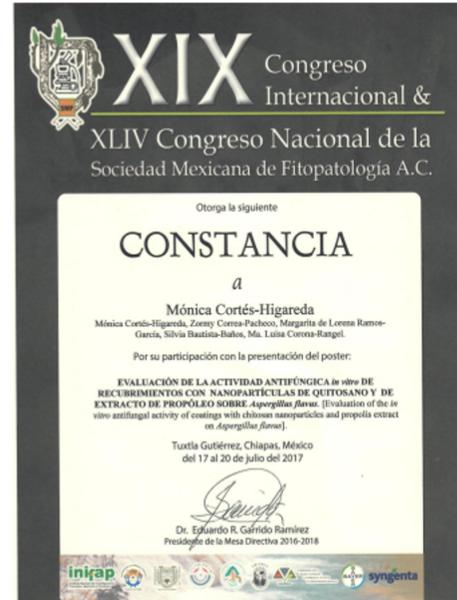
85. Hashem, A., Abd, E. F., & Alwathnani, H. A. (2012). Effect of propolis on growth, aflatoxins production and lipid metabolism in *Aspergillus parasiticus* spear. *Pakistan Journal of Botany* 44(3): 1153-1158. [http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/44\(3\)/47.pdf](http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/44(3)/47.pdf)
86. Reverberi, M., Ricelli, A., Zjalic, S., Fabbri, A. A., & Fanelli, C. (2010). Natural functions of mycotoxins and control of their biosynthesis in fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87(3): 899-911. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2657-5>
87. Mahoney, N., Molyneux, R., Kim, J., Campbell, B., Waiss, A., & Hagerman, A. (2010). Aflatoxigenesis induced in *Aspergillus flavus* by oxidative stress and reduction by phenolic antioxidants from tree nuts. *World Mycotoxin Journal* 3(1): 49-57. <https://doi.org/10.3920/WMJ2009.1185>
88. Schmale, D. G., & Munkvold, G. P. (2009). Mycotoxins in crops: A threat to human and domestic animal health. *The plant health instructor* 3: 340-353. <https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/topics/Mycotoxins/Pages/default.aspx>
89. OMS (Organización Mundial de la Salud) (2018). *Micotoxinas* nota descriptiva (Mayo,2018). <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/mycotoxins>

ANEXOS

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA *in vitro* DE RECUBRIMIENTOS CON NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO Y DE EXTRACTO DE PROPÓLEO SOBRE *Aspergillus flavus*. Mónica Cortés-Higareda, Zorny Correa-Pacheco, Margarita de Lorena Ramos-García, Silvia Bautista-Baños, Ma. Luisa Corona-Rangel. Instituto Politécnico Nacional-Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Facultad de Nutrición, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, mcortesh@yahoo.com.

Aspergillus flavus es un hongo fitopatógeno que contamina cereales durante el almacenamiento y ocasiona pérdidas económicas a nivel mundial. Es productor de aflatoxinas y causa graves daños a la salud humana y animal. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto antifúngico de recubrimientos a base de quitosano con nanopartículas de quitosano, propóleo y extracto de propóleo sobre el crecimiento micelial de *A. flavus*. Se realizó una técnica de pozos para ajustar la concentración de nanopartículas (5, 10, 20, 30, 40 y 50%) adicionadas a los recubrimientos. Se evaluó el crecimiento micelial de *A. flavus* en 9 recubrimientos elaborados con quitosano, nanopartículas de quitosano/propóleo (20% y 40%) y extracto de propóleo. Los resultados mostraron una disminución del crecimiento micelial con el recubrimiento de quitosano / extracto de propóleo (44.5mm) y con el recubrimiento de nanopartículas de extracto de propóleo/extracto de propóleo (46.44mm) comparado con el control (51.9mm). Los recubrimientos a base de quitosano con nanopartículas de quitosano, propóleo y extracto de propóleo pueden ser una alternativa viable para disminuir el crecimiento de *A. flavus*.

Maestría (MC), Área: Hongos, Tópico: interacciones planta-patógeno, Tipo de presentación: poster.



DESARROLLO DE RECUBRIMIENTOS DE QUITOSANO CON NANOPARTÍCULAS DE PROPÓLEO Y QUITOSANO Y SU EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO Y GERMINACIÓN DEL HONGO *Aspergillus flavus*.

DEVELOPMENT OF CHITOSAN COATING WITH PROPOLIS AND CHITOSAN NANOPARTICLES AND ITS EFFECT IN GROWTH AND GERMINATION OF *Aspergillus flavus* FUNGI

Mónica Cortés-Higareda², Zorny Nacary Correa-Pacheco¹, Silvia Bautista-Baños¹, Margarita de Lorena Ramos-García², María Luisa Corona-Rangel¹.

¹Instituto Politécnico Nacional- Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CEPROBI-IPN) Yauatepec, Morelos. México

²Facultad de Nutrición, Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) Cuernavaca, Morelos. México.
mcortesh@yahoo.com.

En los últimos años se ha estudiado la adición de nanopartículas a los recubrimientos vegetales a base de quitosano; ya que tienen una alta actividad sobre los microorganismos patógenos, al ser más reactivas y eficientes. De igual forma, las nanopartículas de propóleo aumentan las propiedades antifúngicas del quitosano. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto antifúngico de recubrimientos a base de quitosano con nanopartículas de quitosano, propóleo y extracto de propóleo sobre la germinación de *Aspergillus flavus*. Se utilizó la técnica de germinación de esporas en 9 recubrimientos elaborados con quitosano, nanopartículas de quitosano/propóleo (40%) y extracto de propóleo. Se utilizaron 6 repeticiones por tratamiento. Se evaluó la germinación a las 2, 4, 6, 8 y 10 hrs. y se realizó un conteo de 100 esporas por disco. Los resultados mostraron que el recubrimiento con nanopartículas de propóleo, quitosano y extracto de propóleo inhibió un 100% la germinación de esporas de *A. flavus*; seguida del recubrimiento con nanopartículas de propóleo que presenta una inhibición del 43.8% teniendo un máximo de inhibición a las 4hrs. Siendo una alternativa viable para disminuir el crecimiento de *A. flavus*.



ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE CUBIERTAS COMESTIBLES ADICIONADAS CON NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO Y PROPÓLEO EN ENSAYOS *in vitro* SOBRE *Aspergillus flavus*

Mónica Cortés-Higareda¹, Zorny Nacary Correa-Pacheco², Silvia Bautista-Baños³, Margarita de Lorena Ramos-García¹, María Luisa Corona-Rangel¹.

¹Facultad de Nutrición, Universidad Autónoma del Estado de Morelos Cuernavaca, Morelos, México. ²CONACYT-Instituto Politécnico Nacional- Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Yauatepec, Morelos. ³Instituto Politécnico Nacional- Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Yauatepec, Morelos, México. mcortesh@yahoo.com

Las cubiertas vegetales comestibles son matrices continuas que se adicionan para conservar la vida de anaquel y reducir la contaminación fúngica en frutas y vegetales. En los últimos años, se ha estudiado la adición de nanopartículas a las cubiertas vegetales a base de quitosano, ya que tienen una alta actividad sobre los microorganismos patógenos al ser más reactivas y eficientes. De igual forma, las nanopartículas de propóleo aumentan las propiedades antifúngicas del quitosano (1). El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto antifúngico de recubrimientos a base de quitosano con nanopartículas de quitosano/propóleo (40%) y extracto de propóleo (0.6%) sobre la germinación de *A. flavus*, hongo fitopatógeno que contamina cereales durante el almacenamiento productor de aflatoxinas; agente cancerígeno para el ser humano (2). Se evaluaron 9 recubrimientos elaborados con quitosano, nanopartículas de quitosano/propóleo (40%) y extracto de propóleo (0.6%) mediante las técnicas de pozos y la técnica de envenenamiento del medio de cultivo. Se midió la inhibición y el crecimiento micelial a los 7 días y el % de germinación, a las 10 h de incubación. Se realizó un conteo de 100 esporas por disco, con 6 repeticiones por tratamiento a una temperatura de $\pm 28^{\circ}\text{C}$. Se realizó un análisis estadístico con ANOVA y comparación de medias. De las 9 cubiertas a base de nanopartículas de quitosano/propóleo y extracto de propóleo, el tratamiento con nanopartículas de propóleo y quitosano (20/20%) y extracto de propóleo (0.06%) presentó mayor halo de inhibición en la técnica de pozos (5.8 cm²), mayor efecto en la técnica de envenenamiento del medio de cultivo (1 cm²) y la técnica de % de germinación de esporas (5.7%). Los recubrimientos a base de quitosano con nanopartículas de quitosano, propóleo al 40% y extracto de propóleo al 0.6% podrían ser una alternativa viable para disminuir el crecimiento de *A. flavus*.

Palabras clave: Inhibición, crecimiento micelial, germinación de esporas.



USO DE CUBIERTAS NANOESTRUCTURADAS CON QUITOSANO Y PROPÓLEO PARA CONTROLAR EL DESARROLLO *in vitro* DE MOHO TOXIGENICO DE ALIMENTOS

Cortés-Higareda Mónica¹, Pacheco-Correa Zorny Nacary², Bautista-Baños Silvia², Ramos-García Margarita de Lorena¹, Corona-Rangel María Luisa².

¹Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Facultad de Nutrición, mcortesh@yahoo.com.
²Instituto Politécnico Nacional-Centro de Desarrollo de Productos Bióticos.

Los cereales así como sus subproductos, son susceptibles a la contaminación causada por el hongo fitopatógeno *Aspergillus flavus*, el cual es considerado como productor de aflatoxinas. El consumo de aflatoxinas durante un período prolongado puede provocar carcinoma hepatocelular (1). Para reducir la contaminación fúngica se han utilizado las cubiertas nanoestructuradas comestibles a base de quitosano y propóleo, ya que tienen una alta actividad al ser más reactivas y eficientes, además brindan alternativas de control para la seguridad alimentaria. (2). El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto antifúngico de recubrimientos con nanopartículas de quitosano/propóleo (40%) y extracto de propóleo (0.6%) sobre el desarrollo de *A. flavus*, mediante las técnicas de pozos y la técnica de envenenamiento del medio (7 días) y el % de germinación (10 h de incubación). Se realizó un conteo de 100 esporas por disco, 6 repeticiones por tratamiento a una temperatura de $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Se realizó ANOVA y comparación de medias de Tukey. La cubierta con nanopartículas de propóleo y quitosano (20/20%) y extracto de propóleo (0.06%) presentó mayor halo de inhibición en la técnica de pozos (5.8 cm²), mayor efecto en la técnica de envenenamiento del medio (1 cm²) y menor porcentaje de germinación de esporas (5.7%). Las cubiertas nanoestructuradas de quitosano y propóleo podrían ser una alternativa viable para disminuir el crecimiento de *A. flavus*.

Palabras clave: Inhibición, crecimiento micelial, germinación de esporas.





International Congress on Transdisciplinary Nanoscience & Nanotechnology



EVALUATION OF NANOSTRUCTURED COATINGS WITH CHITOSAN AND / OR PROPOLIS IN VITRO ON THE PRODUCTION OF AFLATOXINES OF THE TOXIGENIC FUNGUS *Aspergillus flavus*

Mónica Cortés-Higareda¹, Zorny Nacary Correa-Pacheco², Silvia Bautista-Baños³, Margarita de Lorena Ramos-García¹, María Luisa Corona-Rangel³

¹Faculty of Nutrition, Autonomous University of the State of Morelos. Cuernavaca, Morelos. Mexico. Zp 62350 2CONACYT-National Polytechnic Institute- Center for the Development of Biotic Products. Yauatepec, Morelos. 3 National Polytechnic Institute - Center for the Development of Biotic Products. Yauatepec, Morelos. Mexico. Zp 07738.

Phone: +52 17771000505, e-mail: mcortesh@yahoo.com

Aflatoxins are secondary metabolites, produced mainly during the storage of grains, by the fungi *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*; being aflatoxin B₁ the most potent natural carcinogen known to date. Aflatoxins are secondary metabolites, produced mainly during the storage of grains, by the fungi *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*; being aflatoxin B₁ the most potent natural carcinogen known to date. In recent years, the addition of nanoparticles to vegetable covers based on chitosan has been studied to extend the shelf life of agricultural foods: since they have a high activity on pathogenic microorganisms as they are more reactive and efficient (1-3). The objective of this research was to evaluate the antifungal effect of chitosan based coatings with chitosan and / or propolis nanoparticles (40%) and propolis extract (0.6%) in vitro on the production of total aflatoxins *A. flavus*. We evaluated 9 coatings made with chitosan, chitosan and / or propolis nanoparticles (40%) and propolis extract (0.6%) by fluorometry. The determination of total aflatoxins was carried out after 15 days of incubation at a temperature of 28 ± 2 ° C. The characterization of the T2 and T3 coatings was carried out by TEM and Z potential. A statistical analysis was performed with ANOVA and comparison of Tukey means. The coating that inhibited the production of aflatoxins in its entirety was the coating that contained only chitosan in its formula (0.0ppb), followed by the coating with chitosan nanoparticles (1.5ppb) and propolis extract (2.0ppb). Nanostructured coatings of chitosan and propolis may be a viable alternative in the control of *A. flavus*; however, it is necessary to evaluate them in situ studies.

Key words: *Aspergillus flavus*, aflatoxins, nanostructured coatings.

References

- 1.- Manna, M., & Kim, K. D. (2017). Influence of temperature and water activity on deleterious fungi and mycotoxin production during grain storage. *Mycobiology*, 45(4), 240-254. <https://dx.doi.org/10.5941%2FMYCO.2017.45.4.240>
- 2.- Neme, K., & Mohammed, A. (2017). Mycotoxin occurrence in grains and the role of postharvest management as a mitigation strategies. *Food Control* 78, 412-425. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.03.012>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.

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

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por la C. Mónica Cortés Higareda, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula 10220160108, y que lleva por título “EFECTO DE RECUBRIMIENTOS NANOESTRUCTURADOS CON QUITOSANO Y/O PROPÓLEO SOBRE EL DESARROLLO *in vitro* DE *Aspergillus flavus* Y PRODUCCIÓN DE AFLATOXINAS ” 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.

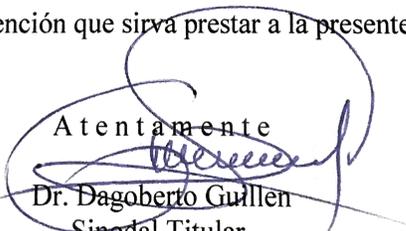
II. Condicionada a que se modifique en algunos aspectos. *

III. Se rechaza.*

*En los dos últimos casos se informará al alumno el plazo dentro del cual deberá presentar las modificaciones o la nueva investigación.

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

Atentamente


Dr. Dagoberto Guillen
Sinodal Titular.

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.

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

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por la C. Mónica Cortés Higareda, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula 10220160108, y que lleva por título “EFECTO DE RECUBRIMIENTOS NANOESTRUCTURADOS CON QUITOSANO Y/O PROPÓLEO SOBRE EL DESARROLLO *in vitro* DE *Aspergillus flavus* Y PRODUCCIÓN DE AFLATOXINAS ” 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.

II. Condicionada a que se modifique en algunos aspectos. *

III. Se rechaza.*

*En los dos últimos casos se informará al alumno el plazo dentro del cual deberá presentar las modificaciones o la nueva investigación.

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

Atentamente



Dra. Silvia Bautista Baños
Sinodal Titular.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE NUTRICIÓN

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.

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

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por la C. Mónica Cortés Higareda, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula 10220160108, y que lleva por título "EFECTO DE RECUBRIMIENTOS NANOESTRUCTURADOS CON QUITOSANO Y/O PROPÓLEO SOBRE EL DESARROLLO *in vitro* DE *Aspergillus flavus* Y PRODUCCIÓN DE AFLATOXINAS " 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.
- II. Condicionada a que se modifique en algunos aspectos. *
- III. Se rechaza.*

*En los dos últimos casos se informará al alumno el plazo dentro del cual deberá presentar las modificaciones o la nueva investigación.

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

Atentamente

Dr. Héctor Sotelo Nava
Sinodal Titular.

Firmo para lo que resulte conducente, en la ciudad de Cuernavaca Morelos, a los 5 días del

mes de Diciembre de 2018

Calle Iztaccihuatl Núm. 1000 Col. Los Volcanes, Cuernavaca, Mor., C.P. 62350
Tel. (777) 329 70 00, Ext. 7951 315 04 35 / academicanutricion@uaem.mx



CERTIFICADO NUM. 798

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÓRELOS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MÓRELOS



FACULTAD DE NUTRICIÓN

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.

COMISIÓN ACADÉMICA DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN PRESENTE

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por la C. Mónica Cortés Higareda, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula 10220160108, y que lleva por título "EFECTO DE RECUBRIMIENTOS NANOESTRUCTURADOS CON QUITOSANO Y/O PROPÓLEO SOBRE EL DESARROLLO *in vitro* DE *Aspergillus flavus* Y PRODUCCIÓN DE AFLATOXINAS" ha sido revisado a satisfacción me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente):

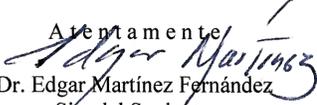
✓ I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente.

II. Condicionada a que se modifique en algunos aspectos. *

III. Se rechaza.*

*En los dos últimos casos se informará al alumno el plazo dentro del cual deberá presentar las modificaciones o la nueva investigación.

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

Atentamente

Dr. Edgar Martínez Fernández
Sínodal Suplente.

Firmo para lo que resulte conducente, en la ciudad de Cuernavaca Morelos, a los 5 días del

05 de Diciembre de 2018.
Calle Iztacoma s/n. C.P. 62000, Cuernavaca, Mor., C.P. 62350
Tel. (777) 329 70 00, Ext. 7951 315 04 35 / academicanutricion@uaem.mx

UA
EM

Una universidad de excelencia

RECTORIA
2017-2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE NUTRICIÓN

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.

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

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por la C. Mónica Cortés Higareda, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula 10220160108, y que lleva por título "EFECTO DE RECUBRIMIENTOS NANOESTRUCTURADOS CON QUITOSANO Y/O PROPÓLEO SOBRE EL DESARROLLO *in vitro* DE *Aspergillus flavus* Y PRODUCCIÓN DE AFLATOXINAS" 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.

II. Condicionada a que se modifique en algunos aspectos. *

III. Se rechaza.*

*En los dos últimos casos se informará al alumno el plazo dentro del cual deberá presentar las modificaciones o la nueva investigación.

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

Atentamente

Dra. Margarita de Lorena Ramos García
Sinodal Suplente.

Firmo para lo que resulte conducente, en la ciudad de Cuernavaca Morelos, a los 5 días del mes de Diciembre de 2018.

Calle Iztacalpan Núm. 1080 CP 62000 Cuernavaca, Mor., C.P. 62350
Tel. (777) 329 70 00, Ext. 7951 315 04 35 / academicanutricion@uaem.mx



