



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**CALIDAD SANITARIA DE BOTANAS DE MAÍZ  
NIXTAMALIZADO**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**INGENIERA EN ALIMENTOS**

**P R E S E N T A:**

**ELITANIA CASTRO MORENO**

**ASESOR**

**DR SERGIO JIMÉNEZ AMBRÍZ**

**COASESORES**

**M. EN C. MARIA CRISTINA JULIA PÉREZ REYES**

**M. EN C. JOSEFINA MORENO LARA**

**CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U.F.A.M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO  
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLAN  
PRESENTE

ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ  
Jefa del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

**Calidad sanitaria de botanas de maíz nixtamalizado**

Que presenta la pasante: Elitania Castro Moreno  
Con número de cuenta: 304331448 para obtener el Título de: Ingeniera en Alimentos

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 25 de noviembre de 2013.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Carolina Moreno Ramos	
VOCAL	Dra. María del Carmen Valderrama Bravo	
SECRETARIO	Dr. Sergio Jiménez Ambriz	
1er. SUPLENTE	IA. Ana María Sabina de la Cruz Javier	
2do. SUPLENTE	M. en C. Guicela Ramírez Bernal	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

HHA/iac



<b>INDICE GENERAL</b> .....	<b>I</b>
<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>IV</b>
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b> .....	<b>VII</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
<b>1 ANTECEDENTES</b> .....	<b>6</b>
<b>1.1 Generalidades del maíz</b> .....	<b>6</b>
<b>1.2 Origen</b> .....	<b>6</b>
<b>1.3 Características estructurales del grano de maíz</b> .....	<b>7</b>
<b>1.4 Composición química</b> .....	<b>10</b>
<b>1.5 Valor nutrimental</b> .....	<b>11</b>
<b>1.6 Producción de maíz en México</b> .....	<b>12</b>
<b>1.7 Producción de maíz a nivel mundial</b> .....	<b>13</b>
<b>1.8 Usos generales del maíz</b> .....	<b>14</b>
<b>1.9 Nixtamalización</b> .....	<b>14</b>
1.9.1 Principales cambios fisicoquímicos que sufre el grano de maíz durante la nixtamalización.	15
<b>1.10 Botanas nixtamalizadas</b> .....	<b>15</b>
1.10.1 Botanas y su elaboración .....	18
1.10.2 Las botanas en México.....	19
1.10.3 Producción de botanas en México.....	20
1.10.4 Procesos de elaboración de botanas .....	23
1.10.4.1 Proceso de freído.....	23
1.10.4.2 Proceso de horneado.....	24
1.10.4.3 Proceso de deshidratación .....	25
1.10.5 Valor nutrimental de las botanas .....	26
1.10.6 Calidad Sanitaria.....	27
<b>1.11 Bacterias</b> .....	<b>28</b>
1.11.1 Bacterias patógenas .....	29
1.11.1.1 Pruebas para la identificación de bacterias mesófilas propuesta en esta investigación .....	30
1.11.1.2 Especies de bacterias mesófilas identificadas en totopos de maíz nixtamalizado en esta investigación .....	31
1.11.2 Bacterias coliformes .....	32
<b>1.12 Hongos</b> .....	<b>33</b>
1.12.1 Clasificación ecológica.....	34
1.12.2 Hongos de campo.....	34
1.12.3 Hongos de almacén .....	34





1.12.3.1	Condiciones que favorecen el crecimiento de hongos de almacén .....	35
1.12.4	Hongos de deterioro avanzado.....	36
<b>1.13</b>	<b>Aflatoxinas .....</b>	<b>36</b>
1.13.1	Efectos tóxicos de las aflatoxinas .....	37
1.13.2	Condiciones para la prevención del desarrollo y producción de aflatoxinas .....	38
<b>2</b>	<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>40</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>42</b>
3.1	Objetivo General.....	42
3.2	Objetivos Particulares.....	42
3.2.1	Objetivo Particular 1.....	42
3.2.2	Objetivo Particular 2.....	42
3.2.3	Objetivo Particular 3.....	42
3.3	Hipótesis.....	42
<b>4</b>	<b>METODOLOGÍA.....</b>	<b>43</b>
4.1	Cuadro Metodológico .....	43
4.1.1	Actividades Preliminares.....	43
4.1.2	Objetivo Particular 1.....	43
4.1.3	Objetivo Particular 2.....	43
4.1.4	Objetivo Particular 3.....	43
4.2	Desarrollo Experimental.....	44
4.2.1	Actividades preliminares.....	44
4.2.2	Análisis microbiológico de bacterias mesófilas presentes en totopos de maíz nixtamalizado propuesta en esta metodología .....	48
4.2.2.1	Siembra de la muestra para bacterias .....	48
4.2.2.2	Cuantificación de bacterias .....	49
4.2.2.3	Identificación de bacterias mesófilas.....	50
4.2.2.4	Análisis microbiológico de la presencia de coliformes utilizando la metodología propuesta en esta investigación .....	55
4.2.3	Análisis microbiológico de hongos presentes en totopos de maíz nixtamalizado propuesta en esta metodología .....	55
4.2.3.1	Siembra de la muestra para hongos.....	55
4.2.3.2	Aislamiento de hongos.....	56
4.2.3.3	Cuantificación e identificación de hongos .....	57
4.2.4	Determinación de aflatoxinas totales.....	58
4.2.5	Análisis Estadístico .....	59
<b>5</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>61</b>
5.1	Contenido de humedad en totopos de maíz nixtamalizado.....	61
5.2	Análisis microbiológico de la presencia de bacterias en totopos de maíz nixtamalizado propuesta en esta metodología.....	62
5.2.1	Análisis microbiológico de la presencia de coliformes en totopos de maíz nixtamalizado propuesta en esta metodología .....	70





<b>5.3</b>	<b>Análisis microbiológico de la presencia de hongos en totopos de maíz nixtamalizado propuesta en esta metodología.....</b>	<b>72</b>
5.3.1	Hongos de campo.....	73
5.3.2	Hongo de almacén.....	78
1.1.1	Hongos de deterioro avanzado.....	84
<b>5.4</b>	<b>Aflatoxinas totales en totopos de maíz nixtamalizado .....</b>	<b>88</b>
	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>92</b>
	<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>95</b>
	<b>BIBLIOGRAFÍA CITADA.....</b>	<b>97</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>109</b>
	<b>ANEXO A- PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO .....</b>	<b>109</b>
	<b>ANEXO B- DIFERENCIACIÓN DE GÉNEROS AISLADOS DE BACTERIAS MESÓFILAS.....</b>	<b>113</b>
	<b>ANEXO C- BACTERIAS MESÓFILAS IDENTIFICADAS .....</b>	<b>114</b>
	<b>ANEXO D- HONGOS DE CAMPO.....</b>	<b>121</b>
	<b>ANEXO E- HONGOS DE ALMACÉN .....</b>	<b>125</b>
	<b>ANEXO F - HONGOS DE DETERIORO AVANZADO .....</b>	<b>128</b>
	<b>ANEXO G - CERTIFICADO DE ANÁLISIS DE BACTERIAS COLIFORMES DIBICO® .....</b>	<b>130</b>
	<b>GLOSARIO DE TÉRMINOS .....</b>	<b>132</b>





## INDICE DE FIGURAS

FIGURA	NOMBRE	PÁGINA
<b>Figura 1.</b>	Estructura del grano de maíz	8
<b>Figura 2.</b>	Producción de maíz	13
<b>Figura 3.</b>	Diagrama de la producción industrial de productos nixtamalizados a partir de masa y harinas nixtamalizadas	17
<b>Figura 4.</b>	Producción de botanas en México	21
<b>Figura 5.</b>	Consumo per cápita en México	22
<b>Figura 6.</b>	Tipos de botanas en México	22
<b>Figura 7.</b>	Distribución geográfica de producción de botanas	23
<b>Figura 8.</b>	Preparación de las muestras	45
<b>Figura 9.</b>	Determinación de contenido de humedad	48
<b>Figura 10.</b>	Estufa para secado de muestra	48
<b>Figura 11.</b>	Siembra, aislamiento e incubación de muestras de totopos en medio IPDA, IPDA c/a y AN	49
<b>Figura 12.</b>	Acomodo de trozos de las muestras de totopos en caja de Petri con medio de cultivo	49
<b>Figura 13.</b>	(a) Purificación de bacterias, (b) Forma estriada de siembra de colonia	50
<b>Figura 14.</b>	Procedimiento para tinción de Gram	51
<b>Figura 15.</b>	Lámpara de luz UV	54
<b>Figura 16.</b>	Esterilización de aguja para purificación de micobiota	57
<b>Figura 17.</b>	(a) Estereoscopio, (b) Preparaciones semipermanentes y (c) Microscopio compuesto	58
<b>Figura 18.</b>	Pesado y molienda de muestras	60
<b>Figura 19.</b>	Preparación de la muestra para	60
<b>Figura 20.</b>	Cuantificación de aflatoxinas en totopos	60
<b>Figura 21.</b>	Media de contenido de humedad en las seis marcas de totopos	62
<b>Figura 22.</b>	Colonias de bacterias presentes en los tres procesos de elaboración de totopos de maíz nixtamalizado. Medias con letras diferentes entre proceso existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).	66
<b>Figura 23.</b>	Colonias de bacterias mesófilas presentes en las seis marcas de totopos de maíz nixtamalizado. Medias con letras diferentes entre marcas existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).	69
<b>Figura 24.</b>	Coliformes presentes en las muestras de totopos de maíz nixtamalizado de seis marcas comerciales	71
<b>Figura 25.</b>	Colonias de hongos de campo presentes en los tres procesos de elaboración de totopos de maíz nixtamalizado. Medias con letras diferentes entre proceso existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).	75





<b>Figura 26.</b>	Colonias de hongos de campo presentes en las seis marcas de totopos de maíz nixtamalizado. Medias con letras diferentes entre proceso existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).	78
<b>Figura 27.</b>	Colonias de hongos de almacén presentes en los tres procesos de manufactura de totopos de maíz nixtamalizado. Medias con letras diferentes entre proceso existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).	80
<b>Figura 28.</b>	Colonias de hongos de almacén presentes en las seis marcas de totopos de maíz nixtamalizado. Medias con letras diferentes entre proceso existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).	83
<b>Figura 29.</b>	Colonias de hongos de deterioro avanzado presentes en los tres procesos de manufactura de totopos de maíz nixtamalizado. Medias con letras diferentes entre proceso existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).	86
<b>Figura 30.</b>	Colonias de hongos de deterioro avanzado presentes en las seis marcas de totopos de maíz nixtamalizado. Medias con letras diferentes entre proceso existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).	88
<b>Figura 31.</b>	Aflatoxinas totales en los tres procesos de elaboración de totopos de maíz nixtamalizado	89
<b>Figura 32.</b>	Aflatoxinas totales en seis muestras de totopos de maíz nixtamalizado	90
<b>Figura 33.</b>	Preparación de medios y esterilización	110
<b>Figura 34.</b>	Vertido de medio en placa	110
<b>Figura 35.</b>	Diferenciación de géneros comúnmente aislados de bacterias	113
<b>Figura 36.</b>	Tinción de Gram	114
<b>Figura 37.</b>	Prueba de peroxidasa	114
<b>Figura 38.</b>	Prueba motilidad	115
<b>Figura 39.</b>	Prueba formación de endosporas (40x)	115
<b>Figura 40.</b>	Prueba oxidación-fermentación(O/F)	116
<b>Figura 41.</b>	Colonias de <i>Pseudomonas avenae</i>	117
<b>Figura 42.</b>	Colonias de <i>Pantoea stewartii</i>	117
<b>Figura 43.</b>	Colonias de <i>Clavibacter michiganensis</i>	118
<b>Figura 44.</b>	Colonias de <i>Xanthomonas campestris</i>	119
<b>Figura 45.</b>	Colonias <i>Pseudomonas syringae</i>	120
<b>Figura 46.</b>	Colonias de hongos de <i>Alternaria</i> sp.	121
<b>Figura 47.</b>	Colonias de hongos de <i>Cladosporium</i> sp.	122
<b>Figura 48.</b>	Colonias de hongos de <i>Fusarium</i> sp.	123
<b>Figura 49.</b>	Colonias de hongos de <i>Helminthosporium</i> sp.	123
<b>Figura 50.</b>	Colonias de hongos de <i>Torula</i> sp.	124
<b>Figura 51.</b>	Colonias de hongos de <i>Penicillium</i> sp.	125
<b>Figura 52.</b>	Colonias de hongos de <i>Aspergillus flavus</i>	126
<b>Figura 53.</b>	Colonias de hongos de <i>Aspergillus terreus</i>	126
<b>Figura 54.</b>	Colonias de hongos de <i>Aspergillus candidus</i>	127
<b>Figura 55.</b>	Colonias de hongos de <i>Monilia</i> sp.	128
<b>Figura 56.</b>	Colonias de hongos de <i>Mucor</i> sp.	128







<b>Figura 57.</b>	Colonias de hongos de <i>Aspergillus niger</i>	129
<b>Figura 58.</b>	Colonias de <i>Escheriquia faecalis</i> ATC 20212	131
<b>Figura 59.</b>	Colonias de <i>Proteus</i>	131
<b>Figura 60.</b>	Modelo de las necesidades de Kano	134





## ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	NOMBRE	PÁGINA
<b>Cuadro 1.</b>	Composición química proximal de las partes principales de los granos de maíz	11
<b>Cuadro 2.</b>	Composición química general del maíz (%)	11
<b>Cuadro 3.</b>	Estimación de la producción de maíz en México 2006-2010	13
<b>Cuadro 4.</b>	Distribución óptima del tamaño de las partículas en harinas nixtamalizadas para tortillas de mesa, fritos y tostitos (Malla estándar de EUA)	19
<b>Cuadro 5.</b>	Composición química nutrimental de botanas (100g)	27
<b>Cuadro 7.</b>	Mínima actividad de agua (aw) requerida para el desarrollo de hongos de almacén	35
<b>Cuadro 8.</b>	Especificaciones de aflatoxinas de acuerdo con la NOM-187-SSA/SCFI-2002	39
<b>Cuadro 9.</b>	Especificaciones de aflatoxinas de acuerdo con la NOM-247-SSA1-2008	39
<b>Cuadro 10.</b>	Procedencia de muestras de totopos de maíz nixtamalizado	44
<b>Cuadro 11.</b>	Media de bacterias presentes en los tres procesos de manufactura de totopos de maíz nixtamalizado	64
<b>Cuadro 12.</b>	Media de bacterias presentes en las muestras de seis marcas de totopos de maíz nixtamalizado	67
<b>Cuadro 13.</b>	Media de hongos de campo presentes en tres procesos de elaboración de totopos de maíz nixtamalizado	73
<b>Cuadro 14.</b>	Media de hongos de campo presentes en las muestras de seis marcas de totopos de maíz nixtamalizado	76
<b>Cuadro 15.</b>	Media de hongos de almacén presentes en tres procesos de elaboración de totopos de maíz nixtamalizado	79
<b>Cuadro 16.</b>	Media de hongos de almacén presentes en las muestras de seis marcas de totopos de maíz nixtamalizado	81
<b>Cuadro 17.</b>	Media de hongos de deterioro avanzado presentes en tres procesos de elaboración de totopos de maíz nixtamalizado	84
<b>Cuadro 18.</b>	Media de hongos de deterioro avanzado presentes en las muestras de seis marcas de totopos de maíz nixtamalizado	87





## RESUMEN

Las botanas en México, al igual que en otros países del mundo son el producto que cubre las necesidades de los consumidores en cuanto a: accesibilidad, precio, buen sabor y una amplia variedad de gustos y porciones. Estos productos no son exclusivos de una clase social y está dirigida a todas las edades.

El consumo de botanas de maíz en los últimos años ha aumentado considerablemente por el acelerado ritmo de vida, por ser un producto natural y accesible para consumo inmediato.

El objetivo de este estudio fue evaluar la calidad sanitaria de totopos de maíz nixtamalizado de seis diferentes marcas comerciales y tres procesos de manufactura puestos a la venta en centros comerciales de los municipios de Atizapán de Zaragoza, Cuautitlán Izcalli, Huixquilucan, Estado de México y delegación Miguel Hidalgo, D.F, que cada vez son más consumidos en la ciudad de México. Se realizó un estudio descriptivo considerando los resultados del muestreo del 31 de abril de 2011 al 7 de septiembre de 2011.

En este trabajo se llevó a cabo la evaluación de la calidad sanitaria de totopos de maíz nixtamalizado de seis diferentes marcas comerciales mediante un análisis microbiológico que incluyó bacterias mesófilas, coliformes totales, hongos de campo, hongos de almacén y de deterioro avanzado, mediante el método de siembra en placa agar. También se realizó la determinación de la presencia de micotoxinas en las muestras de totopos de maíz nixtamalizado, como son las aflatoxinas totales, a través de método de inmunoafinidad por columnas monoclonadas de Afla Test-P® .





De las seis marcas de totopos de maíz nixtamalizado analizadas, todas resultaron contaminadas con al menos un microorganismo y solo dos marcas presentaron contaminación por al menos una colonia de coliformes.

En cuanto a presencia de hongos, las seis marcas analizadas presentaron una o más géneros. Mientras que en cuanto a la presencia de aflatoxinas cinco de las seis marcas analizadas resultaron positivas dentro de los límites máximos permitidos. Sin embargo, las muestras elaborada por el proceso de deshidratación fueron las que presentaron la mayor incidencia de microorganismos, seguidas de las muestras elaborados por el proceso de horneado y finalmente las muestras de totopos elaborados por el proceso de deshidratación, son las que presentaron la menor incidencia de microorganismos.





### INTRODUCCIÓN

El grano de maíz ha sido utilizado como alimento, moneda y en ceremonias religiosas por el pueblo mexicano. El maíz para consumo humano ha sido procesado en México siguiendo la técnica de nixtamalización, del náhuatl *nixtli*: cal de cenizas y *tamalli*: masa de maíz cocida que significa cocimiento del maíz con cal. Este procedimiento fue determinante para incrementar el valor nutrimental de productos de maíz de la dieta en México como son las botanas, totopos, tortillas y nachos entre muchos otros (Figuroa y González, 2001).

En la elaboración de frituras se utiliza la masa cortada y moldeada o la tortilla cocida cortada en fracciones circulares o triangulares que se fríen directamente con condiciones controladas de temperatura (Pérez *et al.* 2005). Las frituras de tortilla son cocidas antes de ser fritas por lo que absorben menor contenido de aceite. Las plantas industriales modernas aún utilizan los mismos principios para transformar el maíz en frituras (Gómez *et al.* 1991).

El proceso de cocimiento por inmersión en aceite o fritura de los alimentos es un proceso que se conoce desde hace muchos años y es utilizado como la operación más importante en la multimillonaria industria de las botanas (Vélez y Hernández, 1999).

La industria de las botanas es de las más versátiles y tecnificadas. Los productos terminados son convenientes y prácticos ya que requieren el mínimo de cocimiento o preparación y tienen una vida de anaquel prolongada. En la actualidad, esto ha tomado más importancia dado al creciente número de amas de casa que desempeñan otras labores y en general al acelerado tren de vida cotidiano (Serna, 1996).





El deterioro de los alimentos depende de sus propias características, de su microbiota presente y del ambiente que rodea al alimento. Dependiendo de estas condiciones se desarrollarán diferentes microorganismos, algunos de los cuales pueden causar alteración en su calidad sanitaria (Bello, 2005). Dentro de los factores bióticos que ocasionan deterioro en granos y semillas, los hongos y las micotoxinas que ellos producen así como también las bacterias juegan un papel importante ya que afectan su calidad sanitaria como granos alimenticios (Moreno, 1988).

Tales microorganismos y micotoxinas pueden estar presentes en la materia prima o tener acceso al alimento en alguna etapa del proceso de transformación si no se aplican correctamente las buenas prácticas de manufactura (BPM); es difícil evitar su presencia y una vez contaminado el alimento, si se mantiene por periodos largos bajo condiciones adecuadas para la multiplicación microbiana, será inaceptable para el consumidor (Bello, 2005). La producción de aflatoxinas depende de varios factores: la cepa del hongo, sustrato, contenido de humedad, temperatura y la microbiota asociada (Moreno, 1988).

La calidad sanitaria tiene una especial relevancia, puesto que se ha de tener siempre presente la estrecha relación que existe entre la salud de una persona y la alimentación que recibe. En consecuencia, asegurar la calidad sanitaria de un alimento debe ser un objetivo prioritario de la industria alimentaria que lo produce (Bello, 2005).

Los criterios microbiológicos ofrecen a la industria alimentaria y a las organizaciones reguladoras directrices para controlar los sistemas de elaboración de alimentos como la utilización de microorganismos indicadores de contaminación, la presencia de microorganismos patógenos específicos y la detección de una toxina específica producida por un patógeno (Doyle *et al.* 2001 y Félix *et al.* 2005).





Debido a la importancia que representa este tipo de botanas por su cada vez mayor consumo en el país, es importantes que las BPM se lleven a cabo correctamente asegurando su inocuidad.





## 1 ANTECEDENTES

### 1.1 Generalidades del maíz

El maíz pertenece a la familia de las gramíneas, su nombre científico es *Zea mays*. El grano de maíz es la principal fuente de alimentación humana en América. El maíz es uno de los cereales de mayor tamaño y que más se produce en el mundo. El maíz es hoy por hoy el cereal más importante y significativo después del trigo en los intercambios mundiales, aunque lamentablemente, en su mayor proporción utilizado como alimento al ganado o materia prima para la obtención del almidón (Gutiérrez y Güemes, 1990 y Ospina, 2002).

### 1.2 Origen

El cultivo del maíz tuvo su origen, con toda probabilidad, en América Central, especialmente en México, de donde se difundió hacia el norte hasta el Canadá y hacia el sur hasta la Argentina. La evidencia más antigua de la existencia del maíz, de unos 7000 años de antigüedad, ha sido encontrada por arqueólogos en el valle de Tehuacán (México) pero es posible que hubiese otros centros secundarios de origen en América. Este cereal era un artículo esencial en las civilizaciones maya y azteca y tuvo un papel importante en sus creencias religiosas, festividades y nutrición; ambos pueblos incluso afirmaban que la carne y la sangre estaban formadas por maíz. La supervivencia del maíz más antiguo y su difusión se debió a los seres humanos, quienes recogieron las semillas para posteriormente plantarlas. A finales del siglo XV, tras el descubrimiento del continente Americano por Cristóbal Colón, el grano fue introducido a Europa a través de España. Se difundió entonces por los lugares de clima más cálido del mediterráneo y posteriormente a Europa septentrional. Mangelsdorf y Reeves (1939) han hecho notar que el maíz se cultiva en todas las regiones del mundo aptas para actividades agrícolas y que se recoge en algún lugar del planeta todos los meses del año. Crece desde los 58° de latitud norte en Canadá y Rusia hasta los 40° de latitud sur en el hemisferio meridional. Se cultiva en regiones por debajo del nivel del mar en la llanura del Caspio y a más de 4 000 metros de







altura en Los Andes Peruanos (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 2011).

Ha habido retro cruzamiento reiterado entre el teocintle y el maíz y sigue habiéndola hoy en día en algunas zonas de México y Guatemala donde el teocintle puede crecer en los cultivos de maíz. Se ha señalado que siguen siendo viables esencialmente dos de las diversas hipótesis sobre el origen del maíz: la primera es que el teocintle actual es el antecesor silvestre del maíz, y/o un tipo primitivo de teocintle es el antecesor silvestre común del maíz y del teocintle; la segunda es que una forma desaparecida de maíz tunicado fue el antecesor del maíz, y el teocintle fue, en cambio, una forma mutante de dicho grano tunicado. En cualquier caso, la mayoría de las variedades modernas del maíz proceden de material obtenido en el sur de los Estados Unidos, México y América Central y del Sur (FAO, 2011).

### 1.3 Características estructurales del grano de maíz

El grano de maíz es un fruto seco indehiscente<sup>1</sup> de una semilla simple. En este tipo de fruto, la pared ovárica madura conocida como pericarpio no se separa naturalmente de la semilla. El grano se encuentra unido a toda la mazorca, el pedúnculo se rompe al azar dejando un final dentado. La estructura cónica, que permanece unida al grano se llama punta (Hernández, 2006).

La estructura anatómica de todos los cereales es muy similar. Los granos de maíz son cariósides desnudos, cuyas partes fundamentales son el pericarpio, el endospermo y el germen como se observa en la Figura 1, la semilla está constituida a su vez por una cubierta de semilla, germen y endospermo (Gil y Ruíz, 2010).

El grano de maíz es la semilla reproductora de la planta del maíz, de tal forma que su estructura y composición existen para propósitos de reproducción más que de

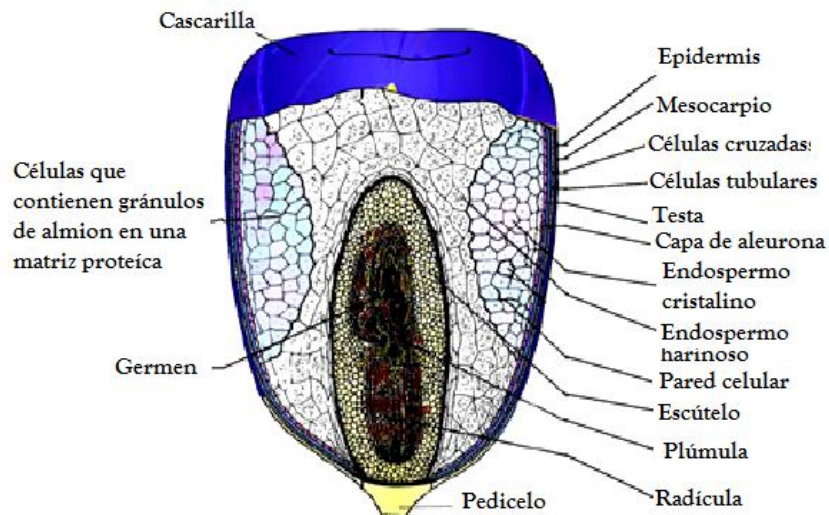
---

<sup>1</sup> Ver glosario de términos





proceso. El grano está compuesto de tres partes principales: germen, endospermo y pericarpio, cada una de ellas presenta diferentes características de composición de importancia en la utilización del grano de maíz (Hernández, 2006).



**Figura 1. Estructura del grano de maíz**

**Fuente: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación-FAO, 2011**

### **Germen**

Desde el punto de vista reproductivo, contiene todas las enzimas esenciales, nutrimentos y material genético para producir una planta de maíz. El germen está compuesto por el embrión y el escutelo, éste último funciona como un órgano nutritivo para el embrión. El germen representa 10-12 % del peso seco del grano, almacena nutrientes y hormonas las cuales son movilizadas por enzimas elaboradas durante las etapas iniciales de la germinación. El escutelo es una sencilla capa de células secretoras las cuales forman el contacto primario entre el germen y el endospermo (Hernández, 2006).

### **Endospermo**

Representa la mayor porción del grano, constituye del 82% al 84% del peso seco del grano y está compuesto principalmente por almidón (86-89%). Está constituido por





células alargadas empacadas con gránulos de almidón de 5-30 $\mu$ m embebidos en una matriz proteica continua. El endospermo harinoso rodea la fisura central del grano y es opaco para transmitir la luz. La opacidad es debida a la refracción de la luz sobre bolsas de aire alrededor de los gránulos de almidón las cuales resultan del desgarramiento de la delgada matriz proteica cuando se encogen durante el secado (Hernández, 2006).

La matriz no se alarga completamente alrededor de los gránulos de almidón y éstos asumen una forma redondeada. El endospermo córneo se encuentra principalmente a los lados del grano, la matriz proteica que lo cubre es más gruesa y permanece intacta durante el secado, los gránulos de almidón se encuentran comprimidos en forma poliédrica, son de aspecto translúcido y no presentan cavidades aéreas (Hernández, 2006).

La matriz proteica del endospermo está comprendida por gluteína y zeína, la gluteína debido a sus fuertes puentes disulfuro proporciona al endospermo características estructurales, no ocurre así con la zeína la cual existe como formas esféricas empotradas dentro de la matriz proteica (Hernández, 2006).

La capa externa del endospermo, llamada aleurona, es una capa sencilla de células de apariencia totalmente diferente. Ésta cubre totalmente al endospermo almidonoso y al germen, y es interrumpida sólo a la altura de la punta del grano. Es más delgada cerca del germen. El contenido de las células de aleurona es granular en apariencia conteniendo gránulos de proteína pero no de almidón, éstas células son ricas en minerales y proteína de alta calidad pero nutrimentalmente no disponibles para las enzimas digestivas a menos que las células sean desintegradas durante la molienda (Hernández, 2006).





### **Pericarpio**

Es la estructura más extrema de la semilla, es una membrana delgada, transparente, casi invisible, llamada cubierta del fruto. Se adhiere a la superficie externa de la capa de aleurona y además imparte propiedades semipermeables al grano de maíz.

El pericarpio representa el 5-6% del peso seco del grano. La capa más externa de tubos celulares es una hilera de tubos largos presionados fuertemente a la capa de aleurona. Cerca está un área muy abierta y poco compacta llamada capa de células cruzadas, la cual tiene una gran distribución de espacio intercelular, ésta se encuentra cubierta por una capa delgada y bastante compacta conocida como mesocarpio formada por células alargadas empacadas y con numerosos hoyos, éstos hoyos y las áreas abiertas en el cruce de la capa celular proveen interconexiones capilares entre todas las células lo cual facilita la absorción de agua.

La capa más externa de las células llamada epidermis, está formada por una cubierta cerosa que probablemente retarda el intercambio de humedad el espesor de la capa de pericarpio varía desde  $62\mu\text{m}$  a  $160\mu\text{m}$  y se ha demostrado que el cultivo de granos de ambos espesores delgado o grueso puede ser exitoso. El pericarpio se extiende desde la base del grano hasta la punta (Hernández, 2006).

La calidad de uso del maíz está determinada principalmente por la estructura y composición del grano. Las diferencias en estructura y composición dependen del cultivar así como de las prácticas del manejo, el clima, el suelo y los métodos de cosecha y pos cosecha. A continuación se presentan algunos datos de composición química del maíz (Hernández, 2006).

#### **1.4 Composición química**

Las principales partes del grano de maíz difieren considerablemente en su composición química, se observa en el Cuadro 1 que el pericarpio se caracteriza por un





elevado contenido de fibra cruda, aproximadamente el 86.7 %. El endospermo, en cambio contiene un elevado nivel de almidón 87.6 %, aproximadamente 8% de proteínas y un bajo porcentaje de grasa cruda (0.8 %). Por último, el germen se caracteriza por un elevado contenido de grasas crudas, el 33.2 % por término medio, y contiene también un nivel relativamente elevado de proteínas (próximo al 20 %) y minerales con 10.5%.

**Cuadro 1. Composición química proximal de las partes principales de los granos de maíz**

Componente químico	Pericarpio	Endospermo	Germen
Proteínas	3.70	8.00	18.4
Grasa Cruda	1.00	0.80	33.2
Fibra cruda	86.7	2.70	8.80
Cenizas	0.80	0.30	10.5
Almidón	7.30	87.6	8.30
Azúcar	0.34	0.62	10.8

Fuente: FAO, 2011

En cuanto a la composición química general del grano de maíz (Cuadro 2) se caracteriza por un alto contenido de hidratos de carbono (71.7%), mientras que el contenido de humedad y proteínas aproximadamente es de 10.8 % y 10 % respectivamente, observándose que su contenido de grasa es de apenas 4.3% mientras que los minerales y fibra está entre 1.5 -1.7% aproximadamente.

**Cuadro 2. Composición química general del maíz (%)**

Material	Humedad	Proteína	Grasa	Cenizas	Fibra	Hidratos de Carbono
Maíz (grano)	12.5	9.2	3.8	1.3	2.15	71.0

Fuente: Benítez, 2005

### 1.5 Valor nutrimental

La importancia de los cereales en la nutrición de millones de personas de todo el mundo es ampliamente reconocida. Debido a su ingesta relativamente elevada en los países en desarrollo, no se les puede considerar sólo una fuente de energía, sino que además suministran cantidades notables de proteínas. Los granos de cereal tienen una baja concentración de proteínas y la calidad de éstas se halla limitada por la





deficiencia de algunos aminoácidos esenciales, sobre todo lisina. Un hecho mucho menos conocido es que algunos cereales contienen un exceso de ciertos aminoácidos esenciales que influye en la eficiencia de la asimilación de las proteínas. Ejemplo clásico de ello es el maíz, pues otros cereales presentan limitaciones iguales, pero menos evidentes (FAO, 2011).

El maíz tiene un valor nutrimental inferior al del trigo, particularmente por ser deficiente en la vitamina niacina, y en aminoácidos lisina y triptófano además de tener una riqueza proteica relativamente baja. El maíz ha sido y será muy probablemente el producto con mayor consumo en los hogares mexicanos ya que es un alimento representativo de la cultura nacional y del cual derivan un sinnúmero de alimentos consumidos de manera cotidiana como son principalmente la tortilla, harinas, frituras, almidones, féculas entre otras (Hernández, 2006).

### 1.6 Producción de maíz en México

El cereal de más importancia para el pueblo mexicano, el de mayor producción, al que se destinan más hectáreas de cultivo y el de mayor consumo *per cápita* sin lugar a duda es el maíz (Serna, 1996).

El maíz es el cultivo más importante de México forma parte importante en la dieta de los mexicanos, ocupa poco más de la mitad de la superficie sembrada del país y representa casi una tercera parte del valor de la producción agrícola. Actualmente se cosechan en México aproximadamente 22 069 254.42 toneladas de maíz (Cuadro 3), cifra superior a la producción obtenida en el 2011 [17 635 417.30 toneladas] (SAGARPA, 2014).



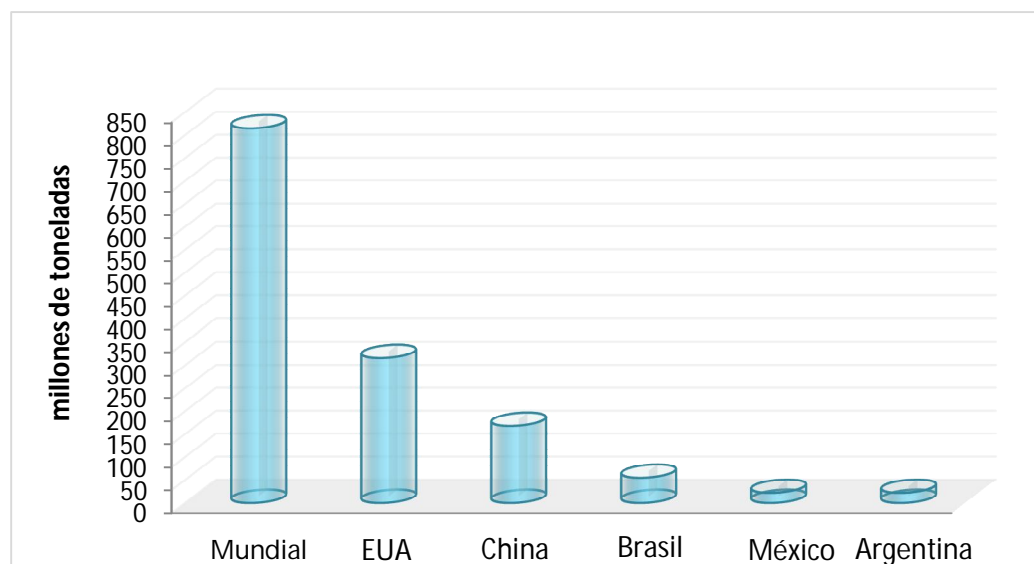
**Cuadro 3. Estimación de la producción de maíz en México 2006-2010**

Año agrícola	Superficie cosechada ( hectáreas)	Producción (Toneladas)
2009	6,223,046.54	20,142,815.76
2010	7,148,045.77	23,301,878.98
2011	6,069,091.63	17,635,417.30
2012	6,069,091.63	22,069,254.42

Fuente: SAGARPA, 2014.

### 1.7 Producción de maíz a nivel mundial

La producción de maíz a nivel mundial es de 815 millones de toneladas (Figura 2), entre los principales países productores de maíz se encuentra E.U.A con una producción de 316 millones de toneladas, seguido de China con una producción de 168 millones de toneladas, el tercer lugar lo ocupa Brasil con una producción de 55 millones de toneladas y finalmente el cuarto lugar existe un empate entre México y Argentina con una producción de 22 millones de toneladas (Grupo Consultor de Mercados Agrícolas, 2011).

**Figura 2. Producción de maíz**

Fuente: Grupo Consultor de Mercados Agrícolas-GCMA, 2011





## 1.8 Usos generales del maíz

Los cereales desde su cosecha hasta llegar a la boca del consumidor son generalmente sujetos a múltiples operaciones o segmentos industriales, entre los cuales destacan la industria almacenadora, molinos e industrias procesadoras de fracciones de molienda en productos procesados.

El maíz entero se consume en la mazorca, el cual es reventado para la producción de palomitas, nixtamalizado para la producción de tortillas y productos relacionados o procesado en harinas y grits<sup>2</sup> que forman la columna vertebral de la industria de botanas y cereales para desayuno (Serna, 1996).

## 1.9 Nixtamalización

Diversos investigadores han descrito el método empleado para cocinar el maíz en las zonas rurales de los países consumidores de la tortilla, el primero en describir el proceso fue Illescas en el año 1943 (Yañez, 2005). El proceso comienza con la nixtamalización del grano. El maíz se mezcla con tres partes de agua y 1 % de cal (basado en el peso original del grano) para posteriormente ser cocido a temperaturas que llegan hasta ebullición. El tiempo de cocimiento varía de acuerdo con las propiedades físicas del grano (dureza, tamaño, condición) y a la capacidad y tipo de cocedores. En términos generales, el maíz se mantiene cociendo a temperaturas de 80°C durante un lapso de 20- 50 min. Posteriormente, el grano se deja reposar en el agua caliente de cocimiento de 10-14 horas. Transcurrido el tiempo se decanta el líquido denominado nejayote, el maíz nixtamalizado pasa por un sistema de lavado hasta que este quede sin residuos de la solución de cal (Serna, 1996 y Yañez, 2005).

La presencia de cal en las fases de cocción y de remojo contribuye a eliminar las cubiertas del grano de maíz disminuyendo la cantidad de fibra en la masa y las

---

<sup>2</sup> Ver glosario de términos







tortillas elaboradas por este proceso (Yañez, 2005). A pesar de la pérdida de algunos nutrimentos durante el proceso de nixtamalización tradicional en este se generan las condiciones óptimas para la interacción de los componentes necesarios que provee las características fisicoquímicas, reológicas, de textura y sensoriales, de las cuales depende la calidad final del producto (masa, tortilla, botana, etc.) (Yañez, 2005).

### **1.9.1 Principales cambios fisicoquímicos que sufre el grano de maíz durante la nixtamalización**

En el proceso de nixtamalización la cal debilita las paredes celulares del grano de maíz facilita la eliminación del pericarpio, solubiliza las paredes celulares del endospermo periférico, da lugar a una hinchazón y gelatinización de los gránulos de almidón y modifica la apariencia de los cuerpos proteicos (Yañez, 2005). El contenido de lípidos en el grano de maíz varía del 33 al 43 % de los cuales el 11.8 al 18.1% se pierden durante la nixtamalización y del 25 al 50 % de los lípidos de la masa se encuentran libres y parcialmente emulsificados (Yañez, 2005). Durante el cocimiento del grano se originan reacciones bioquímicas importantes que modifican las características fisicoquímicas, microbiológicas, texturales y reológicas de la masa (Yañez, 2005).

### **1.10 Botanas nixtamalizadas**

Básicamente existen dos tipos de botanas nixtamalizadas: las manufacturadas a partir de masa, aquellas obtenidas a partir de tortillas y las elaboradas a partir de harina nixtamalizada. Para la producción de botanas a partir de tortillas, la masa gruesa con 54 % de humedad es laminada y cortada en diferentes configuraciones (triángulos, tiras, pequeños círculos) para posteriormente circular a través de un horno de tres pasos para su cocción. Las temperaturas de las diferentes fases del horno están controladas con el objetivo de reducir o eliminar el hinchamiento o formación de las denominadas ampollas sobre la superficie del producto. El gradiente de temperatura





es alto al comienzo con objeto de remover humedad y es baja en las fases finales con el propósito de impedir la excesiva formación de vapor de agua, la cual causa ampollas.

El uso de masa gruesa, la cual permite escapar al vapor de agua, aunado con un buen gradiente de temperatura resulta en un buen producto para freír. Los pedazos de tortilla con aproximadamente 36-42 % de humedad son enfriados, equilibrados y freídos. Esta última operación generalmente se realiza en freidores continuos, los cuales operan a temperaturas de 180 °C y están regulados para dar un tiempo de residencia de aproximadamente un minuto. El producto final con 1.5 % de humedad y 20-24% de aceite tiene un sabor más fuerte que el de los fritos nixtamalizados debido al desarrollo de compuestos saborizantes (reacciones de Maillard) durante el horneado. Al igual que los fritos<sup>3</sup> los tostitos<sup>4</sup> son salados y, o saborizados inmediatamente después de ser freídos (Serna, 1996). En la

Figura 3 se presenta el diagrama que describe la adaptación del proceso de obtención de harina nixtamalizada a nivel industrial, éste sigue el mismo procedimiento de nixtamalización que el que se utiliza para elaboración de fritos, tortillas o tostitos, tostadas, doritos, a partir de masa.

Partiendo de la etapa de molienda húmeda se somete a un proceso de secado, posteriormente se lleva a cabo una molienda seca para que sea tamizada y finalmente se lleva a cabo una selección de partículas para que cumpla con la granulometría deseada obteniéndose finalmente la harina nixtamalizada.

Para continuar con la elaboración de botanas ésta harina es hidratada, mezclada, para pasar a formado/cortado y continuar con el procedimiento deseado, ya sea obtención de fritos y/o doritos de esto dependerá las etapas que se seguirán para obtener las características deseadas en la botana.

<sup>3</sup> No se refiere a marca comercial, sino al proceso de elaboración

<sup>4</sup> No se refiere a marca comercial, sino al proceso de elaboración



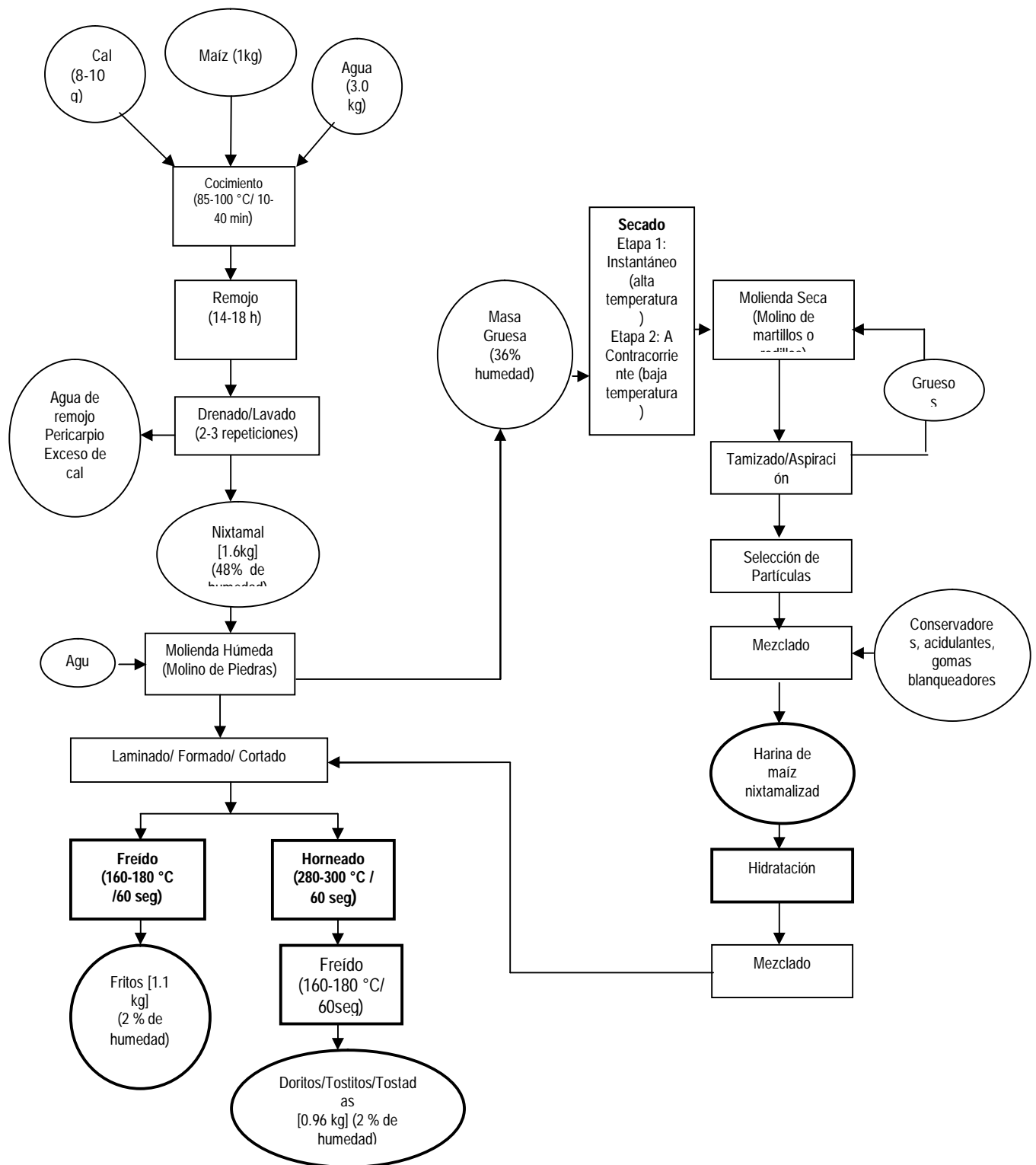


Figura 3. Diagrama de la producción industrial de productos nixtamalizados a partir de masa y harina  
Fuente: Serna, 1996





### 1.10.1 Botanas y su elaboración

Según la NOM-187-SSA1/SCFI-2002 define una botana como los productos de pasta de harinas de cereales, leguminosas, tubérculos o féculas; así como de granos, frutas, frutos, semillas o leguminosas con o sin cáscara o cutícula, tubérculos; productos nixtamalizados y piel de cerdo, que pueden estar fritos, horneados, explotados, cubiertos, extruidos o tostados; adicionados o no con sal y otros ingredientes opcionales y aditivos para alimentos.

Las diferencias primordiales entre un cereal matutino y unas botanas son: los primeros se consideran el primer alimento del día y posee un bajo contenido de grasa o aceite, la mayoría tiene azúcar, están enriquecidos o fortificados con vitaminas o minerales. Las botanas por otro lado, aunque son producidas similarmente, contienen alta cantidad de grasa y sal; éste primero como primer compuesto resultante de la fritura o incluido como agente portador de otros saborizantes y colorantes (Serna, 1996).

Para la manufactura de estos productos se precisa de la apropiada selección y combinación de la materia prima y de depuradas prácticas de producción y control de calidad. Tanto los cereales matutinos como las botanas están caracterizados por contener baja humedad, indispensable para preservar las características de textura del producto e impedir su deterioro. Indudablemente, el tipo de envase juega un papel muy importante en la conservación de las características típicas del producto terminado. En general, los procesos de manufactura incluyen la combinación de ingredientes o materia prima, cocimiento, formación, horneado y/o freído (Serna, 1996).

Las harinas para elaborar botanas fritas necesitan una granulometría más gruesa que la harina para elaborar tortillas (Cuadro 4) y un menor cocimiento para evitar que el vapor de agua que se libera durante los procesos de horneado y freído forme bolsas





de aire, denominadas industrialmente ampollas, en la superficie de la botanas (Serna, 1996). En el Cuadro 4 se presenta la distribución de partículas, utilizando malla estándar EUA (+40 a -100). Para una tortilla, ronda entre (1.4 – 36.1 %) y utilizada en la elaboración de los fritos o tostitos (4.4 -34.9 y 54.3- 12.2%) respectivamente.

**Cuadro 4. Distribución óptima del tamaño de las partículas en harinas nixtamalizadas para tortillas de mesa, fritos y tostitos (Malla estándar de EUA)**

Tamaño de Partícula	Tortilla (%)	Fritos (%)	Tostitos (%)
+ 40	1.4	4.4	54.3
+ 60	33.8	37.5	22.8
+ 100	28.9	23.2	11.2
- 100	36.1	34.9	12.2

**Fuente: Serna, 1996**

### 1.10.2 Las botanas en México

Las botanas en México al igual que en otros países del mundo son el producto que cubre las necesidades de los consumidores, en cuanto a precio, accesibilidad, buen sabor y una amplia variedad de gustos y porciones, este producto no es exclusivo de una clase social y está enfocada a todas las edades. Existe una gran variedad de botanas, que tienen características de sabor diferentes, que nos sirven para acompañar y compartir todos aquellos momentos de distracción y diversión, tanto fuera como dentro de casa, esta variedad incluye: papas, tortilla chips, chicharrones de harina de trigo, chicharrón de cerdo, etc. (Valdés, 2009). En la actualidad, este consumo de botanas ha tomado más importancia dado al creciente número de amas de casa que desempeñan otras labores y en general al acelerado tren de vida cotidiano (Serna, 1996).

Las botanas producidas a partir de maíz tienen gran aceptación dentro del mercado mexicano debido a la gran variedad de productos que es posible desarrollar en relación la textura, forma y sabor. En cuanto a este último concepto las posibilidades





de generar nuevos productos es muy amplia dado que lo que se puede variar es la combinación de condimentos utilizados (Plascencia, 1998).

En Estados Unidos de Norteamérica se consume un volumen cuatro veces mayor de frituras que en México, lo que hace pensar que en nuestro país es muy factible el aumento de su consumo. Esto resulta comprensible para la industria de las frituras dado al gran soporte de mercadotecnia y de distribución que presenta, logrando influir directamente en el gusto por el consumo de estos productos. En ocasiones llegan a ser sustitutos de alguna de las tres comidas que normalmente se llevan a cabo en México (Plascencia, 1998).

### **1.10.3 Producción de botanas en México**

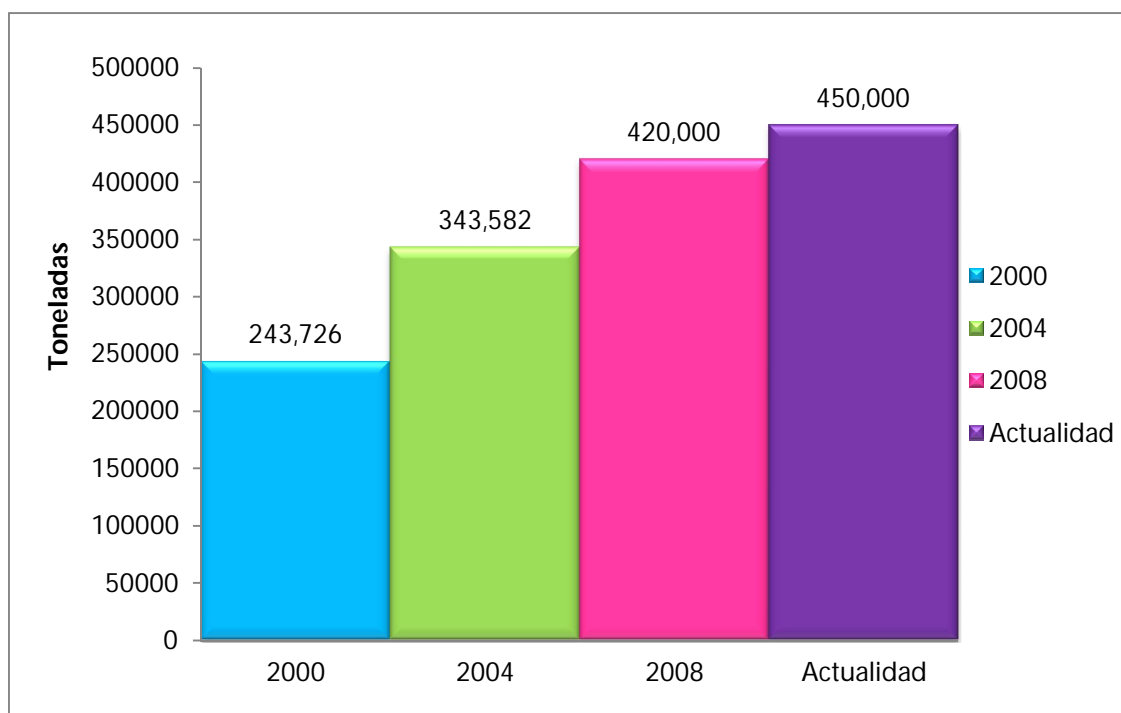
La nixtamalización no sólo ha servido para producir tortillas. La masa, el maíz nixtamalizado y las tortillas, obviamente, se han usado también para preparar un gran número de platillos. Éstos se han vuelto muy populares en México y en otros países de América y Europa. Las botanas nixtamalizadas por excelencia, los totopos, están colocadas en segundo lugar en ventas en el mundo después de las papas fritas (Paredes *et al.* 2006).

La popularidad de estos productos prácticamente ha alcanzado todo el mundo. El mercado de botanas nixtamalizadas se ha incrementado drásticamente durante los últimos 10 años. En Estados Unidos, las botanas nixtamalizadas ocupan actualmente el segundo lugar, después de las papas fritas, en volumen de producción (500,000 ton de producto), segmento del mercado (25.8 %) y ventas, las cuales en 1993 alcanzaron 3500 millones de dólares. Las estadísticas de los últimos 10 años indican que el índice de crecimiento en ventas es más alto (7 % de crecimiento anual) que el de papas fritas, lo que puede ocasionar que en algunos años las botanas nixtamalizadas puedan alcanzar o inclusive desplazar al mercado de las papas fritas (Serna, 1996).





El volumen de producción de botanas en México ha crecido de 234,726 toneladas en el 2000 a 420,000 toneladas al año en 2008 (Figura 4), estimándose que en la actualidad asciende alrededor de 450,000 toneladas (CANACINTRA, 2012).



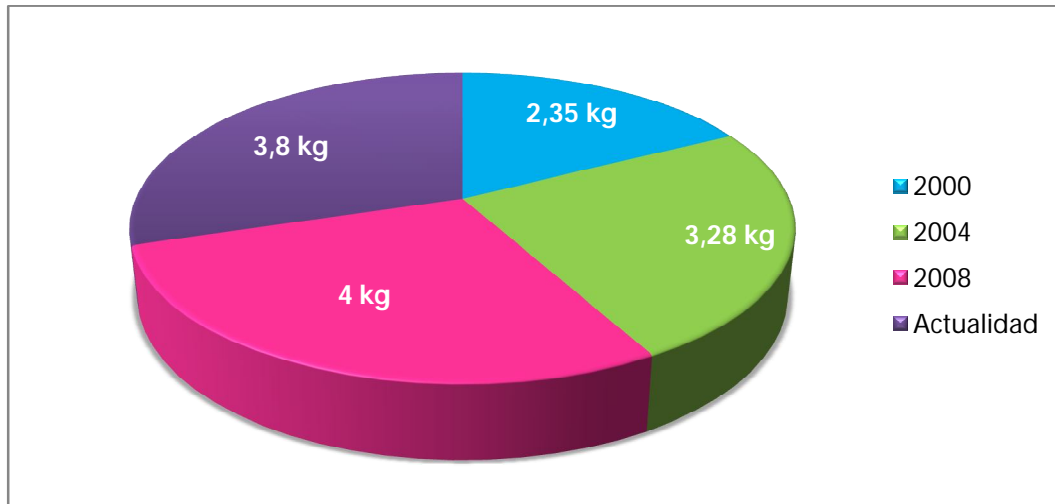
**Figura 4. Producción de botanas en México**

**Fuente: Cámara Nacional de la industria de la transformación-CANACINTRA, 2012**

El consumo *per cápita* igualmente creció de 2.35 kg en 2000 a 3.8 kg para el 2008, mientras que actualmente es de aproximadamente 4 kg (Figura 5).

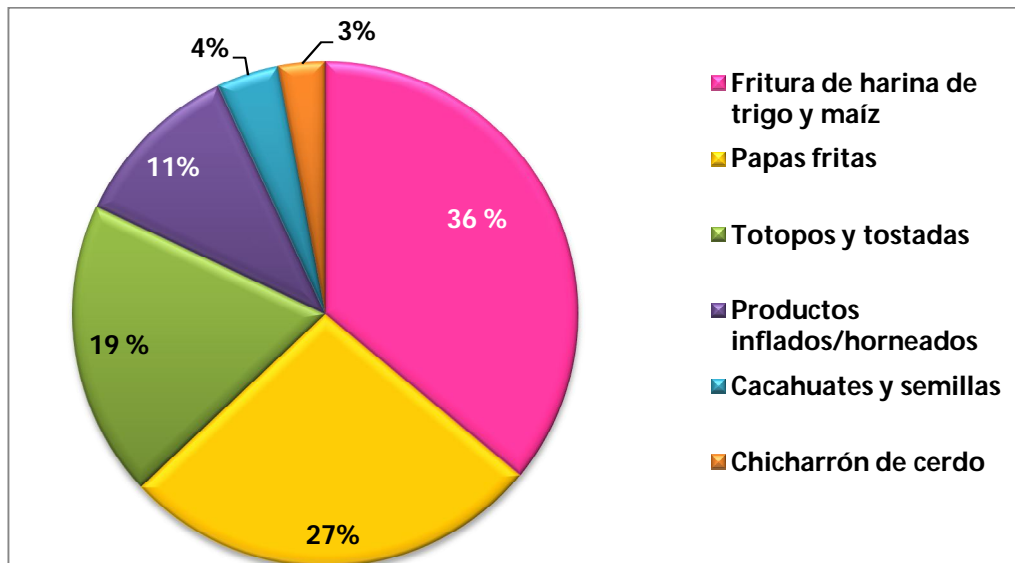
Existen 130 empresas fabricantes establecidas y registradas en el Quinto Directorio Nacional de Fabricantes de Botanas, la mitad de las empresas fabricantes se encuentran localizadas en la ciudad de México (20 %), Jalisco (17 %) y Nuevo León (15 %). La otra mitad se encuentra repartida en el resto del territorio nacional (CANACINTRA, 2012).





**Figura 5. Consumo *per cápita* en México.**  
Fuente CANACINTRA, 2012

De las botanas producidas en México se encuentran distribuidas en diferentes categorías. La mayor producción de botanas fritas son las elaboradas de harina de trigo y maíz con un 36 %, en segundo lugar se encuentran las papas fritas con un 27 %, mientras que los totopos y tostadas representan el 19 % de la variedad, las botanas horneadas representan 11 % y finalmente los cacahuates y chicharrones con el 4 % y 3 % respectivamente (Figura 6) (CANACINTRA, 2012).



**Figura 6. Tipos de botanas en México**  
Fuente CANACINTRA, 2012







En relación a la distribución geográfica la siguiente es la distribución por zonas en orden de importancia en primer lugar lo ocupa la región norte con el 30 %, la región occidente, Distrito Federal y zona metropolitana abarcan el 15 % de la producción, mientras que la región noroeste y centro ocupan el 14 % del total de la producción y finalmente la región sureste con una distribución de 12 % (Figura 7) (CANACINTRA, 2012).

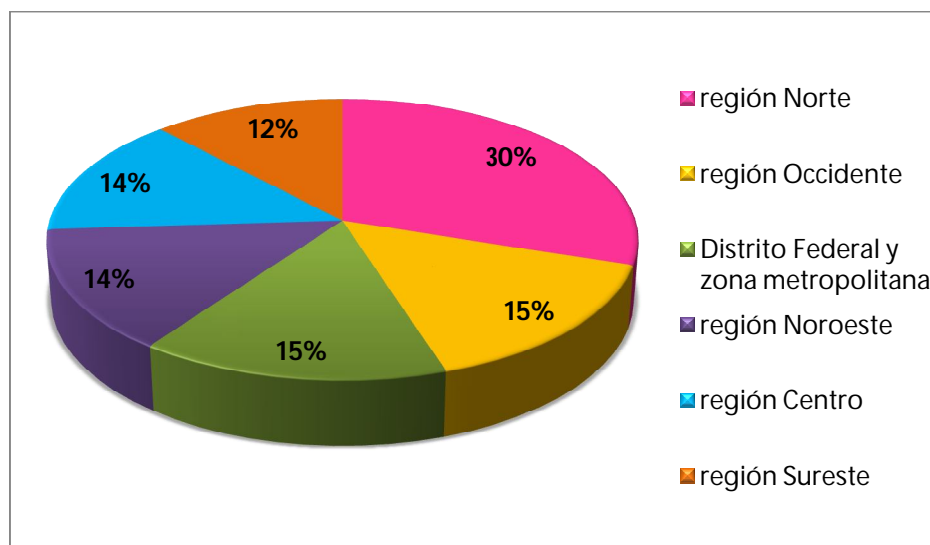


Figura 7. Distribución geográfica de producción de botanas  
Fuente CANACINTRA, 2012

#### 1.10.4 Procesos de elaboración de botanas

##### 1.10.4.1 Proceso de freído

El proceso de cocimiento por inmersión en aceite o fritura de los alimentos es un proceso que se conoce desde hace muchos años. México es particularmente rico en alimentos fritos, tales como las papas a la francesa, donas, tostadas (tortilla dorada) y totopos (cuartos de tortilla dorada), entre otros (Vélez y Hernández, 1999).

La fritura es una operación unitaria destinada a modificar las características organolépticas del alimento. Un objetivo secundario de la fritura es el efecto conservador que se obtiene por destrucción térmica de los microorganismos y enzimas presentes en el alimento y por reducción de la actividad de agua en la





superficie del mismo (o en toda su masa, en los alimentos cortados en rodajas finas). Aquellos alimentos sometidos a procesos de fritura más intensos y en consecuencia con un contenido final de agua bajo, (por ejemplo papas fritas, snacks a base de maíz, etc.) se conservan hasta por doce meses a temperatura también. Con objeto de mantener su calidad se almacenan, debidamente envasados, en condiciones adecuadas (Fellows, 2000).

La fritura es un proceso de cocimiento de alimentos resultante de la inmersión del material alimenticio en aceite o grasa, que se encuentra a una temperatura superior al punto de ebullición del agua, típicamente 150 – 200 °C. Desde el punto de vista ingenieril la transferencia de calor y de masa representa un reto por características particulares, el calor convectivo es transferido desde el aceite que rodea al alimento hacia la superficie, mismo que se utiliza para la gelatinización del almidón, desnaturalización de las proteínas, evaporación del agua superficial y para la formación de una costra (misma que implica el desarrollo de color y sabor). Mientras que la transferencia de masa se caracteriza por la penetración del aceite hacia el interior del alimento, y por la salida del vapor de agua del alimento. Paralelamente, se desarrollan notables cambios texturales, el alimento puede reducir o aumentar su volumen como consecuencia de la pérdida de agua y/o ganancia de aceite (Vélez y Hernández, 1999).

#### **1.10.4.2 Proceso de horneado**

El horneado implica la transmisión de calor y de masa simultáneamente. Se transmite calor al alimento desde las superficies calientes y el aire en el interior del horno y se transfiere agua desde el alimento al aire circundante, eliminándose del horno posteriormente. La radiación es absorbida por el alimento y convertida en calor por interacción con las moléculas de sus componentes. El aire y el vapor de agua presentes en el horno transmiten el calor por convección. En la superficie del alimento y las paredes del horno el calor se convierte en calor de conducción (Fellows, 2000).





El grado de pérdida de humedad del alimento está determinado por su naturaleza, por el movimiento del aire en el horno y por la velocidad de transmisión de calor. Por ejemplo cuando la velocidad de pérdida a la que el agua se elimina de la superficie supera a la velocidad con la que pasa ésta desde el interior, el frente de evaporación va migrando hacia el interior del alimento. La superficie de ésta se deseca y su temperatura acaba igualándose a la del aire del horno (110-240 °C). El horneado posee un objetivo secundario, que es la conservación del alimento por destrucción de su carga microbiana y por reducción de la actividad del agua en su superficie (Fellows, 2000).

#### **1.10.4.3 Proceso de deshidratación**

La deshidratación de alimentos es una de las operaciones unitarias más utilizadas en la conservación de los mismos. En los procesos de deshidratación el agua del alimento es eliminada, en mayor o menor grado, y se consigue con ello una mejor conservación microbiológica. El objetivo principal de la deshidratación consiste en prolongar la vida útil de los alimentos por reducción de su actividad de agua. En los alimentos deshidratados, la inhibición del crecimiento microbiano y de la actividad enzimática se produce por descenso de su actividad de agua, ya que el tratamiento térmico que reciben es insuficiente para lograr su inactivación. Por ello, una rehidratación durante el almacenamiento, por ejemplo debido a un envasado deficiente, puede dar lugar a un rápido deterioro (Fellows, 2000).

El contenido en agua de los productos deshidratados suele ser de entre 2.5 – 3 % máximo. Las bacterias, los hongos y las levaduras requieren en general  $a_w$  elevadas. Por lo tanto,  $a_w$  inferiores a 0.6 (alimentos deshidratados) originan productos muy estables. No obstante, estos productos tienen peligro de su alta higroscopicidad, y el almacenamiento en lugares húmedos puede favorecer el desarrollo de hongos y levaduras. Los alimentos deshidratados en general son muy susceptibles al ataque de





insectos. Por consiguiente, deben tomarse medidas higiénicas necesarias y utilizar embalajes protectores (Ibarz y Barbosa, 2005).

#### **1.10.5 Valor nutrimental de las botanas**

Los productos de maíz cocidos con cal son una fuente importante de energía, proteínas, fibra dietética y calcio para las personas que depende de estos productos como alimento principal. La cocción con cal incrementa significativamente la biodisponibilidad de niacina. Debido a la absorción del aceite durante el freído y el contenido de humedad del 2 %, la densidad calórica de las tostaditas de maíz y tortillas es significativamente mayor que las tortillas de mesa (Plascencia, 1998).

En la composición química nutrimental de botanas en 100 g (Cuadro 5), el contenido de humedad en totopos es ligeramente mayor (1.8 %) que en las botanas fritas (1.0 %), sin embargo en cuanto al contenido calórico entre productos fritos y los totopos varía poco, ya que los productos fritos tienen un contenido de 539 kcal, mientras que en totopos es de 501.0 kcal. En cuanto al contenido de proteínas, cenizas y fibra cruda no existe gran diferencia. Lo que hay que resaltar es el contenido de grasa ya que para los fritos tiene un contenido de 33.4 % mientras que para los totopos es de 26.2 %, ya que en el caso de los fritos se somete a un freído directo después del cortado/formado, mientras que para los totopos se lleva a cabo un horneado y posteriormente a un freído, por lo que la etapa adicional (horneado) hace disminuir el consumo de aceite en su elaboración y por consiguiente una disminución del contenido de grasa en la botana. En cuanto al contenido de vitaminas y minerales no existe gran diferencia de contenido en los productos fritos y totopos (Plascencia, 1998).



**Cuadro 5. Composición química nutrimental de botanas (100g)**

Nutriente (%)	Fritos	Totopos
Humedad	1.0	1.8
Proteína	6.6	7.0
Grasa	33.4	26.2
Fibra Cruda	1.1	1.3
Cenizas	2.2	2.2
Energía (kcal)	539	501

Fuente: Plascencia, 1998

### 1.10.6 Calidad Sanitaria

El concepto de calidad ha evolucionado en los últimos decenios y ha adquirido a los ojos de la sociedad un extraordinario protagonismo. En un contexto económico caracterizado por la saturación de los mercados de países desarrollados, la calidad es un elemento básico en la estrategia empresarial y un elemento determinante de la elección de los consumidores. Se pueden encontrar múltiples definiciones del término "calidad", dependiendo del ámbito de aplicación. Una definición hace referencia al conjunto de propiedades y características de un producto o servicio que le confiere una aptitud para satisfacer unas necesidades expresadas o implícitas (aptitud para el uso o consumo) o, expresado de otra manera, la calidad se basaría en la adecuación a unas especificaciones impuestas para un uso o consumo determinado (Prieto *et al.* 2008).

La calidad del producto sería un concepto variable basado en atributos y vendría determinada por el grado de adecuación para usos o consumos concretos. Según la Organización Internacional de Normalización (ISO) la calidad es la capacidad de un producto o servicio de satisfacer las necesidades declaradas o implícitas del consumidor a través de sus propiedades o características (Prieto *et al.* 2008). La calidad incluye todos los atributos que tienen influencia sobre el valor de un producto según el consumidor. Esto incluye atributos negativos tales como deterioro, contaminación con impurezas, decoloración, olores desagradables; y atributos





positivos como origen, color, aroma, textura y método de procesamiento del alimento (Cuevas, 2008).

Entre los diferentes tipos de calidad en alimentos se encuentran la calidad sanitaria. En nuestra sociedad, la calidad sanitaria constituye un elemento innegociable y de valor absoluto al considerarse que un alimento no debe causar enfermedad en el consumidor. Según el modelo de Kano<sup>5</sup>, se incluirá dentro de los aspectos básicos o inexcusables de la calidad y muchos expertos argumentan que es un componente más importante ya que la falta de calidad sanitaria puede provocar enfermedades graves e incluso la muerte del consumidor. La calidad sanitaria se evaluaría por la ausencia en el alimento de ciertos componentes bióticos (agentes patógenos como bacterias, parásitos, toxinas) y abióticos (residuos de medicamentos, plaguicidas, pesticidas) que significarían un riesgo para la salud (Prieto *et al.* 2008).

En general las enfermedades transmitidas por alimentos, la mayoría de las cuales son de origen microbiano, constituyen uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial. En México durante el periodo de 1980 a 1989 el Laboratorio Nacional de Salud Pública confirmó 58 brotes de toxiinfecciones alimentarias de origen microbiano y parasitario a nivel nacional, en el 2002 el Sistema de Información en Salud reportó a nivel nacional 3612 casos de intoxicaciones alimentarias de origen bacteriano, de los cuales 76 se presentaron en el estado de Sonora. Los microorganismos indicadores que generalmente se cuantifican para determinar la calidad sanitaria de los alimentos son mesofílicos aerobios, mohos, levaduras, coliformes totales, entre otros (Félix *et al.* 2005).

### 1.11 Bacterias

Las bacterias son unicelulares, casi todas con un tamaño cercano de 0.5 a 1.0 x 2.0 a 10µm y tienen tres formas morfológicas: coco, bacilos y coma. Pueden ser móviles o

---

<sup>5</sup> Ver modelo en glosario de términos





no. Con base en el comportamiento de la tinción de Gram, las células bacterianas se agrupan como gramnegativas o grampositivas. Son extraordinariamente variables en sus características, pueden adaptarse a diferentes rangos de condiciones y comúnmente persisten en poblaciones heterogéneas (White, 1999; Ray y Bhunia, 2008).

En la mayoría de los casos, los microorganismos utilizan nuestros alimentos como fuente de nutrientes para su propio crecimiento, hecho que, naturalmente, puede ocasionar su alteración. Cuando se trata de microorganismos patógenos, su asociación con nuestros alimentos es peligrosa desde el punto de vista de la salud pública. Algunos de nuestros alimentos no cuenta con las condiciones necesarias para la multiplicación de los microorganismos patógenos o, por lo menos, actuarán como vectores de los mismos. En este caso, intentamos evitar que penetren y se multipliquen en nuestros alimentos o los destruimos mediante algún tipo de tratamiento térmico (Frazier y Westhoff, 2000)

### **1.11.1 Bacterias patógenas**

Las bacterias que se pueden encontrar en los alimentos y que, en determinadas circunstancias, pueden provocar enfermedades se conocen como bacterias patógenas. Estas bacterias pueden multiplicarse o transferirse de unos alimentos a otros, o de unas partes a otras, debido a prácticas incorrectas de manipulación, como son: conservación de alimentos a temperatura ambiente durante tiempos prologados, cocinado insuficiente de los alimentos, conservación de alimentos en refrigeración durante mucho tiempo, descongelación a temperatura ambiente, insuficiente limpieza de utensilios y equipos, contaminación cruzada de un alimento fresco a uno cocinado (García, 2011).





### **1.11.1.1 Pruebas para la identificación de bacterias mesófilas propuesta en esta investigación**

#### **1.11.1.1.1 Tinción de Gram**

La tinción de Gram es la técnica utilizada para el examen microscópico de las bacterias. Casi todas las bacterias de importancia pueden detectarse con este método. La tinción de Gram fue creada por Hans Christian Gram a fines del siglo XIX y puede utilizarse para separar la mayoría de las especies de bacterias en dos grandes grupos, a saber, las que captan el colorante básico, cristal violeta, es decir las bacterias Gram positivas, y las que pierden ese colorante por lavado con el decolorante alcohol o acetona, es decir bacterias Gram negativas (Forbes *et al.* 2009).

#### **1.11.1.1.2 Prueba de peroxidasa**

La catalasa está presente en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromos. Los anaerobios estrictos carecen de catalasa; la mayoría de las bacterias anaerobias poseen peroxidasa en lugar de catalasa. La catalasa es una hemoproteína<sup>6</sup> (MacFaddin, 2003).

#### **1.11.1.1.3 Prueba de movilidad**

Esta prueba se utiliza para determinar si un organismo es móvil o inmóvil. Las bacterias son móviles por medio de flagelos. Los flagelos aparecen sobre todo entre los bacilos; sin embargo, unas pocas formas cocoides son móviles. Las bacterias móviles pueden contener un único flagelo o muchos flagelos y su ubicación varía según las especies bacterianas y las condiciones de cultivo (MacFaddin, 2003).

#### **1.11.1.1.4 Prueba de Oxidación-Fermentación (OF)**

La determinación de la reacción de oxidación-fermentación temprana en el laboratorio de diagnóstico ayuda en gran medida a la identificación de las bacterias

---

<sup>6</sup> Ver glosario de términos







aerobias y anaerobias facultativas. La fermentación es un proceso anaerobio y las bacterias que fermentan un hidrato de carbono por lo común son anaerobios facultativos. La oxidación de la glucosa es un proceso aerobio y las bacterias que oxidan los hidratos de carbono por lo común son aerobias obligadas (MacFaddin, 2003).

### **1.11.1.2 Especies de bacterias mesófilas identificadas en totopos de maíz nixtamalizado en esta investigación**

#### **1.11.1.2.1 *Clavibacter michiganensis***

Estas bacterias, actualmente consideradas como un grupo complejo llamado "bacterias coryneformes" son típicamente Gram positiva pero pueden decolorar fácilmente y exhibir una tinción irregular, son estrictamente aerobias, no forman ácidos rápidamente, tienen tamaño de 0.5 x 2.5  $\mu\text{m}$ , son bacilos ligeramente curvados que llegan a formar agregados en forma de "V"; generalmente no forman micelio, pero puede ocurrir que lo formen y no forman endosporas. Se encuentran en el ambiente, en las plantas y animales. Algunas especies producen descomposición de los alimentos. Aunque estas bacterias son difíciles de aislar, es un género relativamente fácil de identificar por la morfología de sus colonias que presentan pigmentación anaranjada en medios fortificados con vitaminas (White, 1999; Sosa *et al.* 1997; Ray y Bhunia, 2008).

#### **1.11.1.2.2 *Pantoea stewartii***

Son células de 0.5 a 1  $\mu\text{m}$ , Gram negativa, anaerobia facultativa, inmóvil. Es facultativa anaerobia, forma de bacilo de 0.4-0.8 x 0.9-2.2  $\mu\text{m}$ , no forma endosporas, crecimiento óptimo a 30°C. Las colonias en medio YDC son amarillas convexas. Las colonias pueden ser fluidas. Muchas son patógenas de vegetales y producen descomposición de frutas y productos vegetales (White, 1999; Ray y Bhunia, 2008; Rocha, 2009).





#### 1.11.1.2.3 *Xanthomona campestris*

Esta bacteria es Gram negativa, en forma de bacilo, tamaño de 0.5 x 2.0  $\mu\text{m}$ , pigmentos amarillos, donde xanthomonadin, es el productor, aerobia. Las colonias son amarillas intensas y viscosas en medio YDC, el maíz es el único hospedero conocido y temperatura óptima de crecimiento es de 28 °C (White, 1999).

#### 1.11.1.2.4 *Pseudomonas avenae*

Bacteria Gram negativa, rectos o curvos 0.6 x 1.6  $\mu\text{m}$ . Las colonias en medio YDC son color crema con centro café claro, son convexas, y lisas, aerobia, temperatura óptima de crecimiento es de 30-35 °C, no produce pigmentos fluorescentes en medio B de King y puede formar un precipitado blanco en medio de cultivo (White, 1999).

#### 1.11.1.2.5 *Pseudomonas syringae*

Es una bacteria en forma de bacilo corto con los extremos redondeados, tamaño de 0.6 – 1.2 x 1.5 – 3.0 (promedio 0.73 – 2.13  $\mu\text{m}$ ). Es Gram negativa y aerobia, produce pigmentos fluorescentes en medio B de King. Las colonias son redondas, lisas, polvosa, blanco grisáceo por la luz reflejada y verde fluorescente por la luz transmitida (White, 1999).

### 1.11.2 Bacterias coliformes

Los microorganismos indicadores pueden emplearse para estimar la calidad microbiológica de los alimentos en relación con la vida útil o su seguridad respecto a los patógenos transmitidos por los alimentos. En general, los indicadores más fiables de la calidad de un producto tienden a ser específicos de ese producto (Jay *et al.* 2005).





Desde el punto de vista aplicado, las coliformes son bacilos Gram negativos que fermentan la glucosa en 48 horas y producen colonias oscuras con un brillo metálico en agar. Se multiplican a temperaturas tan bajas como de  $-2^{\circ}\text{C}$  y tan altas como de  $50^{\circ}\text{C}$ . En alimentos, su crecimiento a  $5^{\circ}\text{C}$  es muy lento. Las coliformes pueden multiplicarse en presencia de sales biliares que inhiben el crecimiento de las bacterias Gram positivas. A diferencia de otras bacterias, tienen la capacidad de fermentar la lactosa con producción de gas; esta característica solamente es suficiente para hacer una determinación presuntiva (Jay *et al.* 2005).

### 1.12 Hongos

Los hongos son organismos a los que se les ha reconocido como un grupo independiente del Reino Vegetal, para lo cual se ha constituido el Reino Fungi. Estos organismos son eucariotes, lo cual significa que tienen núcleos bien definidos por membranas y que contienen un determinado número de cromosomas, lo cual diferencia de las bacterias. Los hongos son heterótrofos, por lo tanto dependen de la obtención de compuestos orgánicos a través de sus actividades como saprobios, simbiosis o parásitos.

La mayoría de los hongos están constituidos por estructuras tubulares llamadas hifas, las cuales en algunas especies se mantienen simples, formando lo que se conoce como micelio, y en otras se agregan para formar estructuras con cierto grado de complejidad, como lo son las llamadas setas u hongos superiores. La reproducción de los hongos se lleva a cabo principalmente por medio de propángulos<sup>7</sup> de origen asexual y sexual, a los cuales, en términos generales se les conoce con el nombre de esporas. Sin embargo, hay hongos que no producen esporas, por lo que su reproducción se realiza a través de estructuras somáticas, como lo son el propio micelio o estructuras derivadas del mismo (Cruz, 2008).

---

<sup>7</sup> Ver glosario de términos





Los hongos son importantes en los alimentos porque pueden crecer incluso en condiciones en que muchas bacterias no pueden hacerlo, por ejemplo baja actividad de agua. Hay muchos tipos de hongos en los alimentos, los cuales son microorganismos importantes para la descomposición. Muchas cepas también producen micotoxinas y se han relacionado con la intoxicación originada en alimentos (Ray y Bhunia, 2008).

### 1.12.1 Clasificación ecológica

Los hongos que invaden los granos y semillas fueron clasificados ecológicamente por Christensen y Kaufmann (1965) en los siguientes grupos: hongos de campo, hongos de almacén hongos de deterioro avanzado.

### 1.12.2 Hongos de campo

Los hongos de campo requieren humedades relativas de 90 a 100% para su desarrollo. Algunos de estos hongos ponen en peligro la salud de los animales domésticos y la del hombre, ya que ciertas especies producen sustancias tóxicas, que por su origen se les ha denominado micotoxinas y micotoxicosis a las intoxicaciones que causan cuando los animales las ingieren. Entre estos hongos se encuentran algunos géneros de *Fusarium*, hongo que desafortunadamente es muy común en los cultivos agrícolas, en particular en los cereales; siendo este género uno de los tres más importantes productores de micotoxinas (Moreno, 1988).

### 1.12.3 Hongos de almacén

Los hongos de almacén requieren humedades relativas de 65 a 90%, condiciones muy frecuentes en el almacenamiento de granos. Los daños que causan estos hongos a los granos dependen en gran medida de la severidad del ataque y del hongo que se trate. Los hongos de almacén, especies de *Aspergillus* y *Penicillium* sp, causan diversos daños a los granos y semillas almacenadas, siendo los más sobresalientes la





reducción del poder germinativo de las semillas, el ennegrecimiento de los granos y la producción de micotoxinas (Moreno, 1988).

### 1.12.3.1 Condiciones que favorecen el crecimiento de hongos de almacén

#### Humedad

El factor más importante en la conservación de los granos y semillas es la humedad, tanto la del ambiente (humedad relativa), como el agua contenida en los granos, ya que la disponibilidad de agua es determinante en el desarrollo de insectos y hongos de almacén. En humedades relativas de 55 – 70 % la actividad de los hongos de almacén es nula o prácticamente nula, y los hongos que pueden crecer a esas bajas humedades lo hacen muy lentamente y sus efectos también son lentos y muy poco perceptibles (Cruz, 2008). Sin embargo, existen algunas especies xerofitas como *A. halophilicus*, *A. restrictus* y *A. glaucus* que prefieren desarrollarse a partir de esta humedad relativa (Cuadro 6).

**Cuadro 6. Mínima actividad de agua ( $a_w$ ) requerida para el desarrollo de hongos de almacén**

Especie	Mínima $a_w$ requerida
<i>A. halophilicus</i>	0.65 – 0.70
<i>A. restrictus</i>	0.70 – 0.75
<i>A. glaucus</i>	0.70 – 0.75
<i>A. candidus</i>	0.75 – 0.80
<i>A. versicolor</i>	0.80 – 0.85
<i>A. ochraceus</i>	0.80 – 0.85
<i>A. flavus</i>	0.80 – 0.85

Fuente: Moreno, 1988

#### Temperatura

La temperatura es el segundo factor en importancia para el crecimiento de estos hongos, los que pueden crecer desde temperaturas muy bajas hasta temperaturas que llevan al calentamiento de los granos y en ocasiones hasta su combustión. A temperaturas bajas el crecimiento es lento, incrementándose a medida que a temperatura es mayor (Moreno, 1988).





### Periodo de almacenamiento

El factor tiempo, también es importante en el deterioro de los granos y semillas por la acción de los hongos. A periodos largos de almacenamiento corresponde un mayor riesgo de daño, lo cual es directamente proporcional al contenido de humedad y a la temperatura. Para determinar el periodo de almacenamiento se requiere conocer con precisión la humedad del grano y del ambiente, así como la temperatura y condición del grano o semilla (Moreno, 1988).

#### 1.12.4 Hongos de deterioro avanzado

Estos hongos crecen en productos almacenados en altas humedades relativas superiores al 90%. Su característica biológica principal, es la de ser excesivamente degradadores de materia orgánica. Este tipo de hongos puede invadir a los granos y a otros productos que han estado bajo pésimas condiciones de almacenamiento, condiciones que en ocasiones se inician en el campo; por ejemplo, cuando se dejan mazorcas de maíz en las plantas en el campo o en las bodegas bajo condiciones de alta humedad, como en el caso del almacenamiento de grano forrajero a la intemperie (Moreno, 1988).

Las toxinas que producen algunas especies de estos hongos son de mucha importancia debido a su alto potencial para ocasionar enfermedades en humanos y animales domésticos (Serna, 1996).

### 1.13 Aflatoxinas

La NOM-247-SSA1-2008 define como aflatoxinas a los metabolitos secundarios producidos por hongos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus nomius*, que tienen efectos tóxicos y cancerígenos en animales, incluido el hombre.

En 1960, murieron 100,000 pavos en Inglaterra de una causa misteriosa. La mortandad fue asociada con diferentes lotes de alimentos, y todos ellos tenían un ingrediente en





común, harina de cacahuete de una sola fuente de procedencia. La investigación intensiva que se realizó en torno a este problema permitió concluir que la causa de la muerte de las aves era una sustancia producto del hongo *Aspergillus flavus*, por lo que se les llamó aflatoxinas, encontrándose que era una serie de compuestos tóxicos químicamente relacionados, los cuales varían en su grado de toxicidad. Las aflatoxinas alteran la calidad sanitaria de los granos destinados al consumo humano, originando un riesgo para la salud pública (Moreno, 1988).

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios producidos por los hongos *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius*, que afectan prácticamente a todos los seres vivos. Estos contaminantes de los alimentos actúan en concentraciones de partes por billón (microgramos por kilogramo). Son fluorescentes al exponerlas a la luz ultravioleta de onda larga y resisten altas temperaturas, en un rango entre 260 y 320 °C, por lo tanto no se eliminan por completo con la cocción, fritura ni con la pasteurización de los alimentos (Cruz, 2008).

Los granos dañados y quebrados son más propensos a tener aflatoxinas y residuos de insectos, y son más fáciles de cocinarse por lo que su inclusión puede ocasionar problemas sanitarios y falta de consistencia en la calidad de la harina procesada (Serna, 1996).

### 1.13.1 Efectos tóxicos de las aflatoxinas

La contaminación por aflatoxinas en maíz es un problema internacionalmente importante, especialmente bajo condiciones tropicales y subtropicales donde la invasión por *Aspergillus* y la síntesis de aflatoxinas se ven favorecidas. Las condiciones del medio ambiente como la humedad y la temperatura aunado a las prácticas agronómicas, por ejemplo la fertilización nitrogenada, han sido reportadas como favorables a la síntesis de aflatoxinas en campo (Cruz, 2008).





El efecto tóxico de las aflatoxinas sobre los animales es muy variable, dependiendo de varios factores dentro de los cuales están: edad, sexo, especie, estado nutricional, dosis ingerida, frecuencia de ingestión y composición de la dieta. Los individuos pueden presentar síntomas que van desde la irritación de las mucosas intestinales hasta intoxicaciones severas que traen consigo hemorragias internas, vómitos, diarreas o daños crónicos como la cirrosis, el cáncer en hígado (Cruz, 2008).

El órgano más afectado por estas toxinas, es el hígado, alterando también la absorción y metabolismo de las vitaminas, los lípidos y los minerales. Uno de los factores que colocan a las aflatoxinas como sustancias altamente peligrosas, es el hecho de que son acumulativas, y que pasan del tracto digestivo a la carne, a la leche y a los huevos de los animales que consumen alimentos contaminados con estas sustancias, con el consiguiente riesgo para los consumidores de estos productos (Cruz, 2008).

Actualmente se permite para humanos la ingestión de alimentos, como el maíz, contaminados con 20 ppb de aflatoxina B, dosis baja para causar síntomas agudos; sin embargo, no se le pone atención al efecto a largo plazo de la infección acumulativa de pequeñas dosis de aflatoxina, que bien pueden ser la causa de cáncer, sin que las aflatoxinas se detecten en cantidades significativas, es decir por debajo de los límites permitidos, en los alimentos que se ingirieron al momento de los síntomas severos y la muerte (Cruz, 2008).

### **1.13.2 Condiciones para la prevención del desarrollo y producción de aflatoxinas**

Existen condiciones para prevenir el desarrollo y producción de aflatoxinas. Durante el almacenamiento, para mantener los granos sanos y libres de microorganismo, si se cuenta con una aireación la humedad debe de estar en un rango de 11 – 14 %,







mientras que si realiza un secado artificial cuando se tienen humedades mayores al 16 % la temperatura deberá de ser de 25 °C o menos y en general tener buenas prácticas como son aireación, ventilación o constante movimiento del grano (Dixon y Hamilton, (1981) y Lindon y Lorient, (1996).

Para la inhibición del crecimiento de hongos por algunos compuestos químicos se utilizan diferentes tipos de agentes antifúngico, tales como es ácido propiónico utilizado contra *A. flavus*; el ácido sórbico que inhibe el crecimiento y producción de aflatoxinas de *A. flavus* Link y *A. flavus speare* (Hernández, 2006).

A pesar de algunas condiciones que se tienen en cuenta para el desarrollo de aflatoxinas, se cuenta con especificaciones establecidas por la NOM-187-SSA/SCFI-2002 y la NOM-247-SSA1-2008 que establecen los límites máximos permitidos para productos elaborados a partir de maíz, y que en este caso de las harinas de maíz nixtamalizado indicando que es 12 µg/k (Cuadro 7 y cuadro 8)

**Cuadro 7. Especificaciones de aflatoxinas de acuerdo con la NOM-187-SSA/SCFI-2002**

Producto	Límite máximo (µg/kg)
Masa, tortillas de maíz nixtamalizado, tostadas de maíz nixtamalizado harinas de maíz nixtamalizado para preparar tortillas y tostadas	12

**Cuadro 8. Especificaciones de aflatoxinas de acuerdo con la NOM-247-SSA1-2008**

Determinación	Límite máximo (µg / kg)
Aflatoxinas para harina de maíz nixtamalizado	12





## 2 JUSTIFICACIÓN

El mundo ha experimentado modificaciones drásticas en los patrones de procesamiento de alimentos. En el pasado, éste se realizaba de forma predominante en el hogar y dependía de tecnología relativamente simple, con algún grado de procesamiento artesanal en el ámbito colectivo local. En la actualidad, varios de los alimentos consumidos por la población se procesan de manera industrial mediante tecnología compleja en centros que concentran volúmenes elevados de producción (González *et al.* 2007).

El maíz constituye la base de la alimentación de la población mexicana, que lo consume principalmente en forma de tortilla. En la actualidad la demanda de productos que cumplan con los requerimientos del consumidor, como son mejor sabor, fáciles de elaborar, nutritivos, saludables, entre otros, ha llevado a la industria a elaborar productos de calidad que cumplan con la demanda del consumidor. En la actualidad se elaboran gran variedad de productos a base de maíz, como son los totopos de maíz nixtamalizado, que son elaborados en grandes cantidades mediante diferentes procesos de manufactura con diferentes características organolépticas que satisfacen al consumidor. Es por ello que la demanda de este tipo de productos es cada vez mayor y por ello es importante realizar un análisis de la calidad que estos productos están presentando al ser cada día más consumidos por todas las edades, tanto en niños como en adultos.

Lo anterior ha motivado a la industria de alimentos a buscar alternativas de producción de botanas para obtener productos alimenticios con una menor cantidad de grasa, pero conservando las características propias de los alimentos fritos, lo que ha motivado al diseño de nuevos procesos y a la combinación de los ya existen, con el objetivo de obtener alimentos fritos con un bajo contenido de grasa y buena calidad sanitaria (Sosa y Vélez, 2009). Se sabe que las botanas son productos que consume el 40 % de los niños mexicanos, según el Instituto Nacional de Salud Pública (Instituto





Nacional de Salud Pública-INSP, 2012). Es por ello que también se realiza un análisis a los totopos horneados y a los totopos deshidratados que igual forma que los totopos fritos, son cada vez más consumidas.

Es por ello que debido a la gran demanda de consumo de botanas que son elaboradas por diferentes procesos, desde los fritos, hasta los deshidratados, que conservan características organolépticas de los totopos fritos pero que contienen menor cantidad de grasa y que son cada vez más consumidos por los diferentes sectores de la sociedad, es importante monitorear la calidad que tienen éste tipo de productos, por lo que se decidió realizar el estudio con un análisis microbiológico a cinco marcas comerciales y una marca a granel, que fueron elaboradas por tres procesos de manufactura, para determinar con ello cual era la botana que cumplía con la mejor calidad sanitaria y con ello conocer las botanas que sean inocuas y que cumplan con los estándares demandados por consumidor.





### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo General

Analizar la presencia de bacterias mesófilas, hongos y aflatoxinas en totopos de maíz nixtamalizado en tres procesos de elaboración (frito, horneado y deshidratado) y de seis marcas comerciales mediante una evaluación microbiológica para determinar su calidad sanitaria

#### 3.2 Objetivos Particulares

##### 3.2.1 Objetivo Particular 1

Determinación de la presencia de bacterias mesófilas y coliformes en tres procesos de manufactura y de seis marcas comerciales de totopos de maíz nixtamalizado mediante una evaluación microbiológica para determinar su calidad sanitaria.

##### 3.2.2 Objetivo Particular 2

Determinación de la microbiota presente en tres procesos de manufactura y de seis marcas comerciales de totopos de maíz nixtamalizado mediante una evaluación microbiológica para determinar su calidad sanitaria.

##### 3.2.3 Objetivo Particular 3

Determinación y cuantificación de aflatoxinas totales presentes en seis marcas de totopos de maíz nixtamalizado mediante el método de inmunoafinidad por columnas monoclonadas de Afla Test-P® (AOAC 991.3) para determinar la calidad sanitaria.

#### 3.3 Hipótesis

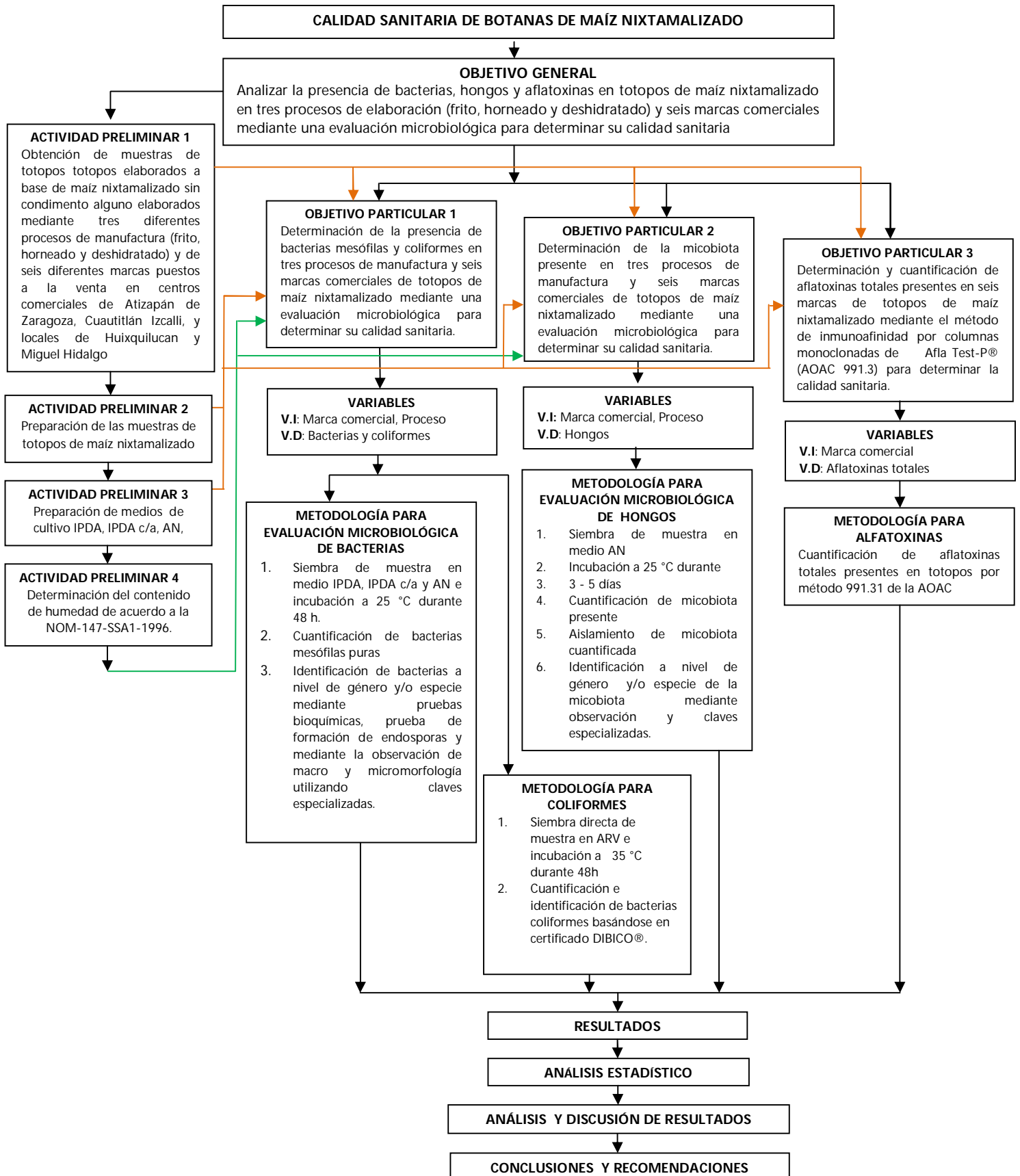
Debido a que los totopos fritos cuentan con una combinación de procesos de manufactura en comparación con los totopos horneados y/o deshidratados, por lo tanto la calidad sanitaria en totopos fritos es mejor que en los totopos horneados y deshidratados.





## 4 METODOLOGÍA

### 4.1 Cuadro Metodológico





## 4.2 Desarrollo Experimental

En el cuadro metodológico (4.1) se presenta la metodología seguida para este trabajo

### 4.2.1 Actividades preliminares

#### Muestreo y preparación de las muestras de totopos de maíz nixtamalizado

Los totopos elaborados a base de maíz nixtamalizado sin condimento alguno mediante tres diferentes procesos de manufactura (frito, horneado y deshidratado) y de seis diferentes marcas fueron obtenidos en centros comerciales de Atizapán de Zaragoza, Cuautitlán Izcalli, Huixquilucan y Miguel Hidalgo. Las pruebas de calidad sanitaria se realizaron dentro de la fecha de vigencia de los productos (Cuadro 9)

**Cuadro 9. Procedencia de muestras de totopos de maíz nixtamalizado**

Lugar	Marca	Proceso
Cuautitlán Izcalli	M1	Frito
Atizapán de Zaragoza	M2	Frito
Atizapán de Zaragoza	M3	Frito
Miguel Hidalgo	M4	Horneado
Cuautitlán Izcalli	M5	Horneado
Huixquilucan	M6	Deshidratado

La preparación de la muestra se realizó en un área del laboratorio en condiciones de asepsia. Posteriormente con una pinza previamente esterilizada por flameo se tomaron dos totopos de todo el envase de la primer marca comercial y se pesaron 7 g en una balanza marca Sartorius® (Figura 8a, 8b) y se depositaron en bolsas de plástico en condiciones estériles y previamente etiquetadas (Figura 8c y 8d). Finalmente la muestra dentro de la bolsa fue triturada en tamaños de aprox. 5 x 5 mm. Se realizaron tres repeticiones para cada marca. De cada repetición se tomaron 2.5 g de muestra para la siembra en cajas con tres diferentes medios de cultivo.





Figura 8. Preparación de las muestras

### Preparación de los medios de cultivo

La metodología para la preparación de los medios de cultivo se describe en el Anexo A.

### Medio infusión de papa-dextrosa-agar [IPDA]

Este medio se utilizó para el aislamiento e identificación de hongos. En este medio se sembró la muestra de totopos y se dejó incubar a 25 °C durante 72 horas. Posteriormente se purificó la colonia, se dejó incubar nuevamente a 25 °C durante 72 horas y mediante la observación de las características morfológicas de la colonia y claves especializadas se realizó la identificación del tipo de hongo que se trataba (Moreno, 1988).

### Medio infusión de papa-dextrosa-agar con antibiótico [IPDA c/a]

Este medio se utilizó para el aislamiento e identificación de hongos. En la preparación de este medio se le agregó antibiótico Clindamicina<sup>8</sup> en una concentración de 100 ppm después de la esterilización, para inhibir el crecimiento de bacterias y permitir un mejor desarrollo de hongos y con ello tener una mejor observación de la colonia desarrollada. En el medio se sembró la muestra y se dejó incubar, posteriormente se purificaron las colonias y nuevamente se dejaron incubar a 25 °C durante 72 horas y

<sup>8</sup> Ver glosario de términos





con base a las características morfológicas de las colonias y claves especializadas se pudo identificar la especie de hongo (Moreno, 1988).

### **Medio agar nutritivo [AN]**

Este medio se utilizó para el aislamiento e identificación de bacterias mesófilas, como son los géneros *Xanthomonas*, *Clavibacter* y *Erwinia*. Para el aislamiento se sembró la muestra de totopo y se dejó incubar para que se desarrollaran las colonias de bacterias mesófilas. Para el aislamiento, se sembraron las colonia axénicas y mediante la observación de sus características morfológicas, pruebas bioquímicas y basándose en claves especializadas se identificó el tipo de especie de bacterias mesófila que se trataba (Echandi, 1967).

### **Medio B de King**

Este medio se utilizó para la identificación bacterias correspondientes al género *Pseudomonas* sp. La muestra de colonia aislada fue sembrada en este medio, pasado el tiempo de incubación se llevó a cabo la identificación de especie que se trataba en base a la producción de fluoresceína<sup>9</sup> que se observó al ser expuesta en luz ultravioleta (Pascual, 2000).

### **Medio levadura-dextrosa-carbonato (yeast-dextrose-calcium-YDC)**

Este medio fue utilizado para la identificación de bacterias *Pseudomona avenae*. Se sembró la muestra de la colonia axénica y se dejó incubar. Posteriormente se realizó su identificación de acuerdo a sus características morfológicas utilizando claves especializadas (Sosa *et al.* 1996).

### **Agar de bilis y rojo violeta [ARV]**

Este medio fue utilizado para la determinación e identificación de bacterias coliformes. En este medio se colocó la muestra de totopo, se dejó incubar,

---

<sup>9</sup> Ver definición de fluoresceína en glosario de términos







transcurrido el tiempo de incubación se purificó la bacteria y se sembró de nuevo en este medio la colonia axénica para su posterior identificación basándose en las características morfológicas de la colonia y con ayuda del certificado de análisis del laboratorio DIBICO® se identificó que especie de coliforme se trataba (Corry, 2003).

### **Determinación del contenido de humedad**

La determinación del porcentaje de humedad en las muestras de totopos se realizó con base en la NOM-147-SSA1-1996. Se realizó por triplicado para cada una de las muestras. La muestra previamente se secó durante una hora a  $130\pm 3$  °C y fue enfriada en desecador durante una hora. Posteriormente en un área limpia, en cajas de aluminio, de 5.5 cm de diámetro por 1.5 cm de altura con tapa ajustada (Figura 9a) para evitar la pérdida o ganancia de humedad (previamente puestas a peso constante), se pesaron 2 g de muestra en una balanza con marca Sartorius® (Figura 9d). Una vez realizado el pesado, inmediatamente se colocaron dentro del desecador (Figura 10b y Figura 10c) para evitar la ganancia o pérdida de humedad y así se trasladaron nuevamente al interior estufa Red-Line® (Figura 9b), y se dejaron secar durante una hora a una temperatura de  $130\pm 3$  °C por un periodo de una hora. El tiempo empezó a contar a partir de que la temperatura en la estufa con la muestra alcanzó los  $130\pm 3$  °C. La caja dentro de la estufa se dejó semitapada (Figura 9b). Después de una hora, con ayuda de unas pinzas de níquel, se tapó la caja dentro de la estufa y se colocaron rápidamente en un desecador durante una hora para que se enfriaran. Una vez que se enfriaron se tomaron las cajas con las pinzas de níquel y se pesaron; se reportó la pérdida de peso como humedad, y el residuo de muestra como sólidos totales. El contenido de humedad se calculó mediante la siguiente ecuación:





Figura 9. Determinación de contenido de humedad



Figura 10. Estufa para secado de muestra

#### 4.2.2 Análisis microbiológico de bacterias mesófilas presentes en totopos de maíz nixtamalizado propuesta en esta metodología

##### 4.2.2.1 Siembra de la muestra para bacterias

Se utilizó la técnica de siembra en placa agar utilizando tres medios de cultivo: IPDA, IPDA c/a y AN. La siembra de muestras de totopos para bacterias se realizó en una campana de flujo laminar marca VECO®, bajo condiciones de asepsia. Posteriormente se colocaron las cajas de Petri con los medios de cultivo IPDA, IPA c/a y AN (Figura 11a), se esterilizó una pinza de níquel por flameo (Figura 11b, c) y de los 8g de muestra previamente triturados, se tomaron 2.5 g de muestra de totopos (14 pedazos), y fueron colocado en cada caja de Petri con los tres medios de cultivo IPDA, IPA c/a y AN como se muestra en la Figura 12, y se realizó por triplicado para





cada medio de cultivo. Las cajas con la muestra se colocaron en recipientes de plástico con tapa y se incubaron durante 48 horas a 25 °C (Figura 11d).

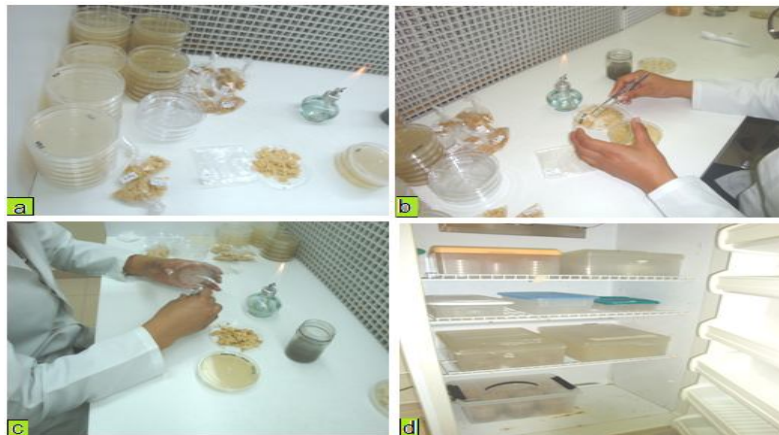


Figura 11. Siembra, aislamiento e incubación de muestras de totopos en medio IPDA, IPDA c/a y AN

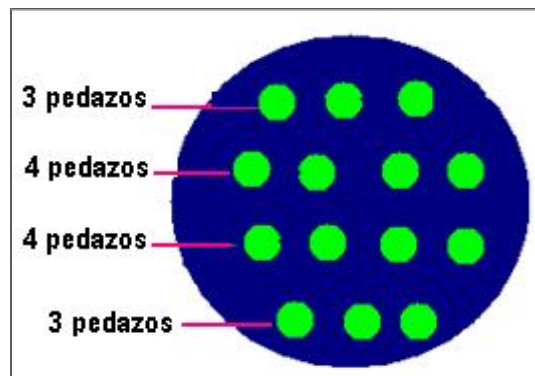


Figura 12. Acomodo de trozos de las muestras de totopos en caja de Petri con medio de cultivo

#### 4.2.2.2 Cuantificación de bacterias

La cuantificación de bacterias de las muestras sembradas, se llevó a cabo en las cajas con los diferentes medios de cultivo IPDA, IPDA c/a y AN, después de 48 horas de incubación. La identificación se realizó mediante la observación de las características morfológicas de la colonia desarrollada. Se le asignó una letra a aquellas colonias que presentaron diferente macromorfología basándose en las claves de Ramírez (2001) al





mismo tiempo que se iban separando las colonias que presentaban el mismo aspecto físico y así poder cuantificarlas.

#### 4.2.2.3 Identificación de bacterias mesófilas

Después del conteo de las diferentes colonias, se procedió a la purificación de todos los tipos morfológicos distintos de colonias que se desarrollaron en las diferentes cajas con los medios IPDA, IPDA c/a y AN. La purificación se llevó a cabo mediante la resiembra directa, con un asa bacteriológica de níquel, esterilizada por flameo, se tomó una pequeña porción de la colonia de cada uno de los tipos morfológicos y se sembraron por estría en placas con media AN (Figura 13a, b), y se incubaron a 25 °C durante 48 horas. Transcurrido las 48 horas de incubación, en un área estéril se procedió a la identificación de cada cepa aislada, mediante pruebas bioquímicas como fueron tinción de Gram, prueba de catalasa, prueba de fermentación/oxidación-OF y prueba de movilidad, a nivel de género y posteriormente siguiendo la metodología propuesta en el Anexo B resembrando la muestra de colonia axénica en medios selectivos, mediante la observación de la macromorfología y utilizando claves especializadas de Gilchrist *et al.* (1995) Ramírez, (2001); Warham *et al.* (1996) y White, (1999) para la identificación a nivel de especie.

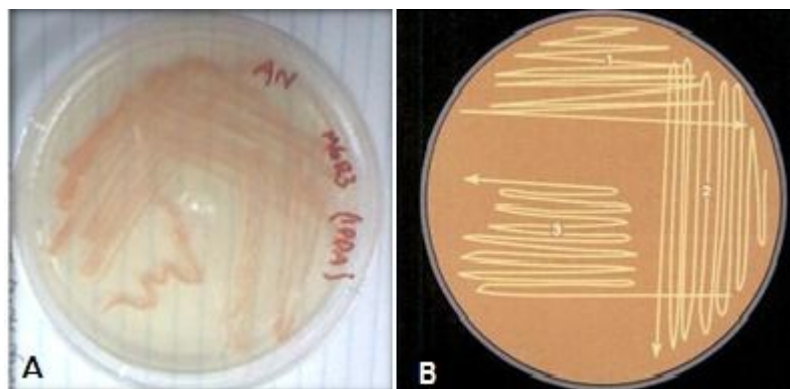


Figura 13. (a) Purificación de bacterias, (b) Forma estriada de siembra de colonia  
Fuente: Tortola *et al.* 2007





#### 4.2.2.3.1 Tinción de Gram

En un área estéril y con ayuda de una asa bacteriológica previamente esterilizada por flameo, se toma una pequeña porción de la colonia a identificar y se coloca en un portaobjetos que contiene una gota de agua destilada. Se realiza un frotis y se fija la colonia con calor y se deja enfriar. Posteriormente se cubre el portaobjetos con cristal violeta y se deja actuar durante 10 a 30 segundos. Enjuagar a corriente con agua destilada. Cubrir el portaobjetos con yodo de Gram y deja actuar de 20 a 60 segundos. Enjuagar a corriente con agua destilada. Después cubrir el portaobjetos con alcohol durante 10 segundos y enjuagar de inmediato con a corriente con agua destilada. Repetir este procedimiento hasta que no salga más colorante azul del portaobjetos con el alcohol. Después, enjuagar nuevamente a corriente con agua destilada y eliminar el exceso. Finalmente cubrir el portaobjetos con safranina y dejarlo actuar durante 30 segundos. Enjuagar a corriente con agua destilada y secar el portaobjetos con al aire (Figura 14). Examinar con el microscopio con el objetivo de inmersión a 100x (Forbes *et al.* 2009).

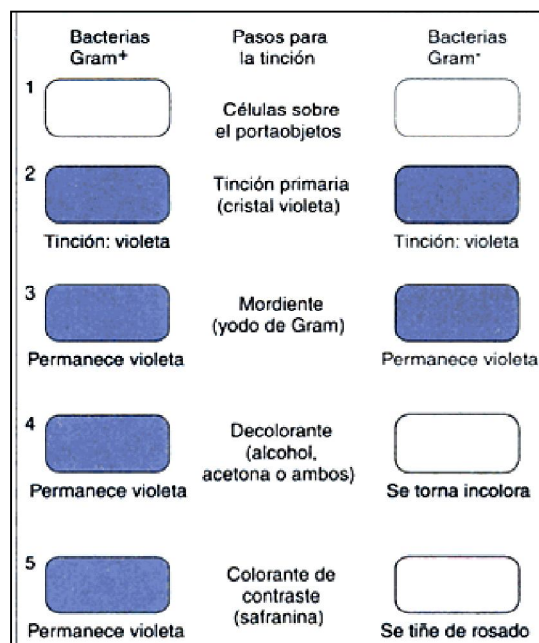


Figura 14. Procedimiento para tinción de Gram  
Fuente: Forbes *et al.* 2009





#### 4.2.2.3.2 Prueba de la peroxidasa

En un área estéril, y con ayuda de una aguja de inoculación previamente esterilizada por flameo, recoger el centro de una colonia pura de un cultivo y colocar sobre un portaobjeto que contiene una gota de agua destilada. Colocar una gota de peróxido al 30% en los microorganismos colocados en el portaobjeto con un gotero. Observa la producción inmediata de burbujeo (liberación de gas) y registrar el resultado (MacFaddin, 20003).

#### 4.2.2.3.1 Prueba de motilidad

Para esta prueba se emplea el medio para la prueba de motilidad y su preparación se describe en el ANEXO A. Después de preparar el medio, se vertieron 10 ml de medio en tubos de ensaye y se dejarón que solidificaran en posición vertical. Se procedió a la inoculación, se tomó una pequeña porción de cultivo puro con una aguja de inoculación, previamente esterilizada por flameo, se punza el centro del medio a una profundidad de 1.25 cm y se deja incubar a 35°C durante 48 horas (MacFaddin, 2003).

#### 4.2.2.3.2 Producción de endosporas

Para esta prueba se preparó medio la prueba para determinar si forman o no endosporas y su preparación se describe en el ANEXO A, empleado para la identificación de bacterias mesófilas a nivel de género. Después de preparar el medio, se vertieron 10 ml de medio en tubos de ensaye y se dejarón que solidificara en posición vertical, se procedió a la inoculación. Para la inoculación, en un área estéril y con ayuda de un asa bacteriológica se toma una pequeña porción de la colonia y se coloca sobre un porta objetos. Se coloca una gota de agua sobre la colonia que se colocó en el portaobjetos y se hace un frotis. Posteriormente se fija la colonia al portaobjetos mediante secado a la flama o al aire. Después se sumerge el portaobjetos en una solución de verde de malaquita al 5.0 % durante 10 min. Transcurridos los 10 minutos, se lava a corriente con agua destilada. Posteriormente





se lava con una solución de safranina al 0.5 % durante 15 segundos. Finalmente se vuelve a enjuagar con agua destilada y se deja secar. Se observa en el microscopio con un objetivo de 40x. Si se observan células color rojo es que no forman esporas; sin embargo, si se observan colonias color verde son bacterias formadoras de endosporas (Schaad *et al.* 2001).

#### 4.2.2.3.3 Prueba de oxidación-fermentación- OF

Para esta prueba se emplea el medio basa OF de Hugh y Leifson y su preparación se describe en el ANEXO A. De esta preparación se agregan 5 ml en un tubo de ensayo y se esterilizan a 121°C durante 20 min. Se dejarón que solidificara en posición vertical, se procedió a la inoculación. En un área estéril se tomo una pequeña porción de la bacteria a identificar con una aguja de inoculación, previamente esterilizada por flameo, y se siembra por punción en los alrededores del tubo desde el fondo del tubo. Recubrir los tubos con alrededor de 1-2 ml de parafina<sup>10</sup> líquida estéril para excluir todo el oxígeno y se dejan encubar a 35°C durante 48 horas (Schaad, *et al.* 2001 y MacFaddin, 2003).

Transcurrido las 48 horas de incubación, para determinar el tipo de microorganismo se trata, si es oxidativo o fermentativo, se pueden utilizar los patrones de reacción que se presentan en el Cuadro 10 (Schaad *et al.* 2001 y MacFaddin, 2003).

**Cuadro 10. Patrones de reacción para la prueba OF**

Reacción	Tubo con reacción	Tubo abierto	Tubo sellado
Oxidación	Abierto	Amarillo (ácido)	Verde (alcalino)
Fermentación	Cubierto	Amarillo (ácido)	Amarillo(ácido)
Ni fermentación ni oxidación	Ninguno	Azul o verde (alcalino)	Púrpura(alcalino)
Fermentación y oxidación	Ambos	Amarillo	Amarillo

Fuente: MacFaddin, 2003

<sup>10</sup> Ver anexo A para preparación de parafina





#### 4.2.2.3.4 Prueba de fluorescencia (Medio B de King)

Para esta prueba se preparó el medio B de King y su preparación se presenta en el Anexo A. Posteriormente en la campana de flujo laminar marca VECO® se desinfectó superficialmente y en condiciones de asepsia y con ayuda de una asa de níquel bacteriológica, previamente esterilizada por flameo y fría entre cada toma de muestra, se tomó una pequeña muestra de la colonia aislada a identificar y se resembró en el medio B de King, se realizó la resiembra para todas las colonias de bacterias diferentes cuantificadas. Se dejaron incubar a 25 °C durante 48 horas (Gilchrist *et al.* 1995). Transcurrido las 48 horas de incubación las muestras fueron observadas en una cámara con luz ultravioleta (Figura 15) para determinar cuál de ellas era fluorescente, y con ello confirmar que se trataba de bacterias del género *Pseudomonas* (Schaad *et al.* 2001).



Figura 15. Lámpara de luz UV

#### 4.2.2.3.5 Medio levadura-dextrosa-calcio-YDC

Para la identificación de bacterias, se sembraron las cepas puras de cada colonia purificada en placa con medio YDC, tomando una muestra con un asa bacteriológica de níquel previamente flameada y enfriada entre toma y toma de colonia. Las colonias se dejaron incubar durante 48 horas a 25 °C (Sosa *et al.* 1996). Transcurridas 48 horas de incubación se observaron las características morfológicas de la colonia que se desarrolló y con ayuda de claves especializadas de Wharham *et al.* (1996) y White, (1999) se determinó el género de bacteria que se trataba (Schaad *et al.* 2001).







#### **4.2.2.4 Análisis microbiológico de la presencia de coliformes utilizando la metodología propuesta en esta investigación**

Para la identificación de coliformes se utilizó la siembra en placa con medio ARV. Para la preparación de este medio ver el Anexo A. En la campana de flujo laminar marca VECO® en condiciones de asepsia, se esterilizó una pinza de níquel por flameo, con la que se tomaron 14 pedazos de totopos (aproximadamente 1g), que fueron colocados sobre la placa con el medio ARV como se muestra en la Figura 12 (los pedazos de totopo se colocaron en líneas imaginarias horizontales). Entre toma y toma de cada producto la pinza fue flameada. La placa con la muestra fue incubada durante 48 horas a 35 °C (Corry, 2003). La siembra de todos los productos se realizó por triplicado.

Transcurrido las 48 h de incubación se realizó la purificación de bacterias coliformes que se desarrollaron y que presentaron diferentes características morfológicas. Bajo condiciones de asepsia en una campana de flujo laminar y fueron purificadas en medio ARV utilizando un asa bacteriológica de níquel previamente flameada. Nuevamente se dejaron incubar a 35 °C durante 48 horas. Posteriormente se identificaron mediante la observación de las características macromorfológicas de la colonia y utilizando el certificado de análisis de bacterias coliformes del laboratorio DIBICO® con registro en S.S.A. No.0124R84 (Ver Anexo G para certificado).

#### **4.2.3 Análisis microbiológico de hongos presentes en totopos de maíz nixtamalizado propuesta en esta metodología**

##### **4.2.3.1 Siembra de la muestra para hongos**

Se utilizó la técnica de siembra en placa utilizando diferentes medios de cultivo: IPDA, IPDA c/a y AN. Para la siembra de muestras de totopos para hongos, en la campana de flujo laminar marca VECO®, en condiciones de asepsia, se apilaron las cajas de Petri con los medios de cultivo (Figura 11a). Posteriormente se colocaron 14 pedazos





de totopos con una pinza de níquel previamente flameada como se muestra en la Figura 12, en una placa con medio. Las placas con la muestra se colocaron en una caja de plástico con tapa y se incubaron durante 3 – 5 días a 25 °C. Se realizó por triplicado para cada uno de los productos en medio IPDA, IPDA c/a y AN.

#### 4.2.3.2 Aislamiento de hongos

Después de transcurrido el tiempo de incubación y mediante la observación del número de colonias desarrolladas en las placas con medio IPDA, IPDA c/a y AN, se procedió al aislamiento de los hongos. Se separaron las cepas que presentaron la misma o diferente macromorfología, considerando principalmente color, asignándoles una letra y para posteriormente cuantificarlas. En algunas de las colonias se observaron sus características macromorfológicas en el microscopio estereoscopio marca OLYMPUS SZ60® (Figura 17a).

Posteriormente se procedió a la purificación de todos los tipos morfológicos distintos de colonias fúngicas que se desarrollaron en las placas con medio IPDA, IPD c/a y AN. Se realizó una resiembra directa para purificar las colonias a identificar, en un área estéril se tomó una muestra con aguja estéril mediante flameo y enfriada (Figura 16), de cada uno de los tipos morfológicos identificados, en placas con medio IPDA e IPDA c/a y se colocó la muestra en el centro de la placa que contenía el medio de cultivo. Posteriormente fueron incubadas a 25 °C durante 3 - 5 días dependiendo de la madurez de la colonia para que pudiera ser observada en el microscopio compuesto marca OLYMPUS BH-2®. Todas las colonias fueron resembradas las veces necesarias hasta que se obtuvieron cultivos axénicos.





#### 4.2.3.3 Cuantificación e identificación de hongos

Una vez obtenidos los cultivos axénicos, se procedió a la identificación de las cepas aisladas. Mediante la observación de la macromorfología, en un estereoscopio marca OLYMPUS SZ60® de diversos parámetros como son: grado de crecimiento, aspecto de colonia (forma, textura superficial, color), características de las hifas, producción de pigmento, esporas (tipo, forma, tamaño, color, tabicación, marcas superficiales, etc.) con ayuda de las claves de Barnet y Hunter (1998).



Figura 16. Esterilización de aguja para purificación de micobiota

Para el examen microscópico se realizaron preparaciones semipermanentes, se tomó una muestra de la colonia a identificar con ayuda de una aguja esterilizada por flameado y fría, y se colocó una porción de la colonia sobre un portaobjetos conteniendo una gota de medio de montaje y/o colorante, cuando se trataba de una colonia fúngica con pigmentos oscuros se utilizó lactofenol y cuando la colonia presentaba pigmentos claros se utilizó azul de algodón con lactofenol (Figura 17b). Posteriormente se observó la preparación al microscopio compuesto marca OLYMPUS BH-2® (Figura 17c).

A partir de todas las características micromorfológicas y macromorfológicas observadas, se procedió a la identificación de los hongos a nivel de género siguiendo claves especializadas de Barnet y Hunter (1998), y a nivel de especie para el género





*Aspergillus*, utilizando las claves de Klich (2002). Posteriormente se analizaron los resultados de acuerdo a su clasificación ecológica según Christensen y Kaufmann (1965) en hongos de campo, hongos de almacén y hongos de deterioro avanzado.

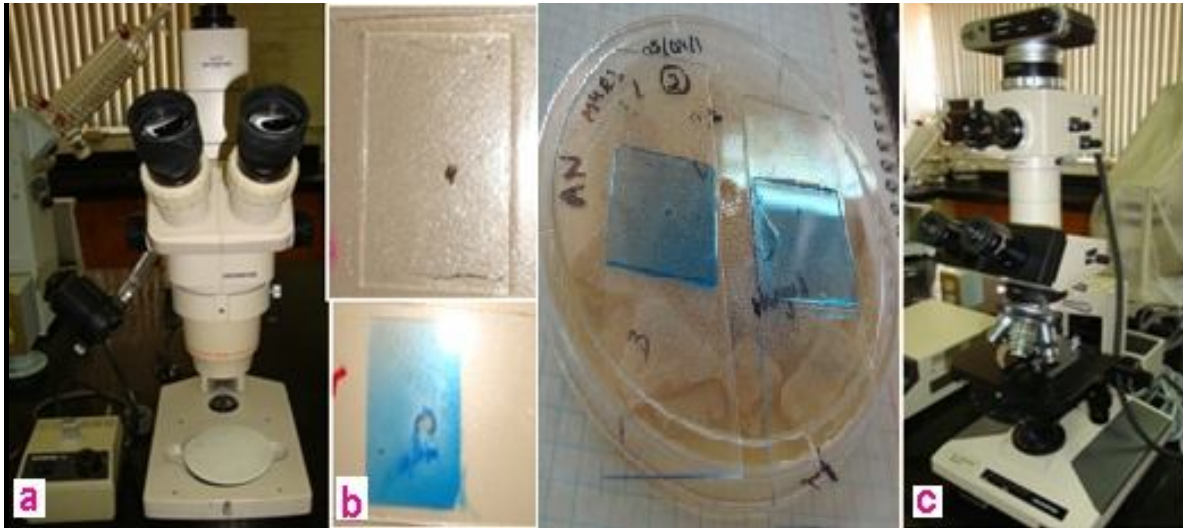


Figura 17. (a) Estereoscopio, (b) Preparaciones semipermanentes y (c) Microscopio compuesto

#### 4.2.4 Determinación de aflatoxinas totales

Para la determinación de aflatoxinas totales, se realizó de acuerdo al método de inmunoadinidad por columnas monoclonadas de Afla Test-P® (AOAC 991.3), aplicable para la determinación de AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub> a concentraciones mayores o iguales a 10 microgramos por kilogramo ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) en maíz o crema de cacahuate (Vicam, 1999).

Se pesaron 50 g de cada muestra de totopos (Figura 18a). Se colocaron en un vaso de licuadora (Figura 18b) y se agregaron 5 g de cloruro de sodio (NaCl). Se molieron durante 1 minuto a alta velocidad (Figura 18c). A esta molienda se le adicionó 100ml de metanol al 80 % (Figura 19f) y se volvió a moler durante 1 minuto a alta velocidad.





Se colocó un embudo con papel filtro Whatman® No.1 aflautado en una probeta de 100ml (Figura 19a) y se filtró la mezcla. Se recolectó el filtrado.

De este filtrado se tomaron 10ml y se colocaron en un vaso de precipitados que contenía 40ml de agua destilada. Se mezcló vigorosamente. Del extracto diluido se tomaron 10ml y se filtraron a través de papel de fibra de vidrio que fue recolectado en una columna de inmunoafinidad Afla Test-P® (Figura 19b y c). Posteriormente se realizó un primer lavado con 10 ml de agua destilada a través de la columna (Figura 19d). Se realizó un segundo lavado hasta pasar el total de la alícuota anterior (Figura 19a). Se pasó a través de la columna 1 ml de metanol grado HPLC (Figura 19e) y se colectó la muestra en un tubo de ensaye (Figura 20). Se tomó 1 ml de este último colectado y se vertió en un tubo de ensaye. Se añadió 1 ml de revelador Afla Test y se homogenizó. Se procedió a la lectura en el fluorómetro VICAM® serie 4 (Figura 20c) calibrado previamente y se obtuvo la lectura de aflatoxinas totales después de 60 segundos. Los resultados obtenidos se expresaron en microgramos por kilogramo ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

#### 4.2.5 Análisis Estadístico

En este estudio se realizó un análisis de varianza ANOVA para determinar diferencia entre medias ( $p < 0.05$ ) que pueda existir entre las muestras de totopos de maíz nixtamalizado. Se aplicó la prueba estadística LSD para comparación de medias. Se utilizó el paquete estadístico SAS versión 9 (Rebolledo, 2002).





Figura 18. Pesado y molienda de muestras para determinación de aflatoxinas en totopos



Figura 19. Preparación de la muestra para

determinación aflatoxinas

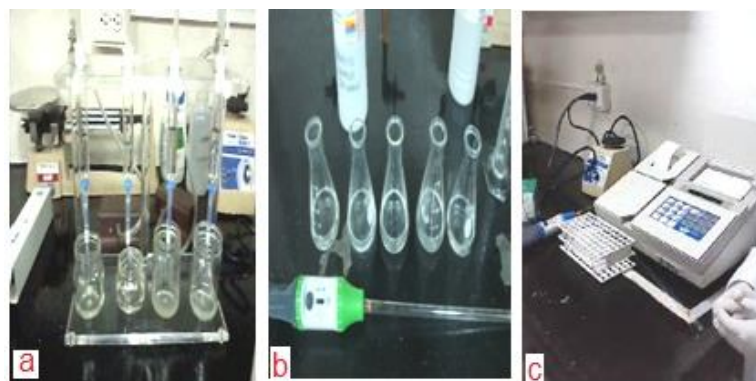


Figura 20. Cuantificación de aflatoxinas en totopos





## 5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Contenido de humedad en totopos de maíz nixtamalizado

En base a la metodología empleada para este trabajo a continuación se presentan los resultados obtenidos de la determinación del contenido de humedad para los tres procesos de manufactura de las muestras de totopos de maíz nixtamalizado.

Partiendo de las botanas elaboradas por el proceso de freído, que corresponde a M1, M2 y M3, se observa en la Figura 21 que el valor más bajo de porcentaje de humedad reportado lo presentó M1 con 0.16 %, seguida por M3 que presentó un porcentaje de humedad de 0.42 % y con 0.54 % para M2; sin embargo, comparando estos valores con lo encontrado por Serna (1996) y Paredes (2006) quienes reportaron el contenido de humedad en general para las botanas oscila entre 1.5 y 2 %, los resultados obtenidos están por debajo de lo reportado bibliográficamente.

Por otro lado, para las botanas que son elaboradas por el proceso de horneado, que corresponden a M4 y M5, se observa en la Figura 21 que el mayor porcentaje lo presentó M4 con 0.72 % y con 0.52 % para M5, bibliográficamente un producto horneado puede contener más de 2.5 % de humedad de acuerdo con Ibarz (2005), por lo que los resultados obtenidos del contenido de humedad de las botanas de maíz nixtamalizado horneadas bajo estudio presentando bajos valores que no coinciden con lo encontrado por Ibarz (2005).

Y finalmente para la botanas que son elaboradas por el proceso de deshidratación, que corresponde a M6, se obtuvo un porcentaje de humedad del 0.66 %, que está dentro de lo reportado por Ibarz (2005), donde un producto deshidratado no debe de contener más de 2.5 % de humedad (Figura 21).

Observamos que el contenido de humedad en las diferentes muestras de totopos de maíz nixtamalizado elaborados por diferentes procesos de manufactura estuvieron





por debajo del 1.00% lo cual disminuye los riesgos del desarrollo de microorganismos en este tipo de productos.

La importancia del contenido de humedad en los totopos es de gran relevancia, ya que la conservación mediante la reducción de la misma es una consecuencia directa sin la cual los microorganismos les es imposible desarrollarse (Jay *et al.* 2005). Aunque el contenido de humedad de un alimento puede ser un factor indicativo de su tendencia al deterioro.

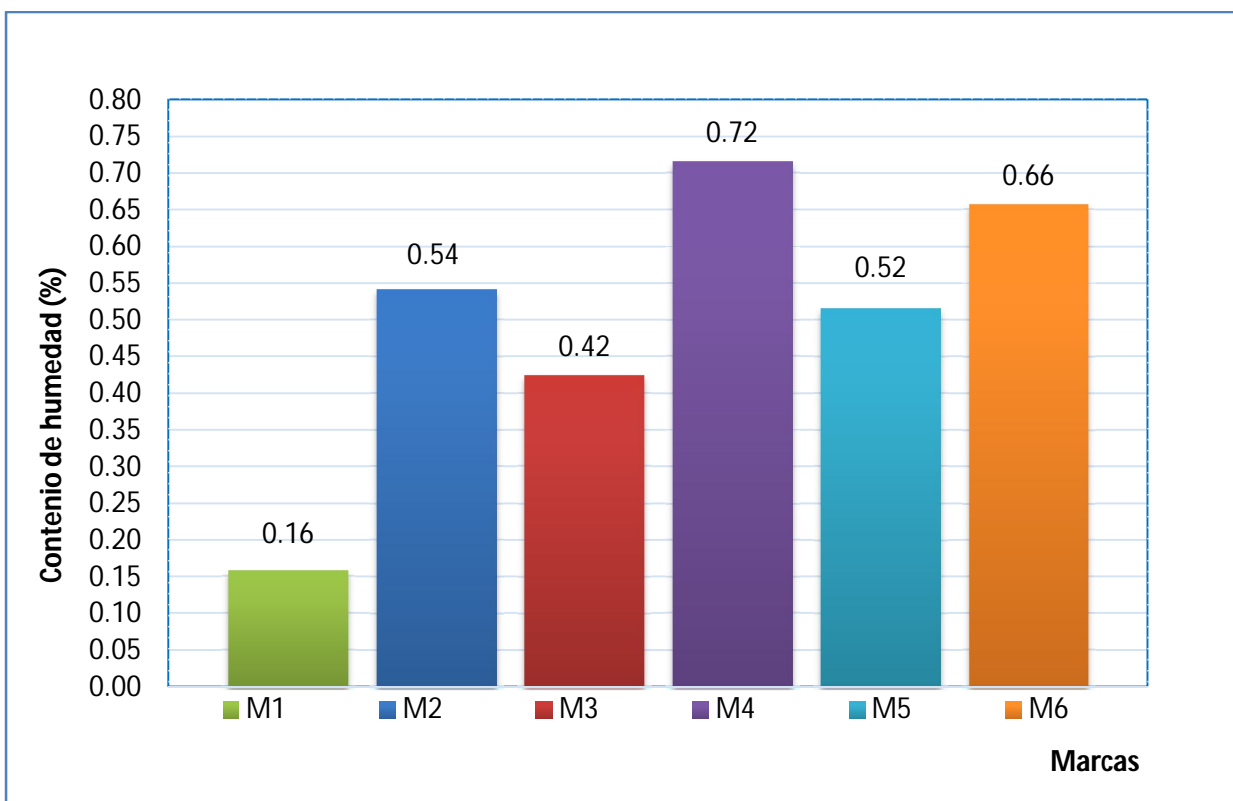


Figura 21. Media de contenido de humedad en las seis marcas de totopos de maíz nixtamalizado

## 5.2 Análisis microbiológico de la presencia de bacterias en totopos de maíz nixtamalizado propuesta en esta metodología

En el ANEXO B se presentan las características de la micro y macromorfología de las especies de bacterias que fueron identificadas en los tres procesos de manufactura







empleando la metodología propuesta en este trabajo. En el Figura 11 se presentan los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas para la identificación de las bacterias mesófilas que se desarrollaron en las muestras de totopos de maíz nixtamalizado.

Con respecto a las pruebas bioquímicas realizadas, los resultados que se obtuvieron coinciden con lo que se reporta en la literatura por White (1999), Ray y Bhunia (2008), Rocha *et al.* (2009) y Sosa *et al.* (1997) de acuerdo a las características de las especies que fueron identificadas. Sólo para la prueba de OF no se observó cambio de color en el medio con lo cual no se pudo confirmar si era oxidativa o fermentativa, lo único que se observó fue la liberación de gas para los tubos que estuvieron cerrados. Así mismo en el anexo C se presentan los resultados fotográficos de las pruebas bioquímicas realizadas.

**Cuadro 11. Resultados de la identificación de bacterias mesófilas identificadas**

Bacteria	Tinción de Gram	Prueba catalasa	Prueba motilidad	Formación de endosporas	Prueba OF
<i>P. syringae</i>	-	-	+	-	NR
<i>P. stewartii</i>	-	+	-	-	NR♣
<i>C. michiganensis</i>	+	+	+	-	NR♣
<i>X. campestris</i>	-	+	+	-	NR♣
<i>P. avenae</i>	-	+	+	-	NR♣

♣ Tubos cerrados sin cambio de color en medio pero con liberación de gas

Aunque no son de interés a nivel de alimentos, ya que no causan enfermedades (ETAS), más sin embargo, se encontraron bacterias mesófilas y en el Cuadro 12 se presentan los resultados obtenidos de la incidencia de las especies de bacterias desarrolladas en los tres procesos de manufactura de totopos de maíz nixtamalizado.

En el Cuadro 12 se presenta la incidencia de las bacterias mesófilas en los tres procesos de manufactura. Empezando el análisis para el proceso de freído, se observa





que la especie que tuvo mayor incidencia fue *Pseudomonas syringae* con 2.17 colonias, seguida de *Pantoea stewartii* con 1.33 colonias, posteriormente *Pseudomonas avenae* con 0.83 colonias, después estuvo *Xanthomonas campestris* con 0.11 colonias y finalmente *Clavibacter michiganensis* con 0.11 colonias presentes en 16 g de muestra. Cabe resaltar que para los totopos que son elaboradas por un proceso de freído se utilizan temperaturas que oscilan entre los 150 y 200 °C durante un tiempo de 60 segundos (Vélez y Hernández, 1999), por lo que a esas temperaturas las bacterias no deberían de desarrollarse; sin embargo, si no se lleva a cabo el proceso cumpliendo las condiciones establecidas esto se ve reflejado en el producto final, más aún sumando el no aplicar correctamente las buenas prácticas agrícolas y las buenas prácticas de manufactura.

**Cuadro 12. Media de bacterias presentes en los tres procesos de manufactura de totopos de maíz nixtamalizado**

Proceso	<i>P. syringae</i>	<i>P. avenae</i>	<i>C. michiganensis</i>	<i>X. campestris</i>	<i>P. stewartii</i>
Frito	2.17	0.83	0.06	0.11	1.33
Horneado	3.58	5.25	0.42	0.17	1.00
Deshidratado	0.00	2.17	0.50	0.17	0.67

Para los totopos elaborados por el proceso de horneado se observa que presentó la incidencia de las cinco especies de bacterias, destacándose *P. avenae* con 5.25 colonias, seguida de *P. syringae* con 3.58 colonias, después *P. stewartii* con 1.00 colonias, después con 0.42 colonias para *C. michiganensis* y finalmente con 0.17 colonias para *X. campestris*. Cabe resaltar que en este proceso se utilizan temperaturas que rondan entre 110 a 240 °C (Fellows, 2000), por lo que a estas temperaturas, no debería existir desarrollo de estas bacterias, por lo tanto esto nos indica que la contaminación de estas especies es por malas prácticas de manufactura.





Y finalmente lo totopos que son elaborados por el proceso de deshidratación, se observa que tuvo la presencia de sólo cuatro especies de bacterias de las cinco que fueron identificadas, realizando el análisis para la especie que tuvo mayor incidencia fue *P. avenae* con 2.17 colonias, seguida de *P. stewartii* con 0.67 colonias, posteriormente *C. michiganensis* con 0.50 colonias y finalmente *X. campestris* con apenas 0.17 colonias. Se observa que la especie *P. avenae*, fue la que tuvo mayor presencia en dos de los tres procesos de manufactura.

La presencia de estas especies de bacterias en los tres procesos de manufactura, nos indica que la materia prima, el maíz, desde su cultivo no se llevó adecuadamente. Para el género *C. michiganensis* que se desarrolló con mayor presencia en el proceso de deshidratación, por lo general estas especies se encuentran en el ambiente, las plantas y animales, y son capaces de sobrevivir a altas concentraciones de sal ( $\geq 10\%$ ), a pesar de que en este estudio solo se llevó a cabo el análisis con totopos de maíz sin ningún tipo de agregado como sal o picante. No se puede dejar de lado que algunos totopos con estas características queden libres de presencia de *C. michiganensis*, por lo que se puede decir que el maíz, materia prima, desde el inicio ya cuenta con una carga de esta especie (Ray y Brunia, 2010). Se ha descubierto, que algunas cepas de *Pseudomonas*, producen enterotoxinas, lo que es indicativo de su capacidad potencial para producir intoxicaciones alimentarias (Jay *et al.* 2000).

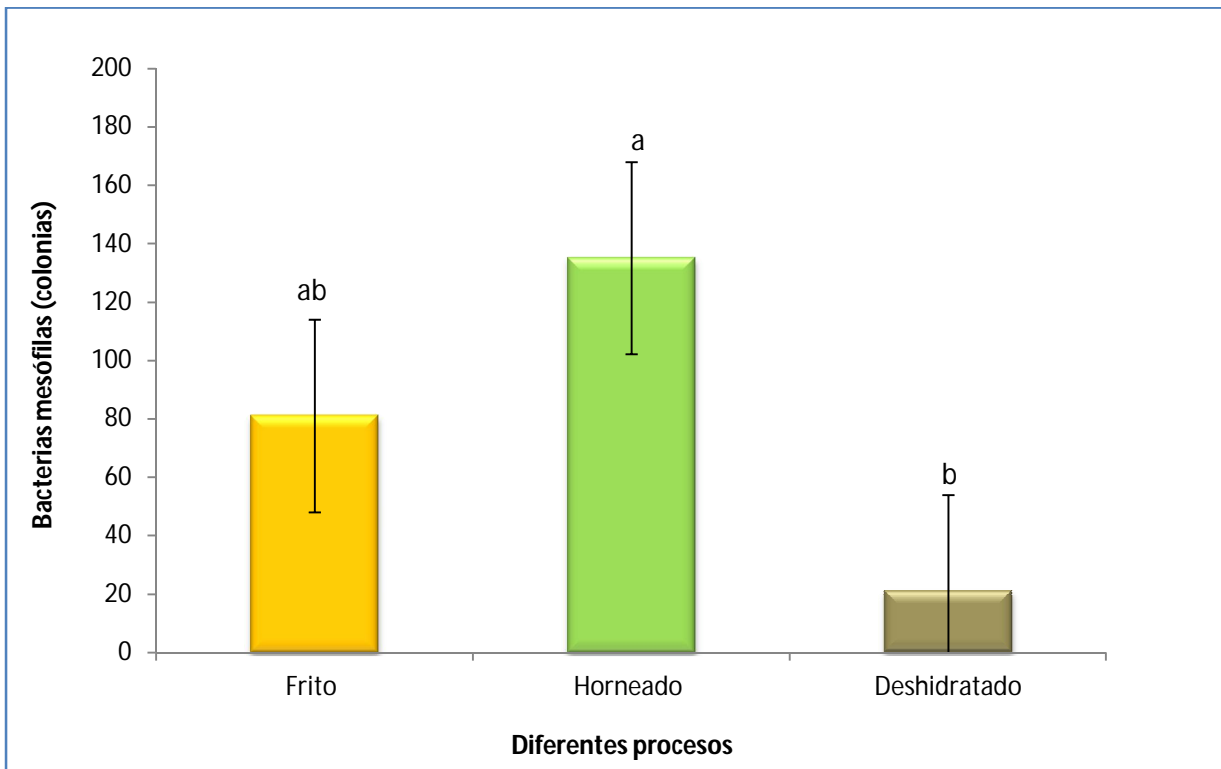
Como se presentó en el Cuadro 12, de las cinco especies de bacterias que fueron identificadas, tres pertenecen al género *Pseudomonas*, éste género se encuentran ampliamente distribuidas en el suelo, animales, plantas y agua. Solo unas pocas especies son peligrosas para los animales y el hombre, mientras que otras muchas son patógenas para la plantas (Moreno *et al.* 2000).

En la Figura 22 se presenta el análisis estadístico para los tres procesos de manufactura. Se observa que las botanas elaboradas por el proceso de horneado son





las que tuvieron mayor incidencia de bacterias que las botanas elaboradas por el proceso de freído y por el proceso de deshidratación. El proceso de horneado no presentó diferencia significativa con respecto al proceso de freído, pero si fue significativamente diferente con respecto al proceso de deshidratación. Los resultados muestran que las botanas horneadas presentaron la mayor incidencia de bacterias, seguidas de las botanas fritas y finalmente las botanas deshidratadas, siendo éstas últimas las que mejor calidad sanitaria mantuvieron con respecto a bacterias.



**Figura 22. Colonias de bacterias presentes en los tres procesos de elaboración de totopos de maíz nixtamalizado. Medias con literales diferentes entre proceso presenta diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).**

Se observa que el proceso que tuvo la mayor incidencia de bacterias es el proceso de horneado por lo tanto la menor calidad sanitaria; y el que tuvo la menor incidencia de bacterias fue el proceso de deshidratado, por lo tanto la mejor calidad sanitaria con respecto a bacterias.





En el Cuadro 13 se presentan los resultados obtenidos de las bacterias identificadas en las seis marcas comerciales de totopos de maíz nixtamalizado. Para empezar con el análisis para M1, se observa que presentó la incidencia de tres especies de bacterias, teniendo una incidencia de 5.83 colonias para la especie *P. syringae*, con 2.67 colonias para *P. stewartii* y con 0.17 colonias para *P. avenae*. Después para M2, se observa que tuvo la incidencia de cuatro especies, la que presentó mayor incidencia fue *P. stewartii* con 1.0 colonias, seguida de *P. avenae* con 0.50 colonias y finalmente con 0.17 colonias para dos especies de bacterias *P. syringae* y *C. michiganensis*.

**Cuadro 13. Media de bacterias presentes en las muestras de seis marcas de totopos de maíz nixtamalizado**

Marca	<i>Pseudomona syringae</i> (colonias)	<i>Pseudomona avenae</i> (colonias)	<i>Clavibacter michiganensis</i> (colonias)	<i>Xanthomona campestris</i> (colonias)	<i>Pantoea stewartii</i> (colonias)
<b>M1</b>	5.83	0.17	0.00	0.00	2.67
<b>M2</b>	0.17	0.50	0.17	0.00	1.00
<b>M3</b>	0.50	1.83	0.00	0.33	0.33
<b>M4</b>	2.50	3.00	0.67	0.17	1.67
<b>M5</b>	4.67	7.50	0.17	0.17	2.00
<b>M6</b>	0.00	2.17	0.50	0.17	0.67

La siguiente marca es M3, donde se observa que tuvo la incidencia de cuatro especies de bacterias, destacándose *P. avenae* con 1.83 colonias, seguida de *P. syringae* 0.50 colonias, y con 0.33 colonias para *X. campestris*, lo mismo para *P. stewartii*. Ahora para M4, se observa que tuvo la incidencia de las cinco especies de bacterias que fueron identificadas, destacándose *P. avenae* con 3.00 colonias, seguida de *P. syringae* con 2.50 colonias, con 1.67 colonias para *P. stewartii*, con 0.67 colonias para *C. michiganensis* y finalmente con 0.17 colonias, *X. campestris*.

Para M5, se observa que al igual que M4, también tuvo la incidencia de las cinco especies de bacterias, se destaca la incidencia de *P. avenae* con 7.50 colonias, seguida de *P. syringae* con 4.67 colonias, posteriormente, *P. stewartii* con una incidencia de





2.00 colonias y finalmente con 0.17 colonias, tanto para *X campestris* y como para *C. michiganensis*.

Y finalmente para M6, se observa que se tuvo la incidencia de cuatro especies de bacterias, destacándose la incidencia de *P. avenae* con 2.17 colonias, posteriormente *P. stewartii* con 0.67 colonias, seguida de *C. michiganensis* con 0.50 colonias y por último *X. campestris* con 0.17 colonias. Se observa que M5 es la marca que presentó la menor calidad sanitaria con respecto a bacterias y que M2 es la que menor incidencia de bacterias tuvo por lo tanto la que mejor calidad sanitaria presenta.

Cabe resaltar que de las seis marcas en estudio, todas presentaron la incidencia de al menos tres especies de bacterias, y de las cinco especies de bacterias que fueron identificadas, *P. avenae* es la especie que tuvo mayor incidencia, ya que se desarrolló en cinco de las seis marcas de totopos de maíz nixtamalizado que fueron analizadas.

Se observa que para M1, fue el único caso, donde la especie que tuvo mayor incidencia fue la especie *P. syringae* con 5.83 colonias, y si se realiza un orden de la especie que tuvo de la menor a la mayor incidencia quedaría de la forma siguiente: *P. avenae*, *P. syringae*, *P. stewartii*, *C. michiganensis* y finalmente *X. campestris*. Así mismo se observa que la marca que tuvo la mayor calidad sanitaria le corresponde a M2 y la que tuvo la menor calidad sanitaria le corresponde a M5, con respecto a bacterias.

En la Figura 23 se observa que aunque M5 tuvo la mayor incidencia de bacterias, fue significativamente diferente al resto de las marcas, siendo M2 la que presentó la menor incidencia de bacterias, aunque no fue significativamente diferente a M3 y M6, pero si fue significativamente diferente a M1, M4 y M5. Así que M5 es la marca con menor calidad sanitaria respecto a bacterias.





Se observa que los resultados obtenidos en este estudio para bacterias de los tres procesos de manufactura y las seis marcas, todas tuvieron la incidencia de al menos una especie de bacteria, la presencia de estas bacterias, nos indican que no se están llevando a cabo el cumplimiento de las buenas prácticas de almacenamiento, como es el no tener un buen manejo de la materia prima durante el almacenamiento que se ven reflejadas en el producto final o una posible contaminación post proceso siempre y cuando se hayan cumplido tiempos y temperaturas de proceso.

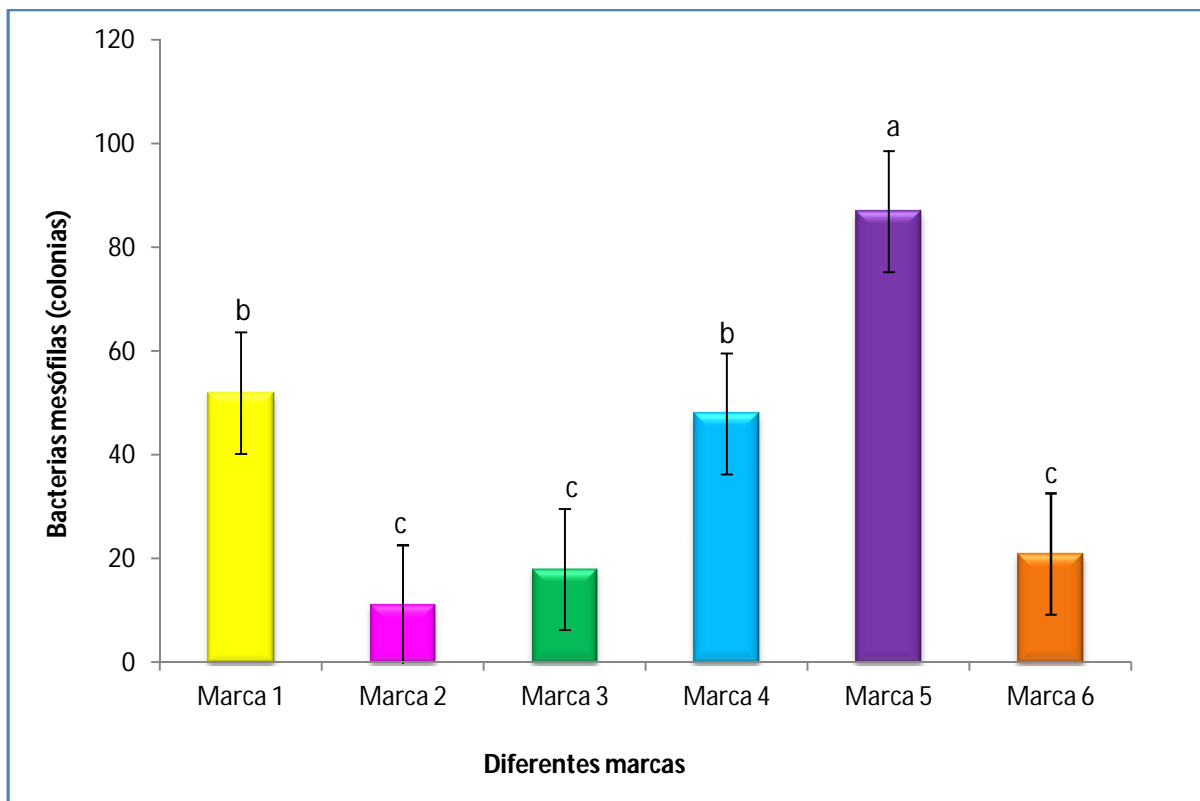


Figura 23. Colonias de bacterias mesófilas presentes en las seis marcas de totopos de maíz nixtamalizado. Medias con letras diferentes entre marcas existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).





### 5.2.1 Análisis microbiológico de la presencia de coliformes en totopos de maíz nixtamalizado propuesta en esta metodología

En la Figura 24 se presentan los resultados obtenidos de la presencia de bacterias coliformes identificadas en muestras de totopos de maíz nixtamalizados con base al certificado de laboratorio DIBICO® (ANEXO G). Se observa que se identificaron dos especies de bacterias. La primera es *Escherichia faecalis* presente en M2 y en M5, M2 se trata de una muestra de totopos que fue elaborada por el proceso de freído mientras que M5 fue elaborada por el proceso de horneado. La especie identificada tuvo una incidencia de 1.00 colonia para cada marca, y se trata de un enterococo Gram positivo que es habitante normal del tracto gastrointestinal. *E. faecalis* tiene capacidad para sobrevivir y crecer en microambientes que pudieran ser tóxicos para muchas bacterias, en particular zonas con altas concentraciones de sales. *E. faecalis* se encuentra normalmente en las heces de muchos mamíferos. Generalmente, su número en las heces humanas es menor que el de *E. coli*. Algunas cepas de *E. faecalis* crece a 50°C. Tiende a estar más presente el tracto intestinal de humanos que de otros animales. Está bien documentado que los enterococos clásicos se encuentran en las plantas, insectos y suelos. Aunque *E. faecalis* se le considera con frecuencia como de origen fecal, algunas cepas son muy comunes en la vegetación y, por tanto, carecen de significado sanitario cuando aparecen en los alimentos. En un estudio con 2334 cepas de *E. faecalis* aisladas de alimentos secos y congelados, un elevado porcentaje de ellas compartían una similitud con los tipos procedentes de vegetales y, por tanto, no tenía significado sanitario. Cuando los enterococos se usan como indicadores de la calidad higiénica de alimentos, es necesario saber si las cepas de *E. faecalis* son de origen vegetal o representan a las de origen humano. Los enterococos se han hallado también en el polvo (Jay *et al.* 2005).

La segunda bacteria identificada es *Proteus*, a pesar de no ser una coliforme se desarrolló en el medio selectivos AVR para las coliformes, presentándose en M2, con una incidencia de 1.00 colonia, tratándose de una muestra de totopos que fue







elaborada por el proceso de freído, la colonia es translúcida rosa pálido sin halo de precipitación de acuerdo al certificado de laboratorio DIBICO®. Algunos informes sobre brotes de intoxicaciones atribuidos al género *Proteus*, la enfermedad se caracteriza por un periodo de incubación de tres a cinco horas, después aparecen los síntomas clínicos, principalmente diarrea, náuseas, vómitos, espasmos intestinales (Moreno *et al.* 2000, Jay *et al.* 2005).

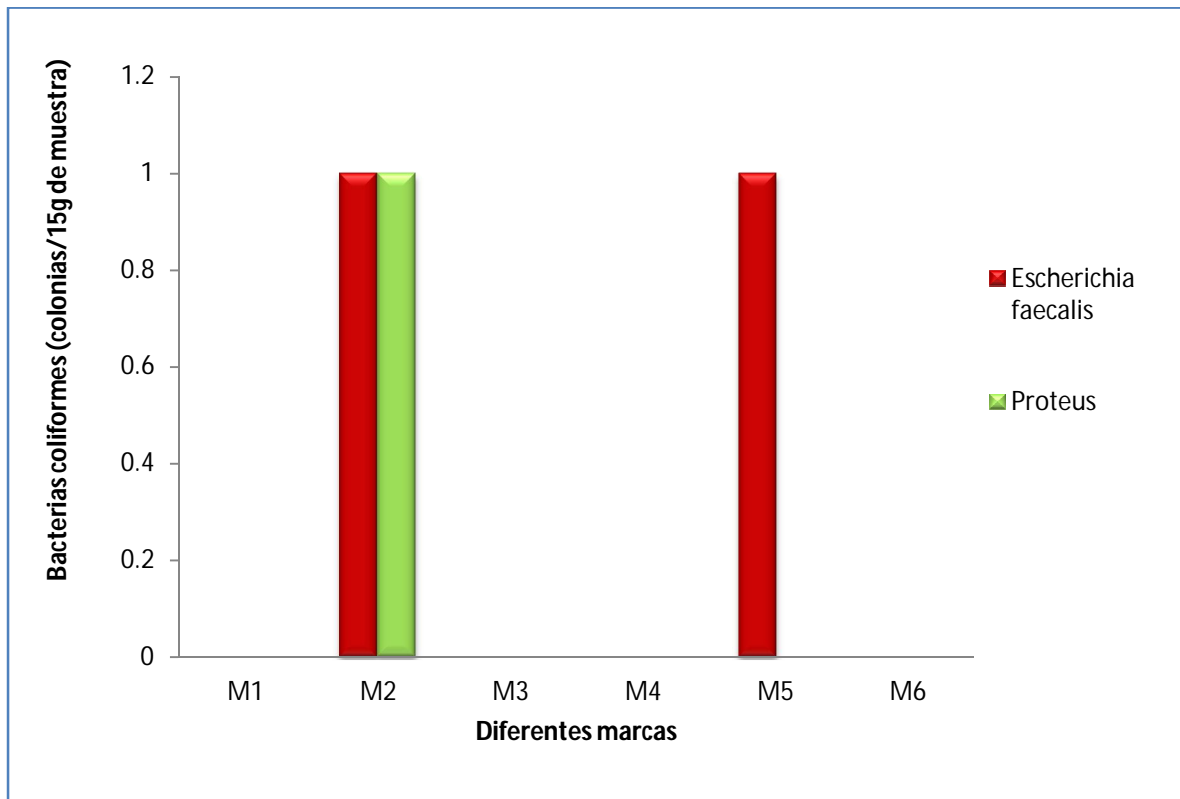


Figura 24. Coliformes presentes en las muestras de totopos de maíz nixtamalizado de seis marcas comerciales

Los alimentos implicados en brotes de intoxicaciones y toxiinfecciones alimentarias contienen a veces bacterias, cuyo significado sanitario es dudoso, por ejemplo el género *Proteus*. Algunos de estos géneros se presentan en la flora intestinal normal de los animales y del hombre, y en el ambiente, y muchas de ellas son contaminantes comunes de los alimentos. Muchos de este género participan en la descomposición





de alimentos. Su mera presencia no es suficiente para considerarlas como causantes de enfermedad. Hasta el momento no se tienen datos concluyentes que indiquen si estas bacterias son o no la causa de algunas toxiinfecciones o intoxicaciones alimentarias, ya que sólo se cuenta con experimentos con animales que proporcionan poca información, ya que no reflejan el mismo comportamiento que en el hombre (Moreno *et al.* 2000; Ray y Bhunia, 2010).

Algunas cepas de este género habitan en el tracto intestinal de humanos y animales, pero proliferan también en otros ambientes naturales. Generalmente este género no es detectado en las pruebas para coliformes y no es enteropatógeno para el hombre. Crecen en forma ramificada en la mayoría de las placas con agar. Pueden aislarse de diversos vegetales (Moreno *et al.* 2000; Jay *et al.* 2005).

Se sabe que los coliformes presentes se deben principalmente a una mala manipulación sanitaria durante la elaboración del producto en este caso la persona que empaca el producto que es quien toma la muestra, al mal transporte de la misma y a las buenas prácticas de manufactura dentro de la cadena de transformación. La presencia de bacterias coliformes en los alimentos no significa necesariamente que hubo una contaminación fecal o que hay patógenos entéricos presentes. Las bacterias coliformes son particularmente útiles como componentes de criterios microbiológicos para indicar contaminación post proceso térmico. En cuanto a los resultados obtenidos de bacterias coliformes, se destaca a M2 como la marca que menor calidad sanitaria presentó respecto a bacterias coliformes.

### **5.3 Análisis microbiológico de la presencia de hongos en totopos de maíz nixtamalizado propuesta en esta metodología**

La mayoría de las personas ha observado el crecimiento de los hongos sobre diversos productos: alimentos, ropa, etc. Los hongos se caracterizan por su aspecto algodónoso, aterciopelado y de diversos colores. Los hongos desarrollados en los





totopos de maíz nixtamalizado, se identificaron y se clasificaron tomando como base su morfología, macro y microscópica (Vera, 2004).

### 5.3.1 Hongos de campo

En base a los antecedentes de los géneros de hongos de campo y con las características de la micro y macromorfología observadas con base a la metodología propuesta en este trabajo y que se reportan en ANEXO D, a continuación se presentan los resultados del análisis estadístico correspondiente para los hongos de campo. En el

Cuadro 14 se presentan los resultados que corresponden a cinco géneros de hongos de campo que fueron identificados en las muestras de totopos de maíz nixtamalizado en los tres procesos de manufactura. Para empezar se observa que los totopos que fueron elaborados por un proceso de horneado presentaron los cinco géneros de hongos de campo, destacando la especie *Cladosporium* sp con 1.25 colonias, seguida de *Fusarium* con 0.17 colonias, y finalmente *Helminthosporium* sp, *Torula* sp y *Alternaria* sp, los tres géneros con 0.08 colonias para cada uno.

**Cuadro 14. Media de hongos de campo presentes en tres procesos de elaboración de totopos de maíz nixtamalizado**

Proceso	<i>Cladosporium</i> sp (colonias)	<i>Fusarium</i> sp (colonias)	<i>Alternaria</i> sp (colonias)	<i>Torula</i> sp (colonias)	<i>Helminthosporium</i> sp (colonias)
Frito	0.22	0.28	0.11	0.00	0.00
Horneado	1.25	0.17	0.08	0.08	0.08
Deshidratación	0.67	0.50	1.50	0.00	0.17

El siguiente proceso de manufactura de acuerdo a la incidencia de hongos fitopatógenos, corresponde a las botanas que fueron elaboradas por el proceso de deshidratación, éste proceso presentó la incidencia de cuatro géneros de hongos de campo; en este caso destacándose la incidencia de *Alternaria* sp con 1.50 colonias seguida de *Cladosporium* sp con 0.67 colonias, posteriormente *Fusarium* sp con 0.50 colonias y finalmente *Helminthosporium* sp con 0.17 colonias.





Y finalmente para las muestras de totopos que fueron elaborados por el proceso de freído, se desarrollaron y fueron identificados tres géneros de hongos fitopatógenos, en este caso el género *Fusarium* sp destacó con 0.28 colonias, le siguió *Cladosporium* sp con 0.22 colonias, y finalmente *Alternaria* sp con 0.11 colonias.

Se observa que a pesar de que el proceso de horneado fue el que presentó los cinco géneros de hongos de campo, no es el proceso que numéricamente presente menor calidad sanitaria; en este caso le corresponde para las botanas que fueron elaboradas por el proceso de deshidratación, ya que aunque presentó la incidencia de solo cuatro géneros, es suficiente para que numéricamente presente la mayor incidencia de hongo de campo y con ello la menor calidad sanitaria.

Enseguida los totopos que fueron elaborados utilizando el proceso de horneado, ocupan el segundo lugar en cuanto a incidencia numérica de hongos de campo, a pesar de que en este proceso se aplican a temperaturas entre 110 – 240 °C, se desarrollaron cuatro géneros de hongos.

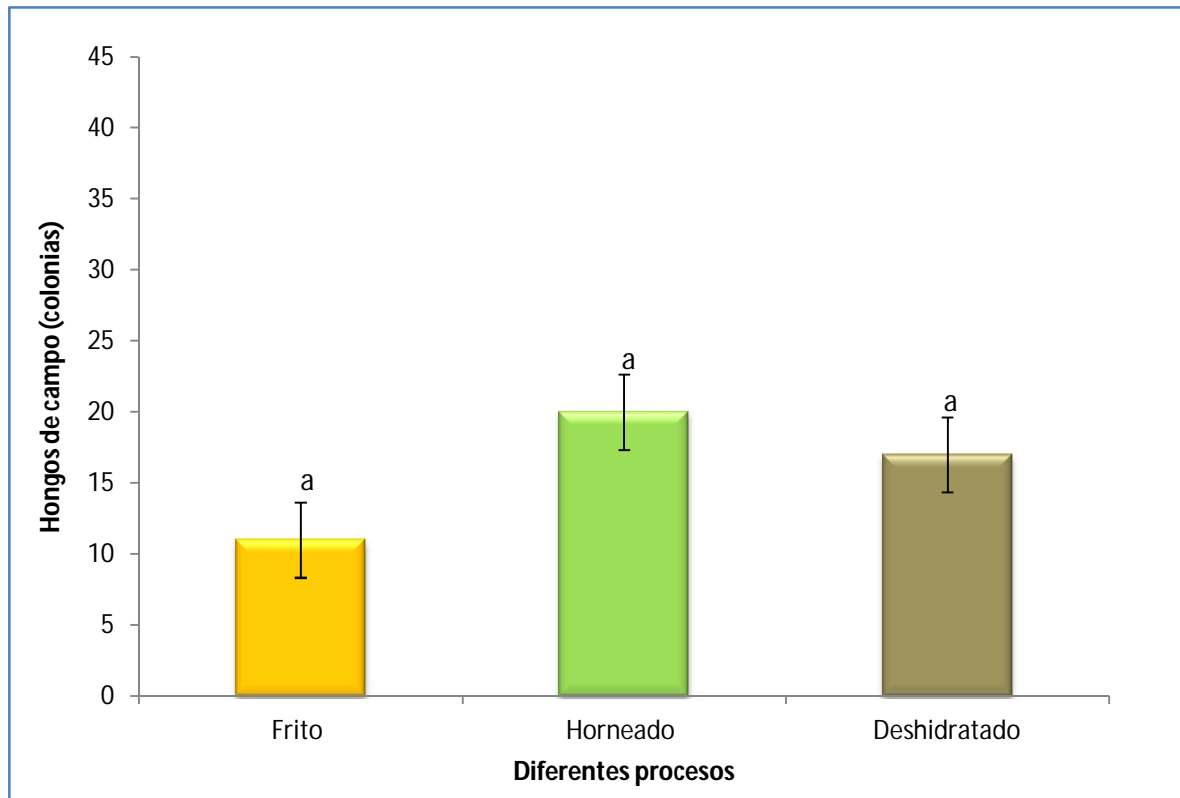
Y finalmente, el proceso que tuvo la mejor calidad sanitaria, con respecto a hongos de campo, fue para las totopos que fueron elaborados por el proceso de freído, ya que fue el proceso que numéricamente presentó la menor incidencia de estos hongos, y cabe resaltar que en este proceso se utilizan temperaturas entre 150-200 °C (Vélez y Hernández, 1999), temperaturas a las que ya no podría desarrollarse colonia alguna de hongo, sin embargo el no cumplir con los tiempos y temperaturas de proceso, se ve reflejado en el producto final con presencia de algún tipo de microorganismo que puede o no causar daño al consumidor.

Sin embargo la presencia de este tipo de especies de hongos de campo sugieren que los tiempos y temperaturas de proceso no eliminaron la carga microbiana del producto.





En la Figura 25 se presentan los resultados del análisis estadístico, con referencia a hongos de campo presentes en los tres procesos de manufactura. Se observa que aunque las botanas elaboradas por el proceso de horneado son las que presentaron la mayor incidencia de hongos de campo, seguida de las botanas deshidratadas y finalmente las fritas, no existe diferencia significativa entre los procesos aunque numéricamente si la hay. Observándose que numéricamente para el proceso de horneado es que presentó la mayor incidencia de hongos de campo, por lo tanto el que tiene menor calidad sanitaria respecto a hongos de campo.



**Figura 25. Colonias de hongos de campo presentes en los tres procesos de elaboración de totopos de maíz nixtamalizado. Medias con letras diferentes entre proceso existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).**

En el Cuadro 15 se presentan los resultados de la incidencia de hongos de campo presentes en las seis marcas comerciales. Empezando el análisis por M6, se observa que tuvo la incidencia de cuatro géneros, y se destaca la incidencia de *Alternaria* sp





con 1.50 colonias, seguida de *Cladosporium* sp con 0.67 colonias, posteriormente *Fusarium* sp con 0.50 colonias y al final *Helminthosporium* sp con 0.17 colonias. Ahora bien, para M5, también presentó la incidencia de los cuatro especies de hongos fitopatógenos de campo, en este caso *Cladosporium* sp, fue el género que se destaca su incidencia con 1.33 colonias, seguido de *Fusarium* sp con 0.33 colonias y al final se presentó *Alternaria* sp y *Torula* sp con 0.17 colonias para ambos géneros.

**Cuadro 15. Media de hongos de campo presentes en las muestras de seis marcas de totopos de maíz nixtamalizado**

Marca	<i>Cladosporium</i> sp (colonias)	<i>Fusarium</i> sp (colonias)	<i>Alternaria</i> sp (colonias)	<i>Torula</i> sp (colonias)	<i>Helminthosporium</i> sp (colonias)
M1	0.17	0.83	0.17	0.00	0.00
M2	0.17	0.00	0.00	0.00	0.00
M3	0.33	0.00	0.17	0.00	0.00
M4	1.17	0.00	0.00	0.00	0.17
M5	1.33	0.33	0.17	0.17	0.00
M6	0.67	0.50	1.50	0.00	0.17

Continuando con la incidencia de hongos de campo, corresponde a M1, donde se tuvo el desarrollo de tres géneros de hongos fitopatógenos de campo, destacándose *Fusarium* sp con 0.83 colonias, y finalmente *Cladosporium* sp y *Alternaria* sp, ambos géneros con 0.17 colonias. La siguiente marca corresponde a M4 que se desarrollaron dos géneros de hongos de campo, donde se destaca el género *Cladosporium* sp con 1.17 colonias y para *Helminthosporium* sp con 0.17 colonias. La siguiente marca en cuanto incidencia es para M3, donde se observó el desarrollo de dos géneros de hongos de campo, *Cladosporium* sp con una incidencia de 0.33 colonias, mientras que para *Alternaria* sp, fue de 0.17 colonias. Y finalmente la marca que tuvo la menor incidencia de hongos fitopatógenos de campo, corresponde a M2, con apenas un género de hongo de campo y se trata de *Cladosporium* sp con 0.17 colonias.

Se observa que para las seis marcas de totopos de maíz que fueron analizadas, todas presentaron la incidencia de al menos un género de hongos de campo; y de las seis marcas M2 es la que numéricamente presentó la menor incidencia de hongos de





campo con sólo un género; por otro lado M6 es la marca que numéricamente presentó mayor incidencia de hongos de campo a pesar de que sólo presentó la incidencia de solo cuatro géneros; sin embargo, es la que menor calidad sanitaria presenta con respecto a hongos de campo.

Así mismo de los resultados obtenidos (Cuadro 15) el género *Alternaria* sp, estuvo en segundo lugar en cuanto a incidencia, ya que se presentó en cuatro de las seis marcas de totopos de maíz nixtamalizado, se sabe que la esporulación óptima de esta especie es a 27 °C, aunque el rango de crecimiento está entre 0 y 35°, por lo que la presencia de esta especie, confirma que los procesos de manufactura no están llevándose correctamente y esto se ve reflejado en el producto final, donde se identificó el desarrollo de género *Alternaria* sp (Carrillo, 2003).

A pesar de que para los tres procesos de manufactura se utilizan temperaturas arriba de la óptima de crecimiento, el hongo *Alternaria* sp se desarrolló. Un factor más que genera el desarrollo de éste género es cuando el secado de los granos en el campo está demorado por las lluvias y la humedad alta. Algunas de las infecciones que causa este género pueden ser bastante extensas en la planta y producir además metabolitos secundarios llamados micotoxinas (Carrillo, 2003).

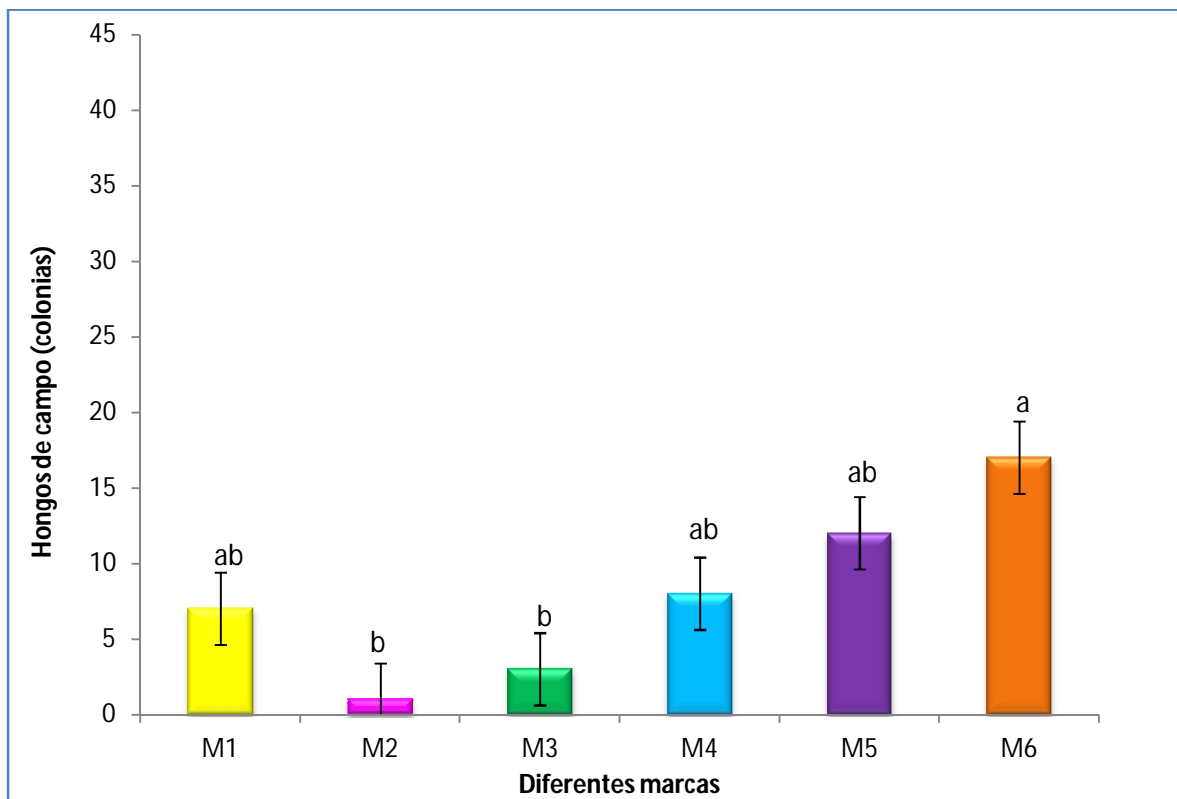
En la Figura 26 se presentan los resultados del análisis estadístico correspondiente para los hongos de campo en las seis marcas comerciales, se observa que M6 fue la que presentó la mayor incidencia de hongos de campo, no fue significativamente diferente a M1, M4 y M5, pero si fue significativamente diferente a M2 y M3. Observándose que M2 es la marca que presentó la menor incidencia de hongos de campo por el contrario M6 fue la marca que presento la mayor incidencia de hongos de campo; por lo tanto M6 es la marca que presentó la menor calidad sanitaria con respecto a hongos de campo.





### 5.3.2 Hogo de almacén

En base a los antecedentes de los géneros de hongos de almacén y con las características de la micro y macromorfología observadas con base a la metodología propuesta en este trabajo y que se reportan en ANEXO DE, a continuación se presentan los resultados del análisis estadístico correspondiente para los hongos de almacén.



**Figura 26.** Colonias de hongos de campo presentes en las seis marcas de totopos de maíz nixtamalizado. Medias con letras diferentes entre proceso existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

En el Cuadro 16 se presentan los resultados obtenidos de las especies de hongo de almacén que fueron identificadas en los tres procesos de manufactura en las muestras de totopos de maíz nixtamalizado. En el proceso de freído, se observa que presento la incidencia de las cuatro clases de hongos de almacén identificados, destacando *Penicillium* sp con 1.50 colonias y con 0.11 colonias para dos especies, *A. terreus* y *A.*







*candidus*; y finalmente con 0.06 colonias para la especie *A. flavus*. Para el proceso de horneado, donde se destaca el género *Penicillium* sp con 0.67 colonias, seguida de *A. terreus* con 0.25 colonias, posteriormente *A. flavus* con 0.17 colonias y finalmente *A. candidus* con 0.08 colonias.

Finalmente para el proceso de deshidratación, se observó que tuvo la incidencia de las cuatro clases de hongos de almacén, donde se destaca la incidencia de la especie *A. flavus* con 2.83 colonias, posteriormente *Penicillium* sp con 0.83 colonias, seguida de *A. terreus* con 0.5 colonias y finalmente *A. candidus* con 0.33 colonias.

**Cuadro 16. Media de hongos de almacén presentes en tres procesos de elaboración de totopos de maíz nixtamalizado**

Proceso	<i>Penicillium</i> sp (colonias)	<i>Aspergillus terreus</i> (colonias)	<i>Aspergillus flavus</i> (colonias)	<i>Aspergillus candidus</i> (colonias)
<b>Frito</b>	1.50	0.11	0.06	0.11
<b>Horneado</b>	0.67	0.25	0.17	0.08
<b>Deshidratado</b>	0.83	0.50	2.83	0.33

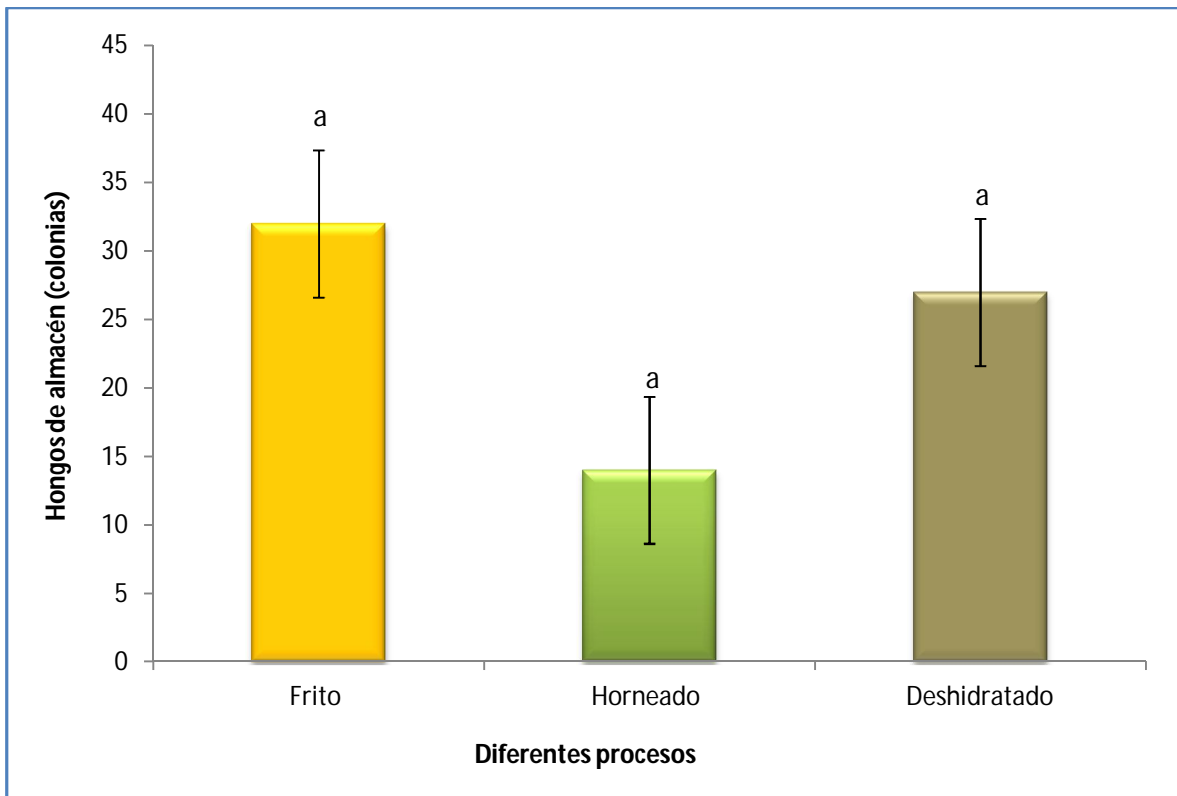
Se observa que de los tres procesos de elaboración de botanas, el de deshidratación es el que presentó la mayor incidencia de hongos de almacén, por el contrario el proceso de horneado fue el que presentó la menor incidencia de hongos de almacén y con ello la mejor calidad sanitaria con respecto a hongos de almacén.

Una especie importante es *A. flavus*, ya que encontrada comúnmente en el medio ambiente y es productora de micotoxinas conocidas como aflatoxinas, que son un riesgo para el consumidor. Por lo que se puede decir que la presencia de estos hongos indica un mal almacenamiento del maíz. (Suárez, 2010; Serna, 1996; Ogawa, 1999; Warham *et al.* 1996; Carlstrom y Yoursef 2006, Klich, 2002). Para la especie *Aspergillus candidus*, la presencia de este hongo es indicativa de que el lote de grano está sufriendo deterioro severo, también es un hongo involucrado en el calentamiento de los granos (Moreno, 1988; Ogawa, 1999; Suárez, 2010; Serna, 1996; Warham *et al.* 1996).





Se observa en la Figura 27 el análisis estadístico correspondiente para los hongos de almacén, donde no existe diferencia significativa entre los tres procesos de manufactura, aunque numéricamente si la hay, siendo las botanas elaboradas por el proceso de horneado las que presentaron la menor incidencia de hongos de almacén, seguida de los deshidratados y por últimos las botanas elaboradas por el proceso de freído, siendo éstas últimas las que presentaron la menor calidad sanitaria respecto a hongos de almacén.



**Figura 27. Colonias de hongos de almacén presentes en los tres procesos de manufactura de totopos de maíz nixtamalizado. Medias con letras diferentes entre proceso existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).**

Se observa que los resultados obtenidos con respecto a los géneros identificados de hongos de almacén, el género que tuvo mayor incidencia en dos de los tres procesos de manufactura, fue *Penicillium* sp, y el segundo lugar lo ocupó la especie *A. flavus*, cabe resaltar que ambas especies son productoras de aflatoxinas, y que son un





contaminante de granos y que además son un peligro para la salud de humano y animales domésticos consumidores que se remiten a trastornos de tipo cancerígeno (Ramakrishna, 1989).

De acuerdo con lo anterior, es necesario tener un buen manejo y conocimiento de los problemas patológicos de maíz almacenados, a fin de concretar medidas preventivas y evita grandes pérdidas económicas que acarrear los contaminantes fúngicos en los granos. En el Cuadro 17 se presentan los resultados de los hongos de almacén que fueron identificados en las muestras de las seis marcas comerciales de totopos de maíz nixtamalizado. Empezando con M1, se observa que tuvo la incidencia de tres clases de hongos de campo, *A. flavus*, *Penicillium* sp y *A. candidus* tuvieron el mismo número de colonias, con 0.17. Para M2, se observa que se desarrollaron dos clases de hongos de almacén, destacándose *Penicillium* sp con 0.33 colonias y *A. candidus* con 0.17 colonias. Después para M3, se observa que solo tuvo la incidencia de dos clases de hongos de almacén, se destaca *Penicillium* sp con 4.00 colonias y con 0.33 colonias para la especie *A. terreus*. Enseguida para M4, se observa que se desarrollaron tres clases de hongos de almacén, donde se destaca *Penicillium* sp con 0.50 colonias, y finalmente con 0.17 colonias para dos especies, *A. flavus* y *A. candidus*. Ahora para M5 se desarrollaron tres clases de hongos de almacén, destacándose *Penicillium* sp con 0.83 colonias, seguida de *A. terreus* con 0.50 colonias y finalmente *A. flavus* con 0.17 colonias. Y finalmente para M6 presentó la incidencia de las cuatro especies, destacando *A. flavus* con 2.83 colonias, después *Penicillium* sp con 0.83 colonias, posteriormente fue *A. terreus* con 0.50 colonias y finalmente *A. candidus* con 0.33 colonias.

Se observa, que para las seis marcas de totopos de maíz nixtamalizado, M6 fue la marca que presentó la mayor incidencia de hongos de almacén, por lo tanto la menor calidad sanitaria; y M2 fue la marca que presentó la menor incidencia de hongos de almacén por lo tanto la mejor calidad sanitaria con respecto a hongos de almacén.



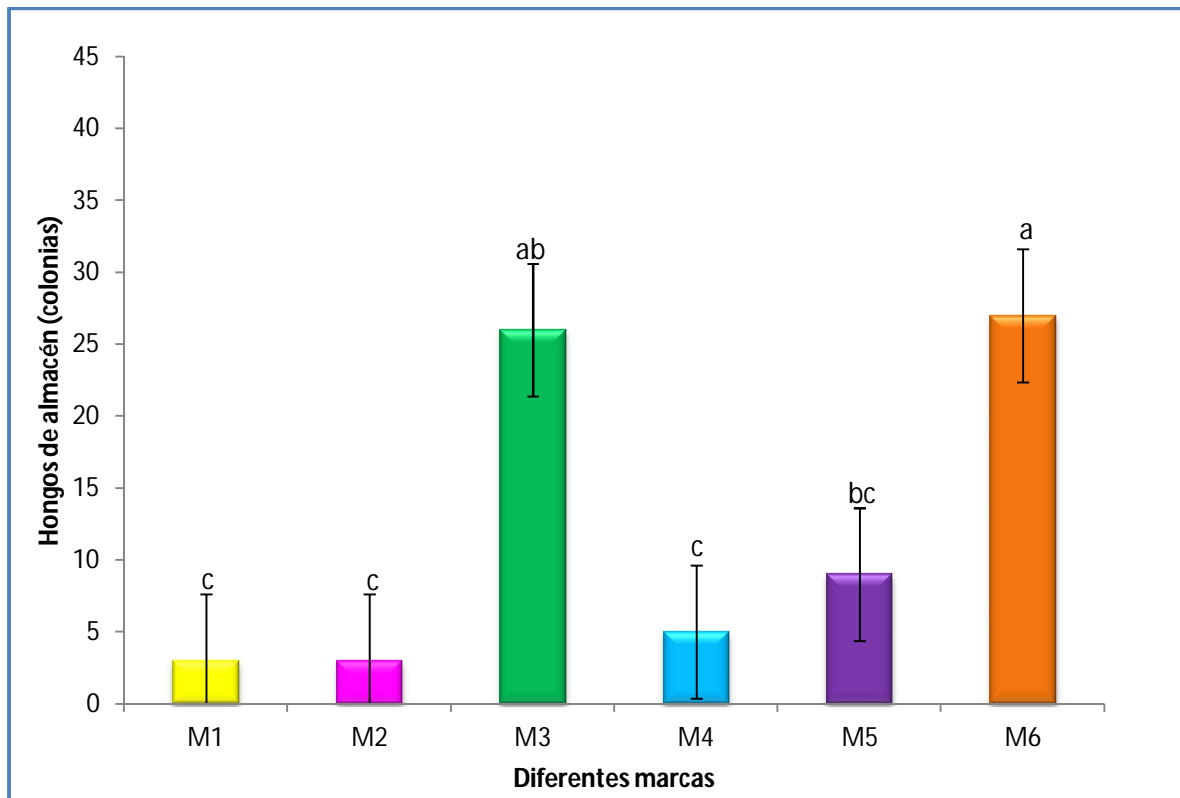
**Cuadro 17. Media de hongos de almacén presentes en las muestras de seis marcas de totopos de maíz nixtamalizado**

Marca	<i>Penicillium</i> sp (colonias)	<i>Aspergillus terreus</i> (colonias)	<i>Aspergillus flavus</i> (colonias)	<i>Aspergillus candidus</i> (colonias)
<b>M1</b>	0.17	0.00	0.17	0.17
<b>M2</b>	0.33	0.00	0.00	0.17
<b>M3</b>	4.00	0.33	0.00	0.00
<b>M4</b>	0.50	0.00	0.17	0.17
<b>M5</b>	0.83	0.50	0.17	0.00
<b>M6</b>	0.83	0.50	2.83	0.33

En la Figura 28 se presenta el análisis estadístico correspondiente a los hongos de almacén para las seis marcas de totopos de maíz nixtamalizado, aunque M6 fue ligeramente mayor a M3 en cuanto a incidencia de hongos de almacén, no fue significativamente diferente a M3, pero si fue significativamente diferente a M1, M2, M4 y M5, siendo que M1 y M2 presentaron la misma incidencia de hongos de almacén, seguidas de M4. Por lo que se puede decir que M6 fue la que presentó la menor calidad sanitaria con respecto a hongos de almacén, coincidiendo con el análisis elaborado con respecto a los tres procesos de manufactura.

De los resultados obtenidos con respecto a hongos de almacén, se observa que el género *Penicillium* sp estuvo presente en las seis marcas de totopos analizadas, y que de las cuatro clases de hongos de almacén identificados tres especies de hongos que se identificaron corresponden al género de *Aspergillus*. Estos dos géneros se desarrollan en granos, principalmente, después de su cosecha si algunas de las condiciones ambientales y su manejo son favorables para ellos, son capaces de proliferar en el campo y en el almacén. Por lo tanto el maíz seguirá teniendo el riesgo de ser contaminado en el almacén. La infección del grano de maíz por el hongo en el almacén sólo requiere aplicar tecnologías disponibles como el secado y la aireación en los almacenes y silos para evitar el calentamiento del grano (Méndez y Moreno, 2007).





**Figura 28. Colonias de hongos de almacén presentes en las seis marcas de totopos de maíz nixtamalizado. Medias con letras diferentes entre proceso existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).**

Un aspecto a resaltar de estos hongos de almacén es que algunos géneros, como es el caso de *Aspergillus*, que es un hongo termorresistente, es decir que crece a una temperatura mínima de 35 °C y también puede producir micotoxinas como la patulina, citrinina, citroviridina y gliotoxina (Suárez, 2010, Asensio, 1999).

Para el caso de las especies de *A. candidus*, estas crecen a humedades relativas alrededor del 80% y en cereales con contenidos de humedad de entre 14.5 - 16%, por lo que la presencia de este hongo indica que el grano está sufriendo deterioro avanzado (Ogawa, 1999; Suárez, 2010, Wharham *et al.* 1996).





### 1.1.1 Hongos de deterioro avanzado

En base a los antecedentes de los géneros de hongos de campo y con las características de la micro y macromorfología observadas con base a la metodología propuesta en este trabajo y que se reportan en Anexo F, a continuación se presentan los resultados del análisis estadístico correspondiente para los hongos de deterioro avanzado.

En el Cuadro 18 se presentan los resultados obtenidos para los tres procesos de elaboración de totopos de maíz nixtamalizado con respecto a hongos de deterioro avanzado, donde el proceso de freído presentó la incidencia de los tres géneros de hongos de deterioro y la especie *A. niger* fue la que tuvo mayor incidencia con 0.17 colonias, posteriormente con 0.11 colonias para *Monilia* sp y con 0.06 colonias para *Mucor* sp. Para las botanas que fueron elaboradas por el proceso de horneado, se observa que presentaron el desarrollo de dos géneros, *Mucor* sp con 0.17 colonias y 0.08 colonias para *Monilia* sp. Y finalmente para las botanas que fueron elaboradas por el proceso de deshidratación, se observa que presentaron la incidencia de dos clases de hongos de deterioro avanzado, *Aspergillus niger* con 1.50 colonias y para *Mucor* sp se observaron 0.50 colonias.

**Cuadro 18. Media de hongos de deterioro avanzado presentes en tres procesos de elaboración de totopos de maíz nixtamalizado**

Proceso	<i>Monilia</i> sp (colonias)	<i>Mucor</i> sp (colonias)	<i>Aspergillus niger</i> (colonias)
<b>Frito</b>	0.11	0.06	0.17
<b>Horneado</b>	0.17	0.08	0.00
<b>Deshidratado</b>	0.50	0.00	1.50

Se observa que los totopos de maíz nixtamalizado que fueron elaborados por el proceso de deshidratación son los que tuvieron numéricamente la mayor incidencia de hongos de deterioro avanzado, por lo tanto la menor calidad sanitaria; por el





contrario para los totopos de maíz nixtamalizado que fueron elaboradas por el proceso de horneado son los que tuvieron la menor incidencia de hongos de deterioro avanzado y con ello el proceso que mejor calidad sanitaria presenta con respecto a hongos de deterioro avanzado.

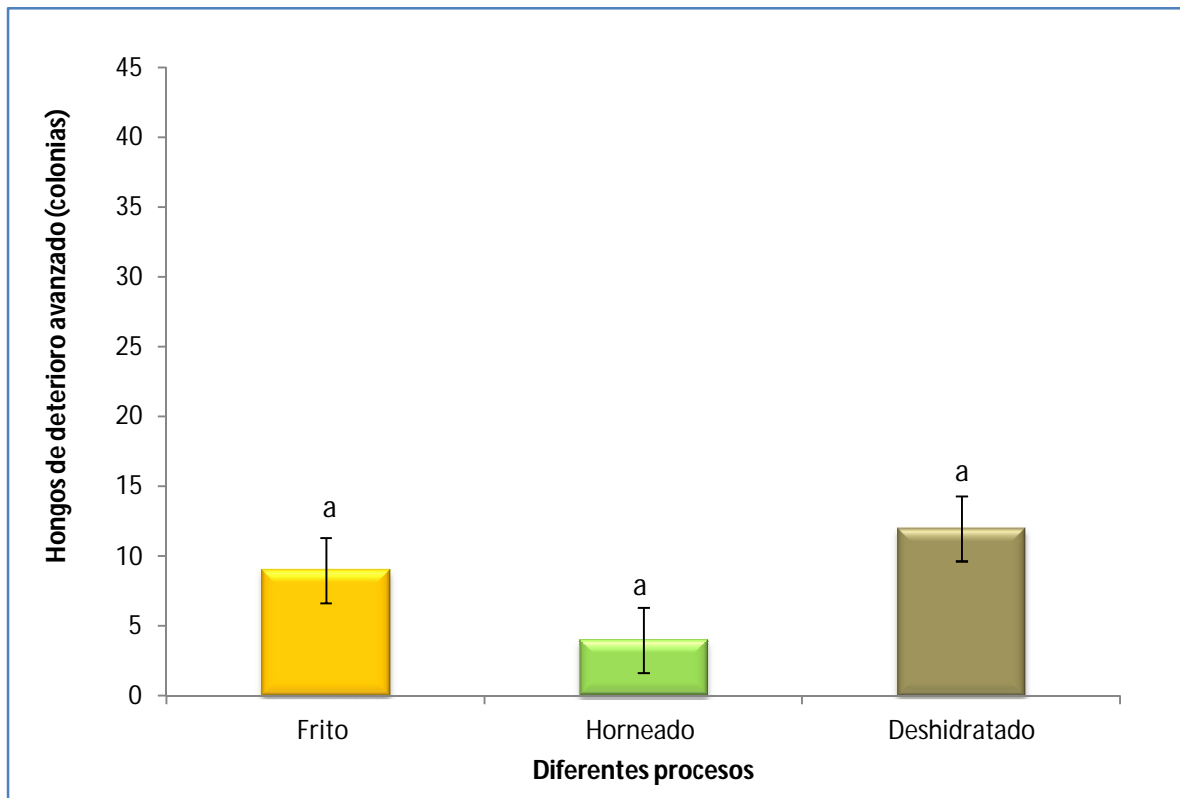
La presencia de *Monilia* en el maíz es el causante de la pudrición y la podredumbre, características que describen a esta especie, frecuentemente está presente en manzanas y en algunos frutos de hueso como cereza, ciruela. El crecimiento es entre 5 y 30 °C, aunque la óptima es a 25 °C (Moreno, 1988; Suárez, 2010).

El género *Mucor* sp tiene importancia por causar podredumbres durante el almacenamiento y distribución. El crecimiento de esta especie es en humedades relativas de entre 95 y 100%, a temperaturas entre 40 y 45 °C (Moreno, 1988; Suárez, 2010; Serna, 1996; Warham *et al.* 1996; Ogawa, 1999; Yoursef y Carlstrom 2006).

No es considerado como hongo común de almacén, sino más bien, un microorganismo que coloniza productos que se encuentran en avanzado estado de deterioro, sus conidios siempre se encuentran en las corrientes de aire (Moreno, 1988), por lo que si el lugar donde se elaboran los productos no se llevan a cabo BMP, las corrientes de aire contaminarán el producto final.

En la Figura 29 se presentan los resultados del análisis estadístico correspondiente a los hongos de deterioro avanzado, de los tres procesos de elaboración de totopos de maíz nixtamalizado, se observa que aunque las botanas elaboradas por el proceso de deshidratación tuvieron la mayor incidencia, numéricamente, que las botanas fritas y que las botanas horneadas, éstas no presentaron diferencia significativa entre los tres procesos, siendo las botanas horneadas las que presentaron una menor incidencia numérica de hongos de deterioro avanzado.





**Figura 29. Colonias de hongos de deterioro avanzado presentes en los tres procesos de manufactura de totopos de maíz nixtamalizado. Medias con letras diferentes entre proceso existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).**

Los resultados obtenidos muestran que las botanas horneadas presentaron la menor calidad sanitaria, seguida de las botanas fritas y por último las botanas horneadas, siendo estas últimas las que mejor calidad sanitaria mantienen respecto a los hongos de deterioro avanzado.

En el Cuadro 19 se presentan los resultados de hongos de deterioro avanzado desarrollados en las seis marcas comerciales. Se observa, que para M1, solo se tuvo la presencia de una colonia de hongo, en este caso se trata de *A. niger* con una incidencia de 0.17 colonias. También se observa que para M2, se tuvo la incidencia de tres clases de hongos de deterioro avanzado, la que tuvo mayor incidencia le corresponde a la especie *A. niger* con 0.33 colonias, y para las dos especies que también estuvieron presentes en M2, fue *Monilia* sp y *Mucor* sp, ambas con una







incidencia de 0.17 colonias. Para M3, solo se tuvo la incidencia de un género de hongo de deterioro avanzado, y se trata de *Mucor* sp, con 0.17 colonias. Enseguida M4 no tuvo presencia alguna de hongos de deterioro avanzado. Después para M5 se desarrollaron dos clases de hongos de deterioro avanzado, con 0.33 colonias para el género *Monilia* sp y con 0.17 colonias para *Mucor* sp. Y finalmente para M6, se observa que se presentaron dos clases de hongos, destacándose la incidencia de *A. niger* con 1.50 colonias y con 0.50 colonias para *Mucor* sp.

**Cuadro 19. Media de hongos de deterioro avanzado presentes en las muestras de seis marcas de totopos de maíz nixtamalizado**

Marca	<i>Monilia</i> sp (colonias)	<i>Mucor</i> sp (colonias)	<i>Aspergillus niger</i> (colonias)
M1	0.00	0.00	0.17
M2	0.17	0.17	0.33
M3	0.17	0.00	0.00
M4	0.00	0.00	0.00
M5	0.33	0.17	0.00
M6	0.50	0.00	1.50

Se observa que de las seis marcas, M6 fue la que presentó la mayor incidencia de hongos de deterioro avanzado, por lo tanto la menor calidad sanitaria; y que M4 fue la marca que presentó la menor incidencia y con ello la mejor calidad sanitaria con respecto a hongos de deterioro avanzado.

En la Figura 30 se presentan los resultados del análisis estadístico correspondiente para los hongos de deterioro avanzado en las seis marcas de totopos de maíz nixtamalizado, observándose que aunque M6 fue la marca que presentó la mayor

incidencia numérica de hongos de deterioro avanzado que el resto de las marcas, sin embargo, no existe diferencia significativa entre las marcas, por lo tanto la que menor calidad sanitaria presentó con respecto a hongos de deterioro avanzado. Por otro





lado M1 es la marca que presentó la menor incidencia de hongos de deterioro avanzado, siendo ésta la que mejor calidad sanitaria presenta con respecto a hongos de deterioro avanzado.

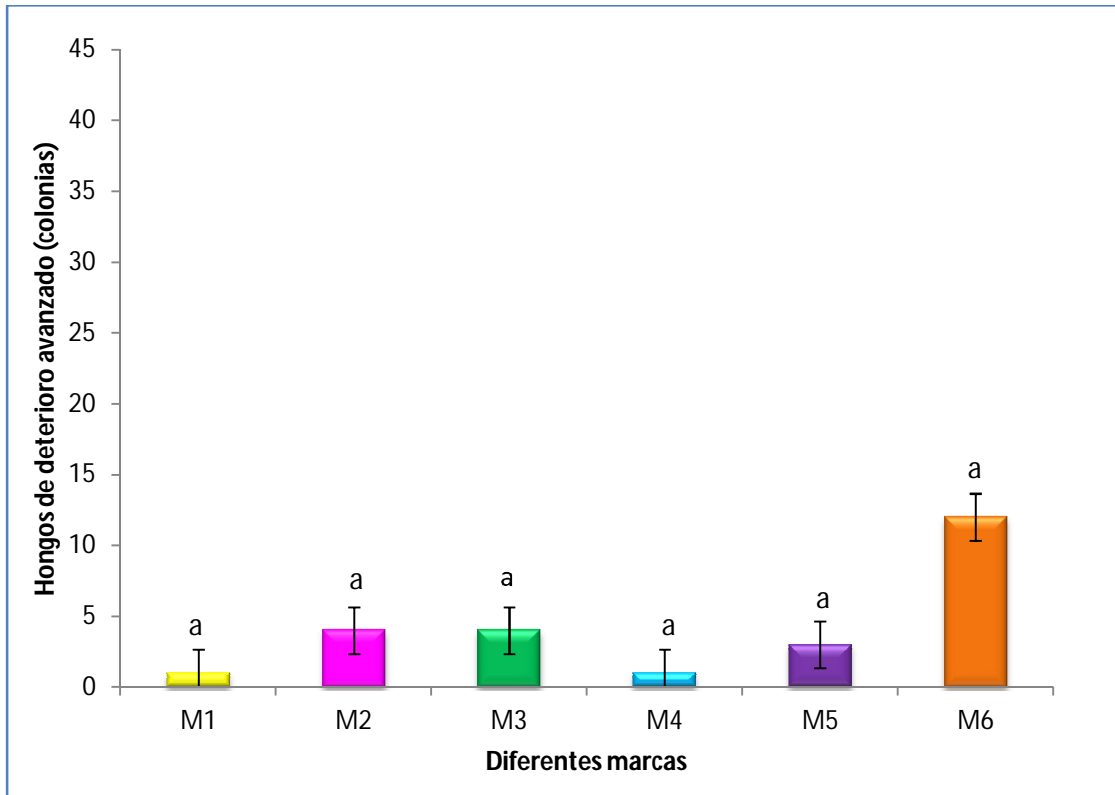


Figura 30. Colonias de hongos de deterioro avanzado presentes en las seis marcas de totopos de maíz nixtamalizado. Medias con letras diferentes entre proceso existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

#### 5.4 Aflatoxinas totales en totopos de maíz nixtamalizado

En la Figura 31, se presentan los resultados obtenidos de aflatoxinas totales en los tres procesos de manufactura. Se observa que las botanas que fueron elaboradas por el proceso de horneado fueron los que presentaron mayor producción de aflatoxinas con  $1.8 \mu\text{g}/\text{kg}$ , seguidos por los totopos deshidratados con  $1.5 \mu\text{g}/\text{kg}$  y finalmente los totopos que fueron elaborados por el proceso de freído con  $0.8 \mu\text{g}/\text{kg}$ .



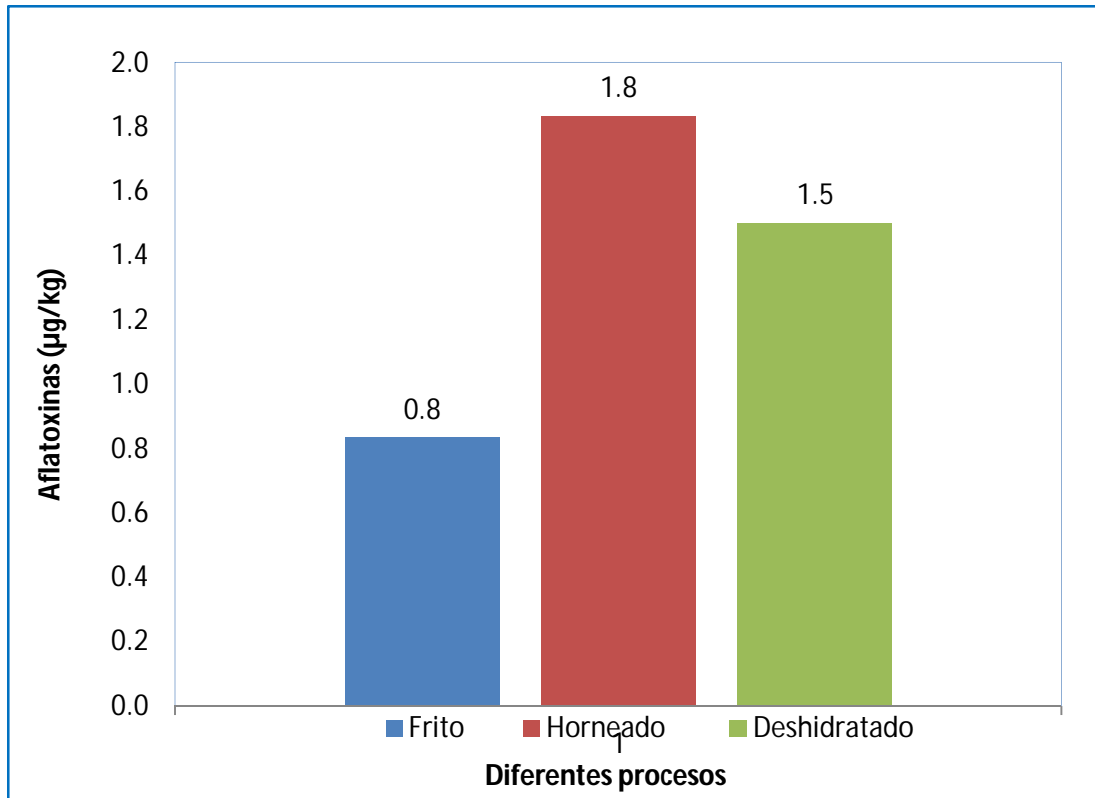


Figura 31. Aflatoxinas totales en los tres procesos de elaboración de totopos de maíz nixtamalizado

En la Figura 32, se presentan los resultados obtenidos de aflatoxinas totales para las seis marcas de totopos de maíz nixtamalizado. Se observa que M6 fue la marca que presentó numéricamente la mayor incidencia de aflatoxinas 1.5 µg/kg, seguida de M4 con 1.3 µg/kg; mientras que M2 y M5 ambas presentan una incidencia de 0.5 µg/kg y finalmente M3 con la menor incidencia de aflatoxinas totales 0.03 µg/kg. Cabe resaltar que M1 no tuvo presencia de aflatoxinas.



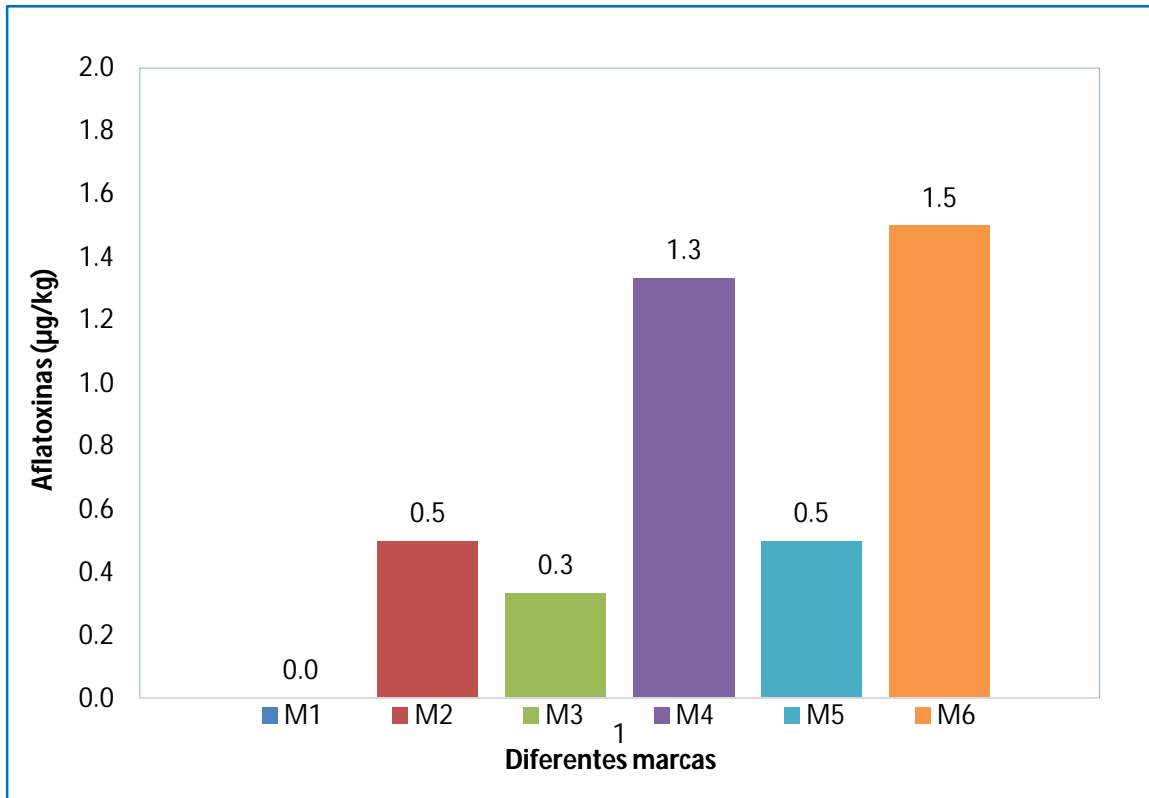


Figura 32. Aflatoxinas totales en seis muestras de totopos de maíz nixtamalizado

A pesar de que los niveles de aflatoxinas totales determinados en los totopos de maíz nixtamalizado, están por debajo de los límites máximos permitidos tanto en la NOM-187-SSA/SCFI-2002 como en la NOM-274-SSA (12 µg/kg), cinco de las seis muestras presentaron contaminación con valores que están entre 0.3 a 1.5 µg/kg. Por ello es importante poner atención a los almacenamientos y al transporte de maíz para evitar que niveles peligrosos de aflatoxinas lleguen al consumidor. También es importante destacar que las aflatoxinas tienen efecto acumulativo, por lo que no se debe de dejar aún lado la presencia de aflatoxinas aún en niveles por debajo de los establecidos en las normas 12 µg/kg (García *et al.* 2001).

Aunque los niveles de aflatoxinas obtenidos en este trabajo sean bajos, ninguna manera es deseable consumir alimentos con toxinas. Lo más conveniente sería producir maíz libre de contaminación por aflatoxinas en el campo y almacén para





preservar esa calidad sanitaria hasta la mesa del consumidor. La contaminación, más difícil de controlar, es la que ocurre en el campo, esto se debe a la dificultad que representa abarcar todas las variables que inciden en la producción de aflatoxinas como lo son las condiciones ambientales, las características del suelo y, por supuesto, los genotipos del maíz, dada por su susceptibilidad diferencial a la infección por los hongos toxígenos (Méndez y Moreno, 2007).

Los resultados obtenidos, muestran la importancia de las condiciones de temperatura y humedad relativa durante el almacenamiento de maíz, ya que las malas prácticas de cosecha (granos dañados o partidos), un maíz mal almacenado, puede desarrollar el crecimiento de hongos capaces de producir micotoxinas muy por encima de los límites superiores a las normas establecidas (Hernández, 2006)

El desarrollo de una micosis en el organismo es lento, por lo que datos epidemiológicos de sus efectos para la salud son difíciles de comprobar, pero sí es posible observar la frecuencia de existencia de sus productos metabólicos como son las aflatoxinas de ciertos hongos que pueden afectar la salud humana como es produciendo tumores y enfermedades hepáticas que se producen por la ingesta repetida a dosis bajas de micotoxinas por lo que se consideran de gran importancia en la industria manufacturera de maíz (Giron, 2007).

En México, el maíz, particularmente el importado, por lo general, está contaminado con aflatoxinas, cuyo principal riesgo radica en que su daño es acumulativo, por lo que puede afectar a los consumidores en diferentes plazos, dependiendo de las cantidades ingeridas (Méndez y Moreno, 2007).





## CONCLUSIONES

- Las bacterias que se identificaron en las seis marcas y los tres procesos de elaboración de los totopos de maíz nixtamalizado fueron *C. michiganensis*, *P. stewartii*, *X. campestris*, *P. avenae* y *P. syringae*, son bacterias mesófilas y que no son de interés a nivel de alimentos, ya que no causan enfermedades transmitidas por alimentos.
- Para los resultados de coliformes, se identificó la especie *Escherichia faecalis* que es de importancia a nivel de alimentos, aunque carecen de de significado sanitario cuando se presentan en alimentos, a pesar de que se consideran de origen fecal, algunas cepas son muy comunes en la vegetación.
- En el medio de coliformes también se desarrolló una cepa que fue identificada como *Proteus*, pero no se le considera como coliforme, ya que este género se presenta en la flora intestinal normal de los animales y del hombre y muchos son contaminantes comunes de los alimentos; su presencia no es suficiente para considerar como causantes de enfermedad y no es enteropatógeno para el hombre.
- Los resultado de hongos de campo que fueron identificados son *Cladosporium sp*, *Fusarium sp*, *Alternaria sp*, *Torula sp* y *Helminthosporium sp*, para los tres procesos de manufactura y las seis marcas comerciales que presentaron la incidencia de al menos una especie.
- Los hongos de almacén que fueron identificados son *Penicillium sp*, *A. terreus*, *A. flavus* y *A. candidus*, para los tres procesos de elaboración y las seis marcas que presentaron incidencia de al menos una especie.





- Los hongos de deterioro avanzado que fueron identificados fueron *Monilia* sp, *Mucor* sp y *A. niger* para los tres procesos de elaboración y las seis marcas que presentaron la incidencia de al menos una especie.
- Las malas prácticas de almacenamiento, tiempos y temperaturas de proceso, manejo, malas prácticas de manufactura, empaque y distribución de estos productos ocasionan una contaminación de bacterias, coliformes y hongos, por lo que su ingestión significa un grave peligro para la salud del consumidor.
- Los resultados de aflatoxinas totales obtenidos, de las seis marcas, solo M1 fue la que no presentó incidencia, tratándose de una marca a granel y elaborada por el proceso de freído. Sin embargo, las cinco marcas restantes, presentaron valores por debajo del límite máximo permitido de acuerdo con la NOM-187-SSA/SCFI-2002 y la NOM- NOM-274-SSA.
- De las seis marcas en estudio, M3, es la marca que presentó la menor incidencia bacterias mesófilas y de hongos, así mismo, no presentó contaminación por coliformes; y debido a que las bacterias mesófilas y los hongos identificados no son de interés a nivel alimenticio ya que no causan ETAS; por lo tanto, se concluye que es la marca que presentó la que mejor calidad sanitaria ya que se trata de una botana de maíz nixtamalizado elaborado por el proceso de freído, siendo ésta una opción de consumo.
- De las seis marcas en estudio M2, (botanas frita), también es la que presenta la menor incidencia de bacterias mesófilas y de hongos; sin embargo, es la marca que presenta incidencia de la especie coliforme. Caso semejante para M5, destacando que presentó la incidencia más alta de bacterias mesófilas y de hongos y una baja concentración de aflatoxinas; sin embargo, presentó la incidencia de la especie coliforme; por lo tanto las dos marcas son las que





presentaron la menor calidad sanitaria, ya que las coliformes pueden causar ETAS en el consumidor, por lo tanto la hipótesis propuesta no se cumple.

- La mayoría de los problemas con microorganismos son el resultado de contaminaciones posteriores causadas por la falta de higiene, no hay una adecuada limpieza de las instalaciones, el no aplicar BPM, mal almacén de materia prima, no cumplir con las BPM, por lo que se recomienda una mayor higiene para garantizar la calidad en los productos.







## RECOMENDACIONES

- La comparación entre los resultados de laboratorio obtenidos y los criterios microbiológicos establecidos puede brindar información importante tanto para el productor/elaborador como para los servicios de inspección en lo referente a la aceptabilidad del producto y/o el proceso.
- No basta con los criterios microbiológicos para lograr productos de buena calidad, sino que es de suma importancia verificar la aplicación de las buenas prácticas de manufactura u otros sistemas (por ejemplo HACCP) para asegurar que los microorganismos indeseables sean eliminados o minimizados a un nivel tal que no puedan ocasionar daño a los consumidores.
- Para una eficiente prevención de las enfermedades fungosas del maíz se puede considerar las siguientes recomendaciones: uso de semilla certificada, sana, ya que los problemas patológicos del grano de maíz almacenado, tanto para consumo como para semillas, empiezan a surgir desde el cultivo en el campo.
- La aplicación de plaguicidas sintéticos es la principal estrategia utilizada en el campo para el control de enfermedades; sin embargo, ya se conocen los efectos negativos del uso de productos químicos en el medio ambiente y en la salud humana y es por esa razón que se está estudiando la posibilidad de utilizar bacterias y hongos antagónicos como agentes de control biológico de los microorganismos patógenos para el hombre.
- Los principales cuidados para evitar la contaminación de los productos elaborados, es un buen en toda la cadena alimenticia, llevar a cabo buenas prácticas agrícolas, buenas prácticas de manufactura (implementación de prerrequisitos) y buenas prácticas de manejo (cuidados del consumidor). Algunos prerrequisitos primordial son las prácticas de higiene, ya que el





personal es una de las principales fuentes de contaminación de patógenos microbiológicos.

- La información que hasta ahora se tiene acerca de los síntomas y causas de desarrollo de bacterias mesófilas y coliformes es de gran utilidad debido a que permite el diseño adecuado de métodos para combatirlas y de esta forma propiciar un mejoramiento en la calidad de los productos finales.
- Realizar un análisis comparativo con la propuesta metodológica de esta investigación con lo establecido en las Normas Oficiales Mexicanas para la determinación de microorganismos en botanas de maíz nixtamalizado.





## BIBLIOGRAFÍA CITADA

- AGROINSA:** [http://www.agroinsa.com/prods\\_grits.html](http://www.agroinsa.com/prods_grits.html). Último acceso: 6 Diciembre 2011.
- Arauz, F. (1998).** "Fitopatología: un Enfoque Agroecológico". Universidad de Costa Rica. Costa Rica. pp.461.
- Asensio. A. (1999).** Boletín Informativo de la Sociedad Española de Microbiología. (27):15-18. (En línea). [Disponible en [http://www.semicrobiologia.org/pdf/actualidad/SEM27\\_15.pdf](http://www.semicrobiologia.org/pdf/actualidad/SEM27_15.pdf)]. Último acceso 27 Octubre 2013.
- Ayala, L., Rodríguez, R., Aguilar, C., Lara, F., Quero, A. (2004).** "Detección de *Clavibacter michiganensis subsp. nebraskensis* (Shuter, Hoff, Mandel y Lazar) Viaver y Mandel, Usando la Reacción en Cadena de la Polimerasa". Revista Mexicana de Fitopatología. Artículo. Julio-Diciembre. 002(22): 239-245. Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C. México. [Disponible en <http://www.societadmexicanadefitopatologia.org/archives/61222211.pdf>]. Último acceso 12 junio 2013.
- Barnett, H., Hunter, B. (1998).** "Illustrated Genera of Imperfect Fungi". 4ªed. The American Phytopathological Society APS PRESS. St. Paul, Minnesota. pp. 218.
- Bello, G. J. (2005).** "Calidad de Vida, Alimentos y Salud Humana". Díaz de Santos. España. pp. 365.
- Benítez, A. (2005).** "Avances Recientes en Biotecnología Vegetal e Ingeniería Genética de Plantas" Reverté. España. pp. 196.
- CANACINTRA-Cámara Nacional de la Industria de Transformación.** [[http://www.botanas.org.mx/botana/index.php?option=com\\_content&view=article&id=66&Itemid=192](http://www.botanas.org.mx/botana/index.php?option=com_content&view=article&id=66&Itemid=192)]. Último acceso 18 Enero 2012.
- Carrillo, L. (2003).** "Los Hongos de los Alimentos y Forrajes". Curso de Posgrado Regional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. En línea. Universidad Nacional de Salta. (En línea). [Disponible en





<http://www.unsa.edu.ar/matbib/micologia.htm>]. Último acceso 01 agosto de 2013.

**Centro de Estudios de las Finanzas Públicas. (2007).** Cámara de diputados. LX. Legislatura. Febrero. [Disponible en <http://www.cefp.gob.mx/intr/edocumentos/pdf/cefp/cefp0042007.pdf>]. Último acceso 18 noviembre 2011.

**CIMMYT-Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. (2004).** "Enfermedades del maíz; una guía para su identificación en el campo". 4ed. México. (En línea). [Disponible en [http://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=x4wC\\_JOmYL8C&oi=fnd&pg=PA1&dq=p.+avenae+en+maiz&ots=KkvMK3mjR1&sig=9yuUySp9wYq6h5A5P\\_ZCuaU6fPkA#v=onepage&q&f=false](http://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=x4wC_JOmYL8C&oi=fnd&pg=PA1&dq=p.+avenae+en+maiz&ots=KkvMK3mjR1&sig=9yuUySp9wYq6h5A5P_ZCuaU6fPkA#v=onepage&q&f=false)]. Último acceso 26 de septiembre de 2012.

**Carlstrom, C., Yousef, A. (2006).** "Microbiología de los Alimentos". Acribia. España. pp. 320

**Christensen, C.M. and H.H. Kaufmann. (1965).** "Deterioration of Stored Grains by Fungi. Phytophology 3. (En línea). [<http://www.amazon.com/Grain-Storage-C-Kaufmann-Christensen/dp/0196154928>].

**COFEPRIS-Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios. (2012).** Último acceso 24 de enero de 2012.

**CONACYT-Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. (2013).** "Propone CIAD Agentes de Control Biológico para Combatir la Pudrición de Tallos en Plantas de Maíz". Gaceta C y T México. Abril. Año 6, Numero 7. (En línea). [Disponible en <http://www.gacetacyt.org>]. Último acceso 12 abril 2013.

**Corry, J. C. (2003).** "Handbook of Culture Media for Food Microbiology: Progress in Industrial Microbiology". Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. (37): 629.

**Cruz, M. (2008).** "Caracterización Biológica de Maíces Resistentes y Susceptibles a Contaminación por Aflatoxinas". Tesis. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM.





- Cuevas, R. (2008).** "Ingeniería de Alimentos, Calidad y Competitividad en Sistemas de la Pequeña Industria Alimentaria con Énfasis en América Latina y el Caribe" *Boletín de Servicios Agrícolas*. Servicio de Tecnologías de Ingeniería Agrícola y Alimentaria. Dirección de Infraestructura Rural y Agroindustrias. Departamento de Agricultura y Protección del Consumidor. FAO. Italia. pp. 27- 33.
- Diccionario de Ciencias Hortícolas. (1998).** Mundi Prensa. Sociedad Española de Ciencias Hortícolas. España. (En línea). [Disponible en <http://books.google.com.mx/books?id=oW6dbRgw62gC&pg=PA343&dq=Prop%C3%A1gulo&hl=es&sa=X&ei=XU8GU4XDOsTQyAG2goDwAQ&ved=0CFcQ6AEwCA#v=onepage&q=Prop%C3%A1gulo&f=false>]. Último acceso 20 de Febrero de 2014.
- Diccionario Forestal. (2005).** Sociedad Española de Ciencias Forestales. Mundi Prensa. España. pp. 1311.
- Dixon R., Hamilton, P. (1981).** Effects of Feed Ingredients on the Antifungal Activity of Propionate. *Poultry Sci.* (60):2407.
- Doyle, P., Beuchat, R., Montville, T. (2001).** "Microbiología de los Alimentos. Fundamentos y Fronteras". Acribia. Zaragoza, España, p.69.
- Echandi, E. (1967).** "Manual de Laboratorio para Fitopatología". Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la O.E.A. Lima, Perú, p.44.
- FAO-Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (1973).** "El maíz en la Nutrición Humana". Colección FAO: Alimentación y nutrición. No. 25.
- FAO-Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (2011).** [Disponible en <http://www.fao.org/docrep/t0395s/T0395S02.htm>]. Último acceso. 17 noviembre 2011.
- Félix, A., Campas, O., Meza, M. (2005).** "Calidad Sanitaria de Alimentos Disponibles al Público de Ciudad Obregón, Sonora, México". *Revista de Salud Pública y Nutrición.* 3(6):1





- Fellows, P. (2000).** "Tecnología del Procesado de los Alimentos: Principios y Práctica". 2ed. Acribia. Zaragoza, España. pp.708.
- Figuroa, J. y González-H. (2001).** "La Tecnología de la Tortilla: Pasado, Presente y Futuro". Ciencia y Desarrollo. 27(156): 22-31. En línea. Disponible en <http://www.maiztortilla.com/es/introduccion/pasado.htm>. Último acceso 02 septiembre de 2013.
- FIRA-Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura.** Secretaria de Hacienda y Crédito Público. (En línea). Disponible en [\[http://www.sae.gob.mx/quienes/entidades\\_transferentes/informes\\_res/Fefa/Paginas/Fefa.aspx\]](http://www.sae.gob.mx/quienes/entidades_transferentes/informes_res/Fefa/Paginas/Fefa.aspx). Último acceso 24 Septiembre 2013.
- FOOD INFO Since (1999).** Organización. (En línea). Disponible en [\[http://www.food-info.net/team.htm\]](http://www.food-info.net/team.htm). Último acceso 11 Junio 2013.
- Forbes, B., Sahm, D., Weissfeld, A. (2009).** "Diagnóstico Microbiológico". 12 ed. Panamericana. Buenos Aires. pp. 1160. (En línea). [Disponible <http://books.google.com.mx/books?id=239cauKqSt0C&pg=PA1028&dq=Bailey+y+Scott,+diagnostico+bacteriol%C3%B3gico&hl=es&sa=X&ei=Y74jU4P1L9PcqAG10oGoCw&ved=0CC0Q6AEwAA#v=onepage&q&f=false>]. Último acceso 14 de Marzo de 2014.
- Frazier, W., Westhoff, D. (2000).** "Microbiología de los alimentos". 4ª ed. Acribia. España. pp. 681.
- Fucikovsky, L. (2002).** "Diseases of Some Tropical and Subtropical Plants Caused by Bacteria, Phytoplasmas and Spiroplasmas". Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Guadalajara. Colegio de Postgraduados. México. pp. 27-34.
- García, G., Matinez, R., Melgarejo, J. (2001).** "Inspección para aflatoxinas en el maíz almacenado o transportado en el estado de Sonora, 1998: Informe técnico". Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Serie Botánica 72(2): 187-193. (En línea). [Disponible en





- <http://www.ejournal.unam.mx/bot/072-02/BOT72205.pdf>. Último acceso 11 de junio de 2013.
- García, I. (2011).** "Alimentos Seguros: Guía Básica Sobre Seguridad Alimentaria". Díaz de Santos. España. pp. 172. (En línea). [Disponible en <http://books.google.es/books?id=sBUUavetruEC&pg=PA15&dq=bacterias+pato+genas+en+alimentos&hl=es&sa=X&ei=CC8CU7KTE-eayAGo4oE4&ved=0CFsQ6AEwCA#v=onepage&q=bacterias%20patogenas%20en%20alimentos&f=false>]. Último acceso 17 de Enero 2014.
- Gil, A., Ruíz, M. (2010).** "Tratado de Nutrición: Composición y Calidad Nutritiva de los Alimentos". Tomo II. 2da edición. Médica Panamericana. Madrid. pp. 786.
- Gilchrist, L. Fuentes, G. Martínez, C. (1995).** "Guía Práctica para la Identificación de algunas Enfermedades de Trigo y Cebada". Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). México, D.F.
- Giron, C. (2007).** "Determinación de la Calidad Microbiológica en Alimentos Balanceados para Caninos en el Mercado de Zumpango, Sacatepéquez". Tesis para obtener el grado de Médica Veterinaria. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Medicina y Zootecnia. Escuela de Medicina Veterinaria. Guatemala, 2007. [Disponible en [http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/10/10\\_1070.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/10/10_1070.pdf)] Último acceso 15 de Noviembre de 2012.
- Gómez, M, Waniska, R and Rooney, L. (1991).** "Starch Characterization of Nixtamalized Corn Flour. Cereal Chem". Revista. (En línea). [Disponible en [http://www.aaccnet.org/publications/cc/backissues/1991/Documents/68\\_578.pdf](http://www.aaccnet.org/publications/cc/backissues/1991/Documents/68_578.pdf)]. Último acceso 27 Octubre 2013.
- Gonzalez, D., Gonzalez, T., Barquera, S., Rivera, J. (2007).** "Alimentos Industrializados en la Dieta de los Preescolares Mexicanos". Salud Pública de México. Septiembre- Octubre. 49(5): 345, 346.
- [GCMA-Grupo Consultor de Mercados Agrícolas.** Abril 2011. Último acceso 14 de Enero de 2012.





- Gutiérrez, D., Gúmes, G. (1990).** "Poscosecha de Maíz en el Estado de Morelos". INIFAP. pp. 1-6.
- Guzmán, P. (2001).** Mitos y Realidades de las Aflatoxinas. Avance y perspectiva. Departamento de Biotecnología y Bioquímica de la Unidad Irapuato de CINVESTAV. Noviembre- Diciembre. (20):415-420.
- Hernández, R. (2006).** "Efecto de la Producción de Aflatoxinas en Granos de Maíz de Cuatro Variedades Diferentes". Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campus 1. UNAM.
- Hernández, Y., Trujillo, G. (2001).** "Detección de Bacterias Fitopatógenas en Semillas de Maíz (*Zea mays* L.). Artículo. Revista Interciencia. Marzo. 2(003). (En línea). [Disponible en <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33905404>> ISSN 0378-1844]. Último acceso 3 de Mayo de 2013.
- Ibarz, A., Barbosa, G. (2005).** "Operaciones Unitarias en la Ingeniería de los Alimentos". Mundi-Prensa. Madrid, España. pp. 864. (En línea). [Disponible en [http://books.google.com.mx/books?id=Bb4J6pzmG\\_wC&pg=PA583&dq=operaciones+unitaria+secado+de+alimentos&hl=es&sa=X&ei=OxqBUfbYFMTMrgGD44CgDQ&ved=0CD8Q6AEwAw#v=onepage&q=operaciones%20unitaria%20secado%20de%20alimentos&f=false](http://books.google.com.mx/books?id=Bb4J6pzmG_wC&pg=PA583&dq=operaciones+unitaria+secado+de+alimentos&hl=es&sa=X&ei=OxqBUfbYFMTMrgGD44CgDQ&ved=0CD8Q6AEwAw#v=onepage&q=operaciones%20unitaria%20secado%20de%20alimentos&f=false)]. Último acceso 20 Febrero 2014.
- IICA-Instituto Interamericano de Cooperación para la agricultura. (2004)** "Manual Tecnológico del Maíz Duro y de Buenas Prácticas Agrícolas para el Valle de Huaura". Departamento de Lima. Diciembre. Lima. pp. 139. (En línea). Disponible en [<http://books.google.com.mx/books?id=quYNAQAAIAAJ&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>] Último acceso 15 abril 2013.
- INSP: Instituto Nacional de Salud Pública. (2012).** (En línea). [Disponible en <http://mexico.cnn.com/salud/2010/01/29/cofepris-excluye-a-la-comida-chatarra-de-la-norma-para-adicionar-harinas>]. Último acceso 24 de enero de 2012.







- Illescas, R. (1943).** "La teoría química de la formación del nixtamal". Rev. Soc. Mex. Hist. Nat. (4): 129. En Yañes, 2005.
- Jay, J., Loessner, M., Golden, D. (2005).** "Microbiología Moderna de los Alimentos". 5 ed. Acribia. España. pp. 767.
- Klich, M (2002).** "Identification of Common: *Aspergillus* Species". United States Department of Agriculture. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands. pp. 116.
- Lindon G., Lorient, D. (1996).** Bioquímica Agroindustrial: Revaloración Alimentaria de la Producción Agrícola. Acribia. España.
- López, E. Rodríguez, P. (2009).** "*Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 y *Dickeya dadantii* 3937, diferentes modelos de infección en bacterias fitopatógenas". Actualidad SEM. Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas. Universidad Politécnica de Madrid-INIA. Campus de Montegancedo. Madrid. (En línea). [Disponible en <http://www.semicrobiologia.org/pdf/actualidad/47/47.pdf>]. Último acceso 20 Febrero de 2014.
- MacFaddin. J. (2003).** "Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Química". 3ed. Médica Panamericana. Argentina. pp. 850. (En línea). [Disponible en [http://books.google.com.mx/books?id=FYWSzy7EjROC&dq=mac+faddin&hl=es&source=gbs\\_navlinks\\_s](http://books.google.com.mx/books?id=FYWSzy7EjROC&dq=mac+faddin&hl=es&source=gbs_navlinks_s)]. Último acceso 14 de Marzo de 2014.
- Mangelsdorf, P.C. & Reeves, R.G. (1939).** "The origin of Indian corn and its relatives". Texas Agric. Exp. Sta. Bull. 574, p. 1-315. (En línea). [Disponible en <http://www.fao.org/docrep/003/x7650s/x7650s03.htm>]. Último acceso 27 octubre 2013
- Méndez, A; Moreno, E. (2007).** "Aflatoxinas en las tortillas de maíz". Revista Ciencia y Desarrollo. Artículo. Agosto 210(33): 14-19. (En línea). [Disponible en <http://www.conacyt.gob.mx/comunicacion/Revista/210/Articulos/Aflatoxinas/Aflatoxinas00.htm>]. Último acceso 1 Agosto 2013.





- Miranda, F., Chamorro, A., Rubio, S., (2007).** "Introducción a la Gestión de la Calidad". Delta. Madrid. (En línea). p.50. [Disponible en <http://books.google.com.mx/books>]. Último acceso 27 Octubre 2013.
- Moreno, B., Díes, V., García, M., Menes, I., Gutiérrez, L., Polledo, J. (2000).** "Microorganismos de los alimentos. Su significado y Métodos de enumeración. 2 ed. Vol. 1. Acribia. España. pp.439.
- Moreno, L. (2004).** "Estudio Comparativo de *A. flavus* Link y *A. flavus parasiticus* Speare en la Producción de Aflatoxinas Bajo Condiciones Diferentes de Humedad y Temperatura". Tesis. M.C. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM.
- Moreno, M. (1988).** "Manual para la Identificación de Hongos en Granos y sus Derivados". UNAM. México. pp.113.
- NOM-147-SSA1-1996.** Cereales y sus Productos. Alimentos a Base de Cereales, de Semillas Comestibles, Harinas, Sémolas o Semolinas o sus Mezclas.
- NOM-187-SSA1/SCFI-2002.** Productos Y Servicios. Masa, Tortillas, Tostadas y Harinas Preparadas para su Elaboración y Establecimientos donde se Procesan. Especificaciones Sanitarias. Información Comercial. Métodos de Prueba.
- Ogawa, J. (1999).** "Plagas y Enfermedades de los Frutales de Hueso". Mundi Prensa. Madrid, España. p.10. (En línea). [Disponible en [http://books.google.com.mx/books?id=JpEqjZg\\_tQsC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](http://books.google.com.mx/books?id=JpEqjZg_tQsC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)].
- Ospina, J. (2002).** "Características Físico Mecánicas y Análisis de Calidad de Granos". Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería. Departamento de Ingeniería Agrícola. Bogotá. pp.228.
- Paredes, O., Guevara, F., Bello, L. (2006).** "Los Alimentos Mágicos de las Culturas indígenas mesoamericanas". Fondo de Cultura Económica, México, p.30. (En línea). [Disponible en [http://books.google.com.mx/books?id=yokrcgpT7rwC&pg=PA38&dq=proceso+de+freido&hl=es&ei=0cXVToi\\_I5CasgKF0PGpDw&sa=X&oi=book\\_result&ct=r](http://books.google.com.mx/books?id=yokrcgpT7rwC&pg=PA38&dq=proceso+de+freido&hl=es&ei=0cXVToi_I5CasgKF0PGpDw&sa=X&oi=book_result&ct=r)]





[esult&resnum=3&ved=0CDUQ6AEwAg#v=onepage&q&f=false](#)]. Último acceso 25 Agosto 2013.

**Parrilla, M., Vázquez, J., Sáldate, E., Nava, L. (1993).** "Brotos de Toxiinfecciones Alimentarias de Origen Microbiano y Parasitario". Salud Pública de México. Septiembre- Octubre. 35(5):457. (En línea). [Disponible en [http://bvs.insp.mx/rsp/\\_files/File/1993/199335\\_456-brotos.pdf](http://bvs.insp.mx/rsp/_files/File/1993/199335_456-brotos.pdf)]. Último acceso 23 Julio 2013.

**Pascual, A. (2000).** "Microbiología Alimentaria: Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas. 2ªed. Díaz de Santos. Madrid, España, p. 447.

**Pérez N., Estrada. C., Chel, G., Betancur, A. (2005).** "Caracterización Física de Extruidos Preparados con Mezclas de Harinas de Maíz QPM (*Zea mays L.*) y Frijol Lima (*Phaseolus lunatis L.*)". Revista Mexicana de Ingeniería Química. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, pp.145-146.

**Plascencia, G. (1998).** "Comportamiento de maíz pigmentado en la elaboración de frituras, empleando el método de nixtamalización tradicional y harina instantánea preparada por un proceso hidrotérmico". Tesis de licenciatura para obtener el título de Ingeniero Industrial. Universidad de Chapingo.

**Prieto, M., Mouwen, J., López, S., Cerdeño, A., (2008).** "Concepto de Calidad en la industria agroalimentaria". Revista Interciencia. 33(4):258-264. (En línea). [Disponible en <http://www.scielo.org.ve/pdf/inci/v33n4/art06.pdf>]. Último acceso 15 Mayo de 2013.

**Ramakrishna, B. (1989).** PROCIANDINO-Programa Cooperativo de Investigación Agrícola para la Subregión Andina. "IX Seminario. Manejo de Enfermedades y Plagas del Maíz". Instituto Colombiano Agropecuario. (En línea). [Disponible en <http://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=I4ttAAAAIAAJ&oi=fnd&pg=PA149&dq=pseudomona+avenae+en+maiz&ots=ZAH9gBOqHw&sig=J-2cxOnFCqAfzVUPfII5TsJPOdl#v=onepage&q&f=false>]. Último acceso 02 Julio de 2013.





- Ramírez, G., Luna, M., Mejía, C., Velázquez, M., Tsuzuki, R., Vierna, G., Hernández, G., Müggenburg, R. (2001).** "Manual de Prácticas de Microbiología General". Laboratorio de Microbiología Experimental. Facultad de Química, UNAM. México, pp.290.
- Ramos, V., Valdivia, B., Montañez, J. (2012).** "Alternativa Para Reducir la Absorción de Aceite en Papas Fritas". Artículo. Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila. 4(7). p 7. (En línea). [Disponible en <http://www.postgradoeinvestigacion.uadec.mx/Documentos/AQM/AQM7/5>].
- Ray, B., Bhunia, A. (2008).** "Fundamentos de Microbiología de los Alimentos", 4ed. Mc Graw-Hill. México. pp. 352.
- Rebolledo, H. (2002).** "Manual SAS por Computadora: Análisis Estadístico de Datos Experimentales". Trillas. México. pp.208.
- Revilla, J., Rodríguez, R. Aguilar, C., Ramírez, E., Lara, F. (2009).** "Detección de *Pantoea stewartii* Mergaert, Verdonck & Kersters directamente de la semillas de maíz utilizando INMNO –PCR". Universidad y Ciencia. Revista Scielo. 25 (3). (En línea). [Disponible en [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0186-29792009000300006&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0186-29792009000300006&script=sci_arttext)]. Último acceso 26 Septiembre de 2012.
- Rocha, JC., Rodríguez, R; Aguilar, C; Ramírez, E., Lara, F. (2009).** "Detección de *Pantoea stewartii* Mergaert, Verdonck & Kersters directamente de la semilla de maíz utilizando INMUNO –PCR". Universidad y ciencia. (En línea). 25(3): 245-252. [Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0186-29792009000300006&lng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-29792009000300006&lng=es)]
- Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación-SAGARPA. (2014).** <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>. Último acceso 03 de Febrero de 2014.
- Serna, S. (1996).** "Química, Almacenamiento e Industrialización de los Cereales". A.G. T. ITESN- Campus Monterrey. Ed. A.G.T. pp 521.





- Schaad, N., Jnes, J., Chun, W. (2001).** "Laboratory Guide for Identification Plant Pathogenic Bacteria". 3ed. The American Phythopalogical Society. USA. p. 6-9.
- Sosa-M., Perdomo, R., W, B., Salazar, C. (1997).** "Manual de Técnicas para el Diagnóstico de Enfermedades de las Plantas: Diagnóstico Fitosanitario II". Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. Agencia de Cooperación Técnica (IICA). México. p. 93.
- Suárez, C. (2010).** "Determinación de la Microflora Micótica en 7 Tipos de Chile (*Capsicum annum* L) de 1ª Calidad Evaluados en Cuatro Centros de Distribución del Área Metropolitana. Tesis Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campus 1. UNAM.
- Tortola, G., Funke, B., Case, C. (2007).** Introducción a la Microbiología. Médica Panamericana. 9ed. Argentina. Pp.988. (En línea). [Disponible en <http://books.google.com.mx/books?id=Nxb3iETuwpIC&pg=PA168&dq=siembra+de+bacterias+en+medios+de+cultivo&hl=es&sa=X&ei=HB0hU8L6Dee-2gWCmYCwBQ&ved=0CC0Q6AEwAA#v=onepage&q&f=false>]. Último acceso 12 de Marzo 2014.
- Uribarren, T. (2012).** "Micotoxicosis". Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. En línea (<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/micotoxicosis.html>) Último acceso 23 Septiembre de 2013.
- Vera, G. (2004).** "Introducción a la Microbiología". Universidad Estatal a Distancia. p.86. (En línea). [Disponible en [http://books.google.com.mx/books?id=K\\_ETVnqnMZIC&printsec=frontcover&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q=mayoria%20de%20las%20personas&f=false](http://books.google.com.mx/books?id=K_ETVnqnMZIC&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q=mayoria%20de%20las%20personas&f=false)]. Último acceso 20 Febrero 2014.
- Valdés, E. (2009).** "La Actualidad del Segmento de las Botanas en México". Revista. Industria Alimenticia para los Procesadores de Alimentos Latinoamericanos. (En línea). [Disponible en <http://www.industriaalimenticia.com/articles/print/la->





actualidad-del-segmento-de-las-botanas-en-mexico]. Último acceso 27 octubre 2013.

- Vélez, J. H y Hernández, J.X. (1999).** "Proceso de Fritura de Alimentos: una revisión". Editorial: Centro de Información Tecnológica (CIT). *10* (2):128- 134.
- Vicam Science and Technology. (1999).** Mycotoxin Testing System Aflatest. Somerville, M.A.
- Warham; E. Butler, L., Sutton, B. (1996).** "Ensayos para la Semilla de Maíz de Trigo: Manual de Laboratorio". CYMMIT. Sistemas Sostenibles de Maíz y Trigo. (En línea). [Disponible en [http://books.google.com.mx/books/p/cimmyt?id=Dc33MXPDP08C&pg=PP5&dq=Ensayos+para+la+semilla+de+ma%C3%ADz+de+trigo:+Manual+de+Laboratorio&hl=es&cd=1&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=true](http://books.google.com.mx/books/p/cimmyt?id=Dc33MXPDP08C&pg=PP5&dq=Ensayos+para+la+semilla+de+ma%C3%ADz+de+trigo:+Manual+de+Laboratorio&hl=es&cd=1&redir_esc=y#v=onepage&q&f=true)]. Último acceso 15 de Enero 2013.
- White, D. (1999).** "Compendium of Corn Disease". 3ra ed. The American Phytopathological Society (APS PRESS). United States of America.
- Yañez, O. (2005).** "Nixtamalización por Extrusión de las Fracciones del Grano de Maíz para la Obtención de Harinas Instantáneas". Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencia Avanzada. Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada. Instituto Politécnico Nacional.





## ANEXOS

### ANEXO A- PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

#### Medio infusión de papa-dextrosa-agar (IPDA)

##### Material y/o equipo

- Autoclave Marca Veco® S.A de C.V número de inventario 890625 UNAM
- Torunda (tapón)
- Probeta de 500 ml
- Embudo de vidrio
- Matraz Erlenmeyer de 500 ml
- Tela de cielo
- Balanza

##### Reactivos

- 1.5 L de Agua destilada
- 200 g de Papa blanca
- 20 g de dextrosa marca Bioxon®
- 15 g de Agar bacteriológico marca BD®

##### Procedimiento

1. Para la autoclave debe de cerciorarse de que el nivel de agua debe de estar a la mitad del tanque (Figura 33a).
2. Pesar 200 g de papa blanca natural
3. Hervir la papa blanca natural con 1000 ml de agua destilada durante hasta que tenga una textura suave.
4. Filtrar con manta de cielo (Figura 33c).
5. Pesar 15 g de dextrosa y 11.25 g de agar
6. Adicionar la dextrosa y el agar y aforar hasta 1000 ml (Figura 33c).
7. Verter en matraz Erlenmeyer, se tapa con una torunda y esterilizar a 1.4 kg/cm<sup>2</sup> durante 20 min (Figura 34d).
8. Dejar enfriar a temperatura ambiente. No dejar que solidifique.
9. Verter en cajas de Petri aproximadamente 10 ml (Figura 34 g) en un área estéril (campana de flujo laminar (Figura 34f) y dejar enfriar en la campana durante 24 h o hasta que solidifique (Figura 34 h) (Moreno, 1988)





Figura 33. Preparación de medios y esterilización



Figura 34. Vertido de medio en placa

### Medio levadura-dextrosa-carbonato de calcio [YDC]

Para la preparación de este medio se utilizan los mismos materiales, equipos que para IPDA.

#### Reactivos

- 10 g de levadura
- 20 g de glucosa
- 20 g de carbonato de calcio
- 15 g de agar
- 1000 ml de agua destilada

#### Procedimiento

1. Pesar los reactivos y aforar a 1000 ml.
2. Verter a un matraz Erlenmeyer se tapan con una torunda y se esterilizan a  $1.4 \text{ kg/cm}^2$  durante 20 min.







3. Se deja enfriar a temperatura ambiente.
4. Verter aproximadamente 10 ml en cajas de Petri, éstas deben estar previamente enfriadas a una temperatura aproximada de 0 °C para evitar que haya sedimentación del carbonato (Figura 33). Dejar solidificar en zona estéril a temperatura ambiente (Sosa *et al.* 1997).

### **Medio B de King**

Para la preparación de este medio se utilizan los mismos materiales, equipos que para IPDA.

#### **Reactivos**

- 15 g de agar
- 20 g de peptona
- 10 g de glicerol
- 1.5 g de fosfato monoácido de potasio
- 1.5 g de sulfato de magnesio

#### **Procedimiento**

1. Pesar los reactivos y aforar hasta 1000 ml
2. Verter en un matraz Erlenmeyer y tapar con una torunda y se esteriliza a 1.4 kg/cm<sup>2</sup> durante 20 min
3. Seguir del paso número 7 al número 9 del preparación del IPDA (Pascual, 2000).

### **Medio agar de bilis y rojo violeta [ARV]**

Para la preparación de este medio se utilizan los mismos materiales, equipos que s utilizados en la preparación del medio de IPDA.

#### **Reactivos**

- 41.5 g de agar de bilis y rojo violeta

#### **Procedimiento**

1. Pesar los reactivos y aforar hasta 1000 mL.
2. Se vierte a un matraz Erlenmeyer, se tapa con una torunda y se esteriliza a 1.4 kg/cm<sup>2</sup> durante 20 min
3. Seguir del paso 7 al 9 del medio IPDA (Corry, 2003).

### **Medio para prueba oxidación-fermentación OF**

#### **Reactivos**

- 2 g de peptona de caseína
- 5 g de Cloruro de sodio (NaCl)





- 0.3 g Fosfato dipotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )
- 3 g de agar
- 3 ml azul de bromotimol (BTM) (solución 1%)
- 10 g de hidratos de carbono

#### **Procedimiento**

1. Pesar los reactivos, rehidratar con agua destilada y calentar con suavidad la solución.
2. Verter en un matraz Erlenmeyer, homogenizar y verter 10 mL en tubos de ensaye. Tapar esterilizar a 121°C, 1.5lb durante 10 min.
3. Enfriar el medio estéril y refrigerar para la conservación (MacFaddin, 2003).

#### **Preparación de sellador de parafina para prueba de oxidación-fermentación**

##### **Reactivos**

- 100 mL de parafina líquida
- 1 mL de agua destilada
- 1 botella de plástico de capacidad de 200 mL.

##### **Procedimiento**

1. En una botella en 200 mL agregar 1 mL de agua. Después agregar 100 mL de parafina líquida y esterilizar a 121°C, 1.5lb, 15 min.
2. Dejar entibiar y verter un poco en tubo de ensaye con medio para prueba OF (MacFaddin, 2003).

#### **Medio para prueba motilidad**

##### **Reactivos**

- 10 g de peptona
- 5 g de Cloruro de sodio (NaCl)
- 3 g Extracto de carne
- 3 g de agar
- 1000 ml de agua

#### **Procedimiento**

4. Pesar los reactivos, rehidratar con agua destilada y calentar con suavidad la solución.
5. Verter en un matraz Erlenmeyer, homogenizar y verter 10 mL en tubos de ensaye. Tapar esterilizar a 121°C, 1.5lb durante 10 min.
6. Enfriar el medio estéril en posición vertical y refrigerar, de 4 a 10°C, para la conservación (MacFaddin, 2003).





## ANEXO B- DIFERENCIACIÓN DE GÉNEROS AISLADOS DE BACTERIAS MESÓFILAS

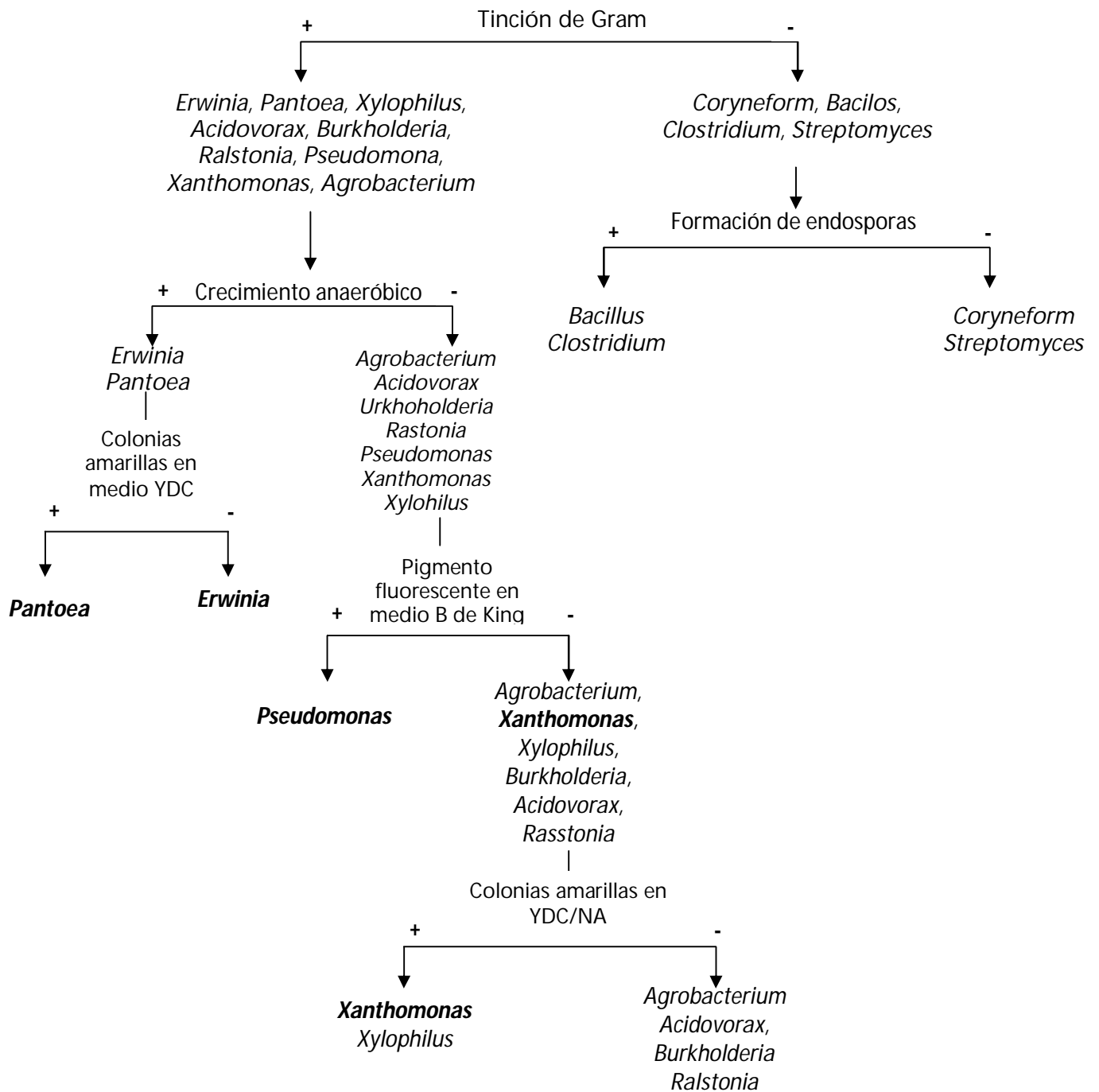


Figura 35. Diferenciación de géneros comúnmente aislados de bacterias  
Fuente: Schaad *et al.* 2001.





### ANEXO C- BACTERIAS MESÓFILAS IDENTIFICADAS

De los resultados obtenidos en las muestras de totopos de maíz nixtamalizado, se observó el crecimiento bacteriano de pequeñas colonias de las que se identificaron cinco especies de bacterias que fueron identificadas con ayuda de pruebas bioquímicas, mediante observación de características de macro y micromorfología y con ayuda de medios selectivos como fueron: tinción de Gram (Figura 36), prueba de catalasa (Figura 37), prueba de motilidad (Figura 38), prueba de formación de endosporas (Figura 39) y prueba de oxidación-fermentación OF (Figura 40).

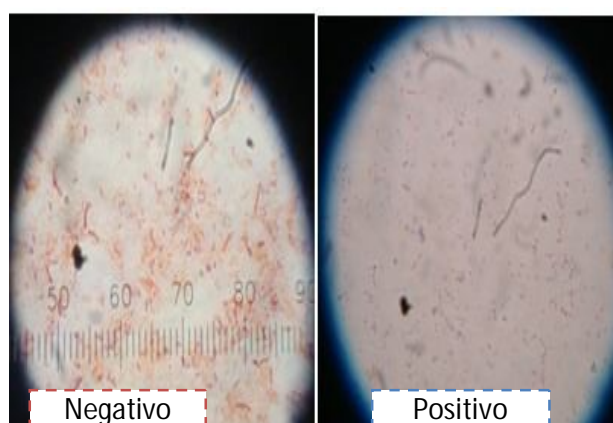


Figura 36. Tinción de Gram

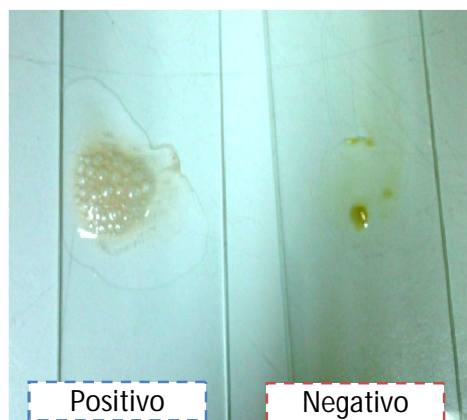


Figura 37. Prueba de peroxidasa





Figura 38. Prueba motilidad

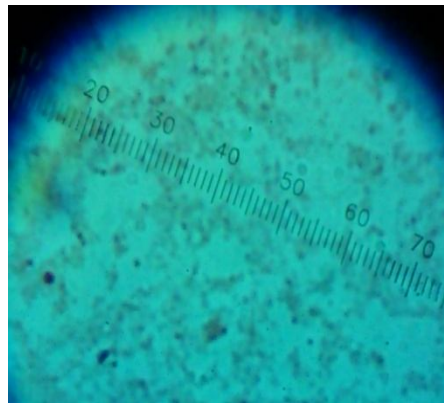
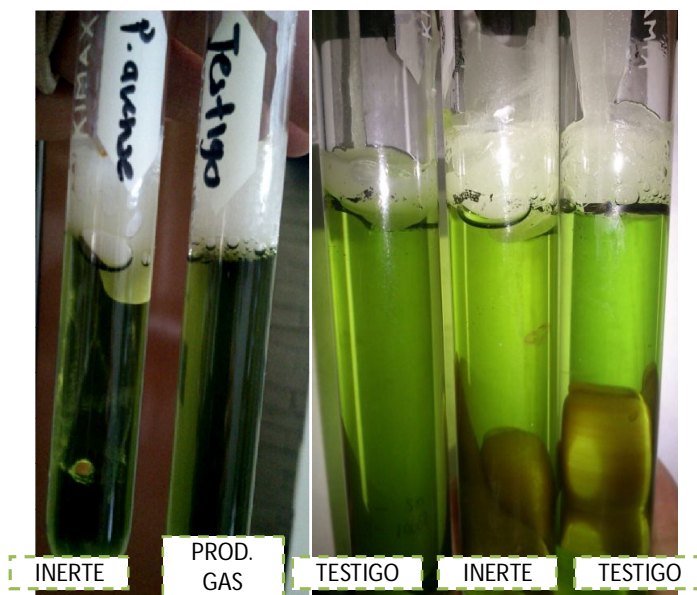


Figura 39. Prueba formación de endosporas (40x)





**Figura 40. Prueba oxidación-fermentación OF**

En la Figura 41 se presentan las características de la macromorfología observada en el medio selectivos, para la bacteria mesófila identificada como *Pseudomonas avenae* (de acuerdo con lo propuesto por Schaad *et al* (2001). En la Figura 35 para la identificación de bacterias a nivel de género), presentó elevación papilar, textura butirosa, en el medio YDC presentó color crema oscuro a café claro, características típicas de esta especie, y en el medio B de King no produjo fluorescencia. Con respecto a la micromorfología presentó forma de bacilo, y en cuanto a pruebas bioquímicas presentó tinción Gram negativa, catalasa positiva, móvil y no forma endosporas, prueba OF inerte sólo libera gas. En cuanto a la especie, de acuerdo con las claves especializadas de Wharham *et al.* (1996), White (1999) y Fucikovsky (2002) con los resultados anteriores y tomando en cuenta la literatura las características presentadas en los antecedentes corresponden a la especie *Pseudomonas avenae* (Figura 41).





**Figura 41. Colonias de *Pseudomonas avenae***

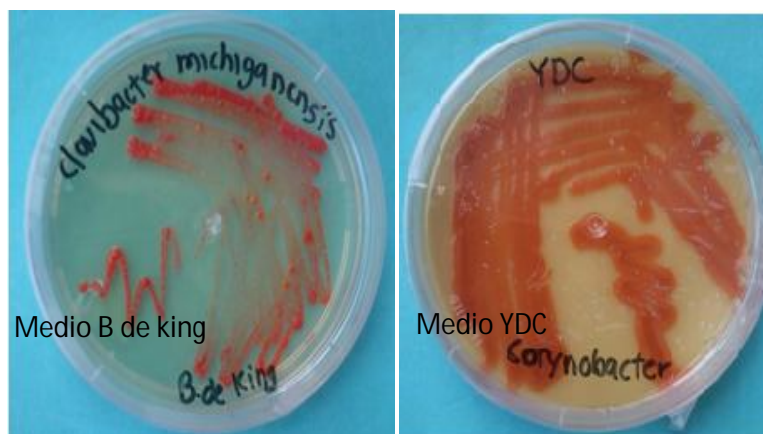
De acuerdo con lo propuesto por Schaad *et al* (2001) en la Figura 35 para la identificación de bacterias a nivel de género, se utilizó el medio selectivo YDC, en que se desarrollaron colonias de bacterias que presentaron la siguiente macromorfología: elevación papilar, textura butirosa, color crema oscuro con bordes enteros, elevación convexa, textura butirosa, presentaron color amarillo cristalino y las colonias eran fluidas. Al realizar la observación del frotis con el objetivo de inmersión 100x se lograron observar colonias en forma de bacilos y con respecto a las pruebas bioquímicas resultó Gram negativa. Para la pruebas de OF inerte sin cambio de color, presentó crecimiento facultativo (es decir que puede crecer con o sin oxígeno), catalasa positiva, no móvil y no forma endosporas. Posteriormente con ayuda de claves especializadas de Wharham *et al.* (1996), White (1999) y Fucikovsky (2002), con los resultados anteriores y tomando en cuenta la literatura presentada en los antecedentes se trata de la especie *Pantoea stewartii* (Figura 42).



**Figura 42. Colonias de *Pantoea stewartii***



De acuerdo con lo propuesto por Schaad *et al* (2001) en la Figura 35 para la identificación de bacterias a nivel de género, se utilizó el medio selectivo YDC, en el que se desarrollaron colonias de bacterias que presentaron la siguiente macromorfología: forma fusiforme, con los bordes enteros, elevada, con textura viscosa y color anaranjado intenso, colonias fluidas; con respecto a su micromorfología presentó forma de bacilo y los resultados de las pruebas bioquímicas Gram positiva, catalasa positiva, móvil, no forma endosporas. Para la prueba OF no presentó cambio de color, solo liberación de gas. Con los resultados obtenidos y utilizando claves especializadas de Wharham *et al.* (1996), White (1999) y Fucikovsky (2002) y tomando en cuenta la literatura presentada en los antecedentes se trata de la especie *Clavibacter michiganensis* (Figura 43).



**Figura 43. Colonias de *Clavibacter michiganensis***

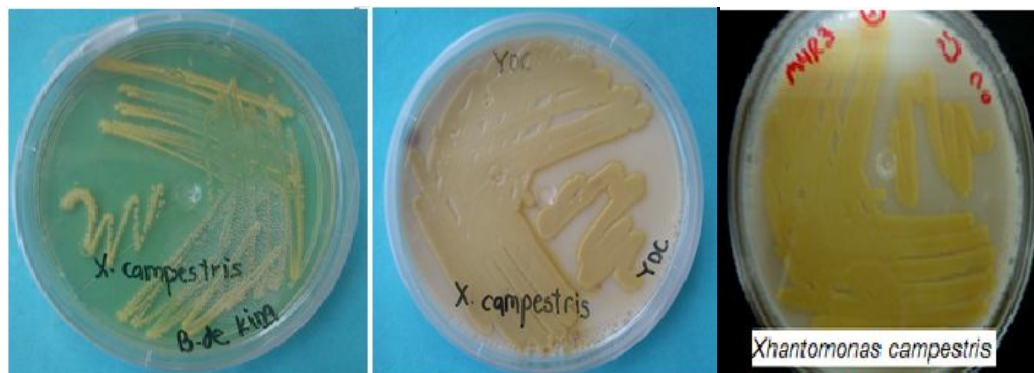
De acuerdo con lo propuesto por Schaad *et al* (2001) en la Figura 35 para la identificación de bacterias a nivel de género, se utilizó el medio selectivo YDC y B de King, presentaron la siguiente macromorfología: borde entero, su elevación convexa, la textura viscosa y fluida, en el medio YDC presentaron color amarillo intenso y viscosas, no fluorescieron en el medio B de King. Para su micromorfología presentó forma de bacilo y para los resultados de las pruebas bioquímicas Gram negativa, catalasa positiva, móvil, no forma endosporas. Para la prueba OF no presentó cambio de color, sólo presentó liberación de gas; con los resultados obtenidos y utilizando claves especializadas de Wharham *et al.* (1996), White (1999) y Fucikovsky (2002) con los resultados anteriores y tomando en cuenta la literatura presentada en los







antecedentes se trata de la especie corresponden con lo descrito en la literatura por White (1999) y se corresponde a la especie *Xanthomonas campestris* (Figura 44).



**Figura 44. Colonias de *Xanthomonas campestris***

Y finalmente también utilizando la propuesta de Schaad *et al* (2001) en la Figura 35 para la identificación de bacterias a nivel de género, las características de forma circular, bordes lobulados, su elevación plana, textura membranosa (no tan seca) y color amarillo opaco a café claro opaco, forma de bacilo, y para los resultados de pruebas bioquímicas presentó tinción Gram negativa, catalasa negativa, móvil, no forma endosporas. Para la prueba OF no fue reactiva, sólo presentó liberación de gas. En cuanto a la identificación a nivel de especie se utilizó medio B de king donde se diferencio fácilmente del aislamiento por una característica muy resaltante al producir fluorescencia a la luz *uv* ((Figura 45), características que permitieron identificar a la especie como *Pseudomonas syringae* que coincide con lo reportado por White (1999).



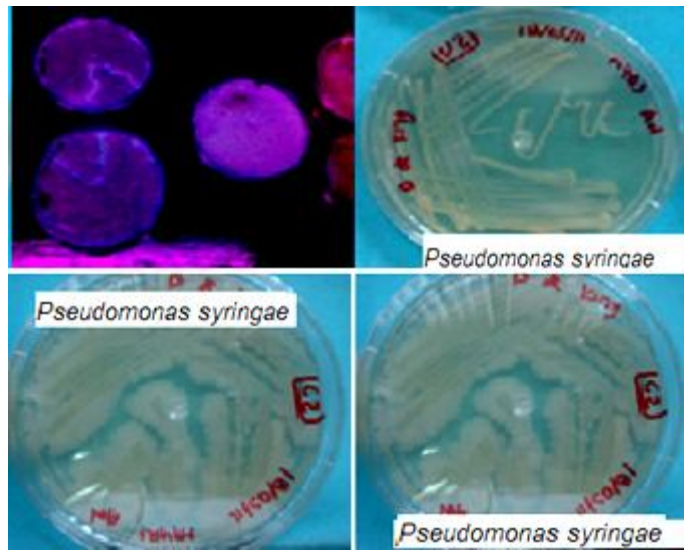


Figura 45. Colonias *Pseudomonas syringae*





## ANEXO D- HONGOS DE CAMPO

El maíz también está expuesto a la invasión de hongos latentes en el interior del grano, provenientes de la infección natural de la mazorca desde el cultivo, generalmente conocido como hongos de campo. Constituyen inóculos potenciales promotores de la muerte de la semilla en presencia de favorables condiciones de temperatura, humedad en cuyo caso predominan algunos de los hongos de campo como *Cladosporium* sp, *Fusarium* sp, *Alternaria* sp, *Torula* sp, *Helminthosporium* sp que fueron aislados e identificados en las muestras de los totopos de maíz nixtamalizado los cuales se describen a continuación:

La siguiente colonia que se desarrolló fue *Alternaria* sp (Figura 46) y presentó las siguientes características: micelio aéreo de color gris verdoso con reverso negro parduzco, conidióforos con septos transversales y longitudinales color negro, coincidiendo con lo que descrito por Barnett y Hunter (1998). En este género de hongo las esporas se encuentran suspendidas en el aire con mayor frecuencia, así que está es una vía de contaminación de la materia prima, como el maíz, y en este caso el aire es el medio de transmisión de esta especie hacia la materia prima el rango de crecimiento está entre 0 y 35°C (Carrillo, 2003).

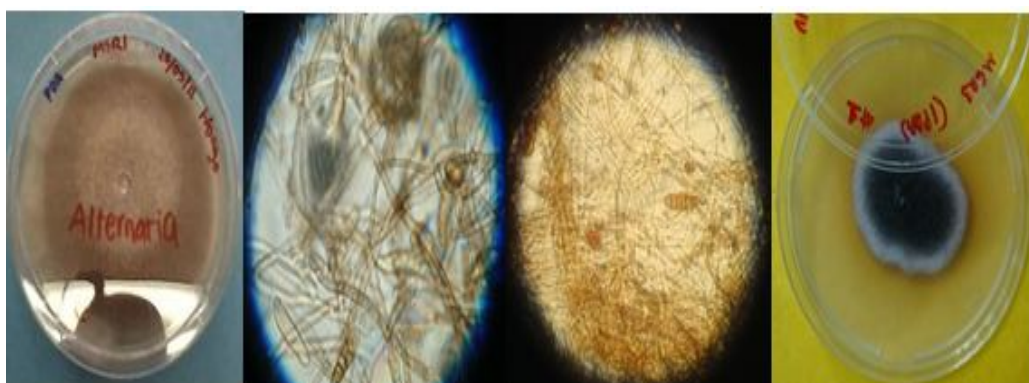


Figura 46. Colonias de hongos de *Alternaria* sp.

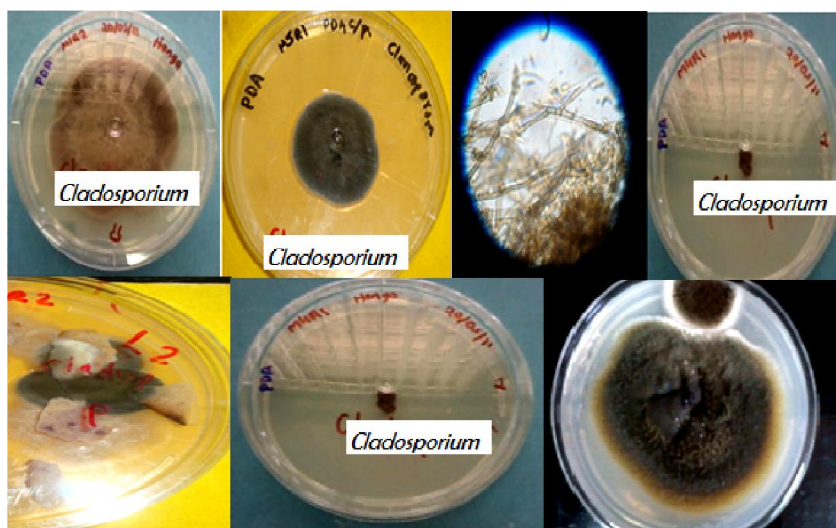
En las placas de medio con PDA se desarrollaron colonias de hongos de campo, de las que se aislaron e identificaron cinco especies (Figura 47). Empezando con el análisis





de las características micro y macro morfología de la colonia que tuvo una mayor incidencia, fue *Cladosporium* sp, presentando las siguientes características; conidióforos largos, ovoides, cilíndricos e irregulares, en forma de limón y oscuros, ramificados, y de color verde oliva, y color gris, descritas por Barnet y Hunter (1998). Se puede resaltar que de los cinco géneros que fueron identificados, *Cladosporium* sp, fue el género que tuvo incidencia en las seis marcas de totopos de maíz nixtamalizado (Cuadro 15). Esta especie habita en el suelo y por lo tanto esto nos indica que no existen buenas prácticas de manufactura en la elaboración de los totopos de maíz nixtamalizado.

La tercera colonia de hongo que se desarrolló, en orden de importancia fue *Fusarium* sp (Figura 48), observando macroconidios en forma de canoa color café claro, colonias verde aceituna o pardo, especialmente en el reverso de la colonia. El micelio algodónoso, de acuerdo con lo descrito por Barnet y Hunter (1998). La presencia de este género causa pudrición en tallos de maíz seguido por un rápido secamiento (CONACYT, 2013).



**Figura 47. Colonias de hongos de *Cladosporium* sp.**

Otro género que se desarrolló en las placas de agar correspondió al género *Helminthosporium* (Figura 49), se caracteriza por presentar conidios con septos





transversales de color oscuro, el micelio aéreo gris obscuro verdoso, de acuerdo con lo descrito por Barnet y Hunter (1998)



Figura 48. Colonias de hongos de *Fusarium* sp.

Y finalmente el hongo que tuvo la menor incidencia fue el género *Torula* sp (Figura 50), presentó micelio color gris pardo, conidios en forma de cadena, redondeados, y con una coloración café oscuro de acuerdo con Barnet y Hunter (1998).

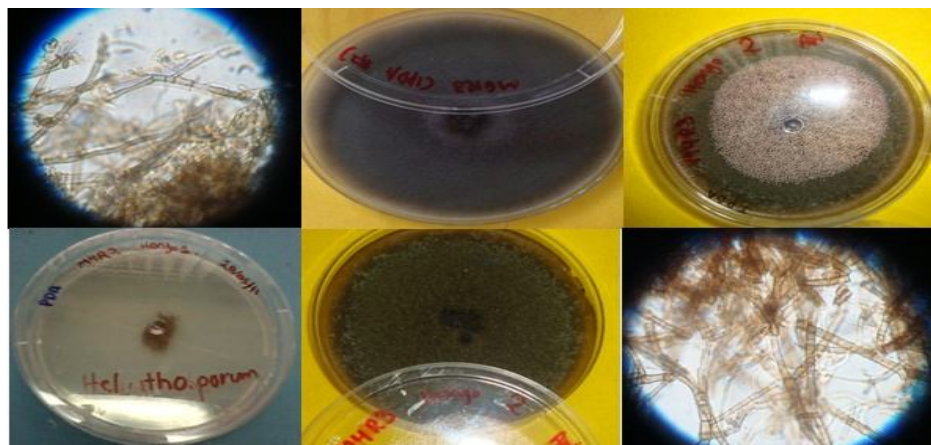


Figura 49. Colonias de hongos de *Helminthosporium* sp.



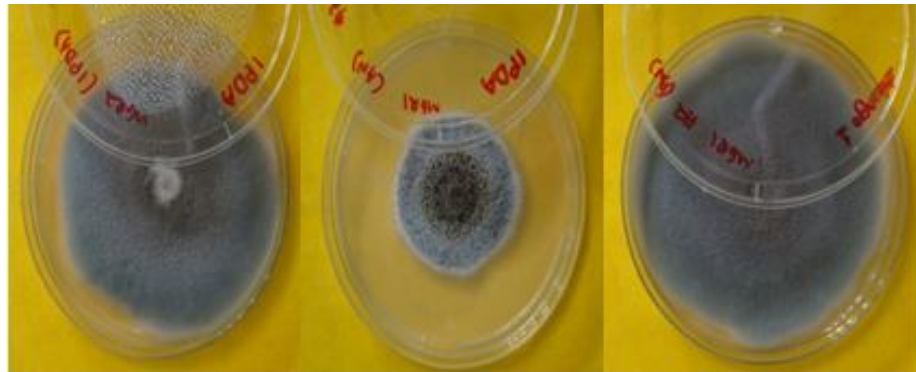


Figura 50. Colonias de hongos de *Torula* sp.





## ANEXO E- HONGOS DE ALMACÉN

La microbiota puede tener su origen en el suelo, aire, agua, en el medio ambiente del almacén o en la fase de manipulación y elaboración. En las cajas con medio IPDA se desarrollaron pequeñas colonias de hongos que fueron aisladas e identificadas como los siguientes: *Penicillium* sp, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus* y *Aspergillus candidus*.

El primer género que se aisló e identificó fue *Penicillium* sp, el cual presentó micelio con apariencia de un aterciopelado de coloración azul-verdoso y con la periferia con un halo blanco, conidios septados con típicas fiáldas<sup>11</sup> hialinas en forma de botella, con estructura característica de un pincel, que corresponde a *Penicillium* sp (Figura 51) de acuerdo con las claves de Barnet y Hunter (1998).

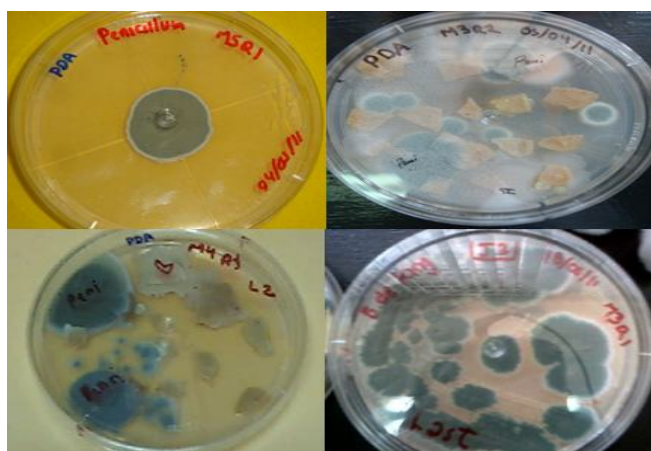


Figura 51. Colonias de hongos de *Penicillium* sp.

Otra especie que fue aislada e identificada, fue *Aspergillus flavus* (Figura 52). De acuerdo con las claves Barnet y Hunter (1998) presentando colonias planas, de aspecto lanosa a flocoso, color amarillo verdosas (IICA, 2004). Por lo general este hongo se desarrolla cuando el maíz se almacena con alto contenido de humedad (18.5% o más), la presencia de este hongo se caracteriza por resistir y ocasionar daños

<sup>11</sup> Estructura en forma de botella, ubicada en el extremo de un conidióforo, sobre la cual se producen esporas





a los productos almacenados con altos porcentajes de humedad. (Asensio, 1999; Suárez, 2010; Serna, 1996; Ogawa, 1999; Warham *et al.* 1996; Carlstrom y Youersef 2006). En México, en la nixtamalización tradicional elimina una gran porción de aflatoxinas (Uribarren, 2012), en este estudio se trabaja con productos que también son elaborados por el proceso de nixtamalización, sin embargo, se identificaron niveles de *Aspergillus flavus*, que están dentro de los límites máximos permitidos.

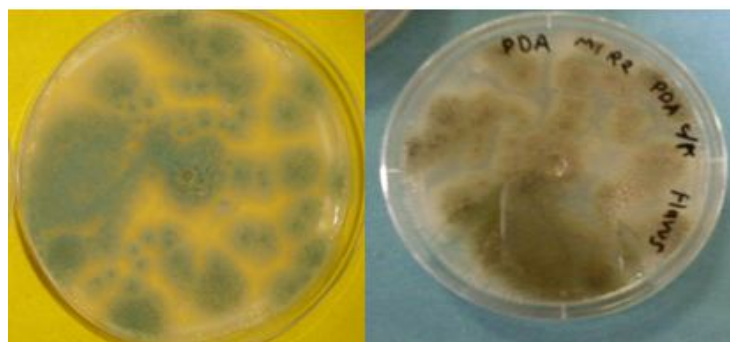


Figura 52. Colonias de hongos de *Aspergillus flavus*

*Aspergillus terreus* también se desarrolló en las muestras, presentando colonias café claro con la periferia con un halo color blanco, con aspecto aterciopelado, de acuerdo con las claves de Klich (2002).



Figura 53. Colonias de hongos de *Aspergillus terreus*







Y finalmente la siguiente especie que se desarrolló fue *Aspergillus candidus* (Figura 54), presentando colonia blanca y al reverso es blanca con el centro café oscuro, la textura es algodonosa, de acuerdo con las claves de Klich (2002). (Moreno, 1988; Ogawa, 1999; Suárez, 2010; Serna, 1996; Warham *et al.* 1996).

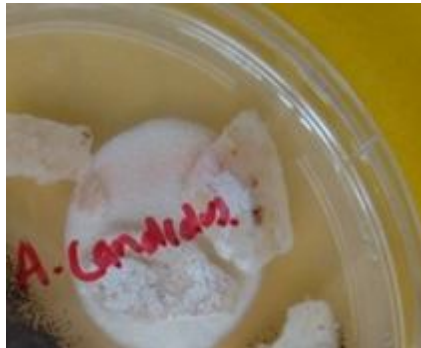


Figura 54. Colonias de hongos de *Aspergillus candidus*





## ANEXO F - HONGOS DE DETERIORO AVANZADO

En el género *Monilia* (Figura 55) se observaron las siguientes características: micelio con una coloración anaranjado, después presentó una coloración café claro, los conidios en forma de limón, de acuerdo con las claves de Barnet y Hunter (1998).



Figura 55. Colonias de hongos de *Monilia* sp.

Otra colonia que se desarrolló fue *Mucor* sp (Figura 56), la cual presentó colonias de color gris pardo, los esporangóforos sencillos o ramificados oscuros de acuerdo con claves de Barnet y Hunter (1998) (Moreno, 1988; Suárez, 2010; Serna, 1996; Warham *et al.* 1996; Ogawa, 1999; Yoursef y Carlstrom 2006).

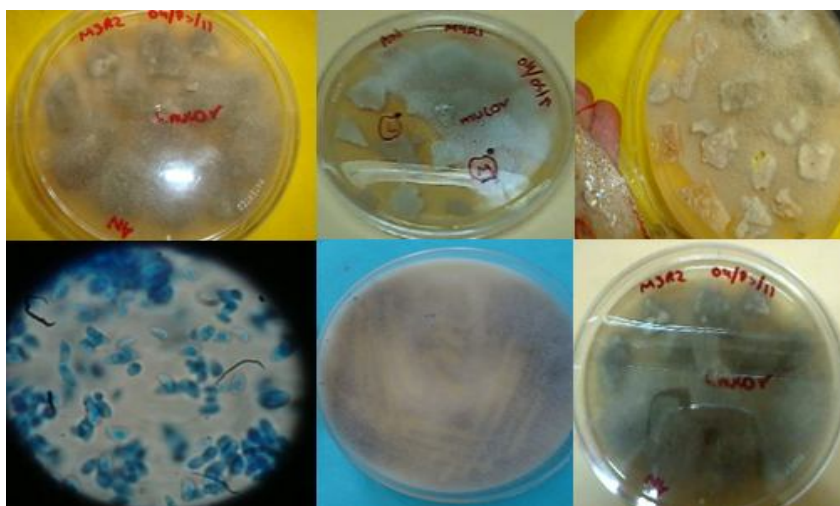


Figura 56. Colonias de hongos de *Mucor* sp.





La especie *Aspergillus niger* (Figura 57), desarrollo colonias color negro o café oscuro, que coinciden con las claves de Klich (2002).

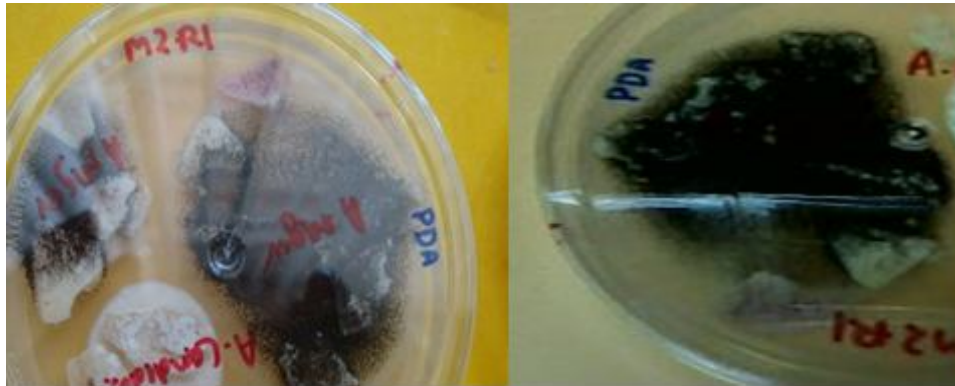


Figura 57. Colonias de hongos de *Aspergillus niger*





## ANEXO G - CERTIFICADO DE ANÁLISIS DE BACTERIAS COLIFORMES DIBICO®

Maria  
Luisa  
Garcia  
85147

**DIBICO®**

**CERTIFICADO DE ANALISIS**

PRODUCTO: AGAR DE BILIS Y ROJO VIOLETA	FECHA DE FABRICACION:	10-Ago-10
N° DE CATALOGO: 1005	FECHA DE CADUCIDAD:	13-Oct-13
REGISTRO S.S.A. N°: 0124R84	TAMAÑO DE LOTE:	55 unidades
N° DE LOTE: 9078080	C.B.S.S.:	080.610.2596

USO: Es un medio selectivo para detección y cuenta de mos coliformes en agua, leche, productos lacteos y otros materiales de importancia sanitaria según las recomendaciones de la APHA.

MEDIO EN POLVO

ESPECIFICACIONES	LIMITES	RESULTADO
ASPECTO:	Polvo fino homogeneo	Polvo fino homogeneo
COLOR:	Grisáceo a rosa grisáceo	beige grisáceo
PERDIDA DE HUMEDAD:	13.50%	4.18 %

MEDIO PREPARADO (Disolver 41.5 g en 1 litro de agua desionizada)

pH:	7.4 +/- 0.2	7.54
TEMPERATURA DE GELIFICACION:	33 +/- 2°C	33°C
CLARIDAD Y COLOR	Translúcido, rojo oscuro	Translúcido, púrpura lig sedimento

CONTROL DE ACTIVIDAD EVALUADA POR LA TECNICA ECOMETRICA DE MOSSEL MODIFICADA

MICROORGANISMO DE CONTROL	LIMITES	RESULTADO
<i>E.coli</i> ATCC 25922	Colonias rojo púrpura con halo de precipitación de sales biliares Recuperación mayor de 95%	Buen crecimiento, colonias rojo púrpura con halo de p.p. de sales biliares. Recuperación mayor 95%
<i>E.faecalis</i> ATCC 29242	Crecimiento inhibido o colonias puntiformes de color rosa Recuperación de 0 a 25%	Crecimiento inhibido
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	Crecimiento inhibido	Crecimiento inhibido
<i>P.mirabilis</i> ATCC 12453	Colonias translúcidas, rosa pálido sin halo de precipitación. Recuperación mayor 95%	Colonias rosa pálido translúcidas sin halo de p.p. Recuperación mayor 95%

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO  
Mantener en lugar fresco y seco, libre de humedad y bien cerrado.

Dictamen: Aprobado  
*[Firma]*  
Q.E.L. Marisela García Rangel  
Control de Calidad  
14 Sep 2010

INFORMACION: Para la disposición final de producto después de su uso y en los casos de (contaminación, accidente de red fría, accidente por manejo y/o transporte, caducidad vencida), consultar la Norma NOM-087-SEMARNAT1-SSA1-2002 Protección Ambiental-Salud Ambiental-Residuos Peligrosos Biológicos-Infeciosos Clasificación y Especificaciones de Manejo.

**DIBICO, S.A. DE C.V.**  
PLANTA Y OFICINAS EN MÉXICO D.F.:  
ORIENTE 182 No. 131 L -1, COL. SANTA CRUZ AVIACION, MÉXICO, C.P. 15540 TELS. 57-86-13-49 AL 52 FAX. 57-85-15-40  
Atención a Cliente: 01 800 7185957  
Correo electrónico: ventas@dibico.com, asistenciatecni@dibico.com  
Visite nuestra página de Internet: www.dibico.com





### RESULTADO FOTOGRÁFICO DE LA COLIFORME IDENTIFICADA EN MUESTRAS DE TOTOPOS DE MAÍZ NIXTAMALIZADO



Figura 58. Colonias de *Escheriquia faecalis* ATC 20212

### RESULTADO FOTOGRÁFICO DE COLONIA DE *Proteus* QUE SE DESARROLLO EN MEDIO ARV

A pesar de que *Proteus* no es coliforme, se desarrolló en el medio ARV



Figura 59. Colonias de *Proteus*





## GLOSARIO DE TÉRMINOS

**AN:** agar nutritivo

**ARV:** agar de bilis y rojo violeta

**BPM:** Buenas Prácticas de Manufactura

**CLINDAMICINA:** es activa en contra de la mayoría de las bacterias Gram positivas. Son sensibles *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *S. pneumoniae*, *S. viridans*, *S. durans*, *S. bovis*, *C. tetani*, *C. perfringens* y *C. diphtheriae*. El *S. faecalis* es resistente. También son sensibles los anaerobios Gram positivos como *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Eubacterium*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*. Aunque los aerobios Gram negativos en general son resistentes, los anaerobios son sensibles, en especial las especies de Bacteroides (<http://www.facmed.unam.mx>).

**DEMANDA BIOLÓGICA DE OXÍGENO:** Prueba realizada para ver el grado de contaminación que tienen los efluentes. Es la cantidad de oxígeno requerido por microorganismos aerobios o facultativos para estabilizar la materia orgánica en efluentes líquidos (Serna, 1996).

**FLUORESCÉINA:** La fluoresceína es una sustancia de la familia de las xantinas, es una sal de sodio de resorcinol ftaleína. Tiene propiedades colorantes y fluorescentes. Es soluble en agua y la colorea de amarillo. Cuando se encuentra en soluciones de pH mayor a cinco, su color se torna verde y altamente fluorescente (<http://quimica.laguia2000.com>).

**GLUTEN:** Nombre de la proteína del endospermo de los cereales compuesta por prolaminas y glutelinas (Serna, 1996).

**GRITS:** Denominación que se da a los gránulos refinados del endospermo. Existen grits de diferente granulometría como son los grits para hojuelas (Grit # 6) o grit cervecero (Grit # 60) (Serna, 1996).

**INDEHISCENTE:** Que no abre tras alcanzar la madurez (Sociedad Forestal Española, 2005).

**IPDA c/a:** infusión de papa-dextrosa con antibiótico





**IPDA:** Infusión de papa-dextrosa-agar

**INSP:** Instituto Nacional de Salud Pública

**LSD:** Utiliza pruebas t para llevar a cabo todas las comparaciones por parejas entre las medias de los grupos. No se efectúa ninguna corrección de la tasa de error por el hecho de realizar múltiples comparaciones. Como información concreta cuanto a la potencia de los contrastes el método estadístico más potente (mayor número de diferencias significativas) es LSD y el de menor potencia (el más conservativo) el de Scheffé. Los métodos de Scheffé, LSD y Tukey proporcionan la misma distancia mínima para cada par de medias. El resto de los métodos distinguen entre pares de medias (Martin *et al.* 2008). El nivel de significancia se puede aplicar cualquier valor entre 0 y 1, aunque los más habituales son 0.05 y 0.01 (Álvarez, 1995).

**MODELO DE NECESIDADES DE KANO:** El profesor Kano sugiere la existencia de tres tipos de necesidades de los clientes: esperadas, estimulantes y explícitas (Figura 60). Las dos primeras tienen un carácter implícito, es decir, no salen a la luz cuando preguntamos directamente al cliente sobre sus deseos. Los requisitos o necesidades esperadas como vemos en la figura no generan satisfacción en el cliente, pero si generan una elevada insatisfacción cuando no están presentes en el producto. Por el contrario, los requisitos estimulantes no provocan insatisfacción si no están presentes, pero sí generan una elevada satisfacción cuando están presentes. Los sistemas tradicionales de investigación de mercados quizás no sean efectivos para descubrir las necesidades estimulantes, por lo que habrá de buscar otros procedimientos que nos permitan sorprender al cliente con características no esperadas en los nuevos productos (Miranda *et al.* 2007).

**MOLIENDA HÚMEDA:** Sistema de molienda., también denominado de refinación de almidón, donde se utiliza exceso de agua y cuyo objetivo es separar los componentes químicos del grano. EL producto de este producto es el almidón, mientras que los subproductos son aceite, gluten y fibra (Serna, 1996).



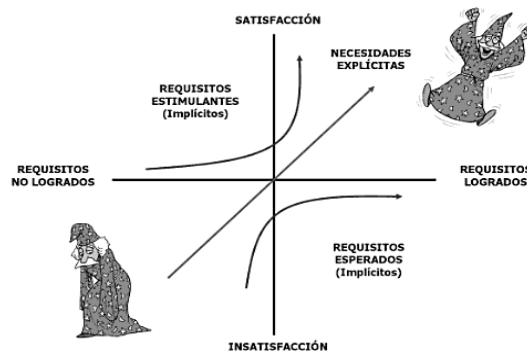


Figura 60. Modelo de las necesidades de Kano

Fuente: García *et al.* 2007.

**MOLIENDA SECA:** Sistema de molienda cuyo objetivo es separar las partes anatómicas de la cariósida. El producto del proceso es el endospermo, el cual puede estar en forma entera (arroz blanco) o ser moturado y clasificado en grits, semolina o harina. Estas fracciones de molienda poseen una alta vida de anaquel debido a que son bajas en aceites. Los subproductos del proceso son las glumas o cáscaras, el salvado (fracción rica en pericarpio) y salvadillo (fracción rica en germen y capa de aleurona) (Serna, 1996).

**NEJAYOTE:** Nombre de la solución resultante del proceso de nixtamalización que es generalmente desechada. EL nejayote es una solución con pH muy alcalino, rica en sólidos solubles e insolubles del maíz y cal. El nejayote presenta un alto valor de demanda biológica de oxígeno y propicia un problema fuerte de contaminación ambiental (Serna, 1996).

**NIXTAMALIZACIÓN:** Cocción alcalina del maíz (García, 2004)

**NOM'S:** Normas Oficiales Mexicanas

**PERICARPIO:** Cascarilla que envuelve al grano de maíz (García, 2004)

**PROPÁNGULO:** Cualquier parte o estructura de un organismo capaz de desarrollarse separada del mismo (Diccionario de Ciencias Hortícolas, 1998).

**YDC:** por sus siglas en inglés yeast-dextrose calcium (carbonate levadura-dextrosa-carbonato de calcio).

