



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

CUAUTITLÁN

**EFFECTO DE UN RECUBRIMIENTO A BASE DE
QUITOSÁN EN DIFERENTES
FORMULACIONES SOBRE LA VIDA ÚTIL DEL
HUEVO FRESCO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERA EN ALIMENTOS

P R E S E N T A N:

MARIANA CÓRDOBA VÁZQUEZ

MÓNICA HERNÁNDEZ AGUÍLA

ASESOR: DRA. SUSANA PATRICIA MIRANDA CASTRO



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

**EFFECTO DE UN RECUBRIMIENTO A BASE DE
QUITOSÁN EN DIFERENTES
FORMULACIONES SOBRE LA VIDA ÚTIL DEL
HUEVO FRESCO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERA EN ALIMENTOS

P R E S E N T A N:

MARIANA CÓRDOBA VÁZQUEZ

MÓNICA HERNÁNDEZ AGUÍLA

ASESOR: DRA. SUSANA PATRICIA MIRANDA CASTRO



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.
ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

**DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE**



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

Con base en el Art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis:

Efecto de un recubrimiento a base de quitosán en diferentes formulaciones

sobre la vida útil del huevo fresco.

Que presenta la pasante Mariana Córdoba Vázquez

Con número de cuenta: 302286799 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 ESPIRITU”

Cuautitlan Izcalli, Mex. a 28 de marzo de 2011

PRESIDENTE Dra. Susana Patricia Miranda Castro

VOCAL Dra. Clara Inés Alvarez Manrique

SECRETARIO Dra. Carolina Moreno Ramos

1er SUPLENTE L.A. Sandra Margarita Piedra Enriquez

2º SUPLENTE L.A. Marian Alvarez Velasco

Clara Inés Alvarez Manrique
Carolina Moreno Ramos
Sandra Margarita Piedra Enriquez
Marian Alvarez Velasco



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.

ASUNTO: **VOTOS APROBATORIOS**

**DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE**



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

Con base en el Art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis:

Efecto de un recubrimiento a base de quitosán en diferentes formulaciones
sobre la vida útil del huevo fresco.

Que presenta la pasante Mónica Hernández Aguila

Con número de cuenta: 405049837 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 ESPIRITU"
Cuautitlan Izcalli, Mex. a 28 de marzo de 2011

PRESIDENTE Dra. Susana Patricia Miranda Castro

VOCAL Dra. Clara Inés Alvarez Manrique

SECRETARIO Dra. Carolina Moreno Ramos

1er SUPLENTE I.A. Sandra Margarita Rueda Enriquez

2º SUPLENTE I.A. Miriam Alvarez Velasco

(Circulo)
Clara Inés Alvarez Manrique
Carolina Moreno Ramos
Miriam Alvarez Velasco

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

En todo mi caminar y la conclusión del trabajo de tesis, ha habido personas que de una u otra forma participaron apoyándome en la conclusión de esta etapa en mi vida, a todos ellos les dedico este trabajo; porque sin su valiosa aportación no hubiera sido posible este trabajo, por haber plasmado su huella en mi camino lleno de obstáculos y aprendizajes vividos pero sobre todo lleno de bendiciones. Les hago extensivo mi más profundo agradecimiento.

Agradezco a Dios por que sin él no estaría aquí, llenando mi vida de dichas y bendiciones, acompañándome en mi caminar día a día.

Agradezco por la fortaleza basada en el desvelo, sudor y cansancio de mi padre, y el temperamento infundido por el sacrificio de mi Madre, porque en sus rodillas y sus oraciones esta mi triunfo y en su presencia mi recompensa, los amo.

Agradezco a mi hijo Leonardo que ha llenado de luz y amor mi vida Te amo mi pequeño Leoncito.

Agradezco a mis hermanas Erika y Liliana por su compañía y el apoyo que me han brindado siempre. Sé que cuento con ellas.

Agradezco a mi esposo Diego por todo su amor, ternura y comprensión.

Agradezco a todas mis amistades y seres queridos especialmente a Israel, Verónica y Mary por su apoyo incondicional, pero sobre todo por todo su cariño y amor brindados.

Agradezco a toda mi generación “29” por las experiencias compartidas especialmente a Erika Paredes Martínez y Monica Hernandez Aguila, por el camino compartido durante nuestra formación universitaria por todo el apoyo brindado.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM por haberme brindado un soporte institucional en la conclusión de mis estudios universitarios.

Agradezco a mis maestros por su disposición y ayuda brindadas.

Reconozco y agradezco ampliamente los comentarios y criticas de; Dra. Clara Inés Alvarez Manrique, Dra. Carolina Moreno Ramos, así como a I.A Sandra Margarita Rueda Enríquez y I.A Miriam Alvarez Velazco, que enriquecieron y mejoraron este manuscrito, así como mis conocimientos.

Un especial agradecimiento a mi asesora de tesis; la Dra. Susana Patricia Miranda Castro que me proporcione todas las armas necesarias para que yo concluyera este trabajo, especialmente por sus conocimientos y por toda su experiencia brindada que hoy por hoy la hacen una mujer admirable.

MARIANA CORDOBA VAZQUEZ

DEDICATORIAS.

A Dios.

Por permitirme llegar hasta momento especial de mi vida y haberme dado salud para lograr mis objetivos.

A mi madre.

Por los ejemplos de perseverancia y responsabilidad que me ha inculcado siempre, por el valor mostrado para salir adelante y por su amor.

A mi padre.

Por haberme apoyado en todo momento, por su paciencia, comprensión y por la motivación constante que me brindó para culminar mi carrera profesional.

A mis familiares.

A mis hermanas mayores Elizabeth y Leticia por ser mis ejemplos a seguir y de las cuales aprendí de momentos difíciles gracias a la confianza que siempre nos hemos tenido y a todos aquellos que participaron directa e indirectamente en la elaboración de esta tesis.

A mis maestros.

*Dra. Susana Patricia Miranda Castro por su apoyo y motivación para la culminación de nuestros estudios profesionales y para la elaboración de esta tesis, a la Dra. Clara Inés Álvarez Manrique por su apoyo ofrecido en este trabajo, por su tiempo compartido y por impulsar el desarrollo de nuestra formación profesional.
¡Gracias!*

A mis amigos.

Que nos apoyamos mutuamente en nuestra formación profesional logrando llegar hasta el final del camino y que hasta ahora, seguimos siendo amigos: Mariana Córdoba Vázquez, Erika Paredes Martínez y María Isabel Castellanos Rodríguez.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y en especial a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán que me dieron la oportunidad de ser parte de ellas.

Mónica Hernández Aguila.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	
INTRODUCCIÓN	1
 <u>CAPÍTULO I. ANTECEDENTES</u>	
1.1 Generalidades del huevo fresco	4
1.1.1 Definición de huevo fresco	4
1.1.2 Estructura y composición del huevo	5
1.1.3 Composición química y nutricional	9
1.1.4 Aspectos socioeconómicos	11
1.1.5 Propiedades funcionales del huevo en alimentos	13
1.1.6 Modificaciones durante el almacenamiento del huevo	15
1.1.7 Métodos de conservación del huevo	16
1.1.8 Ovoproductos	17
1.1.9 Problemas de sanidad que presenta el huevo fresco	19
1.2 Generalidades de películas comestibles	20
1.2.1 Definición y clasificación	20
1.2.2 Propiedades	24
1.2.3 Aplicaciones en alimentos	27
1.3 Generalidades sobre la quitina y quitosán	29
1.3.1 Definición	29
1.3.2 Propiedades funcionales	30
1.3.3 El quitosán como agente microbiano	32
1.3.4 Aplicaciones en alimentos	33
 OBJETIVOS	 35

CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Cuadro metodológico	37
2.2 Material biológico	38
2.3 Selección y clasificación de la materia prima	38
2.4 Caracterización física, fisicoquímica y microbiológica	39
2.5 Aplicación del recubrimiento en los huevos frescos	39
2.5.1 Preparación del recubrimiento a las diferentes formulaciones	39
2.5.2 Aplicación del recubrimiento	40
2.6 Evaluación del efecto de un recubrimiento a base de quitosán en diferentes formulaciones sobre las propiedades físicas, fisicoquímicas y microbiológicas del huevo fresco, durante su vida útil	40
2.7 Métodos analíticos	41
2.7.1 Evaluación física del huevo	41
2.7.1.1 Pérdida de peso del huevo	41
2.7.1.2 Altura de la clara del huevo	42
2.7.1.3 Cámara de aire del huevo	43
2.7.1.4 Índice de yema del huevo	44
2.8 Evaluación fisicoquímica del huevo	45
2.8.1 pH del huevo	45
2.9 Evaluación microbiológica del huevo	46
2.9.1 Determinación de la presencia de <i>Salmonella enteritidis</i>	46
2.9.1.1 Preparación del medio de cultivo	46
2.9.1.2 Preparación y dilución de muestras del alimento	47
2.9.2 Determinación de Mesófilos aerobios	49
2.9.2.1 Preparación del medio de cultivo	49
2.9.2.2 Preparación y dilución de muestras del alimento	49
2.9.3 Determinación de Coliformes totales	51
2.9.3.1 Preparación del medio de cultivo	51
2.9.3.2 Preparación y dilución de muestras del alimento	51
2.9.4 Determinación de la presencia de <i>Staphylococcus aureus</i>	53
2.9.4.1 Preparación del medio de cultivo	53
2.9.4.2 Preparación y dilución de muestras del alimento	53

2.10 Análisis estadístico	55
---------------------------	----

CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización física y fisicoquímica del huevo	57
3.2 Efecto de la aplicación de recubrimiento de quitosán en diferentes formulaciones sobre la vida útil del huevo fresco	57
3.2.1 Pérdida de peso del huevo	58
3.2.2 Cámara de aire del huevo	61
3.2.3 Altura de la clara del huevo	63
3.2.4 Índice de yema del huevo	66
3.3 Determinación de los parámetros fisicoquímicos	68
3.3.1 pH del huevo	68
3.4 Caracterización microbiológica del huevo	70
3.4.1 Evaluación del efecto de un recubrimiento a base de quitosán en diferentes formulaciones sobre las propiedades microbiológicas de huevo fresco almacenado a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$	70
3.4.2 <i>Salmonella enteritidis</i>	71
3.4.3 Mesófilos aerobios	73
3.4.4 Coliformes totales	75
3.4.5 <i>Staphylococcus aureus</i>	77
CONCLUSIONES	81
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	84
ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Pág.
1	Composición química y aporte nutritivo del huevo (por cada 100 gramos de porción comestible)	9
2	Películas y envolturas comestibles: ventajas y condiciones requeridas	20
3	Aplicaciones de las películas y envolturas comestibles	28
4	Aplicación de quitosán en alimentos	34
5	Formulaciones evaluadas para la conservación del huevo	39
6	Interpretación de colonias típicas de <i>Salmonella enteritidis</i>	48
7	Interpretación de morfología típica de Mesófilos aerobios	50
8	Interpretación de morfología típica de Coliformes totales	52
9	Interpretación de colonias típicas de <i>Staphylococcus aureus</i>	54
10	Parámetros físicos y fisicoquímicos del huevo fresco	57
11	Tasa de pérdida de peso en porcentaje por día	59
12	Tasa de cambio de la cámara de aire	62
13	Tasa de cambio de la altura de la clara	64
14	Tasa de cambio del índice de yema	67
15	Tasa de cambio de pH	69
16	Determinación de la presencia de microorganismos durante la recepción del huevo fresco	70
17	Resultados obtenidos a los 28 días de almacenamiento de huevo a temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ (según prueba bioquímica realizada)	71
18	Número de colonias de Mesófilos aerobios en UFC/g en medio de cultivo agar estándar, durante el almacenamiento de huevo a temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$	74

- 19 Número de colonias de Coliformes totales en UFC/g en medio de cultivo agar rojo-violeta, durante el almacenamiento de huevo a temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 76
- 20 Crecimiento en UFC/g en medio de cultivo agar BHI, durante el almacenamiento de huevo a temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Pág.
1	Estructura del huevo	5
2	Producción mundial de huevo, creación propia con datos de la UNA	11
3	Principales estados productores de huevo en la República Mexicana	12
4	Esquema de la fabricación de ovoproductos	18
5	Estructura química de la quitina	29
6	Estructura química del quitosán	30
7	(a) Lote de huevos. (b) Eliminación de suciedades de los huevos	38
8	Balanza Granataria	41
9	Determinación de la altura de la clara	42
10	Determinación de la cámara de aire por medio de un ovoscopio	43
11	Determinación del diámetro de la yema	44
12	Potenciometro digital VWR scientific modelo 8015	45
13	Parrilla de agitación magnética (Gyratherm® Magnetic stirrer-hot plate)	46
14	Incubadora (Dry Type Bacteriological Incubator)	47
15	Efecto del recubrimiento de quitosán a diferentes formulaciones en huevo fresco sobre la pérdida de peso con respecto al tiempo	59
16	Efecto del recubrimiento de quitosán en huevo fresco sobre la cámara de aire, respecto al tiempo	61
17	Efecto del recubrimiento de quitosán en huevo fresco sobre la altura de la clara, respecto al tiempo	64
18	Efecto del recubrimiento de quitosán en huevo fresco sobre el índice de yema, respecto al tiempo	66

19	Efecto del recubrimiento a diferentes formulaciones de quitosán en huevo fresco sobre el pH, respecto al tiempo	68
20	Efecto de la aplicación de un recubrimiento a base de quitosán y quitosán-glicerol con diferentes pH's 3 y 5, con 1 y 2 capas, almacenadas a temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, sobre Mesófilos aerobios	73
21	Efecto de la aplicación de un recubrimiento a base de quitosán y quitosán-glicerol con diferentes pH's 3 y 5, con 1 y 2 capas, almacenadas a temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, sobre Coliformes totales	75
22	Efecto de la aplicación de un recubrimiento a base de quitosán y quitosán-glicerol con diferentes pH's 3 y 5, con 1 y 2 capas, almacenadas a temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, en la prueba para <i>Staphylococcus aureus</i> en medio BHI	77

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo, fue evaluar el efecto de una película a base de quitosán sobre las propiedades de calidad físicas, fisicoquímicas y microbiológicas que definen la vida útil del huevo fresco. Para ello, se establecieron ocho tratamientos con diferentes formulaciones resultado de la combinación de las siguientes variables: quitosán, quitosán-glicerol, pH 3 y 5, recubrimientos con una y dos capas; se utilizó quitosán con grado de desacetilación de 90% con un peso molecular de 135 kDa, a partir de la cual se prepararon disoluciones de quitosán al 1% (p/v) con ácido láctico al 1.4% (v/v) con adición de glicerol al 0.25% (v/v), dependiendo de los diferentes tratamientos a realizar. Los recubrimientos se aplicaron mediante doble inmersión (en el caso de los tratamientos con doble capa). Se realizó la evaluación de las propiedades físicas, fisicoquímicas y microbiológicas del huevo fresco almacenado a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante un lapso de 28 días; en base a los parámetros físicos peso, longitud ecuatorial, longitud polar, cámara de aire, altura de la clara, índice de yema, fisicoquímicos pH y microbiológicos se llevo a cabo una caracterización al inicio del almacenamiento, se mantuvo un lote control (sin recubrimiento) bajo las mismas condiciones de almacenamiento para comparar los cambios sufridos en el huevo.

Todos los tratamientos con quitosán actuaron como barrera a la transferencia de humedad y de dióxido de carbono, esto debido al alto peso molecular del quitosán, el cual obstruyó los poros del cascarón disminuyendo con esto la pérdida de peso, el incremento de la cámara de aire, así como una menor disminución de la altura de la clara e índice de yema, además la mayoría de los tratamientos aplicados sobre el huevo presentaron una disminución en la carga microbiana en comparación con el control. El tratamiento (C8) a base de quitosán-glicerol, pH 5, con 2 capas fue la formulación que mejor resultados presentó con una diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al grupo control, tanto para las propiedades físicas, fisicoquímicas y microbiológicas.

INTRODUCCIÓN

El huevo fresco se entiende como el producto de la ovulación de la gallina (*Gallus domesticus*) y otras especies de aves que sean aceptadas para consumo humano que presentando un olor y sabor característico, no ha sufrido más manipulaciones que una limpieza en seco según la norma NOM-159-SSA1-1996.

El huevo es uno de los alimentos más completo, que existe en el mercado nacional debido a su valor nutricional además de su alta disponibilidad al consumidor, considerándose así, como un alimento de primer necesidad representando una importante y creciente industria en México, tanto en estado fresco como los diferentes productos obtenidos a partir de su procesamiento, no sólo por sus propiedades nutricionales que lo caracterizan, sino también por sus propiedades funcionales aplicables a los procesos de fabricación de muchos alimentos (Desrozier, 1991; Stadelman y Cotterill, 1977).

Los cambios en la calidad del huevo durante el almacenamiento pueden estar provocados por reacciones químicas o microbiológicas, originando pérdidas tanto de humedad como de dióxido de carbono, así como una contaminación microbiológica, las cuales se dan a través de los poros de su propia envoltura natural conocida como “cascarón” (Villanúa, 1990; Plank, 1984).

El empleo de películas y recubrimientos comestibles constituyen a menudo una interesante oportunidad para mejorar la calidad, estabilidad o inocuidad de muchos alimentos, siendo una alternativa a este problema (Caner y Cansiz, 2007; Bureau y Multon, 1995).

En la actualidad se permiten medidas para la desinfección de la cáscara, como el lavado con agua potable y detergente, una vez seco debe ser recubierto con aceite vegetal o mineral (parafina) grado alimentario, en base a la NOM-159-SSA1-1996. Este tipo de actuaciones facilitan la eliminación de microorganismos al tiempo que la parafina taponan los poros, por lo que el producto no se deshidrata. No obstante esto da lugar a problemas, debido a que recientes estudios han demostrado que algunos desinfectantes del lavado pueden causar daño físico a la superficie del huevo, rompiendo la cutícula de la cáscara. Esto puede llevar a una

pérdida de la protección natural, lo que puede permitir la entrada de patógenos, con el consiguiente incremento del peligro de contaminación por otros microorganismos que se encuentren en el entorno del producto (Charley, 1987).

Por lo tanto, el objetivo principal de este proyecto es evaluar el efecto de una película a base de quitosán sobre las propiedades de calidad: físicas, fisicoquímicas y microbiológicas del huevo fresco que definen su vida útil. Para el recubrimiento del huevo, se utilizará el quitosán en solución, debido a que es un biopolímero que se obtiene de la desacetilación de la quitina, es no tóxico, es biodegradable, y con propiedades antimicrobianas y filmogénicas además de ser permeables a gases, con lo cual se podría evitar la contaminación de microorganismos al interior del huevo, incrementando su vida útil (Caner y Cansiz, 2007; Tokura y Uragami, 2006).



ANTECEDENTES



1.1. GENERALIDADES DEL HUEVO FRESCO

1.1.1 DEFINICIÓN DE HUEVO FRESCO

Existen diversas definiciones acerca de huevo fresco, el CODEX alimentario lo define como un huevo destinado a ser vendido con cáscara al consumidor final y sin haber recibido ningún tratamiento que modifique considerablemente sus propiedades. La norma mexicana NMX-FF079-SCFI-2004 lo establece como aquel que se presenta al consumidor en su estado natural que no ha experimentado un tratamiento de limpieza húmeda, desinfección por inmersión, refrigeración o conservación en origen y que cumple con lo estipulado en la norma oficial mexicana NOM-159-SSA1-1996, la cual define al huevo como producto de la ovulación de la gallina (*Gallus domesticus*) y otras especies de aves que sean aceptadas para consumo humano. Esta norma también define al huevo fresco como aquel que presenta un olor y sabor característico que observado en el ovoscopio, aparecerá completamente claro, sin sombra alguna, con yema centrada apenas perceptible, cámara de aire equivalente al tiempo transcurrido y teniendo como un máximo de 15 días después de la postura; por lo tanto, se puede definir al huevo fresco como un producto de la ovulación de la gallina (*Gallus domesticus*) y otras especies de aves que sean aceptadas para consumo humano, que presentando un olor y sabor característico, no ha sufrido más manipulaciones que una limpieza en seco, teniendo como máximo 15 días después de su postura.

La literatura define al huevo como al producto proveniente de la gallina con un alto valor nutricional estableciéndose como uno de los alimentos más completo, tanto en estado fresco como los diferentes productos obtenidos a partir de su procesamiento, no sólo por sus propiedades nutricionales que lo caracterizan, sino también por sus propiedades funcionales aplicables a los procesos de fabricación de muchos alimentos (Barroeta, 2005; Desrozier, 1991; Stadelman y Cotterill., 1977).



1.1.2 ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN DEL HUEVO

El huevo es una compleja estructura biológica que consta de cuatro partes principales las cuales se encuentran en las siguientes proporciones: 8-11% de cáscara, 56-61% de clara y 27-32% de yema. Cada una de las partes anteriores se dividen a su vez, en diferentes estructuras (Fig.1) (Santos, 1995).

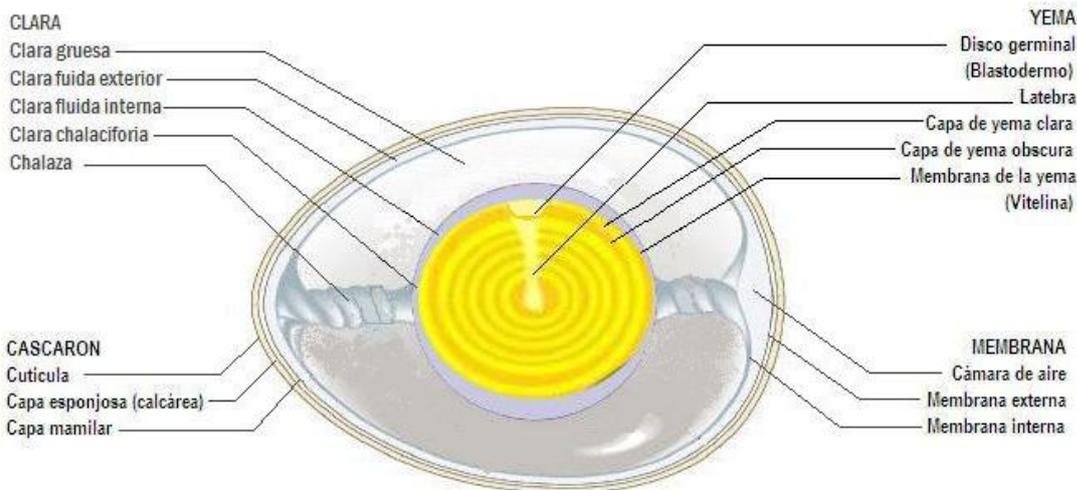


Figura 1. Estructura del huevo.

Fuente: Santos (1995).

Cascarón

Es una estructura porosa en toda su extensión, su color depende de la raza de gallina (blancos o marrones) y no influye en el valor nutritivo, ni en la calidad del huevo. Dentro de sus principales funciones se encuentran la contención y transporte del contenido. En este se encuentran las siguientes capas (Card y Nesheim, 1968):

- **Cutícula:** Es la última capa concéntrica del huevo y se encuentra sobrepuesta al cascarón. Esta cutícula no se encuentra distribuida de forma uniforme, sino varía de 5 a 12.8 mm de grosor. La superficie es irregular con grietas y manchas con apariencia de hojuelas (North, 1990).
- **Capa esponjosa:** Está compuesta por columnas poligonales de cristales perpendiculares a la superficie del cascaron (Instituto Nacional Avícola, 2010).



-
- **Capa mamilar:** Es la porción interna del cascarón. Compuesta por una masa de material orgánico (Santos, 1995).

Membranas del cascarón

Se compone por dos membranas blancas que rodean a la clara del huevo, que se denominan membrana interna y externa del cascarón, ambas están formadas por fibras orgánicas entrecruzadas en todas las direcciones. El grosor de la membrana externa es tres veces más gruesa que la interna (espesores medios 0.05 y 0.015mm respectivamente). Se encuentran normalmente adheridas una con otra, a excepción del extremo más ancho del huevo, donde suelen separarse para formar la cámara de aire. Ambas actúan como barrera brindándole protección al contenido del huevo (Card y Nesheim, 1968; North, 1990).

- **Cámara de aire:** Es el espacio comprendido entre las dos membranas del cascarón, se forma en el polo obtuso o ancho del huevo mientras se enfría luego de la ovoposición, sirve para que el embrión respire en caso de que el huevo sea fértil y se incube. Es relativamente pequeña en el huevo recién puesto (3mm) y aumenta de profundidad por deshidratación a medida que envejece (Instituto Nacional Avícola, 2010; NMX-FF-079-SCF1-2004).

Clara

Es un fluido acuoso, ligeramente amarillento, que rodea a la yema y se encuentra contenida entre las membranas del cascarón, tiene función protectora, y se encuentra compuesta por cuatro capas de diferente viscosidad (Belitz y Grosch, 1997; Frazier y Westhoff, 1993):

- Clara fluida interna
- Clara gruesa
- Clara fluida exterior
- Capa chalaciforia



Las encontramos representadas en las siguientes proporciones; predominando la clara gruesa con mas de la mitad (57.3%), después la clara fluida exterior con 23.2% y por último la clara fluida interior con 16.8% y la capa chalaciforia con 2.7%. En la clara del huevo, además de las cuatro capas, existe otra estructura llamada chalaza (Santos, 1995).

➤ **Chalazas:** Son bandas blanquecinas o palescentes y enroscadas que se une a los polos opuestos del huevo a través de la clara. Su función principal es la de fijar la yema al centro del huevo, permitiendo que gire (Card y Nesheim, 1968).

Yema

Es una masa globosa de consistencia semilíquida, que se localiza en la parte central del huevo. El color está determinado principalmente por la dieta de la gallina. Constituida por una serie de capas amarillentas y blancuzcas, que alternan concéntricamente conocidas como: (Belitz y Grosch, 1997)

- Capa de yema clara
- Capa de yema oscura

La capa clara es aproximadamente de 6mm de diámetro y constituye el 1% del total. La yema se encuentra cubierta por la membrana vitelina (Santos, 1995).

➤ **Membrana vitelina:** Es una cubierta transparente que rodea a la yema, ésta permite conservar una forma casi esférica. En una parte de la esfera de la yema se sitúa el disco germinal (Card y Nesheim, 1968; Belitz y Grosch, 1997).

➤ **Disco germinal o blastódico:** Es un pequeño disco claro, que adopta el aspecto de una mancha blanquecina, cuya dimensión y desarrollo están relacionados con el huevo fértil y el desarrollo embrionario, en este se localiza una columna o tubo angosto llamado latebra (Huevo.org, 2010).



➤ **Latebra:** Ocupa el centro geométrico de la yema, y sirve para comunicar al disco germinal y a la capa de yema clara para alimentar al embrión en caso de ser un huevo fértil (Santos, 1995).



1.1.3 COMPOSICIÓN QUÍMICA Y NUTRICIONAL

El huevo es un alimento de alto valor nutritivo, con una proporción muy elevada de proteínas y lípidos. La composición química y nutricional general de la parte comestible del huevo, se encuentra representado en la tabla 1 (Belitz y Grosch, 1997).

Tabla 1. Composición química y aporte nutritivo del huevo (por cada 100 gramos de porción comestible).

Componente	Huevo entero	Clara	Yema
Agua	74.7	89.3	49.2
Proteínas	12.0	9.4	16.2
Lípidos	12.3	-	34.1
Carbohidratos	1.4	1.5	1.2
Colesterol	0.49	-	1.37
Calcio (mg)	59.0	9.0	136.0
Cloro (mg)	172.0	175.0	162
Cobre (mg)	0.6	0.2	0.13
Yodo (mg)	0.072	0.007	0.167
Hierro (mg)	2.3	Trazas	5.9
Magnesio (mg)	12.4	12.4	12.4
Manganeso (mg)	0.4	0.1	0.11
Fosforo (mg)	238.0	14.0	607.0
Potasio (mg)	138.0	147.0	110.0
Sodio (mg)	139.0	183.0	61.0
Azufre (mg)	165.0	158	165.0
Zinc (mg)	1.5	Trazas	3.8
Vitamina A (UI)*	220.0	-	800.0
Vitamina D (UI)*	36.0	-	170.0
Vitamina E (mg)	1.0	-	3.9
Vitamina K (mg)	Trazas	-	Trazas
Vitamina B12 (µg)	1.1	Trazas	3.2
Biotina (µg)	18.3	5.1	40.8
Colina (mg)	820.0	Trazas	1110.0
Acido fólico (mg)	0.03	Trazas	0.07
Inositol (mg)	15.0	4.0	34.0
Niacina (mg)	0.09	0.1	0.06
Acido pantoténico (mg)	1.4	0.1	4.9
Vitamina B6 (mg)	0.14	Trazas	0.35
Vitamina B2 (mg)	0.32	0.25	0.48
Vitamina B1 (mg)	0.09	Trazas	0.25

Fuente: Santos (1995).

*1 UI de Vit. A=0.3 µg de Vit. A=0.6 de β-Caroteno

**1 UI de Vit. D=0.025 µg de Vit. D

Los principales constituyentes de la clara del huevo, además del agua, son las proteínas entre las que destacan la ovoalbúmina que representa más del 50%, la conalbúmina que suma alrededor del 14%, y una tercera proteína ovomucoide representando un 12% del total de las proteínas en la clara del huevo. Además la clara del huevo contiene aproximadamente un



7% de las globulinas, también contiene a la ovomucina que representa un dos por ciento de la proteína total (Charley, 1987).

La yema puede considerarse como una solución proteica o plasma en el que están dispersas lipoproteínas en gran número de gránulos proteicos de pequeño tamaño. Constituida por mitad agua y mitad sólidos. Las proteínas suman aproximadamente la tercera parte y las grasas las otras dos terceras partes. La proteína principal en la yema de huevo es la vitelina. Además la yema de huevo contiene fosvitina (una proteína extraordinariamente alta en fósforo) y livetina (alta en azufre) Los lípidos de la yema están unidos a proteínas. De los lípidos totales de la yema, 64% son glicéridos, 30% fosfolípidos y 6% colesterol. El contenido de minerales del huevo se enfatizan en la yema representando más del 56% del total de los minerales y el 44% restante en la clara, quitando por supuesto el cascarón, destacando el fósforo que ocupa el 26.5% del total de minerales, el cloro 18.5%, azufre 17.7%, sodio 15% y potasio 14.8% (Belitz y Grosch, 1997; Charley, 1987).

El huevo sin ser buena fuente de vitaminas contiene la mayoría de ellas, en donde la colina es la que se encuentra en mayor cantidad, seguida del ácido pantoténico e inositol. Las vitaminas se localizan en la yema, también en ésta se encuentra la totalidad de tiamina (Vitamina B1), piridoxina (Vitamina B6), ácido fólico y vitamina B12. La Biotina se encuentra localizada en forma mas elevada en la yema, con el 81% del total. El resto de las vitaminas hidrosolubles están en mayor cantidad en la yema, con excepción de la niacina, ya que el 75% se encuentra en la clara. La riboflavina a pesar de estar en forma mas elevada, en proporción en la yema, en la clara se localiza el 50% aproximadamente del total disponible en huevo (Santos, 1995).



1.1.4 ASPECTOS SOCIOECONÓMICOS

Los principales países productores del huevo son: China que ocupa el primer lugar a nivel mundial con una participación del 55%, seguido de la Unión Europea con 11% y en tercer lugar Estados Unidos con un 10%. México en el 2008 logró recabar dos millones 306,000 toneladas de ese alimento, incrementando su producción en un 2% ocupando así el quinto lugar, como se muestra en la figura 2 (Instituto Nacional Avícola, 2010).

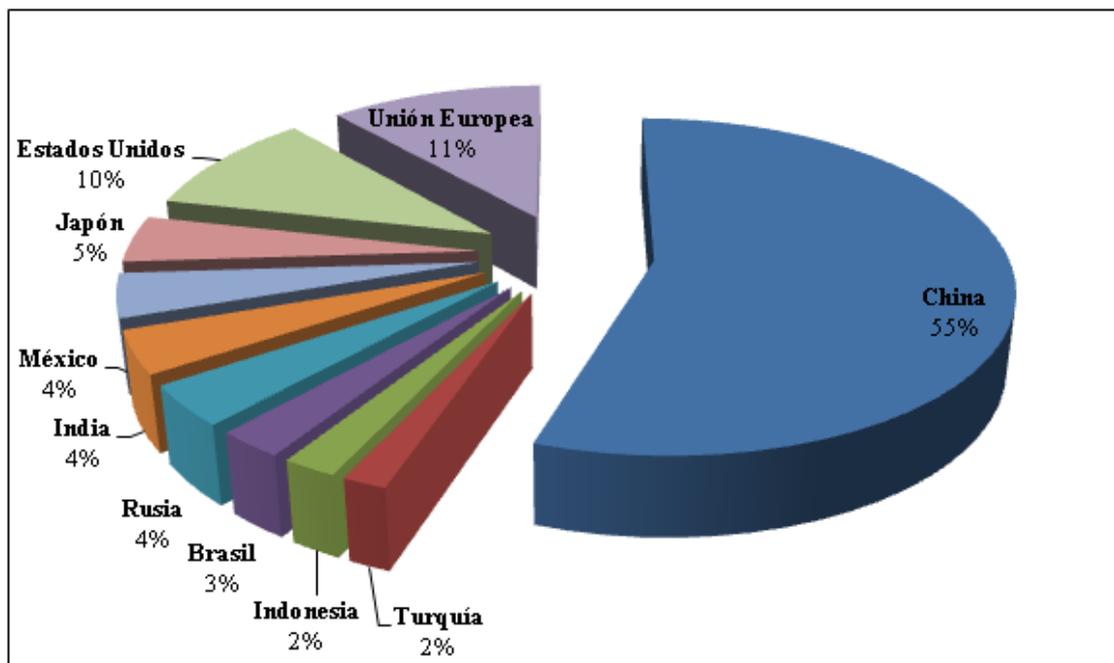


Figura 2. Producción mundial de huevo, creación propia con datos de la UNA.
Fuente: Unión Nacional de Avicultores (2009).

La producción de huevo durante el período 1994-2009 a nivel nacional México creció a un ritmo anual de 3.3 %, actualmente se produce 2.3 millones de toneladas de huevo y se espera un crecimiento del 2% para el 2010 (Unión Nacional Avicultores, 2009).

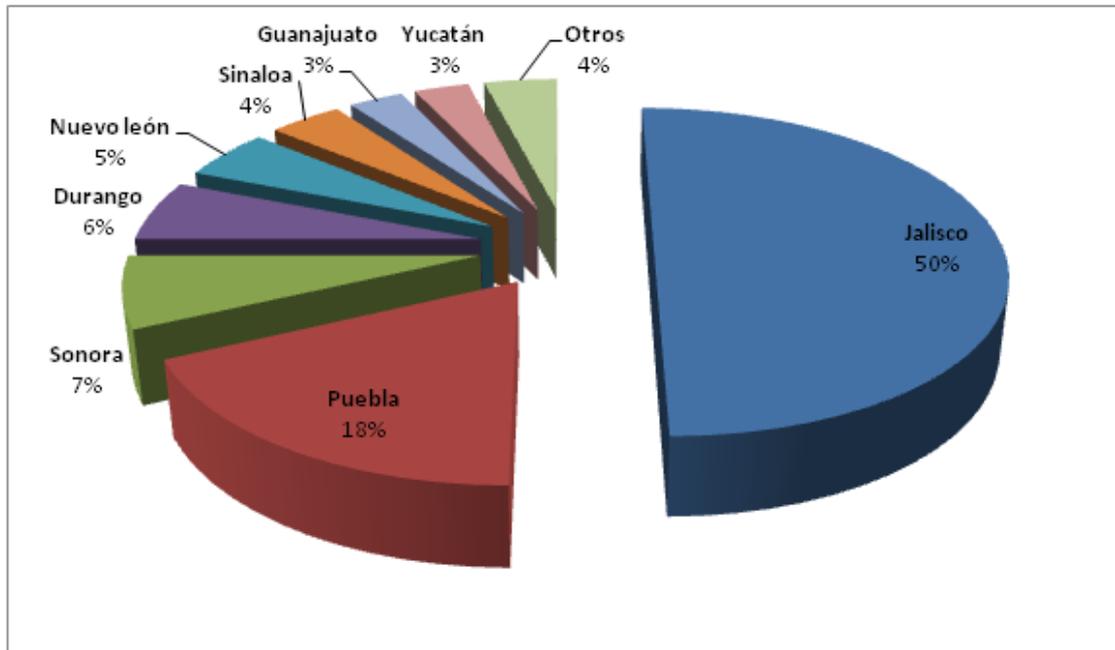


Figura 3. Principales estados productores de huevo en la República Mexicana.
Fuente: Unión Nacional de Avicultores (2009).

En México, Jalisco es el principal estado productor de huevo del país, y se considera que esta entidad participa con un 50% de la producción nacional total seguido de Puebla con un 18%, ver figura 3.

El consumo per cápita de huevo crece sostenidamente en el ámbito mundial a tasas del 1-2% en los últimos años, el mismo se considera asociado al incremento en el hábito de consumo de comidas pre-elaboradas elevando la media mundial a 8,6 kg por habitante al año. El Instituto Nacional Avícola (INA) informó que México es el primer consumidor de huevo fresco en el mundo, pues en 2009 la cifra fue de 21.9 kilos por habitante (Instituto Nacional Avícola, 2010).



1.1.5 PROPIEDADES FUNCIONALES DEL HUEVO EN ALIMENTOS

El término **propiedades funcionales** se refiere a las atribuciones que da el huevo cuando se usa como ingrediente en productos como tallarines, mayonesa pasteles y postres entre otros. Estas funciones se han clasificado de la siguiente forma (Santos, 1995):

➤ **Coagulación:** Se debe a cambios en la estructura molecular de las proteínas del huevo, con una posterior pérdida de solubilidad, seguida de un espesamiento o cambio en el fluido (sol) al estado sólido o semisólido (gel), que pueden producirse por calor, medios mecánicos, sales, ácidos, álcalis, etc. El cambio de sol al estado de gel es conocido como coagulación. En el caso del huevo, la coagulación de proteínas es irreversible. Tanto la clara como la yema son usadas por su capacidad para coagularse (Santos, 1995).

Al aumentar la temperatura, la clara forma un gel firme blanco que se debe principalmente a la ovoalbúmina y la conalbúmina. El mecanismo es el despliegue de su estructura y la agregación posterior de las proteínas desplegadas, formando una red tridimensional que retiene, en su retículo las gotas de agua. La coagulación comienza a los 62°C y va aumentando hasta los 90°C, de modo que los distintos tipos de proteínas van gelificando sucesivamente, comenzando con la conalbúmina y siendo la ovoalbúmina la que se desnaturaliza a temperatura más alta (Primo, 1998).

Las proteínas del huevo se coagulan durante el calentamiento y dan a los huevos la capacidad de aglutinar trozos de alimentos o de espesar a otros alimentos como en los flanes y pudines. Algunas veces la coagulación se considera como la desnaturalización o gelación (Desroisier, 1990).

➤ **Formación de espumas:** Se refiere a la capacidad de incorporar aire por sí mismo o en una mezcla con otros ingredientes y mantener la estructura aireada lo suficiente para que pueda fijarse por medio de calor, secado u otro tratamiento (Desroisier, 1990).

La espuma es una dispersión coloidal, en donde una fase gaseosa se dispersa en una fase líquida. Consiste en el atrapado de burbujas de aire en un líquido, donde este último es una fase continua y la burbuja es la fase dispersa. En el caso de la clara de huevo es un coloide viscoso en donde se encuentran dispersas las proteínas en el agua. El líquido puede formar espuma por batido o agitación, incorporando burbujas de aire (Santos, 1995).



En el batido como consecuencia del gran aumento que experimenta la interface líquido/aire, se produce la desnaturalización y agregación de las proteínas. En particular, la ovomucina forma en las laminillas líquidas en torno a las burbujas de aire una película de material insoluble. También las globulinas contribuyen de manera importante a incrementar la viscosidad y disminuir la tensión superficial, lo que tiene particular importancia especialmente al inicio del batido. La espuma generada al batir la clara de huevo se utiliza para introducir aire y así “esponjar” los alimentos como productos de pastelería como merengues, pasteles diversos, bísquets y soufflés, etc. (Belitz y Grosch, 1997).

➤ **Emulsificación:** La yema es por si sola una emulsión, una dispersión de gotas de aceite en una fase continua de componentes acuosos. Además es un eficiente agente emulsificante (Santos, 1995).

Las lipoproteínas y los fosfolípidos de la yema son la causa del poder emulgente, por que estabilizan las micelas grasas de una emulsión, formando una capa externa lípido-proteíca, con la parte lipóide hacia el interior y la parte hidrófila hacia el medio acuoso. Por eso la yema del huevo se utiliza para fabricar mayonesas, cremas y salsas grasas (Primo, 1998).

La yema de huevo, el huevo entero y la clara del huevo son todos buenos emulsificantes. En realidad la yema de huevo se considera cuatro veces mas efectiva como emulsificante que la clara y el huevo entero es intermedio entre los dos. Las propiedades emulsificantes excelentes de la yema del huevo se atribuyen a las lecitoproteínas (Desrosier, 1990).



1.1.6 MODIFICACIONES DURANTE EL ALMACENAMIENTO DEL HUEVO

Los huevos experimentan durante su almacenamiento una serie de modificaciones, donde este el huevo pierde CO₂ así como una pérdida de humedad a través de los poros del cascarón. El CO₂ se desprende del huevo arriba de 7 días de conservación. La mayoría del CO₂ se remueve en los dos días iniciales, siendo el primero el de mayor desprendimiento de CO₂ (Santos, 1995).

La pérdida de humedad a través de la cáscara hacia el exterior produce una pérdida de peso acompañado de un incremento del pH debido a la pérdida de CO₂. La cámara de aire aumenta debido a la pérdida de humedad. La altura de la clara y el índice de yema disminuyen conforme incrementa el periodo de almacenamiento. (Frazier y Westhoff, 1993; Santos, 1995).

La contaminación microbiológica del huevo se da en la cáscara seguido de una penetración a través de los poros para llegar hasta las membranas internas, con una posterior multiplicación en las membranas atravesando la clara para alcanzar la yema en la que se pueden multiplicar con facilidad debido al alto contenido nutricional de la misma y así completar la alteración del huevo. Las bacterias incapaces de multiplicarse en la clara del huevo pueden alcanzar la yema y multiplicarse en ella solamente en el caso de que esta contacte con la membrana interna de la cámara de aire. El tiempo necesario para que las bacterias atraviesen las membranas de la cáscara depende del microorganismo de que se trata y de la temperatura de almacenamiento (Stadelman y Cotterill, 1977).

Los cambios en la calidad del huevo durante el almacenamiento pueden estar causados por reacciones químicas o microbiológicas, originando pérdidas tanto de humedad como de dióxido de carbono, así como una contaminación microbiológica, las cuales se dan a través de su propia envoltura natural conocida como “cascarón”. Bajo condiciones adversas de almacenamiento también pueden absorber olores poco convenientes (Villanúa, 1990; Plank, 1984; Desroisier, 1990).



1.1.7 MÉTODOS DE CONSERVACIÓN DEL HUEVO

En los huevos, los conservadores se pueden emplear aplicándolos sobre la cáscara, incorporándolos a la atmósfera de su entorno o aplicándolos sobre las envolturas o sobre los recipientes que se emplean para los mismos. Algunas sustancias se emplean principalmente para reducir la salida al exterior del dióxido de carbono y de la humedad (Frazier y Westhoff, 1993).

➤ **Aplicación de recubrimientos:** Se han empleado una gran cantidad de diferentes sustancias para aplicarlas sobre la superficie externa de la cáscara de los huevos con el fin de contribuir a su conservación. El revestimiento de la cáscara de los huevos con una capa de cera o de aceite, o cualquier otro procedimiento para tapar los poros de la cáscara son ejemplos de ello (Suppakul y col, 2003).

➤ **Atmósferas controladas:** Los únicos dos gases que se añaden a la atmósfera de las cámaras donde se almacenan los huevos con el fin de mejorar su calidad de conservación, son el dióxido de carbono y el ozono aunque experimentalmente también se ha empleado el nitrógeno (Frazier y Westhoff, 1993).

El procedimiento más común para conservar huevos consiste en el empleo de bajas temperaturas, como la refrigeración de huevos con cáscara, con lo cual se disminuye la penetración y su posterior multiplicación de microorganismos en el interior del huevo. El recubrimiento de los huevos con aceite, almacenamiento con atmósferas controladas o tratamiento con conservadores químicos se pueden combinar con la refrigeración. (Villanúa, 1990; Frazier y Westhoff, 1993).



1.1.8 OVOPRODUCTOS

Se consideran como productos derivados del huevo constituidos total o parcialmente por huevo de gallina, desprovisto de cáscara y destinados a servir de materia prima para la elaboración de productos alimenticios. Los derivados del huevo los podemos clasificar en (Madrid, 1993):

- **Líquidos:** Constituidos por el contenido entero del huevo o bien por la clara separada de la yema.
- **Secos:** obtenidos por deshidratación o desecación de los derivados líquidos.
- **Compuestos:** Son obtenidos a partir del huevo entero en forma líquida o en polvo, a los que se les agrega otros productos alimentarios, con un mínimo del 50% de huevo.

Entre los procesos más importantes para la obtención de los ovoproductos se encuentran: desglucosado, deshidratación, pasteurización, y congelación (Muller, 1986).

- **Desglucosado:** En el caso de las claras, después de someterlas a una filtración se enfrían y se ajusta el pH, haciendo entonces un tratamiento enzimático o microbiológico para la eliminación de azúcares, con la finalidad de disminuir reacciones de pardeamiento de Maillard (Primo, 1998).
- **Deshidratación:** Los huevos se deshidratan por atomización: aunque algunas veces se liofilizan. Si los procesos se efectúan correctamente no son afectadas las propiedades nutritivas del huevo. Las variaciones de los nutrientes pueden ser del 15 por ciento o superiores (Muller, 1986).
- **Pasteurización:** En el caso del huevo, el microorganismo a destruir es la salmonella y la temperatura debe ser la adecuada para destruir y evitar la coagulación de las proteínas. En el caso de la yema la *Salmonella* es más termo resistente en la yema que en huevo entero, debido a su mayor contenido de nutrientes; por esta razón los requisitos mínimos de pasteurización difieren con el tipo de ovoproducto (León, 1993).



➤ **Congelación:** Para disminuir la carga microbiana se suele pasteurizar y para después congelar, esta puede afectar las propiedades tecnológicas del huevo: como la capacidad de batido, consistencia, estabilidad emulsificante y otras propiedades. La congelación también reduce la flora bacteriana hasta 99% sin afectar las propiedades nutritivas (Belitz y Grosch, 1997; Muller, 1986).

En la figura 4 se muestra un diagrama general del proceso para la obtención de ovoproductos.

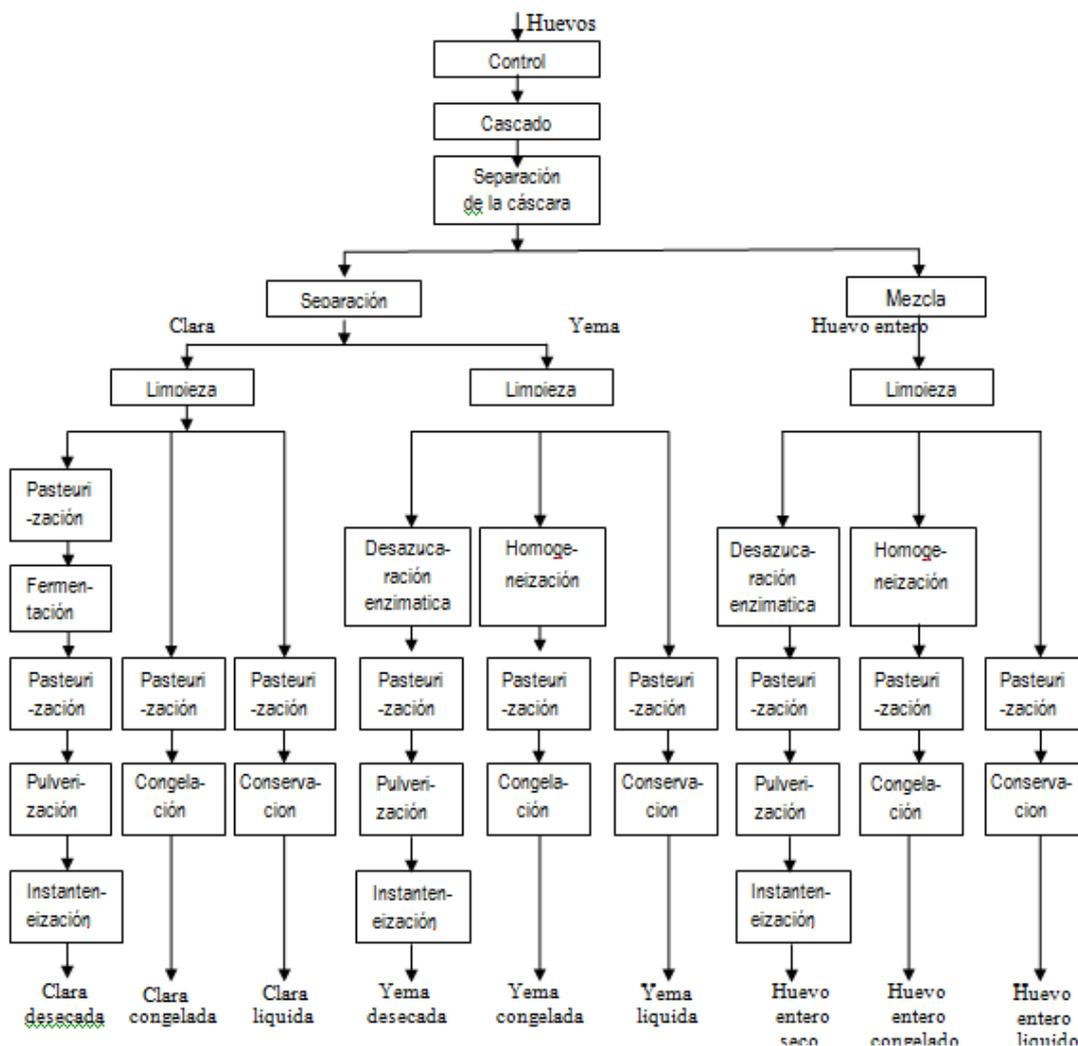


Figura 4. Esquema de la fabricación de ovoproductos (Belitz y Grosch,1997).



1.1.9 PROBLEMAS DE SANIDAD QUE PRESENTA EL HUEVO FRESCO

Se ha considerado al consumo de huevo crudo o subproductos semicocido como vehículo de transmisión de *Salmonella enteritidis*. Esta infección puede presentarse como resultado de las condiciones inadecuadas posteriores a la puesta del huevo, debido a la penetración de contaminantes fecales presentes en el ponedero o en las cajas de embalaje y almacenamiento, a través de los poros del cascarón, especialmente cuando dicha estructura está fisurada o demasiado sucia, o bien porque el tracto reproductor del ave se encuentre infectado, siendo la primera causa, la de mayor interés (Mancera, 2005; Frazier y Westhoff, 1993).

La infección por *Salmonella enteritidis* en gallinas de postura y pollos de engorda tiene importantes implicaciones en la salud pública mundial. Aunque México ha sido declarado como libre de *Salmonella pullorum* y existe el control de *Salmonella gallinarum*, en la producción avícola no se considera a otras *Salmonellas* capaces de producir zoonosis como es el caso de la *Salmonella enteritidis* (Mancera, 2005).

Los huevos de gallina recién puestos no suelen estar contaminados, sí bien algunos microorganismos pueden ganar acceso a éstos a través del oviducto. Entre los microorganismos productores de infecciones alimentarias que pueden estar presente en el huevo se encuentran *Salmonella* sp u otras *Enterobacterias*. En los últimos años en algunos países se han incrementado los casos de infecciones alimentarias por el consumo de huevo contaminado con *Salmonella*. En México el huevo se consume crudo, semicocido y cocido por lo tanto este representa un gran impacto en la salud nacional (Leyva y col., 1996).



1.2 GENERALIDADES DE PELÍCULAS COMESTIBLES

1.2.1 DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN

Los términos película, recubrimiento o cubierta, con frecuencia se emplean como sinónimos, pero estos se diferencian entre sí, ya que una cubierta comestible es definida generalmente como una capa delgada formada sobre el alimento y aplicada en forma líquida sobre el mismo por inmersión, espuma, aspersión, goteo, colado o con una brocha, las mismas son una parte integral del producto alimenticio; mientras que una película comestible es una capa preformada sólida que luego es colocada sobre o entre los componentes de un alimento, mejorando la calidad del mismo (Roblejo, 2009).

Un embalaje en forma de película, revestimiento o capa delgada protectora se califica como comestible cuando forma parte integrante del alimento y se consume como tal. A causa de esta doble función de embalaje y de constituyente del alimento, las películas y revestimientos comestibles ofrecen numerosas ventajas, aunque también deben cumplir con una serie de condiciones que se resumen en la Tabla 2 (Bourtoom, 2008).

Tabla 2. Películas y envolturas comestibles: ventajas y condiciones requeridas.

Ventajas	Condiciones requeridas
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Consumo directo con el producto. ➤ Materiales poco costosos. ➤ Pueden dar protección a pequeñas porciones del alimento (individualmente). ➤ Retardo de la transferencia de agua, gases, grasas y solutos. ➤ Disminución de las pérdidas de sustancias volátiles (aromas). ➤ Protección frente a contaminantes microbianos u otros y frente a ciertos agentes externos (agua, oxígeno, etc.). ➤ Mejoran las propiedades de autoconservación, organolépticas y nutricionales. ➤ En gran parte biodegradables. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Palatabilidad (solubilidad, dispersabilidad en la boca o durante su preparación). ➤ Propiedades organolépticas compatibles con la naturaleza del alimento. ➤ Buenas propiedades mecánicas ➤ Estabilidad (conservación) suficiente. ➤ Tecnología simple. ➤ Ausencia de toxicidad. ➤ Composición acorde con la reglamentación relativa a la aplicación alimentaria. ➤ Termosellable y/o buena adhesión a la superficie del alimento. ➤ Funcional en las condiciones de empleo

Fuente: Bureau y Multon (1995).



Entre los componentes que pueden ser usados para obtener películas y cubiertas comestibles se recomienda el empleo de biomateriales como proteínas, lípidos y polisacáridos; estos últimos incluyen la celulosa, almidón, alginatos, pectina, carragenina y quitina (Roblejo, 2009).

Los componentes de películas y cubiertas comestibles se clasifican en tres categorías (Roblejo, 2009):

- Hidrocoloides (polisacáridos y proteínas)
- Lípidos y resinas
- Multicomponentes

Las películas y recubrimientos comestibles se elaboran con biopolímeros naturales de alto peso molecular que proporcionan una matriz macromolecular con resistencia cohesiva alta. Los principales componentes de los recubrimientos comestibles son polisacáridos, proteínas, lípidos y resinas; además las formulaciones pueden incluir plastificantes tales como los alcoholes polihidroxílicos (glicerol, sorbitol, manitol, polietilenglicol y propilenglicol) y emulsificantes de distinta naturaleza química que mejoran las propiedades (flexibilidad y elongación) de los recubrimientos (Roblejo, 2009; Navarro, 2007).

Hidrocoloides

Los biopolímeros de alto peso molecular y soluble en agua son denominados comúnmente hidrocoloides. Las películas o recubrimientos formulados con hidrocoloides tienen aplicaciones en los casos en los que el control de la migración del vapor de agua no es el objetivo, ya que éstas son excelentes como barrera para la difusión del O₂, CO₂ y lípidos. La mayoría de estas películas también tienen propiedades mecánicas y estructurales deseables que las hacen útiles para mejorar la integridad estructural de productos frágiles. Los hidrocoloides utilizados para la elaboración de recubrimientos se clasifican de acuerdo con su composición, carga molecular y solubilidad en agua (Bósquez, 2003).



Polisacáridos

Los polisacáridos son polímeros que forman redes moleculares cohesionadas con un alta interacción (puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, London, Debye y de valencia primaria), su cohesión molecular le confiere buenas propiedades mecánicas pudiendo ejercer de matriz estructural de recubrimiento, de barrera a los gases (O_2 y CO_2) y se adhieren a las superficies, su función es menor como barrera contra la pérdida de humedad debido a que tienen una naturaleza hidrofílica, son polímeros de larga cadena que al ser dispersados en agua confieren un efecto viscoso. Su ventaja es que no es grasoso, son películas de bajas calorías, pueden ser empleados para extender la vida de anaquel de diferentes productos alimenticios (Navarro, 2007; Bernardo, 2007).

Entre los carbohidratos formadores de películas están incluidos la celulosa, pectinas, almidón y sus derivados, alginatos, quitosano, carragenina, goma garrofin, xantana, el pululano, levano y elsinano son algunos de los polisacáridos utilizados en la formulación de recubrimientos comestibles (Bósquez, 2003; Navarro, 2007).

Proteínas

Las proteínas son buenas formadoras de películas y se adhieren a las superficies hidrofílicas pero en la mayoría de los casos no resisten la difusión al vapor de agua (Bernardo, 2007), sin embargo, son más resistentes a la transferencia de O_2 y solutos diversos que las películas preparadas a partir de polisacáridos, aumentando con esto la vida de anaquel de alimentos envasados. Cada tipo de proteína brinda distintas propiedades fisicoquímicas y mecánicas a las películas comestibles; la incorporación y liberación de sustancias activas depende tanto de la clase de proteína con la que fue elaborada la película, así como del compuesto molecular del compuesto activo (Aguilar, 2007; Murillo, 2008), algunos recubrimientos ofrecen mejores ventajas al ser combinados con caseína en su formulación (Bernardo, 2007). Algunas proteínas utilizadas en la formulación de recubrimientos comestibles son la zeína de maíz, proteína de soya y cacahuate, gluten de trigo, gelatina, queratina, colágeno, proteína del suero de leche y caseína (Navarro, 2007).



Lípidos y resinas

Los lípidos, por su naturaleza hidrofóbica ejercen una buena barrera al vapor de agua, mientras aquellas que contienen resinas son más permeables al vapor de agua, aunque en menor grado que algunos recubrimientos con polisacáridos. Sin embargo su falta de cohesividad e integridad estructural hace que presenten malas propiedades mecánicas formando recubrimientos quebradizos. Los lípidos más utilizados en la formulación de recubrimientos comestibles son ceras naturales (cera de abeja, candelilla y carnauba), ácidos grasos, monoglicéridos acetilados y diversos aceites vegetales (cacahuates, maíz y soja). Algunos lípidos y la mayoría de cubiertas de resina pueden generar condiciones de anaeróbicas debido a sus características de baja permeabilidad a gases además no se adhieren a superficies cortadas de naturaleza hidrofílica (Bernardo, 2007; Navarro, 2007).

Las resinas aportan brillo al recubrimiento, son más permeables al vapor de agua que los lípidos y ejercen una importante barrera a la difusión de fases, por lo que pueden inducir la anaerobiosis de frutos recubiertos. La resina más utilizada es la goma laca (Navarro, 2007).

Multicomponentes

Con la intención de aprovechar las ventajas de los diferentes componentes, las formulaciones se elaboran combinando los materiales mencionados en diferentes proporciones. En estas cubiertas compuestas, el uso de dos ó más materiales simplemente combinados o laminados permiten mejorar las propiedades de intercambio gaseoso, adherencia y permeabilidad al vapor de agua. Este tipo de recubrimientos tienen potencial para cubrir productos vegetales enteros o mínimamente procesados (Bósquez, 2003).

Estos recubrimientos compuestos se formulan a partir de hidrocoloides (polisacáridos y proteínas), que constituyen la matriz estructural y como barrera a gases, y lípidos que aportan la resistencia al vapor de agua (Navarro, 2007).



Otros ingredientes

Ciertos componentes se adicionan, en menores cantidades, a las formulaciones de los recubrimientos para modificar las propiedades mecánicas; a estos compuestos se les clasifica como plastificantes o emulsificantes. Los compuestos lipofílicos se usan frecuentemente para ambos propósitos, e incluso pueden utilizarse como el principal ingrediente formador de la película. Los plastificantes incrementan la flexibilidad de la cubierta, mejorando la dureza y funcionamiento disminuyendo la formación de escamas y grietas. A nivel molecular, estos compuestos debilitan las fuerzas intermoleculares entre las cadenas adyacentes del polímero, disminuyendo la fuerza tensil e incrementando simultáneamente la flexibilidad de la película. Los plastificantes lipídicos más comúnmente empleados incluyen aceites, lecitina, ceras, ácidos grasos y derivados. Debido a la inherente flexibilidad de los monoglicéridos acetilados, algunas veces se incorporan en la formulación de una cubierta a base de ceras para impartir plasticidad adicional sin disminuir materialmente la resistencia de la cubierta a la transferencia de humedad (Bernardo, 2007).

1.2.2 PROPIEDADES

Las películas y cubiertas comestibles sirven de barrera a la humedad, oxígeno, dióxido de carbono, la solubilidad en agua o lípidos, color, apariencia, transparencia; suministran varios materiales al alimento, los cuales pueden mejorar sus propiedades mecánicas, reológicas, protectoras, organolépticas o nutricionales durante su comercialización. Los plastificantes, agentes de entrecruzamiento, antimicrobianos, agentes antioxidante y saborizantes se pueden añadir para mejorar las propiedades funcionales de la película. Estos aditivos deben ser adaptados a cada aplicación específica que en general depende del tipo de alimento (características fisicoquímicas) y de su vida útil (Weber, 2000; Guilbert y col., 1995).

Tomando en cuenta sus propiedades, las películas biodegradables pueden desempeñar la función de envase primario y con su utilización en la industria pueden disminuir la cantidad de material sintético utilizado para estos fines. Además, permiten sustituir a los materiales de envases multicomponentes por un material de un sólo componente (Catalá y Gavara, 2001).



Propiedades organolépticas

Las películas y recubrimientos comestibles tienen propiedades organolépticas lo más neutrales posibles (claro, transparente, inodoro, insípido, etc.) para no ser detectado cuando es consumido. Realza la apariencia de la superficie dando brillantez y si es requerido proporciona características táctiles como viscosidad reducida. Las películas a base de hidrocoloides son generalmente más neutras que las derivadas de lípidos y ceras que a menudo son opacas, resbaladizas y de textura cerosa. Las películas y recubrimientos también pueden ayudar a mantener un mayor color, sabor, especias, ácido, azúcar, edulcorante y concentraciones de sal, dando así al alimento una apariencia atractiva en la superficie. Este procedimiento podría ser utilizado para proporcionar una mejora nutricional sin destruir la integridad de los productos alimenticios (Kester y Fennema, 1986).

Solubilidad en lípidos y agua

En general, la mayoría de las películas de hidrocoloides y recubrimientos comestibles son solubles en agua, a menos que un tratamiento de reticulación o bronceado haya sido llevado a cabo o utilizar las condiciones de desnaturalización.

En el desarrollo de películas de barrera contra la humedad bajo un amplio rango de humedades relativas, a menudo es necesario el uso de materiales que son casi o totalmente insolubles en agua con el fin de evitar la pérdida de las cualidades de la película a través de la hinchazón o desintegración al entrar en contacto con el alimento (Guilbert y col., 1995).

Propiedades mecánicas

Las películas deben ser generalmente resistentes a la fractura y a la abrasión (para fortalecer la estructura de los alimentos sólidos y la facilidad de manejo), y flexible (con suficiente plasticidad para adaptarse a una posible deformación completa o sin fractura) (Guilbert y col., 1995).

Las propiedades mecánicas de las películas pueden mejorar la plastificación de las redes de los polímeros. Hay dos métodos diferentes: Plastificación interna se obtiene para modificar la estructura química del polímero, por ejemplo, la co-polimerización, hidrogenación selectiva, transesterificación cuando los lípidos comestibles o materiales derivados son



utilizados. Plastificación externa es obtenida mediante la adición de agentes que modifican la organización y la energía involucrada en la estructura tridimensional de polímeros formadores de películas. Sin embargo, esto también da lugar a la reducción de gas, vapor y como barrera de solutos. La reducción de las fuerzas intermoleculares entre las cadenas del polímero y por consiguiente la cohesión global facilita la extensibilidad de la película (menos frágil, más flexible) y reduce su temperatura de transición vítrea T_g . El agua es un plastificante común, pero es muy difícil de controlar en películas hidrofílicas (Banker, 1966).

Permeabilidad al vapor de agua

Las películas y recubrimientos comestibles con buenas propiedades de barrera a la humedad se puede utilizar para controlar la transferencia de humedad. En la superficie de secado de algunos alimentos frescos o congelados, su absorción de la humedad en seco o semi-húmeda incluso puede ser obstaculizada por usar películas con baja permeabilidad al vapor de agua (Guilbert y col., 1995).

Para las películas hidrofílicas, al incrementar la actividad de agua (a_w) conduce a un aumento en el contenido de humedad en la película, y por lo tanto induce a un aumento de la permeabilidad al vapor de agua. A elevada a_w se incrementa la hinchazón de la red con agua probablemente aumenta la difusión de la molécula de agua, lo cual claramente las películas no serían eficientes como barreras de vapor de agua (Kamper y Fennema, 1985).

El papel fundamental del agua como plastificante de películas hidrofílicas parece ser muy dependiente de la temperatura. El agua no es muy soluble en películas a base lípidos debido a la baja polaridad y densas matrices moleculares bien estructuradas que pueden estar formando estos compuestos (Guilbert y col., 1995).



Permeabilidad a gases

Las películas comestibles que sirven de barrera al oxígeno se pueden utilizar para proteger a los alimentos que son susceptibles a la oxidación (pérdida de vitaminas oxidables, enranciamiento, etc.). Por el contrario, una relativamente alta permeabilidad a los gases es necesaria para recubrir frutas y verduras frescas (especialmente la permeabilidad al dióxido de carbono). El desarrollo de películas comestibles con una permeabilidad selectiva de gases (oxígeno, carbono, etileno) permite el control de intercambio respiratorio, y el desarrollo microbiano parece muy prometedor para lograr un efecto atmósfera modificada en fruta fresca y para mejorar un almacenamiento potencial para de estos productos (Guilbert y col., 1995).

1.2.3 APLICACIONES EN ALIMENTOS

El empleo de embalajes o envolturas comestibles para la protección de alimentos se practica de forma empírica desde hace mucho tiempo. Por ejemplo, podemos citar la protección frente a la desecación e intercambios gaseosos de trozos de carne mediante recubrimiento con grasa (que se practica en Europa desde el siglo XVI), de algunos productos de bollería con azúcar o chocolate o de ciertas frutas por recubrimiento con películas de cera (practicado en China desde el siglo XII) (Bureau y Multon, 1995).

El empleo de hojas lipoproteicas, obtenidas mediante el secado de la piel formada durante la ebullición de la leche de soja, se utiliza tradicionalmente en Asia como material de embalaje para mejorar la presentación o conservación de ciertos alimentos. Algunos alimentos naturales, por ejemplo, el pan, disponen de una capa superficial protectora, la corteza que se forma a lo largo de distintas operaciones como por ejemplo, la cocción, el secado o la fritura (Bureau y Multon 1995).

En la actualidad se han llevado a cabo numerosos trabajos acerca de la puesta y utilización de películas o envolturas comestibles para mejorar la calidad de diversos alimentos frescos, transformados o congelados. En la Tabla 3 se resumen algunas de las principales aplicaciones en alimentos (Suppakul y col., 2003)

**Tabla 3.** Aplicaciones de las películas y envolturas comestibles.

Objetivos	Principales propiedades requeridas	Aplicaciones
Suministrar protección frente a la humedad y/o al oxígeno	Buena aptitud para la envoltura Baja permeabilidad al oxígeno y/o al agua (posibilidad de adición de un antioxidante)	Pescado fresco, queso, carne y derivados cárnicos Alimentos con humedad intermedia (AHÍ) Frutos secos, almendras, nueces, aperitivos, patatas fritas chips, frutas frescas. Alimentos congelados
Limitar la desecación superficial	Película húmeda (se deshidrata con el alimento)	Alimentos frescos o congelados
Retardar el deterioro microbiano superficial	Incorporación de un agente antimicrobiano	Alimentos húmedos o con humedad intermedia
Mantener las diferencias del a_w en un alimento heterogéneo	Buenas propiedades de barrera frente a la humedad	Alimentos heterogéneos (pastelería, galletas, pizzas, pates, confitería etc.) Mezcla de frutos secos para aperitivo, desayunos, sopas, alimentos congelados heterogéneos
Controlar la transferencia de solutos, pigmentos aromas, etc., en un alimento heterogéneo	Buenas propiedades de barrera frente a los solutos y/o a las grasas	Idem
Impedir la absorción de salmuera, jarabe de deshidratación osmótica o aceite de fritura por el alimento	Idem	Alimentos congelados salados (gambas, cangrejo, etc.); deshidratados por osmosis o fritos
Mejorar las propiedades mecánicas para facilitar las manipulaciones en el de proceso de fabricación o en el almacenamiento y reducir el deterioro, reforzando la estructura del alimento	Buena adhesión y cohesión	Cacahuates, gambas, cangrejos de mar, productos texturizados, de pastelería, productos secos liofilizados, alimentos con corteza y decorados
Proteger individualmente trozos pequeños del alimento	Superficie no pegajosa y buenas propiedades de barrera y mecánicas	Dados de queso, frutos secos y productos de humedad intermedia, cubitos de hielo o sorbetes, etc.
Obtener una superficie no adhesiva o aceitosa Impedir la aglomeración de trozos pequeños	Superficie seca y no pegajosa	Dados de queso, frutos secos, productos fritos, congelados
Mejorar el aspecto superficial de un alimento	Lisa, brillante y homogénea	Productos de panadería (glaseado, barnices), confitería, frutas frescas y secas, aperitivos, etc.
Mejorar o modificar el color, aroma y gusto del alimento	Soporte de colorantes, aromas, salsas, etc., buenas propiedades de barrera	Aplicaciones múltiples
Atrapar los aromas durante la fabricación y almacenamiento	Buenas propiedades de barrera	Frutas de humedad intermedia, alimentos secos, etc.
Acondicionamiento en porciones pre dosificadas de ingredientes destinados a ser dispersados en los productos alimentarios	Aptitud para formar una "cápsula" soluble o dispersable en caliente y en frío	Aditivos con finalidad nutritiva, aditivos alimentarios, concentrados de levadura alimentaria o de enzimas, aromas especias, salsas, etc.
Protección y embalaje de porciones "listas para su empleo" para disolución en agua o en alimentos	Aptitud para formar una "cápsula" soluble en agua	Sopas deshidratadas, bebidas instantáneas, edulcorantes, salsas, preparaciones aromáticas

Fuente: Bureau y Multon (1995).

En el caso del huevo se hace uso de un recubrimiento con aceites vegetales o minerales utilizando generalmente parafina. Esta tapona los poros, y hacen que el cascaron sea menos



permeable al vapor del agua y al dióxido de carbono, por lo que se retarda el deterioro de la calidad de los huevos, durante su almacenamiento (Charley, 1987).

1.3 GENERALIDADES SOBRE LA QUITINA Y QUITOSÁN

1.3.1 DEFINICIÓN

El término quitina proviene del griego chitón que significa túnica o cubierta (Covarrubias e Hidalgo, 2007).

La quitina es un polisacárido abundante en la naturaleza, este material se encuentra en crustáceos, insectos, etc., consiste en 2-acetamido-2-desoxi- β -D-glucosa en un enlace β (1-4), ver figura 5, la quitina puede ser degradado a quitinasa, es un material altamente insoluble parecido a la celulosa en su solubilidad y baja reactividad química, su función principal es como polisacárido estructural. La quitina es blanca, resistente, inelástica, polisacárido nitrogenado y la principal fuente de contaminación de superficie en las zonas costeras (Ravi, 2000).

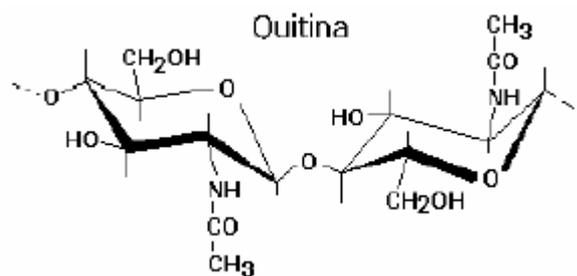


Figura 5. Estructura química de la quitina.
Fuente: Roblejo (2009).

El derivado de la quitina que mayor atención y usos a recibido es el quitosán; al igual que la quitina es uno de los polímeros más abundantes en la naturaleza, tiene aplicaciones industriales extremadamente importantes (Covarrubias e Hidalgo, 2007). El quitosán fue descubierto por Rouget en 1859, quién encontró que al tratar quitina con una solución caliente de hidróxido de potasio se obtiene un producto soluble en ácidos orgánicos y la llamó quitina modificada; más tarde en 1894, fue estudiada por Hoppe- Seyler quién la denominó quitosano (Muzarrelli, 1974). El quitosán es el N-desacetilado derivado de la quitina a través de un tratamiento alcalino, químicamente se describe como (1-4)-2-amino-2-



desoxi- β -D-glucosa (fig. 6), aunque esta N-desacetilación casi nunca es completada (Ravi, 2000; Covarrubias e Hidalgo, 2007).

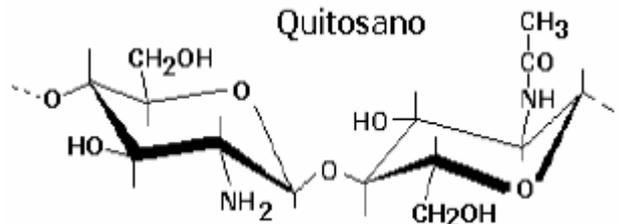


Figura 6. Estructura química del quitosán.

Fuente: Roblejo (2009).

1.3.2 PROPIEDADES FUNCIONALES

El quitosán tiene muchas aplicaciones en distintas áreas de investigación, por ejemplo: en la industria farmacéutica, cosmética, medicina, biotecnología, alimenticia y agricultura, entre otros (Miranda, 2000)^a.

Se ha estudiado ampliamente debido a sus propiedades peculiares, dándole así un uso muy versátil, como: vehículo de fármacos de liberación controlada y ADN, para la regeneración de los tejidos epiteliales, formación de las membranas artificiales, promotor de la osteogénesis, antibacteriano, como coadyuvante de higiene oral, la absorción de grasa y reducción del colesterol, componente de los cosméticos, para la eliminación y recuperación de diferentes residuos, la biotransformación y detección de pesticidas, como recubrimiento de semillas para la agricultura y como un agente de floculación en el tratamiento de efluentes acuosos (Fai y cols., 2008).

El quitosán forma una película fina y flexible sobre la piel que evita la pérdida de agua y proporciona elasticidad; se incluye en cosméticos antiarrugas, calmantes, hidratantes y tensores, en cosmética capilar la película de quitosán protege el cabello de las agresiones externas, reduce la carga estática y confiere una fijación ligera del peinado (Zamora, 2008).

En la industria alimentaria se puede utilizar como ingrediente funcional y como fibra alimentaria. Además, tiene la capacidad de unirse a grasas, por lo que se utiliza como agente hipocolesterolémico en productos dietéticos (Harris, 2010). También se ha encontrado que posee la propiedad para formar películas, y que puede ser utilizada en forma de esta o como



recubrimiento comestible, que pueden mejorar la capacidad de almacenamiento de alimentos perecederos. Es biocompatible con órganos, tejidos y células de animales y plantas (Aguilar, 2007), no antígeno, no tóxico y biofuncional, su seguridad biológica ha sido demostrada con experimentos de alimentación con animales domésticos (Leleu y cols., 2009).

Por su propiedad policatiónica como agente coagulante le han dado uso en el tratamiento de aguas residuales debido a su efectividad en la separación de coloides y partículas suspendidas que se generan durante la elaboración de alimentos, permitiendo también la recuperación de materiales como proteínas, grasas y carbohidratos que pueden ser utilizados como alimento para animales (Hernández, 2006).

En el campo de la biomedicina ha sido altamente utilizado debido a sus propiedades anticoagulantes, acción antibacteriana, antifúngica y por su acción como promotor de la cicatrización de heridas (Harris, 2010).

En el área farmacéutica el quitosán puede ser utilizado como agente antimicrobiano y como material para la encapsulación de medicamentos. En agricultura, el quitosán se ha descrito como antiviral en plantas y como aditivo en fertilizantes. También ha sido utilizado en la industria papelera, en la textil y en el tratamiento de aguas residuales (Harris, 2010).

Los complejos formados con quitosán y muchos iones de metal son usados en la quelación de hierro, cobre, magnesio o bien, por sus grupos $-NH_3^+$ el quitosán puede ser usado como un buen floculante para remover iones de metales pesados tóxicos como la plata, plomo, mercurio y cromo (Hernández, 2006).

La Universidad del estado de Washington ha mostrado que el recubrimiento de semillas de trigo con quitosán ha incrementado el rendimiento de los cultivos. El quitosán aparentemente dispara una respuesta en la semilla que puede denominarse como un mecanismo de autoprotección, en especial al ataque de hongos patógenos, muchos de los cuales contienen quitina en sus paredes celulares (Miranda, 2000)^a.



1.3.3 EL QUITOSÁN COMO AGENTE ANTIMICROBIANO

El quitosán tiene actividad antimicrobiana frente a mohos, levaduras y bacterias Gram negativas y positivas. En general, la actividad antimicrobiana del quitosán es mayor cuando el grado de desacetilación es más alto y el peso molecular y pH son más bajos (por debajo de pH 6,3) (Leleu y cols., 2009).

El quitosán y otras poliaminas interactúan con la membrana celular para alterar la permeabilidad de la misma. A bajas concentraciones el quitosán policatiónico probablemente se une a la superficie bacteriana cargada negativamente, causando aglutinación. A altas concentraciones, el gran número de cargas positivas impartirá una carga positiva neta en las superficies bacterianas para mantener a la bacteria en suspensión y elevando aún más la concentración de quitosán, la superficie bacteriana estará cubierta totalmente previniendo la salida de los componentes intracelulares impidiendo la transferencia de masa en ambos sentidos (Miranda, 2000)^a.

El mecanismo de actividad antimicrobiana del quitosán está estrechamente relacionado con las propiedades fisicoquímicas de las soluciones tales como peso molecular, temperatura, pH, fuerza iónica, grado de desacetilación, concentración utilizada y tiempo de exposición, además de las características intrínsecas de la membrana del microorganismo (Fai y cols., 2008; Álvarez y Madin, 2009).

Investigaciones demuestran que la actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram (+) aumenta cuanto mayor sea el peso molecular del polímero, mientras que para las bacterias Gram (-) cuanto menor es la masa molecular, mayor será el potencial antimicrobiano. Así, se ha sugerido los efectos del quitosán en dos tipos distintos de bacterias. En Gram (+), la hipótesis es que el quitosán forma películas alrededor de la célula, que acaba por inhibir la absorción de nutrientes, mientras que los de baja masa molecular penetra más fácilmente en bacterias Gram (-) mediante la unión a ADN e impidiendo la transcripción y traducción, provocando alteraciones en el metabolismo celular. El quitosán es eficiente como antimicrobiano contra varios microorganismos como: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus faecalis*, *Salmonella entérica*, *Salmonella paratyphi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Bacilo cereus*, *Shigella dysenteriae*, *Aeromonas hydrophila*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Helminthosporium*, *Saccharomyces cerevisiae*, *S. ludwigii*, *Baillie zygosaccharomyces*, *Cryptococcus albidus*, *Candida sp.*, *Rhodotorula sp.* (Fai y cols., 2008).



Estudios recientes han informado que el quitosán induce la desorganización molecular y cambios morfológicos en mohos fitopatógenos como: *Fusarium oxysporum*, *Sclerotio Sclerotinia*, *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium digitatum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Aspergillus niger*, entre otros. El quitosán también tiene la función de agente quelante de iones metálicos. Por lo tanto, se sugiere que este polisacárido también podría interferir con la producción de toxinas en el crecimiento microbiano (Fai y cols., 2008).

1.3.4 APLICACIONES EN ALIMENTOS

Este biopolímero ha demostrado tener múltiples efectos en sistemas alimenticios como: fibra dietética, conservador, adsorbente de lípidos y emulsificante, recuperación de material de desecho, estabilización de color, aditivo en alimentos para animales, cubiertas biodegradables en frutos y otros alimentos. Además los productos de vinagre que contienen quitosán son manufacturados en Japón debido a su habilidad para disminuir el colesterol (Rodríguez y cols., 2003).

Las películas preparadas a partir de quitosán y sus derivados, así como sus propiedades mecánicas, de barrera y su biodegradación son características estudiadas. Es antifúngico y antimicrobiano, las películas a partir de quitosán prolongan la vida de los alimentos en las estanterías o en los anaqueles como en el caso del banano, mango y pera. Se han realizado estudios en películas de quitosán-almidón y quitosán-PLA las cuales han mostrado una alta permeabilidad a gases y un aumento en las propiedades mecánicas (Villada y cols., 2007).

En la actualidad, la calidad es un componente fundamental de los alimentos, tales como la seguridad alimentaria (inocuidad) y componente indispensable de la calidad. Sin embargo, el mantenimiento de la calidad de diversos productos alimenticios durante su vida útil sólo es posible gracias a las acciones de conservantes químicos, por lo que la producción de alimentos es algo complejo, dado que los consumidores exigen alimentos seguros para el consumo, con mínimo de aditivos químicos, con la comodidad de tener una larga vida útil (Fai y col., 2008).

La aplicación de ceras o recubrimientos produce importantes efectos sobre la fisiología y calidad de las frutas. El quitosán es una molécula biológicamente muy activa que presenta múltiples aplicaciones en postcosecha debido principalmente a su poder antimicrobiano, a la capacidad de formar films comestibles y a sus propiedades antioxidantes. El objetivo del



presente trabajo ha sido evaluar el quitosán aplicado como recubrimiento a diferente contenido en sólidos sobre la fisiología y calidad de naranjas (Contreras y cols., 2006).

En la tabla 4, se muestran algunas aplicaciones del quitosán en la industria alimenticia:

Tabla 4. Aplicación de quitosán en alimentos.

Aplicación	Ejemplos
Agente antibacteriano	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Bactericida ➤ Fungicida ➤ Medición de la contaminación de moho en la agricultura
Película comestible	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Controla la transferencia de humedad en el alimento y el ambiente ➤ Controla la liberación de sustancias antimicrobianas ➤ Controla la liberación de antioxidantes ➤ Controla la liberación de nutrientes y sabores ➤ Reduce la presión parcial de oxígeno ➤ Controla la respiración, temperatura y pardeamiento enzimático en frutos

Fuente: Miranda (2007).



OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de un recubrimiento a base de quitosán en diferentes formulaciones sobre las propiedades físicas, fisicoquímicas y microbiológicas del huevo fresco, durante su vida útil.

OBJETIVO PARTICULARES

1. Determinar el efecto de un recubrimiento a base de quitosán en diferentes formulaciones sobre la pérdida de peso, cámara de aire, altura de la albúmina e índice de yema en huevos almacenados a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante su vida útil.
2. Determinar el efecto de un recubrimiento a base de quitosán sobre la alcalinización en huevos almacenados a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante su vida útil.
3. Determinar el efecto de un recubrimiento a base de quitosán en diferentes formulaciones sobre la inhibición de *Salmonella enteritidis*, Mesófilos aerobios, Coliformes totales y *Staphylococcus aureus* en huevos almacenados a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante su vida útil.

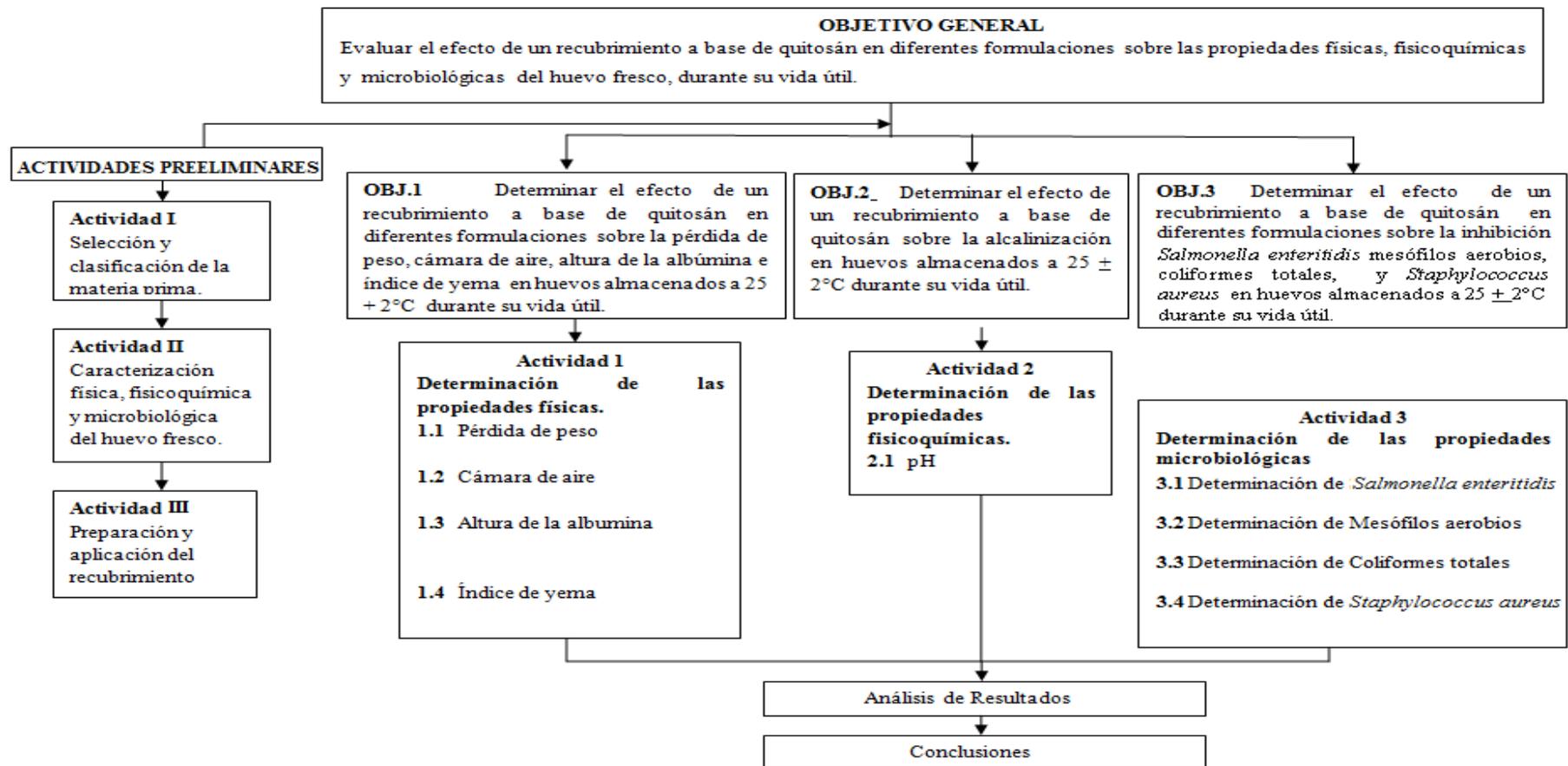


MATERIALES Y MÉTODOS



2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Cuadro Metodológico.





2.2 Material Biológico.

Se adquirieron 270 huevos frescos, procedentes del municipio de Zumpango del Estado de México adquiridos en la granja San Sebastián fueron llevados al laboratorio de Biotecnología de la unidad de posgrado de la Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán, UNAM, donde se acondicionaron para su posterior tratamiento.

2.3 Selección y clasificación de la materia prima.

Se seleccionó la materia prima eliminando aquellos huevos que presentaron cascarón roto o fracturado, limpiándose los que se encontraban con materia extraña adherida al cascarón con un cepillo, posteriormente se pesaron y se midieron a cada uno la longitud ecuatorial y polar de una muestra tomada aleatoriamente para contar con lotes homogéneos, los cuales se almacenaron con el polo mayor hacia arriba, distribuyéndose al azar en lotes por tratamiento (los lotes contaron con 30 huevos para cada tratamiento), ver figura 7.

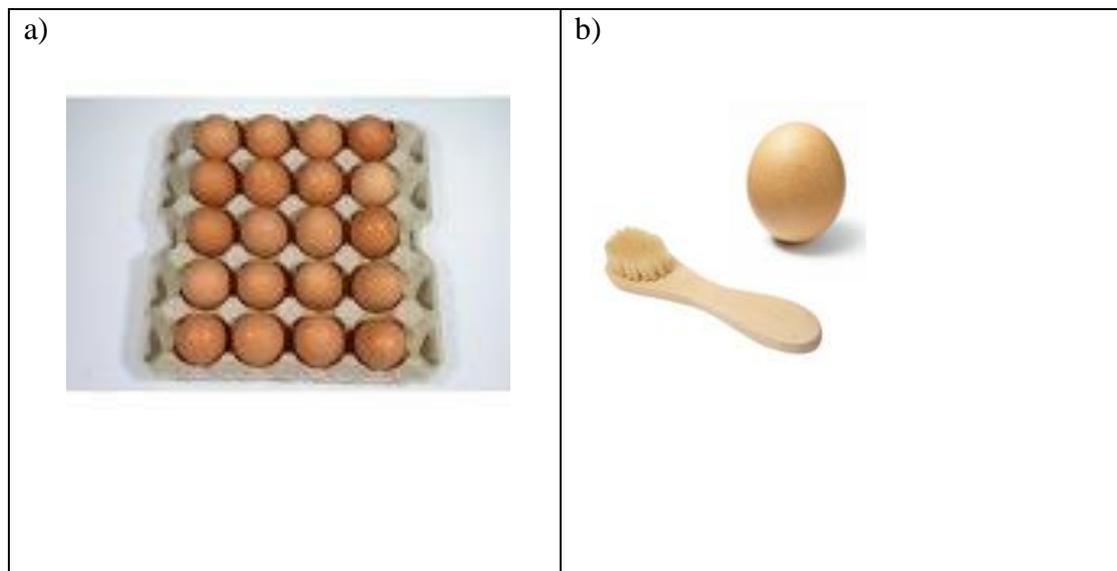


Figura 7. (a) Lote de huevos. (b) Eliminación de suciedades de los huevos.



2.4 Caracterización física, fisicoquímica y microbiológica

Se evaluaron las características físicas, fisicoquímicas y microbiológicas para lo que se utilizaron huevos previamente seleccionados sin aplicación de recubrimiento de quitosán se realizó por triplicado cada evaluación. Los parámetros de calidad que se evaluaron de acuerdo a la norma NOM-159-SSA1-1996 y NMX-FF079-SCFI-2004 los cuales fueron; índice de yema, altura de la clara, altura de la cámara de aire, pH, así como una caracterización microbiológica en donde se determinó la presencia de *Salmonella enteritidis*, conteo de Mesófilos aerobios, Coliformes totales y *Staphylococcus aureus* de acuerdo a las técnicas descritas en los métodos analíticos.

2.5 Aplicación del recubrimiento en los huevos frescos

2.5.1 Preparación del recubrimiento a las diferentes formulaciones

El quitosán que se utilizó para la realización de este proyecto fue obtenido por la Dra. Patricia Miranda Castro en el laboratorio de Biotecnología de la unidad de posgrado de la Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán, a partir de la desacetilación de quitina extraída de desechos de camarón, siguiendo la metodología establecida en este laboratorio (Miranda, 2000)^b.

Se realizaron diferentes formulaciones para el recubrimiento de los huevos.

Tabla 5. Formulaciones evaluadas para la conservación del huevo.

Tratamientos	% Quitosán (p/v)	% Glicerol (v/v)	% Acido láctico (v/v)	pH	Numero de capas
C1	1	-	1.4	3	1
C2		-		3	2
C3		0.25		3	1
C4		0.25		3	2
C5		-		5	1
C6		-		5	2
C7		0.25		5	1
C8		0.25		5	2
Control	-	-	-	-	-



Se procedió a preparar cada una de las formulaciones de acuerdo a los porcentajes establecidos en la tabla 5 preparando una solución de quitosán al 1% en agua, a la cual se le adiciono 1.4% de ácido láctico.

El glicerol se adicionó al 0.25% de la concentración de quitosán adicionado, manteniendo una agitación constante hasta obtener soluciones homogéneas y transparentes. Al final se ajustó la solución de quitosán a los pH's establecidos con NaOH posteriormente se esterilizo a 121°C durante 15 minutos y se guardó en refrigeración a 4°C.

2.5.2 Aplicación del recubrimiento

Se procedió a sumergir cada uno de los huevos en las diferentes soluciones de quitosán a las diferentes formulaciones durante 30 segundos el cual se determinó con un cronómetro. Una vez recubiertos con la solución fueron colocados en rejillas de metal para escurrir el exceso de la misma, para su posterior secado a temperatura ambiente. Los huevos recubiertos fueron almacenados en contenedores de cartón para huevos en una incubadora Gravity Convetion Incubator modelo 4 a 25±2°C a una humedad relativa de 60% por un periodo de 30 días.

2.6 Evaluación del efecto de un recubrimiento a base de quitosán en diferentes formulaciones sobre las propiedades físicas, fisicoquímicas y microbiológicas del huevo fresco, durante su vida útil.

Una vez recubiertos los huevos se procedió a determinar sus propiedades físicas, fisicoquímicas y microbiológicas al inicio y en intervalos de aproximadamente 7 días.



2.7 Métodos analíticos

2.7.1 Evaluación física del huevo

2.7.1.1 Pérdida de peso del huevo

La pérdida de peso se determinó por diferencia de peso utilizando una balanza granataria (fig. 8) en donde se pesó cada uno de los grupos a evaluar, esta prueba se realizó por triplicado. Los resultados se expresaron en % de pérdida de peso durante el almacenamiento; los cuales se sometieron a un tratamiento estadístico que consistió en una regresión múltiple lineal del cual se obtuvo la tasa de pérdida de peso por día.



Figura 8. Balanza Granataria Harvard Trip Balance 2 kg-5lb.



2.7.1.2 Altura de la clara del huevo

La altura de la clara se determinó de acuerdo a la norma NMX-FF-079-SCFI-2004 para lo cual se peso cada huevo individualmente y se registraron los datos. Se procedió a romper el huevo y se depositó en una superficie plana. Se determinó con un vernier (fig.9) la altura de la clara localizada entre la yema sin involucrar esta y el borde exterior de la clara densa y se registraron los datos, la prueba se realizo por triplicado. Los resultados obtenidos se sometieron a un tratamiento estadístico que consistió en una regresión múltiple lineal del cual se obtuvo la tasa de cambio por día.

Calculo de la altura de la clara:

$$U.H.= 100 \log_{10} \left[\frac{A - \sqrt{G(30P^{0.37} - 100)} + 1.9}{100} \right]$$

Donde

U.H son las unidades Haugh;

A es la altura de la clara en mm;

G es 32.2

P es el peso del huevo en gramos

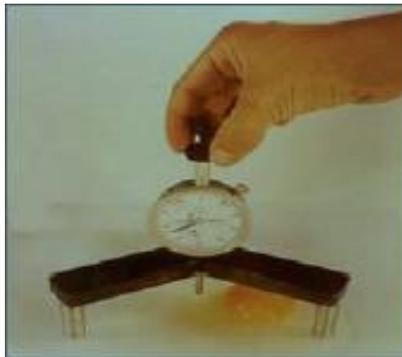


Figura 9. Determinación de la altura de la clara



2.7.1.3 Cámara de aire del huevo

El método empleado para la medición de la cámara de aire en el huevo fresco de acuerdo a la norma NMX-FF-079-SCFI-2004 es por medio de la observación o miraje del mismo producto del reflejo de la luz directa producido por un ovoscopio con una lámpara incandescente de al menos 40 watts en un cuarto oscuro.

El procedimiento para la medición consiste en colocar cada uno de los huevos en el ovoscopio previamente encendido, marcar una línea alrededor de donde se observa el límite inferior de la cámara de aire en el polo obtuso ver figura 10. Posteriormente se debe medir la profundidad de la cámara por medio de un vernier o una escuadra graduada en milímetros, considerando la altura a partir del tope del polo obtuso a la línea más lejana marcada.

Los resultados obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza, así como una regresión múltiple lineal del cual se obtuvo la tasa de cambio por día.

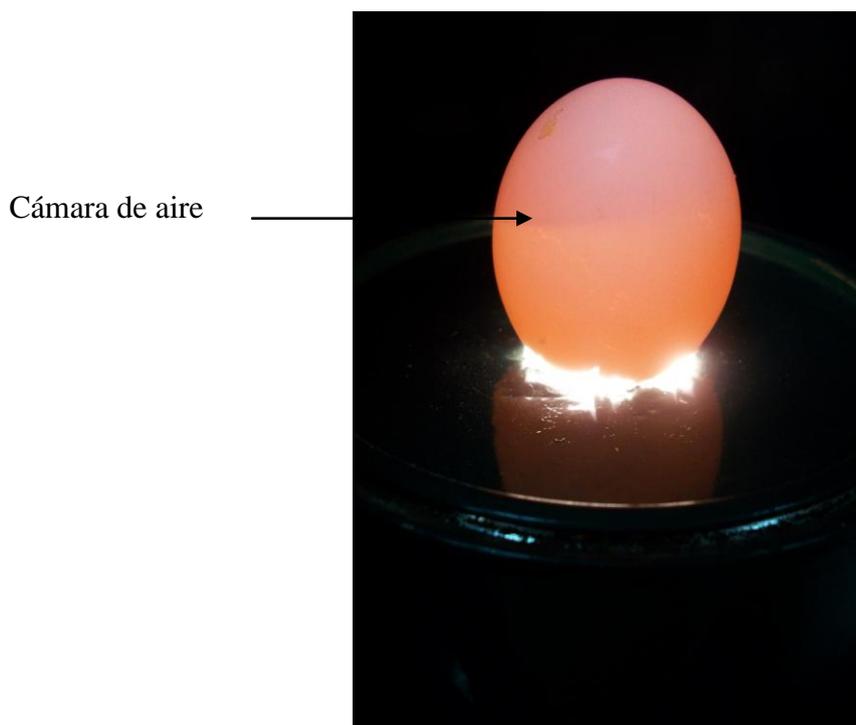


Figura 10. Determinación de la cámara de aire por medio de un ovoscopio.



2.7.1.4 Índice de yema del huevo

El índice de yema es un parámetro que informa sobre la forma ideal de la yema y su relación con la frescura y calidad del huevo. Cuanto mayor sea el valor de este índice, mayor es la frescura del huevo, ya que la yema se presenta más compacta (Raigón, 2001).

Es la relación existente entre la altura y el diámetro de la misma. El procedimiento para su determinación consistió en romper el huevo y se depositó en una superficie plana. Se determinó con un vernier la altura de éste en su parte mas alta (centro) y el diámetro de la misma (fig. 11), se registraron los datos de la prueba, la cual se realizó por triplicado. Los resultados obtenidos se trataron mediante un tratamiento estadístico que consistió en un análisis de varianza, así como una regresión múltiple lineal del cual se obtuvo la tasa de cambio por día (Quintana, 1988).



Figura 11. Determinación del diámetro de la yema.



2.8 Evaluación fisicoquímica del huevo

2.8.1 pH del huevo

Se determino de acuerdo a la norma NOM-129-SSA1-1995 para lo cual se procedió a romper cada uno de los huevos, con un posterior homogeneizado sumergiéndose el electrodo en la muestra y se leyó el pH directamente en la escala del instrumento, hasta alcanzar un valor estable, se registraron los datos de la prueba, la cual se realizo por triplicado. Se utilizó un potenciómetro digital marca VWR scientific modelo 8015 ver figura 12. Los resultados obtenidos fueron sometidos a una regresión múltiple lineal del cual se obtuvo la tasa de cambio por día.



Figura 12. Potenciometro digital VWR scientific modelo 8015



2.9 Evaluación microbiológica del huevo

2.9.1 Determinación de la presencia de *Salmonella enteritidis*

2.9.1.1 Preparación del medio de cultivo

Este procedimiento se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Merck de México, S.A de C.V). Se utilizó Merck® Agar SS deshidratado para Salmonella y Shigella, se pesaron 60 g del contenido del Agar SS en una balanza granataria (Harvard Trip Balance 2 kg-5lb) (fig. 8) y se disolvió en 1000 ml de agua destilada en un matraz erlenmeyer. Se hirvió agitando continuamente en una parrilla (Gyratherm® Magnetic stirrer-hot plate) (fig. 13) hasta disolución completa, dejando a ebullición durante 1 minuto. Este medio no se esteriliza en autoclave.



Figura 13. Parrilla de agitación magnética (Gyratherm® Magnetic stirrer-hot plate).

Posteriormente se enfrió el medio de cultivo a 40°C aproximadamente en baño de agua manteniéndose a esta temperatura para evitar que se solidificara antes de su uso. Una vez frío el medio, se distribuyó en cajas petri desechables estériles de 90X15 mm, en cantidades de aproximadamente la mitad del volumen del mismo.

Se dejó solidificar a temperatura ambiente, después se dejaron por 24 horas en una incubadora (Dry Type Bacteriological Incubator) (fig. 14) a 35°C como prueba de esterilidad y finalmente se almacenaron en refrigeración a 4°C.



Figura 14. Incubadora (Dry Type Bacteriological Incubator).

2.9.1.2 Preparación y dilución de muestras del alimento

Este procedimiento se llevo a cabo de acuerdo a la NOM-110-SSA1-1994 con las siguientes modificaciones:

➤ Preparación del diluyente

Se pesó en una balanza granataria (figura 8) 8.5 g de cloruro de sodio y se disolvió en 1000 ml de agua destilada en un matraz aforado, agitando cuidadosamente para obtener una mezcla homogénea, se ajustó el pH a 7 con hidróxido de sodio al 1 N, después se esterilizó en un autoclave a 121°C durante 15 minutos.

➤ Preparación de la dilución primaria

Se pesó 1 g de yema y clara de huevo en un tubo de 16 x 150 mm con tapón de rosca estériles (este procedimiento se realizó para cada tratamiento propuesto, ver tabla 5) en una balanza granataria, posteriormente se adicionó 9 ml de diluyente, después se mezcló hasta obtener una suspensión completa con un homogeneizador estéril.

➤ Inoculación de las muestras preparadas

Con una punta de micropipeta estéril se tomó una alícuota de 100 µL de la dilución primaria, se inoculó sobre la superficie del medio de cultivo y se diseminó con una varilla de vidrio estéril y se incubaron (Dry Type Bacteriological Incubator) (ver figura 14) a 35°C durante 24 horas, este procedimiento se realizó por triplicado para cada tipo de dilución.



➤ Interpretación para *Salmonella enteritidis*

Después de la incubación, se examinó las placas para investigar la presencia de colonias típicas de *Salmonella* con las siguientes características (ver tabla 6):

Tabla 6. Interpretación de colonias típicas de *Salmonella enteritidis*.

Color de las colonias	Centro negro	Viraje del medio de cultivo
Incoloras, transparentes	-	Amarillo

Fuente: Merck (1994).

Una vez que se obtuvo el crecimiento de colonias sospechosas en el medio de cultivo agar *Salmonella-Shigella* (SS), se llevo a cabo un posterior aislamiento y purificación de la bacteria. Después se enviaron a un Laboratorio particular para realizarle pruebas bioquímicas para la identificación genérica del microorganismo en estudio.



2.9.2 Determinación de Mesófilos aerobios

2.9.2.1 Preparación del medio de cultivo

Este procedimiento se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Proveedor Científico S.A.). Se utilizó Bioxon® Agar para métodos estándar deshidratado, se pesaron 23.5 g del Agar en una balanza granataria (Harvard Trip Balance 2 kg-5lb) (ver Fig. 8) y se disolvió en 1000 ml de agua destilada en un matraz erlenmeyer, se hirvió hasta total disolución con agitación continua en una parrilla (Gyratherm® Magnetic stirrer-hot plate) (ver Fig. 13), después se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Posteriormente se enfrió el medio de cultivo a 45°C aproximadamente en baño de agua manteniéndose a esta temperatura para evitar que se solidifique antes de su uso. Una vez que el medio está a esa temperatura, se distribuyen en cajas petri desechables estériles de 90X15 mm, en cantidades de aproximadamente la mitad del volumen del mismo. Se dejó solidificar a temperatura ambiente, después se dejaron por 24 horas en una incubadora (Dry Type Bacteriological Incubator) (ver figura 14) a 35°C como prueba de esterilidad y finalmente se almacenaron en refrigeración a 4°C.

2.9.2.2 Preparación y dilución de muestras del alimento

Este procedimiento se llevo a cabo de acuerdo a la NOM-110-SSA1-1994 con las siguientes modificaciones:

➤ Preparación del diluyente

Se pesó en una balanza granataria (figura 8) 8.5 g de cloruro de sodio y se disolvió en 1000 ml de agua destilada en un matraz aforado, agitando cuidadosamente para obtener una mezcla homogénea, se ajustó el pH a 7 con hidróxido de sodio al 1 N, después se esterilizó en un autoclave a 121°C durante 15 minutos.

➤ Preparación de la dilución primaria

Se pesó 1 g de yema y clara de huevo en un tubo de 16 x 150 mm con tapón de rosca estériles (este procedimiento se realizó para cada tratamiento propuesto, ver tabla 5) en una



balanza granataria, posteriormente se adicionó 9 ml de diluyente, después se mezcló hasta obtener una suspensión completa con un homogeneizador estéril.

➤ Preparación de las diluciones decimales adicionales

Posteriormente con una pipeta graduada se tomó un 1 ml de la dilución primaria en un tubo de 16 x 150 mm con tapón de rosca previamente estériles que contenían 9 ml de diluyente estéril, se agitó la muestra manualmente con movimientos de arriba a abajo en un arco de 30 cm (este procedimiento se realizó para cada una de las diluciones que se requirieron). Todo el material utilizado para este procedimiento se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

➤ Inoculación de las muestras preparadas

Con una punta de micropipeta estéril se tomó una alícuota de 100 µL de la dilución primaria y de cada una de las diluciones decimales adicionales utilizadas, se inoculó sobre la superficie del medio de cultivo distribuyendo con una varilla de vidrio estéril y se incubaron (Dry Type Bacteriological Incubator) (ver figura 14) a 35°C durante 24 horas, este procedimiento se realizó por triplicado para cada tipo de dilución.

➤ Interpretación de Mesófilos aerobios

Después de la incubación, se contó el número de colonias que presentaron las siguientes características (ver tabla 7):

Tabla 7. Interpretación de morfología típica de Mesófilos aerobios.

Características de las colonias
Contar todas las colonias desarrolladas en las placas (excepto las de mohos y levaduras), incluyendo las puntiformes.

Fuente: NOM-092-SSA1-1994.



2.9.3 Determinación de Coliformes totales

2.9.3.1 Preparación del medio de cultivo

Este procedimiento se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Dibico, S.A de C. V.). Se utilizó Dibico® Agar de bilis y rojo violeta deshidratado, se pesaron 41.5 g del medio de cultivo en una balanza granataria (Harvard Trip Balance 2 kg-5lb) (ver figura 8) y se disolvió en 1000 ml de agua destilada en un matraz erlenmeyer. Se calentó y agitó frecuentemente en una parrilla (Gyratherm® Magnetic stirrer-hot plate) (ver figura 13) hasta punto de ebullición, después se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Posteriormente se enfrió el medio de cultivo a 40°C aproximadamente en baño de agua manteniéndose a esta temperatura para evitar que se solidifique antes de su uso. Una vez frío el medio, se distribuyen en cajas petri desechables estériles de 90X15 mm, en cantidades de aproximadamente la mitad del volumen del mismo. Se deja solidificar temperatura ambiente, después se dejaron por 24 horas en una incubadora ((Dry Type Bacteriological Incubator) (ver figura 14) a 35°C como prueba de esterilidad y finalmente se almacenaron en refrigeración a 4°C.

2.9.3.2 Preparación y dilución de muestras del alimento

Este procedimiento se llevo a cabo de acuerdo a la NOM-110-SSA1-1994 con las siguientes modificaciones:

➤ Preparación del diluyente

Se pesó en una balanza granataria (figura 8) 8.5 g de cloruro de sodio y se disolvió en 1000 ml de agua destilada en un matraz aforado, agitando cuidadosamente para obtener una mezcla homogénea, se ajustó el pH a 7 con hidróxido de sodio al 1 N, después se esterilizó en un autoclave a 121°C durante 15 minutos.

➤ Preparación de la dilución primaria

Se pesó 1 g de yema y clara de huevo en un tubo de 16 x 150 mm con tapón de rosca estériles (este procedimiento se realizó para cada tratamiento propuesto, ver tabla 5) en una



balanza granataria, posteriormente se adicionó 9 ml de diluyente, después se mezcló hasta obtener una suspensión completa con un homogeneizador estéril.

➤ Preparación de las diluciones decimales adicionales

Posteriormente con una pipeta graduada se tomó un 1 ml de la dilución primaria en un tubo de 16 x 150 mm con tapón de rosca previamente estériles que contenían 9 ml de diluyente estéril, se agitó la muestra manualmente con movimientos de arriba a abajo en un arco de 30 cm (este procedimiento se realizó para cada una de las diluciones que se requirieron). Todo el material utilizado para este procedimiento se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

➤ Inoculación de las muestras preparadas

Con una punta de micropipeta estéril se tomó una alícuota de 100 µL de la dilución primaria y de cada una de las diluciones decimales adicionales utilizadas, se inoculó sobre la superficie del medio de cultivo distribuyendo con una varilla de vidrio estéril y se incubaron (Dry Type Bacteriological Incubator) (ver figura 14) a 35°C durante 24 horas, este procedimiento se realizó por triplicado para cada tipo de dilución.

➤ Interpretación de Coliformes totales

Después de la incubación, se contó el número de colonias que presentaron las siguientes características (ver tabla 8):

Tabla 8. Interpretación de morfología típica de Coliformes totales.

Características de las colonias
Colonias color rojo oscuro, que estén rodeadas de un halo de precipitación debido a sales biliares, el cual es color rojo claro o rosa.

Fuente: NOM-113-SSA1-1994.



2.9.4 Determinación de la presencia de *Staphylococcus*

En esta determinación se aplicó la técnica de preparación de dilución primaria y diluciones decimales adicionales para su posterior inoculación directa en placas en medio cultivo (Agar BHI) y finalmente la confirmación mediante pruebas bioquímicas (Merck, 2009; NOM-115-SSA1-1994 con algunas modificaciones).

2.9.4.1 Preparación del medio de cultivo

Este procedimiento se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Merck de México, S.A de C.V). Se utilizó Merck® Caldo de infusión cerebro corazón (BHI) y Bioxon® Agar bacteriológico (como solidificante) deshidratados, se pesaron 37 g de BHI y 15 g de agar en una balanza granataria (Harvard Trip Balance 2 kg-5 lb) (ver figura 8), se disolvieron en 1000 ml de agua destilada en un matraz erlenmeyer en agitación continua en una parrilla (Gyratherm® Magnetic stirrer –hot plate) (ver figura 13). Se dejó reposar por 15 minutos y después se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Posteriormente se enfría el medio de cultivo a 40°C aproximadamente en baño de agua manteniéndose a esta temperatura para evitar que se solidifique antes de su uso. Una vez frío el medio, se distribuyen en cajas petri desechables estériles de 90X15 mm, en cantidades de aproximadamente la mitad del volumen del mismo. Se dejan enfriar a temperatura ambiente para que solidifique, después se dejaron por 24 horas en una incubadora (Dry Type Bacteriological Incubator) (ver figura 14) a 35°C como prueba de esterilidad y finalmente se almacenaron en refrigeración a 4°C.

2.9.4.2 Preparación y dilución de muestras del alimento

Este procedimiento se llevo a cabo de acuerdo a la NOM-110-SSA1-1994 con las siguientes modificaciones:

- Preparación del diluyente

Se pesó en una balanza granataria (figura 8) 8.5 g de cloruro de sodio y se disolvió en 1000 ml de agua destilada en un matraz aforado, agitando cuidadosamente para obtener una



mezcla homogénea, se ajustó el pH a 7 con hidróxido de sodio al 1 N, después se esterilizó en un autoclave a 121°C durante 15 minutos. Corregido parecido a la norma

➤ Preparación de la dilución primaria

Se pesó 1 g de yema y clara de huevo en un tubo de 16 x 150 mm con tapón de rosca estériles (este procedimiento se realizó para cada tratamiento propuesto, ver tabla 5) en una balanza granataria, posteriormente se adicionó 9 ml de diluyente, después se mezcló hasta obtener una suspensión completa con un homogeneizador estéril.

➤ Preparación de las diluciones decimales adicionales

Posteriormente con una pipeta graduada se tomó un 1 ml de la dilución primaria en un tubo de 16 x 150 mm con tapón de rosca previamente estériles que contenían 9 ml de diluyente estéril, se agitó la muestra manualmente con movimientos de arriba a abajo en un arco de 30 cm (este procedimiento se realizó para cada una de las diluciones que se requirieron). Todo el material utilizado para este procedimiento se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

➤ Inoculación de las muestras preparadas

Con una punta de micropipeta estéril se tomó una alícuota de 100 µL de la dilución primaria y de cada una de las diluciones decimales adicionales utilizadas, se inoculó sobre la superficie del medio de cultivo distribuyendo con una varilla de vidrio estéril y se incubaron (Dry Type Bacteriological Incubator) (ver figura 14) a 35°C durante 24 horas, este procedimiento se realizó por triplicado para cada tipo de dilución.

➤ Interpretación de *Staphylococcus aureus*

Después de la incubación, se contó el número de colonias que presentaron las siguientes características (ver tabla 9):

Tabla 9. Interpretación de colonias típicas de *Staphylococcus aureus*.

Características de las colonias
Son circulares, amarillas, brillantes, lisas de aprox. 1-2 mm de diámetro.

Fuente: Merck (2009).



Una vez que se obtuvo el crecimiento de colonias sospechosas en el medio de cultivo agar infusión cerebro corazón (BHI), se llevo a cabo un posterior aislamiento y purificación de la bacteria. Después se enviaron a un Laboratorio particular para realizarle pruebas bioquímicas para la identificación genérica del microorganismo en estudio.

2.10 Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron por triplicado con el fin de obtener resultados significativos y con ello realizar un análisis estadístico confiable y representativo. Se aplicó a los datos obtenidos un análisis de varianza unidireccional (ANOVA), con un nivel de confianza α de 0.05, para obtener de esta manera la diferencia significativa entre la muestra control y los tratamientos estudiados. Este análisis se llevo a cabo por medio del programa estadístico Minitab 15 Español. Los resultados obtenidos a partir de la aplicación de este programa estadístico se muestran en el apartado de Anexos.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN



3.1 Caracterización física y fisicoquímica del huevo.

Para la realización de este estudio fue necesario evaluar los parámetros físicos y fisicoquímicos del huevo, a fin de establecer sus características y seleccionar lotes homogéneos. Los parámetros a evaluar fueron el peso, longitud ecuatorial, longitud polar, cámara de aire, altura de la clara, índice de yema (Tabla 10).

Tabla 10. Parámetros físicos y fisicoquímicos del huevo fresco.

Parámetro	Promedio
Peso (g)	44.75 ± 0.36
Longitud ecuatorial (cm)	4.07 ± 0.05
Longitud Polar (cm)	5.47 ± 0.08
Cámara de aire (mm)	5.38 ± 0.24
Altura de la clara (UH)	76.97 ± 0.42
Índice de yema	0.44 + 0.12
pH	7.03 ± 0.14

Los valores obtenidos corresponden a tres réplicas ± desviación estándar, n=220 muestras.

De acuerdo a los parámetros obtenidos, los huevos utilizados pertenecen a la categoría chico debido a que pesa menos de 55g, además se encontraron clasificados en las siguientes categorías: México 1 debido a que la altura de la clara fue mayor a 70 y como México 2 dado que la cámara de aire que presentaron fue mayor a 5 mm esto de acuerdo a la norma NMX-FF-079-SCFI-2004, aunque el pH estuvo por arriba de lo establecido en la NOM-159-SSA1-1996 se decidió trabajar con estos puesto que los demás parámetros se encuentran dentro de lo establecido, además que en pruebas previas con otro lote de huevos que se obtuvieron del mismo lugar y con mismas características presentaban datos similares.

3.2 Efecto de la aplicación de recubrimiento de quitosán en diferentes formulaciones sobre la vida útil del huevo fresco.

La calidad de un alimento se define como una combinación de características, atributos y propiedades que le darán un valor como alimento. Las propiedades de calidad de un huevo



fresco se asocian con propiedades físicas, fisicoquímicas y microbiológicas que definen la frescura y a su vez su vida útil (Besterfield, 1995; Juárez, 2009).

3.2.1 Pérdida de peso del huevo

La evaluación del porcentaje de pérdida de peso durante el almacenamiento es esencial debido a que representa una alta pérdida de humedad de los huevos dando como consecuencia pérdida de la calidad del mismo y por lo tanto una disminución del valor en el mercado (Caner y Cansiz, 2007).

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 15 éstos fueron graficados y se evaluaron a través de un análisis de varianza y regresión múltiple lineal de donde se obtuvo la tasa de pérdida de peso por día (ver tabla 11) El análisis mostró que existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre cada una de las tasas de pérdida de peso de los diferentes tratamientos con respecto al control. Esto se atribuye a que efectivamente el recubrimiento con quitosán disminuyó la transferencia de humedad hacia el exterior del huevo reduciendo con esto la pérdida de peso.

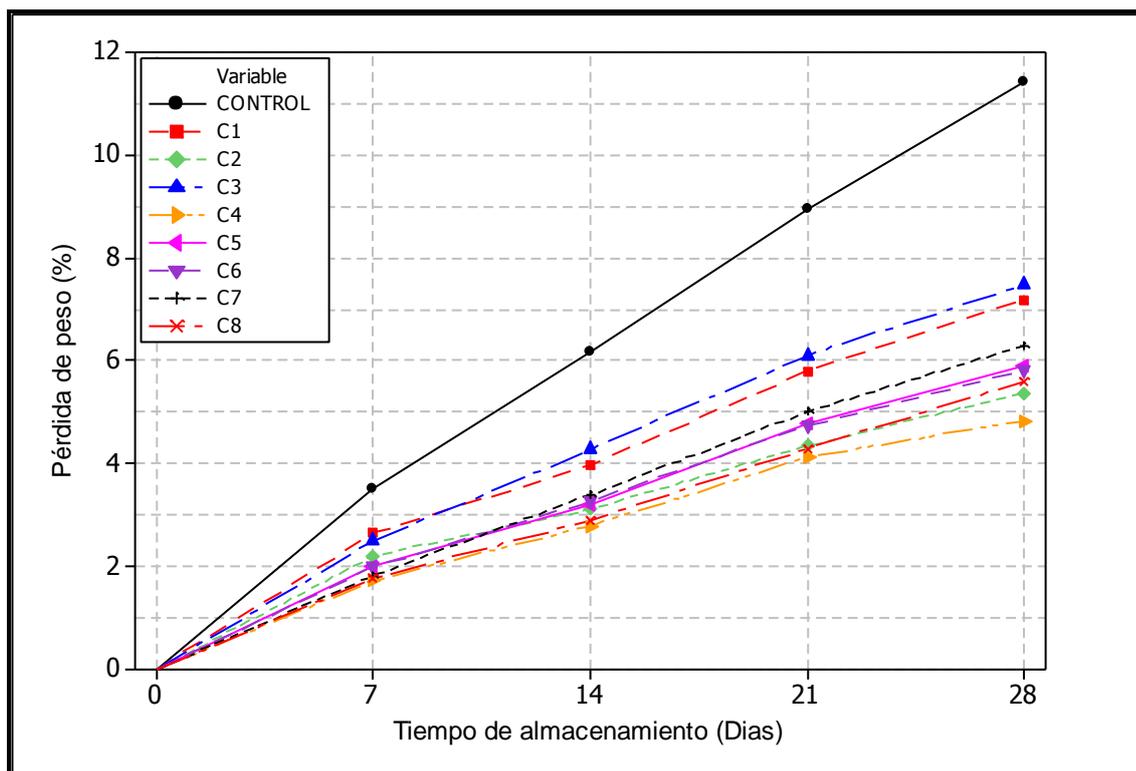


Figura 15. Efecto del recubrimiento de quitosán a diferentes formulaciones en huevo fresco sobre la pérdida de peso con respecto al tiempo.

Tabla 11. Tasa de pérdida de peso en porcentaje por día.

Tratamiento	Tasa de pérdida de peso (g/Día)	Tratamiento	Tasa de pérdida de peso (g/Día)
Control	0.3765 ^a	Control	0.3765 ^a
C1	0.2323 ^b	C5	0.1941 ^f
C2	0.1711 ^c	C6	0.1911 ^g
C3	0.2462 ^d	C7	0.2028 ^h
C4	0.1603 ^e	C8	0.1826 ⁱ

Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto al control.

Como se observa el grupo control tuvo una pérdida de peso mayor al 10 % a los 28 días de almacenamiento con una tasa de pérdida de 0.3765 g/día, mientras que los tratamientos que alcanzan un menor porcentaje de pérdida de humedad son los grupos C4 (quitosán-glicerol pH 3, 2 capas), C2 (quitosán pH 3, 2 capas) y C8 (quitosán-glicerol pH 5, 2 capas) que posteriormente al analizarlos estadísticamente no se encontró diferencia significativa entre estos.



Este efecto se debe a que el recubrimiento de quitosán aplicado sobre el huevo dado a su alto peso molecular tapa los poros de la cáscara evitando la transferencia de humedad hacia el exterior del huevo y con esto disminuyendo la pérdida de peso del mismo entre otras propiedades. Por otro lado las dos capas tienen un efecto más fuerte de barrera debido a que se forman dos capas disminuyendo la transferencia de gases al exterior, esto se observa en el grupo C2. El glicerol le proporcionó a los recubrimientos quitosán mayor adherencia.

Al comparar los resultados obtenidos con los de la literatura se observó que se obtienen resultados afines, en los que el recubrimiento con quitosán efectivamente actúa como barrera a la transferencia de humedad. Se contrastaron los resultados de los grupos C4 y C8 con los reportados en la literatura por Caner y Canzis se observó que aunque también aplican doble capa de recubrimiento de quitosán obtienen una pérdida de peso del 5.3% mientras que experimentalmente con el grupo C4 obtiene una pérdida de peso del 4.8% y el grupo C8 obtuvo una pérdida del 5.6% pero al comparar el grupo control estos obtienen una pérdida de peso del 7.38% logrando disminuir la pérdida de peso en un 24.11%, mientras que con el grupo C4 dado que fue el que menor pérdida de peso se alcanzó disminuir la pérdida de peso en un 57.65% todo esto respecto al grupo control. Las variaciones entre los resultados pudieron deberse principalmente a las diferentes condiciones de almacenamiento que aunque se almacenaron a la misma temperatura de 25°C no reporta la humedad relativa del lugar donde fueron almacenados los huevos.



3.2.2 Cámara de aire del huevo

La cámara de aire se forma en las horas posteriores a la puesta cuando comienza a disminuir la temperatura del huevo. Al enfriarse se produce una contracción de los líquidos en el interior y como resultado de esta contracción la membrana interna de la cáscara se separa de la membrana externa y se forma la cámara. El incremento posterior de tamaño de la cámara es el resultado de la evaporación de agua del huevo (INEA; Santos, 1995).

La Figura 16 y tabla 12, presentan los valores obtenidos de la cámara de aire de huevo recubierto con quitosán a diferentes formulaciones y almacenados a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y 65% HR durante su almacenamiento.

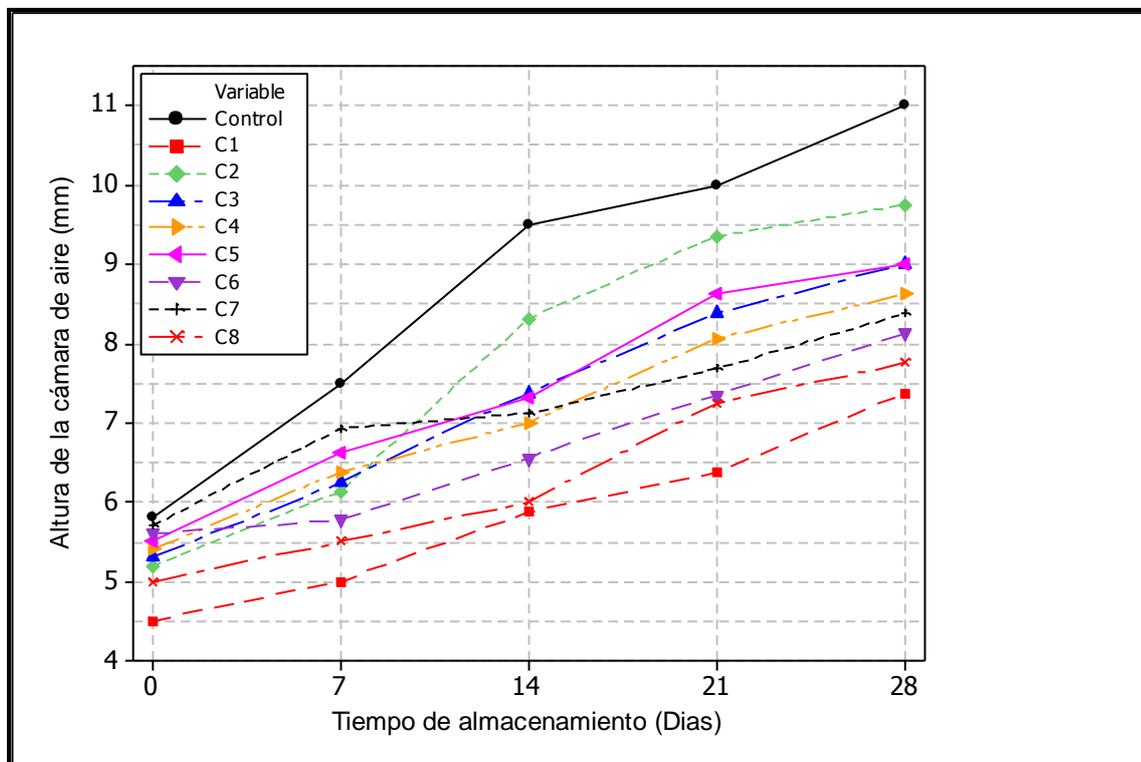


Figura 16. Efecto del recubrimiento de quitosán en huevo fresco sobre la cámara de aire, respecto al tiempo.

**Tabla 12.** Tasa de cambio de la cámara de aire.

Tratamiento	Tasa de cambio de la cámara de aire. (mm/Día)	Tratamiento	Tasa de cambio de la cámara de aire (mm/Día)
Control	0.2429 ^a	Control	0.2429 ^a
C1	0.1250 ^b	C5	0.1643 ^f
C2	0.2393 ^c	C6	0.1200 ^g
C3	0.1714 ^d	C7	0.0857 ^h
C4	0.0981 ^e	C8	0.1310 ⁱ

Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

Los resultados obtenidos fueron graficados y se evaluaron a través de un análisis de varianza y regresión múltiple lineal de donde se obtuvo la tasa de cambio de la cámara de aire por día (ver tabla 12). El análisis mostró que existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre cada una de las tasas de los diferentes tratamientos con respecto al control. Esto corrobora que efectivamente el quitosán actúa como barrera a la transferencia de humedad que está relacionado con el tamaño de la cámara de aire, entre menor sea la pérdida del tamaño de la cámara, menor es el valor de pérdida de humedad esto de acuerdo a la norma NMX-FF-079-SCFI-2004.

Todos los tratamientos con quitosán a excepción del los grupos C2, C3 y C5 se encuentran dentro de lo establecido en la norma NOM-159-SSA1-1996, es decir se encuentran por debajo de los 9mm a los 28 días, mientras que el grupo control solo alcanza los 12 días de almacenamiento. Los valores de C4 y C8 son los que menor tasa de cambio de la cámara de aire alcanzan. Al analizar los grupos C1 (quitosán pH 3, 1 capa), C4 (quitosán-glicerol pH 3, 2 capas) y C8 (quitosán-glicerol pH 5, 2 capas) estadísticamente no se encontró diferencia significativa entre estos.



3.2.3 Altura de la clara del huevo

La altura de la clara es un índice de calidad de la albúmina de huevo. Se expresa en unidades Haugh la cual es una expresión que relaciona el peso del huevo y la altura de la clara. Cuanto más alto sea el valor Haugh, mejor será la calidad de la albúmina que presenten los huevos (Navarro, 2000).

Al salir CO₂ del huevo suceden una serie de cambios entre los que se encuentran la caída de la altura de la clara y directamente una disminución del índice Haugh. Para explicar este adelgazamiento se han formulado las siguientes hipótesis (Santos, 1995):

Hipótesis I.- Se basa en la responsable de la textura de la clara es la ovomucina. Al elevarse el pH forma un complejo con la lisozima, ocasionándose el adelgazamiento.

Hipótesis II.- Esta nos dice que la textura de la clara gruesa es debido al complejo ovomucina-lisozima, existiendo en equilibrio, que se disocia cuando aumenta el pH. Por otro lado, también se encuentra que la unión de la ovomucina-lisozima determina la estructura del gel y el adelgazamiento sucede cuando se quita la ovomucina de la solución.

Hipótesis III.- El adelgazamiento es causado por reacciones reductivas de enlaces disulfuro. En una mezcla de α y β -ovomucina se ha visto que tiene una elevada proporción de cistina y solo puede ser solubilizada o despolarizada por reducción de los enlaces disulfuro. Por otro lado, la lisozima también tiene alta concentración de cistina que en vitro están relacionados en el natural adelgazamiento de la clara gruesa.

Hipótesis IV.- Esta hipótesis nos dice que el adelgazamiento es debido a la pérdida de carbohidratos de la ovomucina.

Los resultados de la altura de la clara de huevo recubierto con quitosán a diferentes formulaciones y almacenados a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y 65% HR se muestran en la figura 17, se observa que durante el periodo de almacenamiento los huevos tratados con quitosán, en general presentaron valores menores de la altura de la clara, independientemente del día de la



evaluación respecto al grupo control, lo que indica que los recubrimientos con quitosán actúan efectivamente como barrera a la transferencia de CO₂ al exterior del huevo.

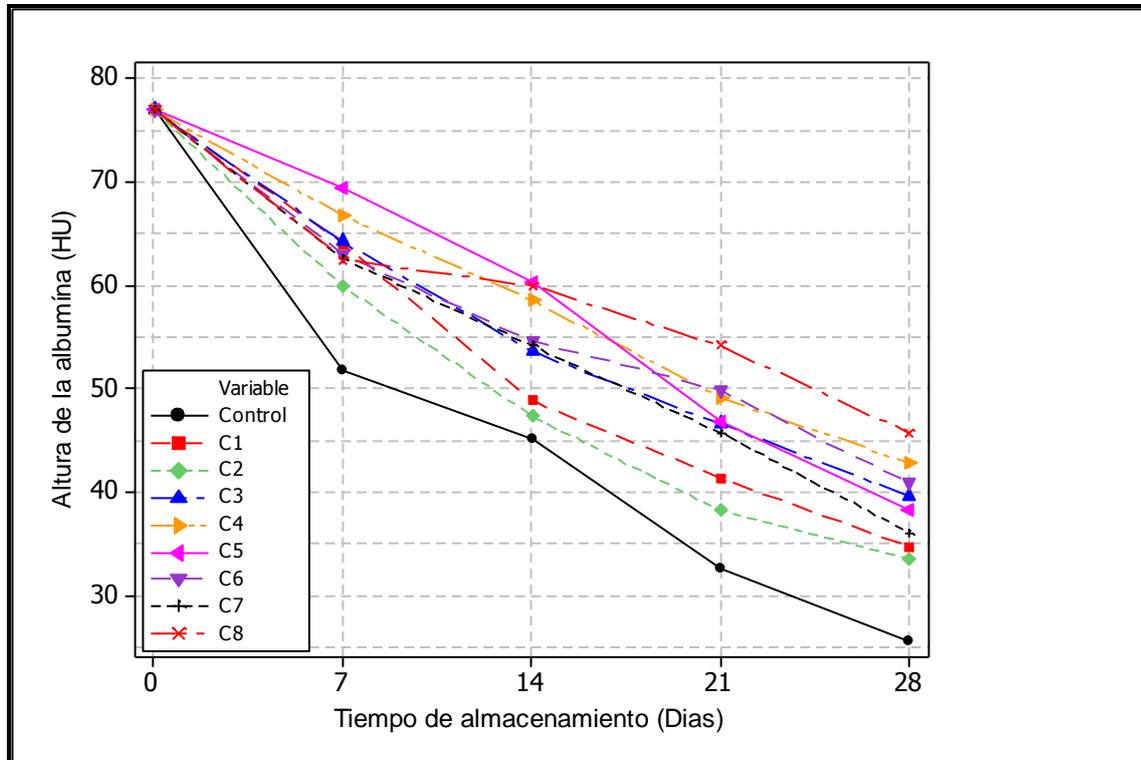


Figura 17. Efecto del recubrimiento de quitosán en huevo fresco sobre la altura de la clara, respecto al tiempo.

Tabla 13. Tasa de cambio de la altura de la clara.

Tratamiento	Tasa de cambio de la altura de la clara (HU/Día)	Tratamiento	Tasa de cambio de la altura de la clara (HU/Día)
Control	-1.6175 ^a	Control	-1.6175 ^a
C1	-1.4214 ^b	C5	-1.4263 ^f
C2	-1.437 ^c	C6	-1.2207 ^g
C3	-1.2254 ^d	C7	-1.4124 ^h
C4	-1.1431 ^e	C8	-1.0134 ⁱ

Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 17 y tabla 13, los valores obtenidos fueron graficados y se evaluaron a través de un análisis de varianza y regresión múltiple lineal de donde se obtuvo la tasa de cambio de la altura de la clara por día. El análisis mostró que



existe diferencia significativa ($p < 0.05$) en cada uno de los tratamientos con respecto al control, lo que muestra que efectivamente el quitosán actuó como barrera a la transferencia de CO_2 .

Se puede observar el grupo C8 alcanza un 37.34% menos de cambio de la altura de la clara y un 8.02% menos de disminución que el grupo C4 todo esto respecto al grupo control, siendo el que mayor diferencia significativa ($p < 0.05$) obtuvo, esto debido a que a pH 3 el recubrimiento es mucho más hidrosoluble es decir que con la humedad relativa del ambiente puede verse comprometida la permeabilidad al vapor de agua, en la cubierta, mientras que a pH 5 el recubrimiento de quitosán se vuelve más impermeable al agua y a la transferencia de gases (Miranda, 2000^a).

Al comparar los resultados obtenidos en la literatura se observó que se obtienen resultados afines es decir los resultados de la altura de la clara se encuentran aproximados lo que corrobora que se elaboró la técnica correctamente. Se contrastó el grupo C8 puesto que fue el que mayor altura de la clara mantuvo de 45.68 HU y el grupo control se obtuvo una altura de la clara de 25.46 HU con los resultados reportados por Caner y Canzis ya que estos obtuvieron con el recubrimiento de quitosán una altura de la clara de 55.55 HU y su grupo control de 37.49 HU todo esto a los 28 días de almacenamiento con lo que logran disminuir con el recubrimiento de quitosán solamente en un 50.75% mientras que experimentalmente se logró disminuir en un 60.75% la disminución de la altura de la clara todo esto respecto al grupo control.

Todos los tratamientos con quitosán se encuentran dentro de lo establecido en la norma NMX-FF-079-SCFI-2004, es decir se encuentran por arriba de 31 HU a los 28 días logrando mantenerse en la misma clasificación como México 2, mientras que el grupo control solo alcanza aproximadamente los 23 días de almacenamiento encontrándose como fuera de clasificación.



3.2.4 Índice de yema del huevo

Con el tiempo la yema pierde consistencia y aparece más achatada con esto se disminuye el índice de yema con el tiempo. Todo esto se debe a la degradación de glico y lipoproteínas, así como un debilitamiento progresivo de la membrana vitelina y licuefacción de la yema causada principalmente por la difusión de agua de la clara (Primo, 1998; Obanu y Mpieri, 1984).

Es preciso aclarar que esta prueba no se basó en ninguna norma ya que estas no la mencionan, pero al consultar con la literatura la mayoría de los autores la realizan y la establecen como una prueba de calidad del huevo fresco. Como se puede observar los resultados de el índice de yema de huevo recubierto con quitosán con diferentes formulaciones y almacenados a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y 65% HR durante su almacenamiento, se muestran en la figura 18.

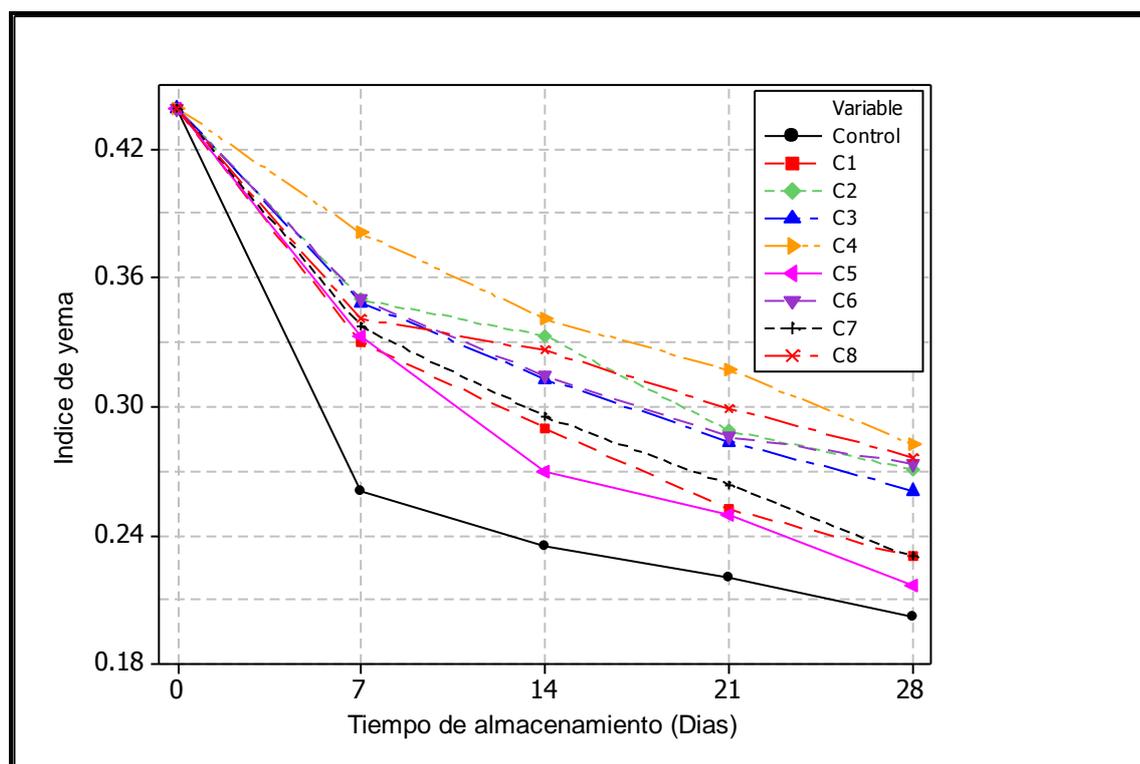


Figura 18. Efecto del recubrimiento de quitosán en huevo fresco sobre el índice de yema, respecto al tiempo.

**Tabla 14.** Tasa de cambio del índice de yema.

Tratamiento	Tasa de cambio (índice de yema/día)	Tratamiento	Tasa de cambio (índice de yema/día)
Control	-0.0067 ^a	Control	-0.0067 ^a
C1	-0.0065 ^a	C5	-0.007 ^a
C2	-0.0053 ^c	C6	-0.0052 ^g
C3	-0.0056 ^d	C7	-0.0065 ^a
C4	-0.005 ^e	C8	-0.0048 ⁱ

Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

Los resultados obtenidos se evaluaron a través de un análisis de varianza y regresión múltiple lineal de donde se obtuvo la tasa de cambio del índice de yema por día (ver tabla 14) El análisis mostró que existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre cada una de las tasas de pérdida de peso de los diferentes tratamientos con respecto al control, a excepción de los tratamientos C1, C5 y C7.

Como se observa el grupo control tuvo una disminución del índice de yema menor al 0.23 a los 28 días de almacenamiento con una tasa de cambio del índice de yema 0.0067 por día de almacenamiento, mientras que los tratamientos que alcanzan una mayor índice de yema son los grupos C4 (quitosán-glicerol pH 3, 2 capas) y C8 (quitosán-glicerol pH 5, 2 capas) y al analizarlos estadísticamente no se encontró diferencia significativa entre estos, además de que este último tratamiento obtiene una menor tasa de cambio del índice de yema, lo que indica que con este recubrimiento se puede preservar mejor la calidad de la yema.

Los resultados obtenidos se compararon con los resultados reportados por la literatura obtenidos por Caner y Canzis, se observó que se obtienen resultados afines es decir se encuentran aproximados lo que corrobora que se elaboró la técnica correctamente además que según estos autores presentan inicialmente la misma calidad.



3.3 Determinación de los parámetros fisicoquímicos del huevo

3.3.1 pH del huevo

El mayor cambio de pH del huevo se da en la clara. El pH de la clara es dependiente del equilibrio entre el CO₂, el ion bicarbonato, del ion carbonato y las proteínas. La pérdida de CO₂ hace que el pH de la clara sufra un incremento (Santos, 1995).

La figura 19 muestra los cambios sufridos de pH de huevo recubierto con quitosán con diferentes formulaciones y almacenados a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y 65% HR.

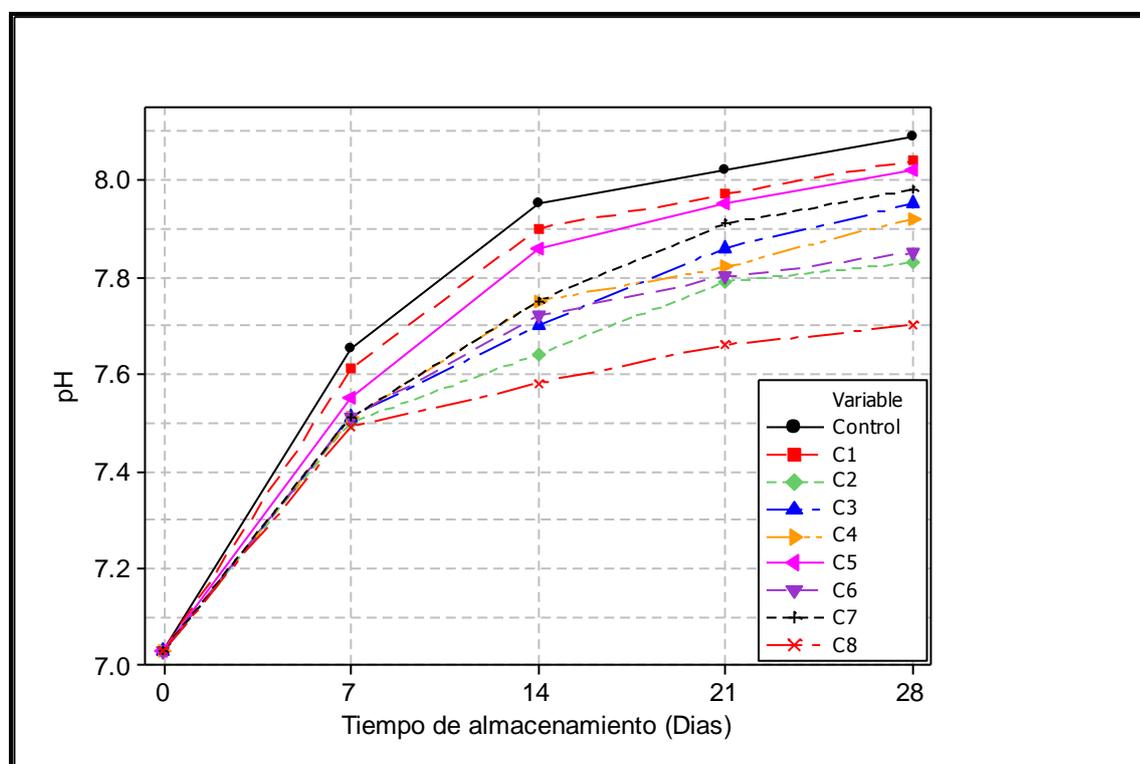


Figura 19. Efecto del recubrimiento a diferentes formulaciones de quitosán en huevo fresco sobre el pH, respecto al tiempo.

Se observa que durante el periodo de almacenamiento los huevos tratados con quitosán, en general presentaron valores menores de pH, independientemente del día de la evaluación lo que corrobora que efectivamente el quitosán actuó como barrera a la transferencia de CO₂.



A los resultados obtenidos se les realizó un análisis estadístico que consistió en un análisis de varianza y regresión múltiple lineal de donde se obtuvo la tasa de cambio del pH por día (ver tabla 15). El análisis mostro que existe diferencia significativa ($p < 0.05$) en cada uno de los tratamientos.

Tabla 15. Tasa de cambio de pH.

Tratamiento	Tasa de cambio del (pH/día)	Tratamiento	Tasa de cambio del (pH/día)
Control	0.0326 ^a	Control	0.0326 ^a
C1	0.0312 ^b	C5	0.0313 ^f
C2	0.0249 ^c	C6	0.0253 ^g
C3	0.0289 ^d	C7	0.0303 ^h
C4	0.0275 ^e	C8	0.0198 ⁱ

Letras diferentes indican diferencia significativa ($p > 0.05$).

Como se observa el grupo control alcanzaron un pH de 8.1 a los 28 días de almacenamiento con una tasa de cambio de 0.0326 del pH por día de almacenamiento, mientras que el tratamiento que alcanzan un menor cambio de pH es el grupo C8 (quitosán-glicerol pH 5, 2 capas) lo que mostró que el quitosán a pH mayor resulto más impermeable no solo para la transferencia de humedad si no también a la transferencia de gases en este caso CO₂.



3.4 Caracterización microbiológica del huevo

Para llevar a cabo la caracterización se realizó un análisis microbiológico una vez que se recibieron en el laboratorio de Biotecnología de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Los microorganismos que fueron evaluados son los siguientes: *Salmonella enteritidis*, Mesófilos aerobios, Coliformes totales y *Staphylococcus aureus*. En la tabla 16, se muestra los resultados que se obtuvieron en el análisis.

Tabla 16. Determinación de la presencia de microorganismos durante la recepción del huevo fresco.

Microorganismo	Promedio (UFC/g)
<i>Salmonella enteritidis</i>	Ausencia
Mesófilos aerobios	3.60×10^4
Coliformes totales	Ausencia
<i>Staphylococcus aureus</i>	Presencia

3.4.1 Evaluación del efecto de un recubrimiento a base de quitosán en diferentes formulaciones sobre las propiedades microbiológicas de huevo fresco almacenado a $25 \pm 2^\circ \text{C}$.

Los huevos poseen un sistema defensivo que obstaculiza su contaminación interna, el huevo de gallina sana, en el momento de la puesta es normalmente estéril y su estructura y composición ofrecen una protección eficaz frente a las contaminaciones microbianas. Sin embargo, la yema por su composición y otras propiedades constituye un excelente medio de cultivo para los microorganismos, ya que es fuente rica de nutrientes, no contiene agentes inhibidores, por lo que si se contamina los microorganismos crecen muy rápidamente. La contaminación del huevo se produce habitualmente después de la puesta, cuando los microorganismos presentes en la superficie externa de la cáscara intentan vencer la barreras defensivas naturales del huevo para penetrar en su interior y si lo logran se producen fenómenos de alteración como putrefacción (verde, rojo, negro, heno, caseificados), descomposición de las proteínas y grasas, producción de cetonas por la oxidación de ácidos grasos; entre los microorganismos que se encuentran más frecuentes en los huevos son: *Micrococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Escherichia coli*, *Serratia* y mohos. También puede ocurrir que el huevo se contamine en el ovario u oviducto durante su formación, esto ocurre



principalmente con microorganismos patógenos como *Salmonella* (Pascual y Calderón, 2000; Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos, 2003)

Se realizó la determinación de la presencia de *Salmonella enteritidis*, conteo de Mesófilos aerobios, Coliformes totales y de *Staphylococcus aureus* en el huevo sometidos a diferentes tratamientos, debido a que uno de los objetivos fue determinar el efecto de un recubrimiento a base de quitosán en diferentes formulaciones sobre la inhibición de microorganismos que establece la NOM-159-SSA1-1996 en huevos almacenados a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante su vida útil, con la ventaja de consumir huevo inócuo y fresco durante un lapso de tiempo más amplio.

3.4.2 *Salmonella enteritidis*

Para la determinación de la presencia de *Salmonella enteritidis* los huevos frescos sin recubrimiento al inicio del almacenamiento, se reportó ausencia de este microorganismo. Posteriormente se recubrieron conforme a las diferentes formulaciones (quitosán, quitosán-glicerol), pH y número de capas, donde se observó que durante los 28 días de almacenamiento no hubo crecimiento para la muestra control y para los diferentes tratamientos (ver tabla 17).

Tabla 17. Resultados obtenidos a los 28 días de almacenamiento de huevo a temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ (según prueba bioquímica realizada).

Tratamientos	<i>Salmonella enteritidis</i>
Control (sin recubrimiento)	Ausencia
C1 (quitosán, pH 3, 1 capa)	Ausencia
C2 (quitosán, pH 3, 2 capas)	Ausencia
C3 (quitosán-glicerol, pH 3, 1 capa)	Ausencia
C4 (quitosán-glicerol, pH 3, 2 capas)	Ausencia
C5 (quitosán, pH 5, 1 capa)	Ausencia
C6 (quitosán, pH 5, 2 capas)	Ausencia
C7 (quitosán-glicerol, pH 5, 1 capa)	Ausencia
C8 (quitosán-glicerol, pH 5, 2 capas)	Ausencia

Es preciso mencionar, que aunque los resultados fueron negativos en cuanto a la presencia de *Salmonella enteritidis*, sin embargo, es recomendable efectuar un pre-enriquecimiento dado que este permite restaurar las células de *Salmonella* a una condición fisiológica estable en un medio de enriquecimiento no selectivo, así como también un enriquecimiento



selectivo, con el propósito de incrementar las poblaciones de *Salmonella* e inhibir otros microorganismos en la muestra (Boscán y cols., 2005).

La *Salmonella* es un bacilo gram (-), no esporulado, anaerobio facultativo, existen diferentes especies como: *S. typhi*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, por mencionar algunas. El hábitat principal de la *Salmonella* es el tracto intestinal de los animales y personas, también se pueden encontrar en el agua de modo especial en el agua contaminada, cualquier tipo de alimento o bebida puede convertirse en el vehículo para la transmisión de esta enfermedad, la *Salmonella* puede estar presente en cualquier tipo de alimentos como productos cárnicos, lácteos, huevo, productos del mar e incluso frutas y hortalizas, predomina en aves y carne cruda ya que su hábitat natural lo constituyen la ganadería y las aves (Doyle y cols., 2001). Los huevos se contaminan de dos maneras principales:

1. **Por infección transovárica:** El problema proviene de la transmisión a través del oviducto del agente infeccioso al interior del huevo antes de la deposición de la cáscara y la presencia de determinadas especies bacterianas puede ser indicadora de un ave infectada (Doyle y cols., 2001).
2. **Por infección a través de la cáscara:** Supone la contaminación inicial de la superficie del huevo, seguida de la penetración del microorganismo en el albumen o en algunos casos directamente en la yema, la superficie del huevo recién formado se contamina con una diversidad de microorganismos entéricos por causa del tracto intestinal, urinario y reproductor del ave porque comparten un orificio común, también se contamina por microorganismos del ambiente en el que es puesto (ICMSF, 2001).



3.4.3 Mesófilos aerobios

Así mismo, también se determinó la presencia de Mesófilos aerobios, al inicio del almacenamiento de huevo fresco sin recubrir, presentó una cuenta de 3.6×10^4 UFC/g. En el transcurso del almacenamiento se registró que en los diferentes tratamientos (quitosán, quitosán-glicerol, pH y número de capas) incluyendo el grupo control mostró un incremento en el crecimiento de estos microorganismos como se observa en la figura 20.

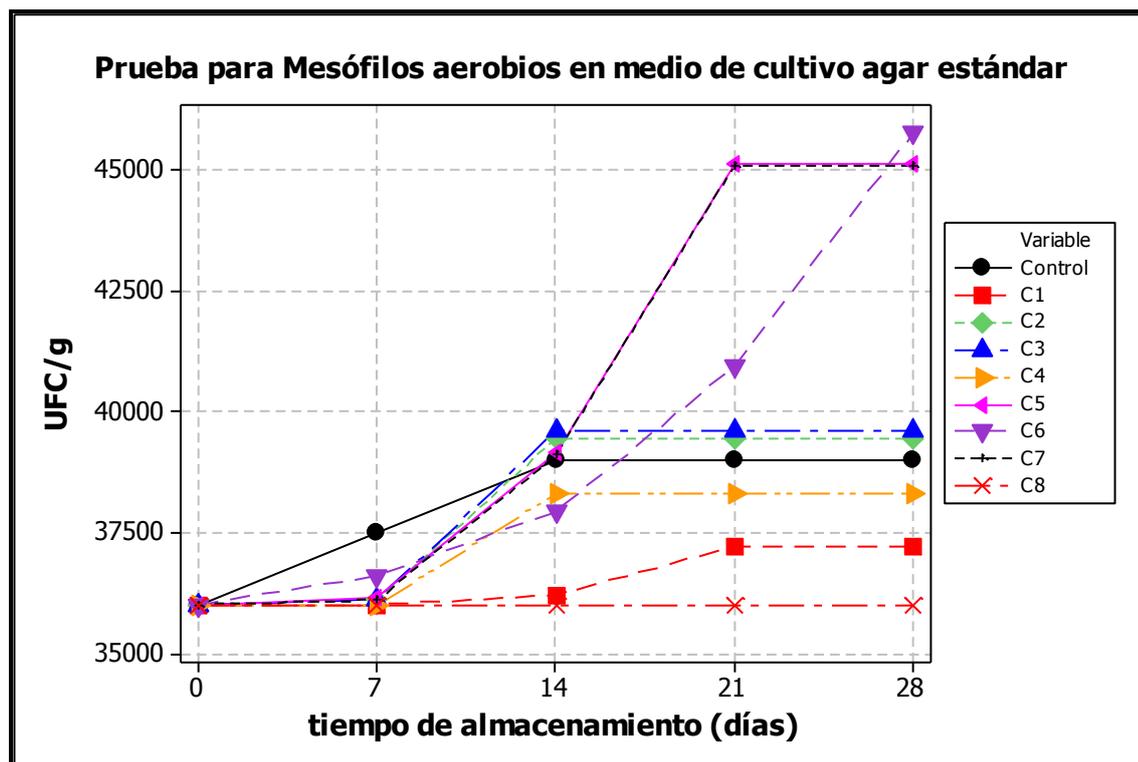


Figura 20. Efecto de la aplicación de un recubrimiento a base de quitosán y quitosán-glicerol con diferentes pH's 3 y 5, con 1 y 2 capas, almacenadas a temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, sobre Mesófilos aerobios.

Sin embargo, se observa que en los tratamientos a base quitosán pH 3 con una capa (C1), quitosán-glicerol pH 3 con dos capas (C4) y quitosán-glicerol pH 5 con dos capas (C8) mostraron un menor crecimiento con respecto al control durante el almacenamiento; cabe mencionar, que el tratamiento a base de quitosán pH 3 con una capa (C1) mantuvo su carga microbiana desde el inicio hasta el final del almacenamiento, siendo este tratamiento el que mejor resultados presentó.

En la tabla 18, se muestran los valores de crecimiento de Mesófilos aerobios en medio de cultivo agar estándar, para observar más detalladamente el comportamiento que tuvieron las diferentes formulaciones sobre los microorganismos que se desarrollaron en este medio.



Tabla 18. Número de colonias de Mesófilos aerobios en UFC/g en medio de cultivo agar estándar, durante el almacenamiento de huevo a temperatura de 25±2°C.

Tratamientos	Tiempo de almacenamiento (días)				
	0	7	14	21	28
Control (sin recubrimiento)	36000	37500	39000	39000	39000
C1 (quitosán, pH 3, 1 capa)	36000	36000	36200	37200	37200
C2 (quitosán, pH 3, 2 capas)	36000	36000	36100	39433	39433
C3 (quitosán-glicerol, pH 3, 1 capa)	36000	36100	39600	39600	39600
C4 (quitosán-glicerol, pH 3, 2 capas)	36000	36000	38300	38300	38300
C5 (quitosán, pH 5, 1 capa)	36000	36150	39150	45150	45150
C6 (quitosán, pH 5, 2 capas)	36000	36600	37933	40933	45765
C7 (quitosán-glicerol, pH 5, 1 capa)	36000	36100	39100	45100	45100
C8 (quitosán-glicerol, pH 5, 2 capas)	36000	36000	36000	36000	36000

Nota: Las filas sombreadas corresponden a los tratamientos que presentaron mejores resultados.

Basándose en el análisis estadístico, se obtuvo que los tratamientos a base de quitosán pH 3 con una capa (C1) y quitosán-glicerol pH 5 con dos capas (C8) tuvieron diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto a la muestra control (ver anexos), por lo tanto, estos valores muestran que existe un efecto importante en la inhibición de Mesófilos aerobios.

Además también se puede observar en la tabla 18, todos los tratamientos desde el inicio hasta el final del almacenamiento presentaron número de colonias dentro de los rangos especificados según la NOM-159-SSA1-1996, que establece como límite máximo 1×10^5 UFC/g. No obstante, los tratamientos que se recomiendan son C1 y C8, porque no permitieron que los microorganismos en estudio se multiplicaran demasiado y se pueden utilizar para reducir la carga microbiana en huevo o en caso de no tener microflora inicial mantener inócuo al huevo.

Los Mesófilos aerobios se multiplican a temperaturas entre 30-37°C, se consideran generalmente como microorganismos indicadores. La presencia de un número elevado de bacterias aerobias mesófilas significa que puede haberse dado condiciones favorables a la multiplicación de microorganismos patógenos para el ser humano y animales, el recuento de estas bacterias es el más comúnmente utilizado para indicar si el manejo sanitario del producto ha sido el adecuado (ICMSF, 2000). Los principales géneros y especies de bacterias, en general, se incluyen dentro de los Mesófilos, tanto especies saprofitas como patógenas para el hombre y los animales (Bourgeois y cols., 1994).



3.4.4 Coliformes totales

Los resultados que se obtuvieron con relación a la presencia de Coliformes totales al inicio del almacenamiento de huevo fresco sin recubrimiento, se registró ausencia de estos microorganismos. Posteriormente, los huevos recubiertos a base de quitosán pH 3 con una capa (C1), quitosán pH 3 dos capas (C2), quitosán-glicerol pH 3 con dos capas (C4), quitosán pH 5 con una capa (C5) y quitosán-glicerol pH 5 con dos capas (C8) no manifestaron crecimiento de Coliformes totales durante todo el tiempo de almacenamiento (ver fig. 22), mientras que los tratamientos con quitosán-glicerol pH 3 con una capa (C3), quitosán pH 5 con dos capas (C6) y quitosán-glicerol pH 5 con una capa (C7), mostraron a los 7 días de almacenamiento un crecimiento de 1×10^2 UFC/g. Es importante mencionar, que los tratamientos C1, C2, C4, C5 y C8, desde el inicio hasta el final del almacenamiento presentaron una cuenta de microorganismos menor al límite máximo (5×10^1 UFC/g) de acuerdo a la NOM-159-SSA1-1996 (ver tabla 20).

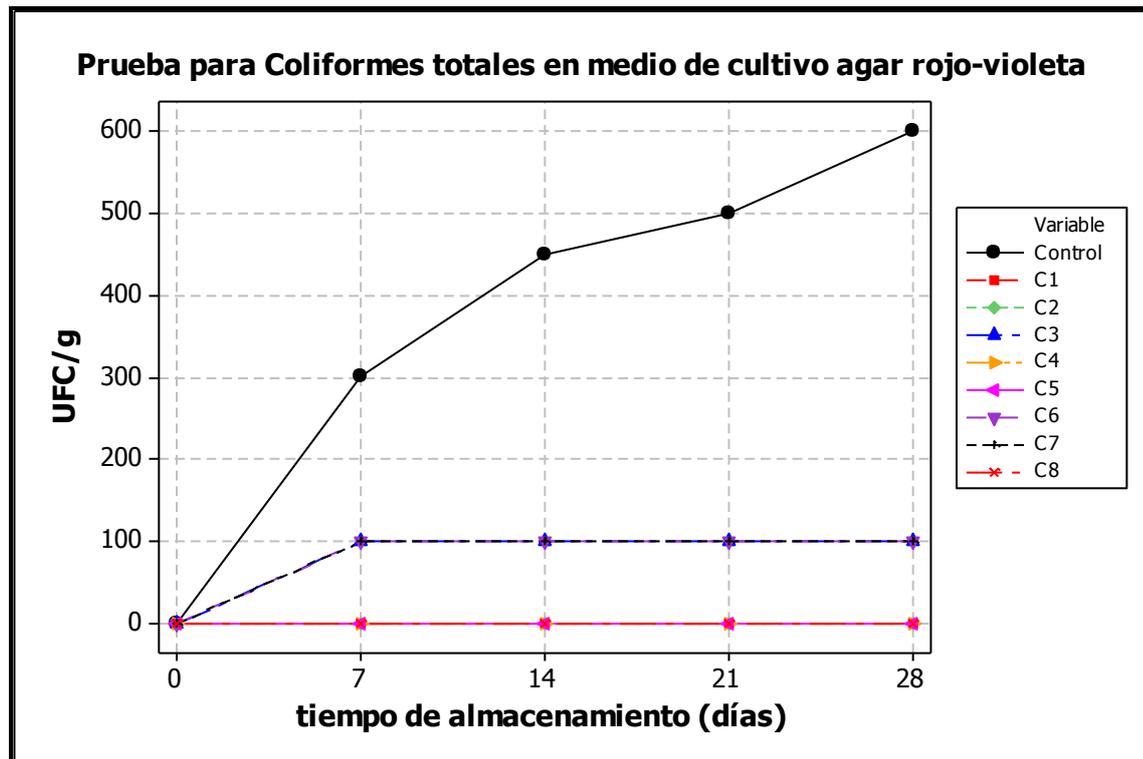


Figura 21. Efecto de la aplicación de un recubrimiento a base de quitosán y quitosán-glicerol con diferentes pH's 3 y 5, con 1 y 2 capas, almacenadas a temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, sobre Coliformes totales.



Tabla 19. Número de colonias de Coliformes totales en UFC/g en medio de cultivo agar rojo-violeta, durante el almacenamiento de huevo a temperatura de 25±2°C.

Tratamientos	Tiempo de almacenamiento (días)				
	0	7	14	21	28
Control (sin recubrimiento)	0	300	450	500	600
C1 (quitosán, pH 3, 1 capa)	0	0	0	0	0
C2 (quitosán, pH 3, 2 capas)	0	0	0	0	0
C3 (quitosán-glicerol, pH 3, 1 capa)	0	100	100	100	100
C4 (quitosán-glicerol, pH 3, 2 capas)	0	0	0	0	0
C5 (quitosán, pH 5, 1 capa)	0	0	0	0	0
C6 (quitosán, pH 5, 2 capas)	0	100	100	100	100
C7 (quitosán-glicerol, pH 5, 1 capa)	0	100	100	100	100
C8 (quitosán-glicerol, pH 5, 2 capas)	0	0	0	0	0

Nota: Las filas sombreadas corresponden a los tratamientos que presentaron mejores resultados.

Mediante un análisis estadístico los tratamientos C1, C2, C4, C5 y C8 presentaron diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto a la muestra control (ver anexos), por lo tanto, estos mostraron un mejor efecto antimicrobiano contra Coliformes totales sobre huevo almacenado.

Las bacterias del grupo coliforme se definen como bacilos, gram (-), anaerobios facultativos, no esporulados, incluye los géneros: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Citrobacter*, varios de ellos pueden vivir e incluso crecer en el suelo, agua y otros ambientes. Los coliformes totales fermentan la lactosa con producción de ácido y gas en 24-48 horas a 36 °C, mientras que los coliformes fecales son un subgrupo de los coliformes totales que crecen con lactosa y la fermentan a 44.5°C produciendo ácido y gas en las primeras 48 horas de incubación, son termotolerantes e incluyen cepas de los géneros *Escherichia* y *Klebsiella* de los que se conoce que están relacionados con contaminación fecal procedentes de animales de sangre caliente (ICMSF, 1998; García y cols., 2006). El grupo de los microorganismos coliformes es el más ampliamente utilizado en la microbiología de los alimentos como indicador de prácticas higiénicas inadecuadas, el uso de los coliformes como indicador sanitario puede aplicarse para: la detección de prácticas sanitarias deficientes en el manejo y en la fabricación de los alimentos, para la evaluación de la calidad microbiológica de un producto aunque su presencia no necesariamente implica un riesgo sanitario, para la evaluación de la eficiencia de prácticas sanitarias e higiénicas del equipo, para determinar la calidad sanitaria del agua y hielo utilizados en las diferentes áreas del procesamiento de alimentos (NOM-113-SSA1-1994).



3.4.5 *Staphylococcus aureus*

En cuanto a la determinación de la presencia de *Staphylococcus aureus* al inicio del almacenamiento de huevo fresco sin recubrimiento, se reportó ausencia del mismo. Durante el lapso de almacenamiento se observó que el grupo control tuvo crecimiento de microorganismos, mientras que los tratamientos a base de quitosán pH 3 con dos capas (C2), quitosán-glicerol pH 3 con una capa (C3), quitosán-glicerol pH 3 con dos capas (C4) y quitosán-glicerol pH 5 con dos capas (C8) presentaron crecimiento microbiano, pero en menor proporción comparado con el control (ver fig. 22). Las colonias que se presentaron en medio de cultivo BHI se le realizaron pruebas bioquímicas con la finalidad de identificar si en efecto se trataba del microorganismo en estudio.

Los microorganismos que fueron identificados son: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Bacillus cereus*, los dos últimos microorganismos se presentaron casi al final de la experimentación.

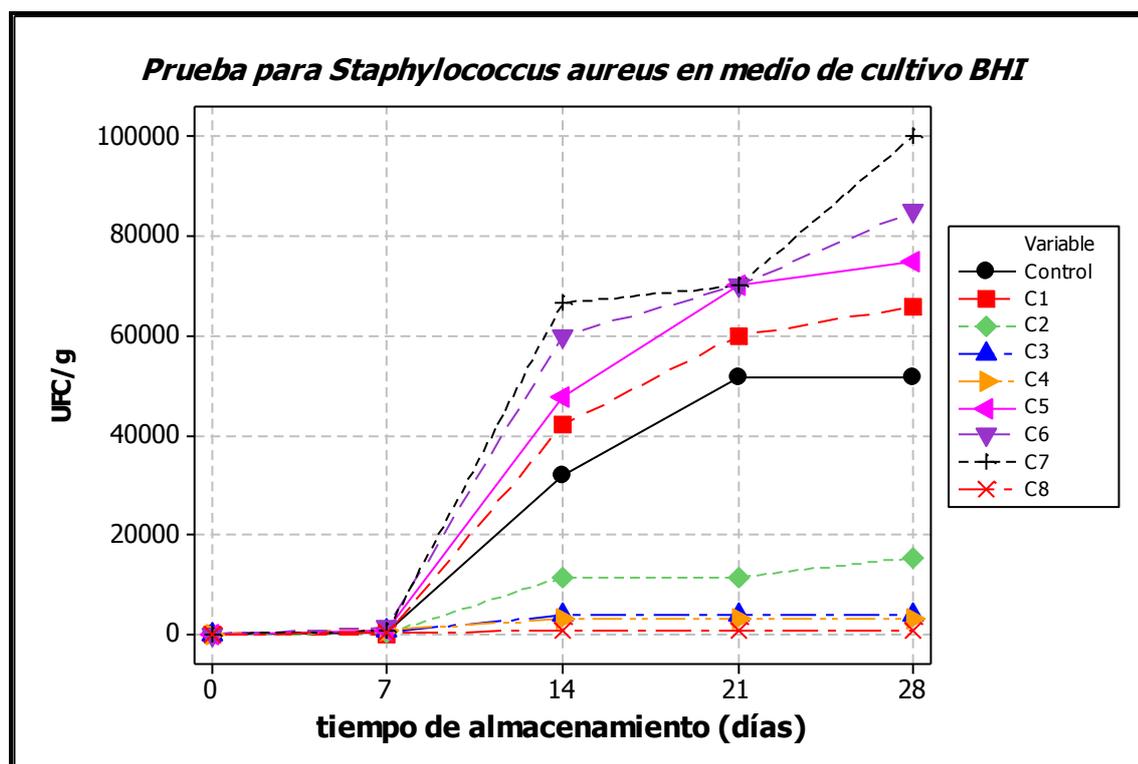


Figura 22. Efecto de la aplicación de un recubrimiento a base de quitosán y quitosán-glicerol con diferentes pH's 3 y 5, con 1 y 2 capas, almacenadas a temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, en la prueba para *Staphylococcus aureus* en medio BHI.



En la tabla 20, se muestran los valores de crecimiento en medio de cultivo BHI, para observar más detalladamente el comportamiento que tuvieron las diferentes formulaciones sobre los microorganismos que se desarrollaron en este medio.

Tabla 20. Crecimiento en UFC/g en medio de cultivo agar BHI, durante el almacenamiento de huevo a temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Tratamientos	Tiempo de almacenamiento (días)				
	0	7	14	21	28
Control (sin recubrimiento)	0	400	31666	51666	51666
C1 (quitosán, pH 3, 1 capa)	0	100	42000	60000	65700
C2 (quitosán, pH 3, 2 capas)	0	200	11400	11400	15400
C3 (quitosán-glicerol, pH 3, 1 capa)	0	585	37800	37800	37800
C4 (quitosán-glicerol, pH 3, 2 capas)	0	800	3000	3000	3000
C5 (quitosán, pH 5, 1 capa)	0	900	47500	70000	75000
C6 (quitosán, pH 5, 2 capas)	0	1300	60000	70000	85000
C7 (quitosán-glicerol, pH 5, 1 capa)	0	600	66500	70000	100000
C8 (quitosán-glicerol, pH 5, 2 capas)	0	300	700	700	700

Nota: Las filas sombreadas corresponden a los tratamientos que presentaron mejores resultados.

Según la NOM-159-SSA1-1996 establece que el huevo fresco debe tener un conteo menor a 100 UFC/g de *Staphylococcus aureus*, por lo que en la tabla 20 se puede observar que todos los tratamientos a los 28 días de almacenamiento incluyendo el grupo control no están dentro del límite máximo señalado por la norma.

De acuerdo con los datos arrojados por el análisis de varianza de un solo factor realizado, muestra diferencia significativa ($p < 0.05$) solo para el tratamiento a base de quitosán-glicerol pH 5 con dos capas (C8) con respecto a la muestra control (ver anexos), por lo tanto, esto nos sugiere que este tratamiento en particular proporcionó un efecto inhibitorio contra *Staphylococcus aureus*.

El género *Staphylococcus* es gram (+), comprende principalmente tres especies, *S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. saprophyticus*, se considera entre las más importantes para la microbiología de los alimentos; es un microorganismo patógeno presente en la piel, fosas nasales y garganta de personas y animales, además casi toda la población humana es portadora del microorganismo, por ello, la diseminación de *S. aureus* de unas personas a otras y de las personas a los alimentos se puede producir por contacto directo (por medio de utensilios que se usan en la elaboración de los alimentos tales como picadoras de carne, cuchillos, hojas de sierra, etc.), indirectamente por medio de fragmentos de piel y por medio del tracto



respiratorio. La presencia de un gran número *S. aureus* en un alimento se interpreta como indicativo de que las prácticas de limpieza y desinfección o el control de temperatura no han sido en algún lugar adecuados (ICMSF, 2000). La bacteria *Bacillus cereus* es gram (+), en forma de bastón (bacilo), formadora de esporas, es anaerobio facultativo. Se encuentra corrientemente en el suelo (tierra, polvo) y agua, puede encontrarse en una gran variedad de alimentos vegetales y carnes (Bourgeois, 1994).

En base a lo anterior, el huevo pudo haberse contaminado por *Bacillus cereus* debido a un posterior lavado con agua sucia o a la falta de limpieza en los lugares de la puesta, incluso por la manera en que son manipulados después de obtenidos. En cuanto a la contaminación de *Staphylococcus aureus* y *epidermidis* pudo haberse dado porque el manipulador estaba enfermo de las vías respiratorias o de la piel y por contacto directo con el huevo contaminó el alimento, debido a una incorrecta manipulación post-oviposición, limpieza y desinfección de los ponederos.

Por otro lado, si observa a detalle que para cada microorganismo evaluado, en particular solo el tratamiento C8 (quitosán-glicerol, pH 5, con dos capas) presentó el menor crecimiento microbiano frente al control y demás tratamientos; por lo tanto, nos muestra que este tratamiento influye de manera representativa como barrera a la contaminación, porque a pH 5, las cargas positivas del grupo amino de la estructura del quitosán están reducidas, debido a que las demás cargas positivas fueron neutralizadas por el grupo OH^- del hidróxido de sodio utilizado al momento de ajustar el pH de la solución de quitosán, provocando que el recubrimiento sea más hidrofóbico y evitando así la penetración de vapor de agua u oxígeno al interior del huevo, por consiguiente, al no existir las condiciones adecuadas de oxígeno por ende se detiene la proliferación de microorganismos aerobios.

Algunos investigadores, han estudiado el efecto antimicrobiano de quitosán en combinación con glicerol, variando concentración de la solución de quitosán, peso molecular, grado de desacetilación por mencionar algunos, sobre las propiedades físicas, fisicoquímicas y microbiológicas del huevo durante determinado tiempo de almacenamiento, resultando diferentes efectos favorables para alargar la vida de anaquel del alimento. Por lo anterior, es importante resaltar que en el presente trabajo, se utilizaron diferentes variables en comparación con otros investigadores, para el recubrimiento a base de quitosán sobre las propiedades físicas, fisicoquímicas y microbiológicas del huevo, entre las cuales serían pH,



número de capas, quitosán en combinación con glicerol, además del uso de quitosán con peso molecular intermedio (135 kDa) con un grado de desacetilación del 90%, aunque estas dos últimas no se variaron, si tuvieron una importante efecto en las determinaciones antes mencionadas.



CONCLUSIONES

Con base a los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede concluir lo siguiente:

- La aplicación del recubrimiento comestible a base de quitosán-glicerol permitió el desarrollo de un método efectivo de conservación para el huevo como agente antimicrobiano y recubrimiento comestible.
- La selección de la concentración de quitosán (1%) así como el ácido orgánico (ácido láctico) para su disolución fueron los adecuados.
- Se llevaron a cabo 8 tratamientos diferentes para el recubrimiento del huevo, las cuales fueron la variación de la adición de glicerol, el pH de la solución de quitosán y el número de capas para el recubrimiento del huevo y el tratamiento.
- El quitosán actuó positivamente como barrera a la transferencia de humedad, CO₂ y a la contaminación de microorganismos.
- La adición de glicerol al ser utilizado a una concentración baja, no se observó su efecto frente a la permeabilidad, únicamente actuó favoreciendo la adherencia del quitosán sobre el huevo.
- La aplicación de la doble capa funcionó mejorando su propiedad de barrera, debido a que se forman dos capas disminuyendo la transferencia de gases al exterior y a la contaminación microbiana.
- El tratamiento C8 (quitosán-glicerol, pH 5, con dos capas) aplicados en huevos frescos, almacenados a temperatura de 25°C con 65% de HR, presentó las menores pérdidas tanto de humedad como de dióxido de carbono.



-
- Todos los tratamientos con quitosán en cámara de aire a excepción del los grupos C2, C3 y C5 se encuentran dentro de lo establecido en la norma NOM-159-SSA1-1996, es decir se encuentran por debajo de los 9mm a los 28 días, mientras que el grupo control solo alcanza los 12 días de almacenamiento.
 - En cuanto a altura de la clara todos los tratamientos con quitosán se encuentran dentro de lo establecido en la norma NMX-FF-079-SCFI-2004, es decir se encuentran por arriba de 31 HU a los 28 días logrando mantenerse en la misma clasificación como México 2, mientras que el grupo control solo alcanza aproximadamente los 23 días de almacenamiento encontrándose como fuera de clasificación.
 - De acuerdo a la NOM-159-SSA1-1996 en cuanto al pH inicial de los huevos estaban fuera de esta norma ya que fue mayor al inicial, mas sin embargo de acuerdo a los resultados obtenidos de la cámara de aire todos los huevos tratados con quitosán entraban de acuerdo a esta a excepción del tratamiento C2 y el control estos últimos desde el día 13 de almacenamiento obtuvieron un altura de la cámara de aire mayor a la establecida en esta norma.
 - La actividad antimicrobiana del tratamiento C8 (quitosán-glicerol, pH 5, 2 capas) presentó un efecto significativo en la inhibición de *Salmonella enteritidis*, Mesófilos aerobios, Coliformes totales y *Staphylococcus aureus*.
 - Los tratamientos con pH 3 como C1, C2, C3 y C5 solo manifestaron un efecto inhibitor para algunos microorganismos, resultando no eficientes como recubrimientos antimicrobianos.
 - El mejor efecto inhibitor fue dado por el tratamiento C8 sobre los Coliformes totales y *Salmonella enteritidis* con ausencia de carga microbiana durante todo el almacenamiento.



-
- En el caso de Mesófilos aerobios y *Staphylococcus aureus* el tratamiento C8 a pesar de estar contaminados los huevos inicialmente, mantuvo estable la carga microbiana durante todo el tiempo de almacenamiento.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar, L. K. (2007). Estudio del grado de hinchamiento de películas de quitosán compuestas para su aplicación en alimentos. Tesis de Licenciatura en Ingeniero en Alimentos. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo uno.
- Álvarez, Y. L. E. y Madin, A. I. (2009). Efecto del quitosán en la cicatrización de piel utilizando como modelo, una incisión quirúrgica a nivel de línea media en la región infraumbilical en perras. Tesis de Licenciatura en Médico Veterinario Zootecnista. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo cuatro.
- Amorin, R. V. S., Lendingham, W. M., Kennedy, J.F, y Campos-Takaki, G. M. (2006). Chitosan from syncephalastrum racemosum using sugar cane substrates as inexpensive carbon sources. *Food Biotechnology*; 20(1), 43-53.
- Austic, R. E. (1994). Producción avícola. 13th ed. El manual moderno, S.A de C.V. México.
- Ayres, H. G. (1970). Análisis químico cuantitativo. 2^a ed. Harla. México.
- Banker, G. S. (1966). Film coating: theory and practice. *Pharmacy Science*; 55, 81-92.
- Barroeta A. C. (2005). El huevo y sus componentes como alimento funcional. Instituto de Estudios del Huevo. España.
- Belitz H.D. y Grosch W. (1997). Química de los alimentos. 2^a ed. Acribia, S. A. España.
- Bernardo, R. K. (2007). Evaluación del aprovechamiento de la pitaya como alternativa de solución para las regiones marginadas de México. Tesis de Licenciatura en Ingeniero en Alimentos. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo uno.
- Besterfield, D. (1995). Control de Calidad. 4^a ed. Prentice Hall Hispanoamericana. México.
- Boscán, D. L. A., Arzalluz, A. M., Ugarte, C. I., Sánchez, D., Díaz, D., Wittum, E. T. y Hoet, E. A. (2005). Aislamiento de salmonellas de importancia zoonótica en



-
- vísceras de pollos beneficiados en el estado Zulia, Venezuela. *Revista Científica, FCV-LUZ*; 15(6), 576-582.
- Bósquez, M. E. (2003). Elaboración de recubrimientos comestibles formulados con goma de mezquite y cera de candelilla para reducir la cinética de deterioro en fresco del limón persa (*Citrus latifolia Tanaka*). Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma Metropolitana. México.
 - Bourgeois, C. M., Mescle, J. F. y Zucca J. (1994). *Microbiología alimentaria vol. 1: aspectos microbiológicos de la seguridad y calidad alimentaria*. 1ª ed. Acribia, S.A. España.
 - Bourtoom T. (2008). Edible films and coatings: characteristics and properties. *International food research journal*. Department of material product technology, prince of songkla university; 15(3), 1-12.
 - Box, P. G. E., Hunter, G. W. y Hunter, S. J. (1999). *Estadística para investigadores*. Reverté, S. A. México.
 - Bureau, G. y Multon J. L. (1995). *Embalaje de alimentos de gran consumo*. 1ª ed. Acribia, S. A. España.
 - Card E. L. y Nesheim. (1968). *Producción avícola M.C.* Acribia, S. A. España.
 - Caner, C. y Cansiz, O. (2007). Effectiveness of chitosan-based coating in improving shelf-life of eggs. *J. Sci Food Agric*; (87), 227-232.
 - Caner, C., Vergano, P. J. y Wiles, J. L. (1998). Chitosan film mechanical and permeation properties as affected by acid, plasticizer, and storage. *Journal of Food Science*; 63(6), 1049-1053.
 - Catalá, R. y Gavara, R. (2001). Nuevos envases de la protección pasiva a la defensa activa de los alimentos envasados. *Arbor CLXVIII*. 109-127.
 - CODEX Alimentario. (2007). *Código de Prácticas de Higiene para los huevos y productos de huevo*.
 - Contreras, A., Bermejo, A., Pérez, G. M. B. y Rojas, A. C. (2006). Efecto del quitosano aplicado como recubrimiento en naranjas variedad valencia. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. España.
 - Covarrubias, C. G. C. e Hidalgo, H. M. L. (2007). Evaluación del efecto del quitosán como cubriente en granos de maíz, en la mortalidad, la oviposición y emergencia de *Sitophilus zeamais* y como antifúngico en hongos de campo y almacén in vitro. Tesis



- de Licenciatura en Ingeniero en Alimentos. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo uno.
- Charley, H. (1987). Tecnología de los alimentos. 1ª ed. Limusa. México.
 - Desroisier, N. (1991). Tecnología de los Alimentos. 8ª ed. Continental. México.
 - Enciclopedia de los alimentos, 2005
 - “http://www.mapa.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_DYC/DYC_2005_79_1_05_115.pdf”
 - Fai, C. A. E., Montenegro, S. T. C. y Montenegro, S. T. L. (2008). Potencial biotecnológico de quitosana em sistemas de conservação de alimentos. Revista iberoamericana de polímeros. 9(5), 435-451.
 - Falder, A. R. (2005) Enciclopedia de los alimentos. Ministerio de agricultura, pesca y alimentación. España.
 - Frazier, W. C. y Westhoff, D. C. (1993). Microbiología de los alimentos. 4ª ed. Acribia, S.A. España.
 - Fennema, R. O. (2000). Química de los alimentos. 2ª ed. Acribia S. A. España.
 - Fujimoto, T., Tsuchiya, Y., Terao, M., Nakamura, K. y Yamamoto, M. (2006). Antibacterial effects of chitosan solution against *Legionella pneumophila*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus*. International Journal of Food Microbiology; 112, 96-101.
 - González, R. (2009). Data analysis for experimental design. Guilford. New York.
 - Guilbert, S., Gontard, N. y Cuq, B. (1995). Technology and applications of edible protective. Packaging Technology and Science; 8(6), 339-346.
 - Harris, E. R. (2010). Quitosano, un biopolímero con aplicaciones en sistemas de liberación controlada de fármacos. Memoria de Doctorado en Bioquímica. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Biológicas. España.
 - Hayes, P. R. (1993). Microbiología e higiene de los alimentos. 1ª ed. Acribia, S.A. España.
 - Hernández, Q. L. J. (2006). Recubrimiento de quitosán sobre mango *Mangifera indica* L. variedad manila. Tesis de Licenciatura en Ingeniero en Alimentos. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo uno.
 - Huevo, 2010 “http://www.huevo.org.es/el_huevo_estructura.asp”



-
- Hyun, K. S., Kyoon, N. H. y Prinyawiwatkunl, W. (2007). Effect of molecular weight, type of chitosan, and chitosan solution pH on the shelf- life and quality of coated eggs. *Journal of Food Science*; 72(1), 44-48.
 - Ibarz, R. A., Barbosa, C. G. V., Garza, G. S. y Gimeno, A.V. (2000). *Métodos experimentales en la ingeniería alimentaria*. Acribia S. A. España.
 - ICMSF. (1998). *Microorganismos en los alimentos: características de los patógenos microbianos*. 1ª ed. Acribia, S.A. España.
 - ICMSF. (2000). *Microorganismos de los alimentos 1: su significado y métodos de enumeración*. 2ª ed. Acribia, S.A. España.
 - ICMSF. (2001). *Microorganismos de los alimentos 6: ecología microbiana de los productos alimentarios*. Acribia, S.A. España.
 - INEA, 2011 <http://www.inea.uva.es>
 - Instituto de Nutrición e Higiene de los alimentos, 2003
“<http://www.inha.sld.cu/vicedirecciones/huevo.htm>”
 - Instituto Nacional Avícola, 2010 <http://www.institutonacionalavicola.org.mx>
 - Juárez, A., Gutiérrez, E. (2009). Control de cloquez y comportamiento productivo de guajolotas criollas. Universidad Michoacana de San Nicolás Hidalgo. Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales.
 - Kamper, S. L. y Fennema, O. (1985). Uses of an edible film maintain water vapor gradients in foods. *Journal Food Science*; 50, 382-384.
 - Kasaai, M. R. (2010). Determination of the degree on N-acetylation for chitin by various NMR spectroscopy techniques: a review. *Carbohydrate Polymers*; 79, 801-810.
 - Kester, J. J. y Fennema, O. (1986). Edible films and coatings: a review. *Food Technology*; 40(12), 47-59.
 - Kong, M., Guang, C. X., Xing, K. y Jin, P. H. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*; 144, 51-63.
 - Kyoon, N. H., Prinyawiwatkunl, W. y Meyers, R. S. (2005). Comparison of shelf life of eggs coated with chitosan prepared under various deproteinization and desmineralization times. *Sensory and Qualities of Food*; 1-6.



-
- Leleu, S., Herman, L., Heyndrickx, M., Reu, K., Michiels, C. W., Baerdemaeker, J. y Messens, W. (2009). Selection of a chitosan type of eggshell coating to reduce *salmonella* shell contamination. *Technology and Food Science Unit*; 1-6.
 - Leyva, C. V., Valdés, A. E., Cisneros, D. E. y Pérez, R. O. (1996). Determinación de *Salmonella* y Enterobacterias totales en huevos frescos de gallina. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*; 10(2), 6-83.
 - León, M. J. (1993). Condiciones de operación en la pasteurización HTST de huevo entero líquido. Tesis en Licenciatura en Ingeniero en Alimentos. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo uno.
 - Madrid, V. A. (1993). *Nuevo Manual de Industrias Alimentarias*. 1ª ed. Mundiprensa. España.
 - Mancera, A. (2005). Identificación de *Salmonella enteritidis* en huevo para consumo en la ciudad de México. *Técnica pecuaria en México*. 43, 229-237.
 - Matissek, R., Schnepel, M. F. y Steiner, G. (1998). *Análisis de los alimentos: fundamentos-métodos-aplicaciones*. 2ª ed. Acribia S.A. España.
 - Merck, G. (1994). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 2ª ed. Alemania.
 - Merck Group, 2009
<https://mypronet.merck.de/Attachment/200710.092.Pronet.pdf?file>
 - Min, F., Qiaoling, H. y Kai, S. (2009). Preparation and structure of chitosan soluble in wide pH range. *Carbohydrate Polymers*; 78, 66-71.
 - Miranda, C. S. P. (2000)^a. Evaluación de la actividad antibacteriana de quitosán, caracterizado física y químicamente. Tesis en Maestría en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo uno.
 - Miranda, C. S. P. (2000)^b. Proceso de extracción de quitina a partir de caparazones y su conversión a quitosán. Instituto mexicano de la propiedad industrial en México.
 - Miranda, C. S. P., Cárdenas, G., López, D. y Lara, S. A. V. (2003). Comportamiento de películas de quitosán compuesto de un modelo de almacenamiento de aguacate. *Journal of the Mexican Chemical Society*; 47(4), 331-336.



-
- Miranda, R. E. (2007). Evaluación del efecto de oligómeros de quitosán obtenidos por radiación gamma, para determinar su acción fungicida y/o fungiestática en *Aspergillus flavus*. Tesis en Licenciatura en Ingeniero en Alimentos. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo uno.
 - Montgomery, D. C. (2002). Diseño y análisis de experimentos. 2ª ed. Limusa Wiley. México.
 - Morales, Z. J. (2002). Estimación del efecto antifúngico de una película de quitosán sobre los parámetros de calidad y grado de madurez de la fresa fragaria vesca variedad solana durante su vida útil. Tesis de licenciatura en ingeniería en alimentos. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México.
 - Mossel, D. A. A. y Moreno, G. B. (1983). Microbiología de los alimentos: Fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la inocuidad y la calidad de los alimentos. Acribia, S. A. España.
 - Mountney, G. J. (2001). Tecnología de productos agrícolas. Acribia, S. A. España.
 - Muller, H. G. (1986). Nutrición y ciencia de los alimentos. 1ª ed. Acribia, S. A. España.
 - Murillo, M. M. (2008). Evaluación de propiedades fisicoquímicas y antimicrobianas de películas comestibles adicionadas con nisina y/o glucosa oxidasa. Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. México.
 - Muzarrelli, R. A. A. (1974). Chitin. 1ª ed. Pergamon Press. Inglaterra.
 - Navarro, P. C. (2010). Recubrimientos comestibles a base de hidroxilpropil metilcelulosa. Tesis de Doctorado en Tecnología de Alimentos. Universidad Politécnica de Valencia. España.
 - Navarro, T. M. (2007). Efecto de la composición de recubrimientos comestibles a base de hidroxipropilmetilcelulosa y cera de abeja en la calidad de ciruelas, naranjas y mandarinas. Tesis de Doctorado en Investigaciones Agrarias. Universidad Politécnica de Valencia. España.
 - Navarro, U. G. (2000). Estudio de factores de calidad de huevos en ponedoras Isa Brown y Shaver Cross sometidas a diferentes dosis de esparteína y alcaloides totales



- de lupino. Tesis en Licenciatura en Medicina Veterinaria. Universidad Austral de Chile.
- No, H. K., Meyers, S. P., Prinyawiwatkul, W. y Xu, Z. (2007). Applications of Chitosan for Improvement of Quality and Shelf Life of Foods: A Review. *Journal of Food Science*; 72(5), 87-100.
 - NOM-092-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la determinación de Mesófilos aerobios en alimentos. Norma Oficial Mexicana.
 - NOM-113-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la determinación de Coliformes totales en alimentos. Norma Oficial Mexicana.
 - NOM-114-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la determinación de Salmonella en alimentos. Norma Oficial Mexicana.
 - NOM-115-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la determinación de Staphylococcus aureus en alimentos. Norma Oficial Mexicana.
 - NOM-129-SSA1-1995, Bienes y servicios. Productos de la pesca: secos-salados, ahumados, moluscos cefalópodos y gasterópodos frescos-refrigerados y congelados. Norma Oficial Mexicana.
 - NOM-159-SSA1-1996, Bienes y Servicios. Huevo, sus Productos y Derivados. Disposiciones y Especificaciones Sanitarias.
 - NMX-FF-079-SCF1-2004, Productos Avícolas- Productos Avícolas-Huevo Fresco de Gallina- Especificaciones y Métodos de Prueba.
 - North M. O. (1990). Manual de producción avícola. 2ª ed. El manual moderno, S. A. de C.V. México.
 - Obanu, Z. A., Mpieri A. A. (1984). Efficiency of dietary vegetable oils in preserving the quality of shell eggs under ambient tropical conditions. *Journal Science Food Agriculture*; 35(13), 11-7.
 - Pascual, A. M. R. y Calderón, P. V. (2000). Microbiología alimentaria: metodología analítica para alimentos y bebidas. 2ª ed. Díaz de Santos. España.
 - Pérez, G. C. K. (2007). Efecto de la aplicación de un recubrimiento comestible a base de gelatina en la calidad de fresa (*Fragaria vesca*. L.) almacenada en refrigeración. Tesis de Licenciatura en Ingeniero en Alimentos. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo uno.



-
- Plank, R. (1984). Empleo del Frio en la Industria de Alimentos. 1ª ed. Reverte. España.
 - Primo, Y. E. (1998). Química de los alimentos. 1ª ed. Síntesis. España.
 - Quintana, J. A. (1988). Avitecnia: manejo de las aves domésticas más comunes. 1ª ed. Trillas. México.
 - Raigón, M. D., García, M. M. y Esteve, P. (2001). Valoración de la calidad del huevo de granja ecológica e intensiva. Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Agrícola. Universidad Politécnica de Valencia.
 - Ravi, K. M. N.V. (2000). A Review of chitin and chitosan applications. Reactive and Functional Polymers; 46, 1-27.
 - Roblejo, P. L. A. (2009). Evaluación de la aplicación de coberturas de quitosana en la conservación tomates. Tesis de Licenciatura en Ciencias Alimentarias. Universidad de la Habana, Cuba.
 - Rodríguez, M. S., Albertengo, L. A., Vitale, I., Agulló, E. (2003). Relationship between astringency chitosan-saliva solutions turbidity at different pH. Journal of Food Science; 68(2), 665-667.
 - Sagarpa, 2010 “<http://www.siap.gob.mx>”
 - Santos, M. (1995). Química y Bioquímica de los alimentos. 1ª ed. Dirección general de difusión cultural departamento de publicaciones. México.
 - Sauver, B. (1993). El huevo por consumo. Mundiprensa. España.
 - Sinha, V. R., Singla, A. K. Wadhawan, S., Kaushik, R., Kumria, K., Bansal, K. y Dhawan, S. (2004). Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. International Journal of Pharmaceutics; 274, 1-33.
 - Stadelman, W.J. y Cotterill, O. J. (1977). Egg Science and Technology. 2ª ed. Avi. Estados Unidos.
 - Suppakul, P., Miltz, J., Sonneveld, K. y Bigger, S. W. (2003). Active packaging technologies with emphasis on antimicrobial packaging and its applications. Journal of Food Science; 68, 408-420.
 - Tokura, S. y Uragami, T. (2006). Material Science of chitin and chitosan. Kodansha. Japón.



-
- Trang, S. T., Wah, W. T. H., Nguyen, T. Q., Chuen-How, N. y Willem, F. S. (2006). Functional characteristics of shrimp chitosan and its membranes as affected by the degree of desacetylation. *Bioresource Technology*; 97, 659-663.
 - Unión Nacional de Avicultores, 2009 ” <http://www.una.org.mx>”
 - Villada, S. H., Acosta, A. H. y Velasco, J. R. (2007). Biopolímeros naturales usados en empaques biodegradables. *Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad del Cauca*; 12(2), 5-13.
 - Villanúa, L. (1990). *Alimentos Congelados Procesado y Distribución*. Acribia, S. A. España.
 - Weber, C. J. (2000). *Biobased packaging materials for the food industry. Status and Perspectives*. Frederiksberg: KVL; 45-84.
 - Zamora, H. S. (2008). Efecto sinérgico y antagónico de quitosán y extracto de caléndula *officinalis* en bacteria comúnmente asociadas a infecciones de heridas de humanos. Tesis de Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, campo uno.

ANEXOS

ANÁLISIS ESTADÍSTICO (ANOVA)

Tabla 1. Valores de diferencia significativa de cada uno de los tratamientos comparados con el grupo control correspondientes a la prueba de Pérdida de peso.

Tratamiento	Fcalculada	Ftabulada	Diferencia significativa
(C1) Quitosán, pH 3.3, 1 capa	3123373.5	12.22	Si
(C2) Quitosán, pH 3.3, 2 capas	6334537.5	12.22	Si
(C3) Quitosán-glicerol, pH 3, 1 capa	2550624	12.22	Si
(C4) Quitosán-glicerol, pH 3, 2 capas	7017853.5	12.22	Si
(C5) Quitosán, pH 5, 1 capa	4995937.5	12.22	Si
(C6) Quitosán, pH 5, 2 capas	5161537.5	12.22	Si
(C7) Quitosán-glicerol, pH 5, 1 capa	4173336	12.22	Si
(C8) Quitosán-glicerol, pH 5, 2 capas	5645400	12.22	Si

Si $F_{cal} > F_{tab}$ hay diferencia significativa ($p < 0.05$).

Tabla 2. Valores de diferencia significativa de cada uno de los tratamientos comparados con el grupo control correspondientes a la prueba de Cámara de aire.

Tratamiento	Fcalculada	Ftabulada	Diferencia significativa
(C1) Quitosán, pH 3.3, 1 capa	41288.3465	12.22	Si
(C2) Quitosán, pH 3.3, 2 capas	1944	12.22	Si
(C3) Quitosán-glicerol, pH 3, 1 capa	766837.5	12.22	Si
(C4) Quitosán-glicerol, pH 3, 2 capas	3145056	12.22	Si
(C5) Quitosán, pH 5, 1 capa	929053.5	12.22	Si
(C6) Quitosán, pH 5, 2 capas	44864.5842	12.22	Si
(C7) Quitosán-glicerol, pH 5, 1 capa	3706776	12.22	Si
(C8) Quitosán-glicerol, pH 5, 2 capas	37192.901	12.22	Si

Si $F_{cal} > F_{tab}$ hay diferencia significativa ($p < 0.05$).

Tabla 3. Valores de diferencia significativa de cada uno de los tratamientos comparados con el grupo control correspondientes a la prueba de Altura de la clara.

Tratamiento	Fcalculada	Ftabulada	Diferencia significativa
(C1) Quitosán, pH 3.3, 1 capa	5768281.5	12.22	Si
(C2) Quitosán, pH 3.3, 2 capas	96773.0198	12.22	Si
(C3) Quitosán-glicerol, pH 3, 1 capa	23061361.5	12.22	Si
(C4) Quitosán-glicerol, pH 3, 2 capas	33758304	12.22	Si
(C5) Quitosán, pH 5, 1 capa	5477881.5	12.22	Si
(C6) Quitosán, pH 5, 2 capas	23617536	12.22	Si
(C7) Quitosán-glicerol, pH 5, 1 capa	6309901.5	12.22	Si
(C8) Quitosán-glicerol, pH 5, 2 capas	54740521.5	12.22	Si

Si $F_{cal} > F_{tab}$ hay diferencia significativa ($p < 0.05$).

Tabla 4. Valores de diferencia significativa de cada uno de los tratamientos comparados con el grupo control correspondientes a la prueba de Índice de yema.

Tratamiento	Fcalculada	Ftabulada	Diferencia significativa
(C1) Quitosán, pH 3.3, 1 capa	6	12.22	No
(C2) Quitosán, pH 3.3, 2 capas	420.25	12.22	Si
(C3) Quitosán-glicerol, pH 3, 1 capa	181.5	12.22	Si
(C4) Quitosán-glicerol, pH 3, 2 capas	433.5	12.22	Si
(C5) Quitosán, pH 5, 1 capa	13.5	12.22	Si
(C6) Quitosán, pH 5, 2 capas	337.5	12.22	Si
(C7) Quitosán-glicerol, pH 5, 1 capa	6	12.22	No
(C8) Quitosán-glicerol, pH 5, 2 capas	541.5	12.22	Si

Si $F_{cal} > F_{tab}$ hay diferencia significativa ($p > 0.05$).

Tabla 5. Valores de diferencia significativa de cada uno de los tratamientos comparados con el grupo control correspondientes a la prueba de pH.

Tratamiento	Fcalculada	Ftabulada	Diferencia significativa
(C1) Quitosán, pH 3.3, 1 capa	294	12.22	Si
(C2) Quitosán, pH 3.3, 2 capas	8893.5	12.22	Si
(C3) Quitosán-glicerol, pH 3, 1 capa	2053.5	12.22	Si
(C4) Quitosán-glicerol, pH 3, 2 capas	3901.5	12.22	Si
(C5) Quitosán, pH 5, 1 capa	253.5	12.22	Si
(C6) Quitosán, pH 5, 2 capas	7993.5	12.22	Si
(C7) Quitosán-glicerol, pH 5, 1 capa	793.5	12.22	Si
(C8) Quitosán-glicerol, pH 5, 2 capas	24576	12.22	Si

Si $F_{cal} > F_{tab}$ hay diferencia significativa ($p > 0.05$).

Tabla 6. Valores de diferencia significativa de cada uno de los tratamientos comparados con el grupo control correspondientes a la prueba de Mesófilos aerobios.

Tratamientos	P	Diferencia significativa
(C1) Quitosán, pH 3.3, 1 capa	0.044	Si
(C2) Quitosán, pH 3.3, 2 capas	0.985	No
(C3) Quitosán-glicerol, pH 3, 1 capa	0.942	No
(C4) Quitosán-glicerol, pH 3, 2 capas	0.407	No
(C5) Quitosán, pH 5, 1 capa	0.329	No
(C6) Quitosán, pH 5, 2 capas	0.497	No
(C7) Quitosán-glicerol, pH 5, 1 capa	0.336	No
(C8) Quitosán-glicerol, pH 5, 2 capas	0.008	Si

Si hay diferencia significativa ($p > 0.05$).

Tabla 7. Valores de diferencia significativa de cada uno de los tratamientos comparados con el grupo control correspondientes a la prueba de Coliformes totales.

Tratamientos	p	Diferencia significativa
(C1) Quitosán, pH 3.3, 1 capa	0.008	Si
(C2) Quitosán, pH 3.3, 2 capas	0.008	Si
(C3) Quitosán-glicerol, pH 3, 1 capa	0.026	Si
(C4) Quitosán-glicerol, pH 3, 2 capas	0.008	Si
(C5) Quitosán, pH 5, 1 capa	0.008	Si
(C6) Quitosán, pH 5, 2 capas	0.026	Si
(C7) Quitosán-glicerol, pH 5, 1 capa	0.026	Si
(C8) Quitosán-glicerol, pH 5, 2 capas	0.008	Si

Si hay diferencia significativa ($p > 0.05$).

Tabla 8. Valores de diferencia significativa de cada uno de los tratamientos comparados con el grupo control correspondientes a la prueba de *Staphylococcus aureus*.

Tratamientos	p	Diferencia significativa
(C1) Quitosán, pH 3.3, 1 capa	0.731	No
(C2) Quitosán, pH 3.3, 2 capas	0.144	No
(C3) Quitosán-glicerol, pH 3, 1 capa	0.066	No
(C4) Quitosán-glicerol, pH 3, 2 capas	0.062	No
(C5) Quitosán, pH 5, 1 capa	0.582	No
(C6) Quitosán, pH 5, 2 capas	0.476	No
(C7) Quitosán-glicerol, pH 5, 1 capa	0.408	No
(C8) Quitosán-glicerol, pH 5, 2 capas	0.050	Si

Si hay diferencia significativa ($p > 0.05$).