



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN**

**ELABORACIÓN DE UNA MAYONESA TIPO BAJA EN
COLESTEROL A TRAVÉS DE LA SUSTITUCIÓN DE YEMA
DE HUEVO POR QUITOSÁN**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERÍA EN ALIMENTOS
P R E S E N T A
SELENE SARAÍ MARTÍNEZ GASCA**

**ASESORA: DRA. SUSANA PATRICIA MIRANDA
CASTRO**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



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

U.N.A.M.
ASUNTO: **VOTO APROBATORIO**
SUPERIORES CUAUTITLÁN

**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**



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

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **TESIS**

Elaboración de una mayonesa tipo baja en colesterol a través de la sustitución de yema de huevo por quitosán

Que presenta la pasante: **Selene Sarai Martínez Gasca**

Con número de cuenta: **40802500-7** para obtener el Título de: **Ingeniera en Alimentos**

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

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 21 de septiembre de 2012.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Susana Patricia Miranda Castro	
VOCAL	Dra. Carolina Moreno Ramos	
SECRETARIO	IA. Patricia Muñoz Aguilar	
1er SUPLENTE	IA. Sandra Margarita Rueda Enríquez	
2do SUPLENTE	IA. Miriam Álvarez Velasco	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).
HHA/pm

*“Hay dos maneras de hacer las cosas:
una bien y otra nada más para salir del paso.
Lo que se hace bien, se hace para siempre”*

DEDICATORIA

Al Verbo Eterno, principio de todo, fuente del verdadero conocimiento que alumbra a todo hombre.

A mis hermanas Estefanía y Priscila, compañeras de la infancia, amigas de vida, como prueba del esfuerzo y perseverancia.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por abrirme sus puertas y darme la oportunidad de formarme como una mujer profesional. Faltan las palabras para expresar el orgullo por pertenecer para siempre a ella.

A mi asesora de tesis, Dra. Susana Patricia Miranda Castro, por todo el apoyo y confianza que depositó en mí, por sus consejos, por hacer que mi estancia de trabajo en el laboratorio fuera agradable y provechosa y por la amabilidad y consideración que tuvo siempre conmigo.

A las profesoras que integran el jurado, Dra. Carolina Moreno Ramos, Patricia Muñoz Aguilar, Sandra Margarita Rueda Enríquez y Miriam Álvarez Velasco, por el tiempo dedicado para revisar el documento y por las observaciones y recomendaciones que me brindaron.

A los profesores que fueron parte de toda mi trayectoria de estudiante, y principalmente, a los catedráticos de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, por las clases impartidas, por formar parte en la realización de este logro y por todo lo que aprendí de ustedes, espero sus enseñanzas se reflejen en este trabajo y en mi desempeño profesional.

A la Dirección General de Cooperación e Internacionalización (DGEI), por contribuir con mi formación académica y cultural al concederme la beca para perfeccionar el inglés con el curso de inmersión en UNAM Canadá.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología, por la beca proporcionada, que sirvió de sustento para llevar a cabo el proceso de mi titulación.

A mis hermanitas, Fany, Pris y Miros por formar parte de mi vida, las amo mucho. Gracias por estar conmigo.

A mis padres, por haberme incitado desde pequeña a estudiar y por haberme ofrecido los medios para llevarlo a cabo. Porque siempre estuvieron para mí cuando los necesite y me apoyaron en todo. Les comparto esto, que también es suyo.

A mi padre Enrique, por el apoyo, consideración, consejos y por estar siempre al tanto de mis estudios.

A Víctor, desde que te conocí has sembrado en mí el deseo de aprender más de lo que me enseñaron en clase, de ser una mejor alumna, persona, y ahora, profesionalista. Gracias por todo el apoyo real: moral, académico, personal y emocional que me has dado en esta etapa universitaria y en toda mi vida. Gracias por tus recomendaciones en el desarrollo de este trabajo. Con tus consejos, motivación e interés entendí el significado e importancia de la Universidad y comprendí que soy capaz de hacer todo por mí misma. Tú me inspiras, lo demás ya lo sabes.

A mis compañeros de clase y amigos, por su amistad y por compartir conmigo su estadía en la universidad. Gracias por su apoyo.

Este trabajo no hubiese existido sin el apoyo de todos los profesores de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, que sin reserva y con gusto me proporcionaron su ayuda, ¡muchas gracias!

A Saturnino Maya Ramírez por darme la oportunidad de realizar las determinaciones químicas, por su gentileza y por su amistad.

A la Sección de Analítica, en particular al maestro Pablo Hernández Matamoros, por el valioso y desinteresado apoyo que me brindó en la determinación cromatográfica de colesterol, nos resultó complicada, pero gracias a la paciencia y tiempo que me dedicó, lo conseguimos.

A la Dra. Guadalupe Pérez Caballero, por estar al tanto de la cromatografía de gases, por la ayuda brindada, por compartirme sus conocimientos y darme clase e información del tema.

Al Dr. Tonatiuh Alejandro Cruz Sánchez por su ayuda y préstamo de equipo para las determinaciones microscópicas.

A Julieta González Sánchez por auxiliarme en la determinación de grasa, también gracias por su cordialidad.

Al Dr. Enrique Ángeles Anguiano, por el préstamo del evaporador rotatorio y por su amabilidad.

Con sinceridad, Selene Sarai

“El fracaso es la regla, el éxito la excepción que la confirma”

Es importante hacer un agradecimiento especial al proyecto PE203211 PAPIME por el apoyo financiero, el cual sirvió para la realización de este trabajo.

ÍNDICE

	Página
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO	
1.1 Mayonesa	3
1.1.1 Definición	3
1.1.2 Origen	3
1.1.3 La mayonesa en México	4
1.1.4 Normatividad	6
1.2 Emulsión	6
1.2.1 Definición	6
1.2.2 Tipos	6
1.2.3 Formación	7
1.2.4 Estabilidad	7
1.2.4.1 Emulsificante	8
1.2.5 Fenómenos de inestabilidad	9
1.2.5.1 Cremado	9
1.2.5.2 Floculación	10
1.2.5.3 Degradación	10
1.2.5.4 Coalescencia	11
1.2.5.5 Maduración de Ostwald	11
1.2.6 Emulsiones alimentarias	12
1.3 Colesterol	13
1.4 Quitina	14
1.5 Quitosán	15
1.5.1 Definición	15
1.5.2 Propiedades	15
1.5.2.1 Propiedades como agente emulsificante	16
1.5.3 Obtención	18
1.5.4 Aplicaciones en alimentos	18

1.5.5 Otras aplicaciones	19
1.5.6 Ventajas de uso	21
1.5.7 Desventajas de uso	21
CAPÍTULO II. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	
2.1 Definición de objetivos	22
2.2 Cuadro metodológico	23
2.3 Actividades preliminares	24
2.4 Materiales y métodos	39
2.4.1 Objetivo Particular 1	39
2.4.1.1 Tamaño de partícula	39
2.4.1.2 Cremado	41
2.4.1.3 Separación de fases	41
2.4.2 Objetivo Particular 2	41
2.4.2.1 Grasa	41
2.4.2.2 Humedad	44
2.4.2.3 Proteína	44
2.4.2.4 Índice de peróxidos	46
2.4.2.5 Actividad de agua (aw)	49
2.4.2.6 pH	49
2.4.2.7 Acidez total	49
2.4.2.8 Viscosidad aparente	50
2.4.3 Objetivo particular 3	51
2.4.3.1 Mohos y levaduras	54
2.4.3.2 Mesófilos aerobios	55
2.4.3.3 Coliformes totales	56
2.4.3.4 <i>E. coli</i>	57
2.4.2 Objetivo particular 4	58
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
3.1 Actividades preliminares	61
3.2 Objetivo particular 1	68
3.2.1 Tamaño de partícula	68

3.2.2 Cremado	73
3.2.3 Separación de fases	75
3.3 Objetivo particular 2	76
3.3.1 Grasa	76
3.3.2 Humedad	76
3.3.3 Proteína	77
3.3.4 Índice de peróxidos	78
3.3.5 Actividad de agua (aw)	79
3.3.6 pH	80
3.3.7 Acidez total	80
3.3.8 Viscosidad aparente	81
3.4 Objetivo particular 3	82
3.4.1 Mohos y levaduras	82
3.4.2 Mesófilos aerobios	83
3.4.3 Coliformes totales	84
3.4.4 <i>E. coli</i>	85
3.5 Objetivo particular 4	86
CONCLUSIONES	88
RECOMENDACIONES	90
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
ANEXO 1	98
APÉNDICE 1	99

ÍNDICE DE TABLAS

Número	Título	Página
1	Aplicaciones alimenticias del quitosán	19
2	Aplicaciones de la quitina y el quitosán en diferentes áreas	20
3	Formulación de la mayonesa tradicional	24
4	Viscosidad relativa, específica y reducida de las soluciones de quitosán y buffer	62
5	Características de mayonesas control y con sustituciones de concentración quitosán/vinagre	64
6	Características de mayonesa control y mayonesas con diferentes sustituciones de yema de huevo.	66
7	Formulación de la mayonesa tipo baja en colesterol	67
8	Diámetro promedio de gota de las mayonesas control y tipo recién elaboradas y envejecidas	70
9	Resultados de cremado de mayonesa control y mayonesa tipo	75
10	Porcentaje de grasa de mayonesa control y mayonesa tipo	76
11	Porcentaje de humedad de mayonesa control y mayonesa tipo	77
12	Porcentaje de proteína de mayonesa control y mayonesa tipo	77
13	Índice de peróxidos de mayonesa control y mayonesa tipo	79
14	Actividad de agua de mayonesa control y mayonesa tipo	79
15	pH de mayonesa control y mayonesa tipo	80
16	Acidez total como ácido acético de mayonesa control y mayonesa tipo	81
17	Contenido de colesterol de mayonesa control y mayonesa tipo	87
A1	Datos obtenidos para la curva patrón de colesterol	98
A2	Datos obtenidos para el análisis cromatográfico de las mayonesas	99

ÍNDICE DE FIGURAS

Número	Leyenda	Página
1	Producción y ventas netas en México de mayonesa y aderezos durante el año 1998	4
2	Volumen de producción de mayonesa en México desde 2005 al 2010	5
3	Ventas netas de la mayonesa en México desde 2005 al 2010	5
4	Representación esquemática del cremado en emulsiones	10
5	Representación esquemática de floculación en emulsiones	10
6	Representación esquemática de coalescencia de gotas en emulsiones	11
7	Representación esquemática del proceso de maduración de Ostwald	12
8	Estructura química de la molécula del colesterol	14
9	a) Monómeros de la quitina, b) Monómeros de la celulosa	14
10	Estructura química de la molécula del quitosán	15
11	Representación esquemática de la red tridimensional formada por quitosán alrededor de gotas de aceite en una emulsión	17
12	Diagrama de proceso para la elaboración de mayonesa tradicional	25
13	Batidora Braun modelo MR 430 CA	26
14	Obtención de los caparazones del camarón	27
15	Estufa Quincy Lab Modelo 30-GC	28
16	Molino casero	28
17	Caparazones molidos contenidos en frascos de vidrio	28
18	Potenciómetro HORIZON ECOLOGY CO.	29
19	Equipo montado para determinación del peso molecular	31
20	Filtración de disoluciones de quitosán	32
21	Viscosímetro Ostwald y equipo para la determinación de peso molecular	32

22	Viscosímetro Ostwald	33
23	Centrífuga Clínica IEC	37
24	Incubadora bacteriológica Blue M	37
25	Ingreso de los tubos con muestra en la centrífuga	38
26	Equipo empleado para realizar la microscopía óptica de las mayonesas. a) Microscopio Axioskop 40, b) cámara Evolution VE cooled	40
27	Butirómetro de mantequilla para la determinación de grasa	42
28	Centrífuga para butirómetro	43
29	Tapones de butirómetro con muestras de mayonesa tipo	43
30	Termobalanza OHAUS modelo MB45 para la determinación de humedad	44
31	Tubos de vidrio con muestra de mayonesa dentro de la incubadora	48
32	Medidor de actividad de agua marca Testo modelo 650	49
33	Viscosímetro Brookfield modelo RVDV-II+PRO	51
34	Baño serológico Marca Quimis modelo Q304M1105	51
35	Placa Petrifilm ^{MR} marca 3M	52
36	Autoclave ALLAMERICAN mod 25X-1	52
37	Inoculación de la muestra	53
38	Ejemplo de placa para conteo de mohos y levaduras	55
39	Ejemplo de placa para conteo de mesófilos aerobios	56
40	Ejemplo de placa para conteo de coliformes totales	57
41	Ejemplo de placa para conteo de <i>E. coli</i>	58
42	Cromatógrafo de gases Buck Scientific Inc. modelo 910	59
43	Concentración de colesterol en función del área de pico	59
44	Curva de valoración del quitosán	62
45	Viscosidad reducida de las concentraciones de quitosán en función de la concentración	63
46	Microscopía óptica de mayonesa control recién elaborada (magnificación de 40x)	68

47	Microscopía óptica de mayonesa control envejecida (magnificación de 40x)	69
48	Microscopía óptica de mayonesa tipo recién elaborada (magnificación de 40x)	69
49	Microscopía óptica de mayonesa tipo envejecida (magnificación a 40x)	70
50	Tubos cónicos de vidrio con muestra después de la centrifugación. a) Mayonesa control, b) Mayonesa tipo	73
51	Prueba de separación de fases después de 30 días. a) Mayonesa control, b) Mayonesa tipo	75
52	Gráfico de viscosidad aparente con respecto al tiempo a 1 rpm de mayonesa control y mayonesa tipo	82
53	Placas para el conteo de Mohos y Levaduras de mayonesa control (3 repeticiones)	83
54	Placas para el conteo de Mohos y Levaduras de mayonesa tipo (3 repeticiones)	83
55	Placas para conteo de mesófilos aerobios de la Mayonesa Control (3 repeticiones)	84
56	Placas para conteo de mesófilos aerobios de la Mayonesa Tipo (3 repeticiones)	84
57	Placas para el conteo de coliformes totales de mayonesa patrón (3 repeticiones)	85
58	Placas para el conteo de coliformes totales de mayonesa tipo (3 repeticiones)	85
59	Placas para el conteo de <i>E coli</i> de la mayonesa control (3 repeticiones)	86
60	Placas para el conteo de <i>E. coli</i> de la mayonesa tipo (3 repeticiones)	86
A1	Curva de calibración del colesterol	99

INTRODUCCIÓN

Existe un gran número de productos emulsionados en la industria de los alimentos, entre los cuales se pueden mencionar la mantequilla, margarina, aderezos, leche, helados, emulsiones cárnicas y mayonesa. Debido a la importancia de estos productos, las emulsiones alimentarias representan un área de gran relevancia dentro de la industria alimentaria (Pons et al., 1994). En México la mayonesa es considerada como un producto imprescindible para todos los estratos sociales y ciudades del país, junto con el pan, la tortilla, embutidos, bebidas embotelladas, galletas, arroz, leche fresca, verduras, azúcar, huevo, frutas y carne de res (Torres, 2000).

La mayonesa es una de las salsas más populares en el mundo. Se trata de una emulsión aceite en agua, que contiene como ingredientes básicos aceite vegetal (contiene del 70 al 80%), yema de huevo, vinagre y jugo de limón, y aditivos como clara de huevo, sal, especias, estabilizantes, espesantes, etc. Es típicamente producido a través de la mezcla de una fase de agua con una fase de aceite usando yema de huevo, que es el emulsionante más común (Depree y Savage, 2001 y Kerkhofs et al., 2011). Sin embargo, un importante problema con la yema de huevo, es su alto contenido en colesterol. En México, desde comienzos de la década de los 80's, las enfermedades cardiovasculares pasaron a ser la primera causa de muerte junto con la diabetes, la cirrosis del hígado y ciertos cánceres que se saben ligados con la alimentación y hábitos de vida. En el 2002 hubo un total de 24 325 defunciones debido a las enfermedades cardiovasculares. Según estudios recientes se ha relacionado al colesterol elevado como uno de los principales responsables de las muertes por estas enfermedades (Cruz, 2004 e INEGI, 2003). Aproximadamente en nuestro país el 30% de los hombres y 25% de las mujeres tienen el colesterol elevado en más de 200 mg/dl. Y aún más alarmante es el hecho de que el 8,1% de los hombres y 6.2% de las mujeres tienen colesterol mayor a 240 mg/dl. Es por esta razón que los consumidores muestran interés por alimentos bajos o sin contenido en colesterol (Rodríguez, 2006) y el uso de otro emulsificante en mayonesas, diferente a

la yema de huevo, tiene la ventaja de disminuir el contenido de colesterol. Una alternativa al uso del huevo como agente emulsionante podría ser el uso de quitosán, que según estudios anteriores ha presentado buenas propiedades como emulsionante, ya que su incorporación, en emulsiones del tipo aceite en agua, proporcionó una alta viscosidad, mayor estabilidad al cremado y un tamaño promedio de gota menor (Jumaa y Muller, 1999, Speiciene et al., 2007; y Laplante et al., 2005).

El quitosán es un derivado de la desacetilación de la quitina, que es un polisacárido natural y además es el segundo polímero más abundante después de la celulosa. La quitina es el mayor componente del caparazón de los crustáceos como camarón y cangrejo (No y Meyers, 1995), es por esta razón que los caparazones de crustáceos, que son productos de desperdicio de la industria alimentaria, son comercialmente empleados para la producción de quitosán con diferentes grados de desacetilación y peso molecular (No y Meyers, 1995).

Considerando todo esto, el desarrollo de una mayonesa baja en colesterol, empleando quitosán como agente emulsificante, resulta ser una posible alternativa para el consumo. Es por ello que el objetivo de este trabajo fue eliminar un 30% de yema de huevo en la formulación de una mayonesa tradicional, sustituyéndolo por quitosán, para determinar si es viable la obtención de una mayonesa baja en colesterol, esto a través de la evaluación y comparación de las propiedades físicas, químicas, microbiológicas y de estabilidad tanto de la mayonesa con sustitución de quitosán como de la mayonesa tradicional, que sirve como control.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Mayonesa

1.1.1 Definición

La mayonesa es una emulsión de aceite en agua que contiene como ingredientes básicos aceite vegetal (contiene del 70 al 80%), yema de huevo, vinagre y jugo de limón, y aditivos como clara de huevo, sal, especias, estabilizantes, espesantes, etc. La mayonesa se prepara mezclando primero los huevos, vinagre y aditivos y luego añadiendo lentamente el aceite resultando en una consistente emulsión (Depree y Savage, 2001 y Kerkhofs et al., 2011).

1.1.2 Origen

La mayonesa es un producto culinario que ha existido por siglos, admitiéndose como denominación Mayonesa y Bayonesa. Su exacto origen es materia de disputa, existiendo dos versiones; la primera versión, es que fue creada en la ciudad balear de Mahón, en España, y cuando esta ciudad fue tomada por los franceses el 28 de Junio de 1756, al Duque de Richelieu le dieron a probar una salsa denominada “mahonesa”, y le complació tanto, que se la llevó a Francia donde le cambió de nombre y se hizo famosa. El escritor ampurdanés Josep Pla, entre otros autores, da una versión ligeramente diferente, según la cual al Duque de Richelieu, que quiso degustar la comida menorquina, le ofrecieron un alioli, hecho con aceite de oliva,

muy cargado de ajo, el cual no le agradó, por lo que se eliminó el ajo y se dio origen a la mayonesa.

A finales del siglo XVIII la mayonesa ya había sido absorbida por las cocinas del Mediterráneo y en la actualidad es una de las salsas o condimentos más ampliamente usados (Berasategui, 2005 y Ross, 2001).

1.1.3 La mayonesa en México

La mayonesa es un producto que se encuentra dentro de la canasta básica mexicana, clasificada como alimento de consumo tradicional y de alta intensidad junto con arroz, azúcar morena, bebidas de cola, café soluble, carne de res, huevo entero fresco, leche fresca, pan blanco, pastas para sopa, pollo, tortilla de maíz y jitomate (Martínez, 2001). En la Figura 1 se presenta la producción y ventas netas que presentó la mayonesa con jugo de limón durante el año de 1998 en México. Se puede observar que su producción fue mayor que en la mayonesa baja en calorías y otros aderezos, en un 84% y 87% respectivamente, y en cuanto a ventas netas, se obtuvo una tendencia similar, presentando un valor 84% mayor en comparación con la mayonesa baja en calorías y 89% mayor con respecto a otros aderezos.

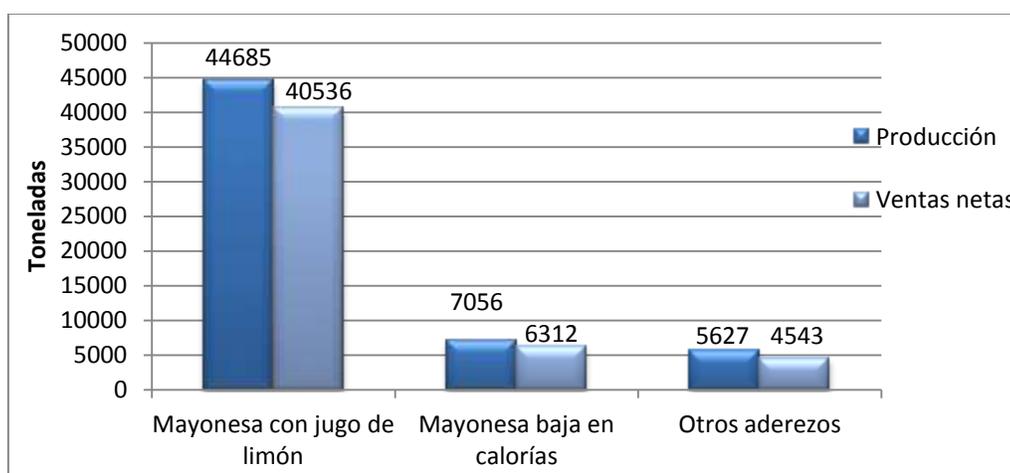


Figura 1. Producción y ventas netas en México de mayonesa y aderezos durante el año 1998 (INEGI, 1999)

De acuerdo a los datos reportados por el INEGI (ver Figuras 2 y 3), se ha presentado un incremento anual en producción y ventas netas de la mayonesa en nuestro país, lo cual refleja la importancia de consumo de este producto a nivel nacional.

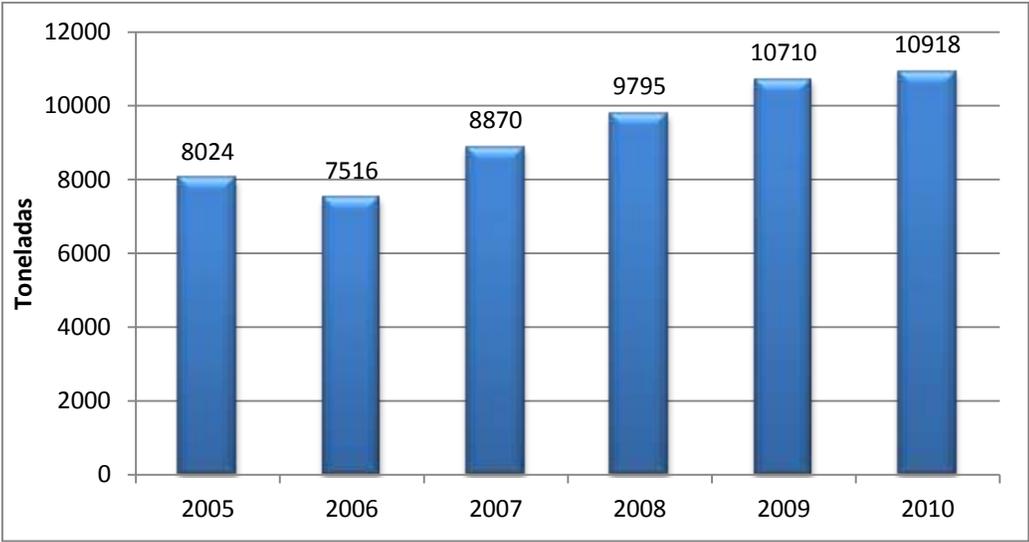


Figura 2. Volumen de producción de mayonesa en México desde 2005 al 2010 (INEGI, 2011)

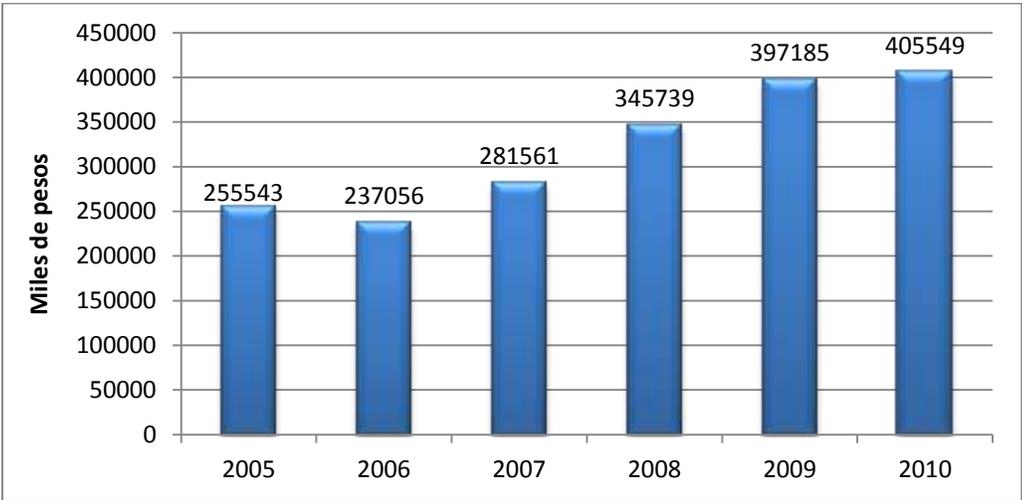


Figura 3. Ventas netas de la mayonesa en México desde 2005 al 2010 (INEGI, 2011)

1.1.4 Normatividad

En México las especificaciones que debe cumplir el producto denominado mayonesa están regidas por la norma mexicana NMX-F-021-S-1979. En esta norma se define a la mayonesa como el producto alimenticio obtenido por la emulsión cremosa que se obtiene con aceites vegetales comestibles, yema de huevo líquido o su equivalente en cualquiera de sus formas, vinagre, adicionado o no de jugo de limón, sal, edulcorantes nutritivos, acidulantes permitidos, mostaza, paprika u otras especias o extractos y aceites esenciales de las mismas, con excepción de azafrán y cúrcuma. Además especifica que, el contenido de aceite vegetal comestible, no será menor de 65% en peso y de yema de huevo líquida de 6%, o su equivalente en yema de huevo deshidratada, o su equivalente de huevo entero líquido o deshidratado.

1.2 Emulsión

1.2.1 Definición

Una emulsión es un sistema coloide que consiste en gotas de un líquido dispersado en un segundo líquido, que es llamado fase continua, los dos líquidos son inmiscibles. Por lo general la fase dispersa es menos densa que la fase continua. En la interface se presenta, invariablemente, una sustancia modificadora de superficie (una pequeña molécula de surfactante o un polímero como una proteína) entre cada gota y la fase continua, y las propiedades del sistema dependerán de esta sustancia que es llamada emulsificante (Robins et al., 2002 y Vaclavic y Christian, 2008). Las propiedades de una emulsión dependen de las propiedades de la fase continua y su proporción sobre la fase dispersa (Lissant, 1974).

1.2.2 Tipos

Existen dos tipos de emulsiones de acuerdo al líquido dispersado y fase continua:

- Emulsiones agua en aceite (W/O): Formadas por una fase dispersa de agua, o líquidos miscibles en ella, y una fase continua grasa (ejemplos: mantequilla, margarina, algunas mayonesas industriales, etc.)
- Emulsiones aceite en agua (O/W): Formadas por una fase dispersa grasa y una fase continua acuosa (ejemplos: leche, nata líquida, mayonesa casera, etc.) (Cubero et al., 2002).

1.2.3 Formación

Una emulsión se forma cuando el aceite, el agua y un emulsificante se mezclan juntos. Para formar una emulsión se debe aportar energía al sistema, de manera que se aumente la superficie de contacto entre las dos fases y se pueda formar la zona de interface donde se sitúa el emulsionante. La energía a aportar al sistema depende de muchos factores, entre ellos se encuentran: la tensión superficial entre las dos fases, diferencia de densidad entre las fases, tipo de agitador, viscosidad de la fase continua, entre otros.

El método más común para producir emulsiones consiste en adicionar el material que será dispersado sobre la fase continua, que contiene el emulsificante, mientras se somete el sistema a alta cizalla. La cizalla puede ser generada por impulsores, bombas, agitación rápida, forzando a la mezcla a través de orificios, equipos ultrasónicos, el uso de equipos como molinos coloidales, etc. (Lissant, 1974).

Con el tiempo, el sistema tenderá a volver a su forma estable. Por eso el problema no solo está en crear la emulsión, sino en mantenerla a lo largo del tiempo (Cubero et al., 2002 y Vaclavic y Christian, 2008).

1.2.4 Estabilidad

Las emulsiones son termodinámicamente inestables debido al carácter no miscible de las dos fases que forman el sistema (Cubero et al., 2002). Para evitar

que en las emulsiones alimentarias se separen el aceite y el agua, usualmente se adiciona un emulsificante adecuado y en algunos casos se requiere de un agente estabilizante (Vaclavic y Christian, 2008).

Factores como pH, temperatura y condiciones del proceso, durante la preparación de la emulsión, son muy relevantes para la estabilidad (Huck et al., 2011). Además la estabilidad de una emulsión se demuestra por la retención de la apariencia original, viscosidad y olor, bajo condiciones de transporte y almacenamiento (Lissant, 1974).

1.2.4.1 Emulsificante

Un emulsificante es un ingrediente activador de superficie que fácilmente se adsorbe en la interface y facilita la formación de emulsiones, disminuyendo la tensión superficial (fuerza que se debe vencer sobre la superficie de un líquido para adentrarse a él) en la zona interfacial de los dos líquidos inmiscibles. Un emulsificante tiene un carácter bipolar o anfílico que le permite orientarse en la interface, de manera que favorece un estado de equilibrio entre las dos fases. Los emulsificantes, varían considerablemente, en su habilidad para formar y estabilizar emulsiones, en cuanto a su costo, facilidad de uso, compatibilidad con los ingredientes y sensibilidad ambiental (Mun et al., 2006 y Cubero et al., 2002).

Los emulsificantes son capaces de:

- Adsorberse en la interfase entre dos líquidos como el aceite y el agua.
- Reducir la tensión interfacial de cada líquido, favoreciendo que un líquido se disperse más fácilmente en el otro.
- Formar una película interfacial estable, coherente y viscoelástica. Esta película previene la coalescencia y por lo tanto la inestabilidad de la emulsión.
- Prevenir ó retrasar la coalescencia de las gotas de la emulsión.

Los emulsificantes se pueden dividir de acuerdo a su comportamiento iónico en: aniónicos, catiónicos, no iónicos y anfóteros. Un emulsificante iónico está compuesto

por un grupo orgánico lipofílico y un grupo hidrofílico, además este tipo de emulsificante se puede clasificar en aniónico ó catiónico, dependiendo de la naturaleza del grupo iónico activo. La porción lipofílica de la molécula es usualmente considerada la porción tensoactiva. Los emulsificantes no iónicos no muestran una tendencia a ionizar, por lo tanto se pueden combinar con emulsionantes no iónicos. Los emulsificantes anfóteros tienen la facultad de comportarse como aniónicos o catiónicos, dependiendo de la acidez del medio (Lissant, 1974).

1.2.5 Fenómenos de inestabilidad

Los mecanismos de inestabilidad de las emulsiones son: floculación, cremado, incremento de tamaño de gota debido a la difusión de aceite, agregación con o sin cremado, degradación y coalescencia de las gotas, los cuales originan la separación de la fase aceite y por lo tanto deben prevenirse (Capek, 2004). A continuación se define cada uno de los fenómenos de inestabilidad:

1.2.5.1 Cremado

El término cremado se refiere al proceso gravitacional en el que las partículas dispersas se hacen menos densas que el fluido suspendido, y por lo tanto, tienden a desplazarse hacia la parte superior de la muestra formando una región más concentrada que es llamada crema (Alben e Ilbanoglu, 2007), lo cual se representa en la Figura 4. La presencia de cremado depende del tamaño de gota y de la distribución del tamaño de gota (Capek, 2004). Un tamaño de gota menor, permite un mayor número de gotas, y entonces, la fase continua puede atrapar mayor cantidad de gotas, resultando en un cremado menos denso (Daimer y Kulozik, 2009).

La velocidad de cremado se puede medir por la cantidad separada de la emulsión de la fase acuosa por un periodo de tiempo (Capek, 2004) y depende de la viscosidad de la fase continua y la distribución del tamaño de gota en las emulsiones (Speiciene et al., 2007).

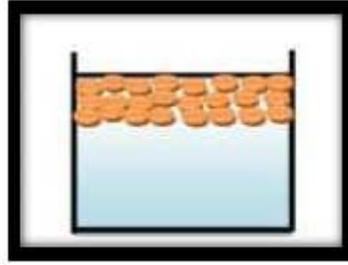


Figura 1. Representación esquemática del cremado en emulsiones

1.2.5.2 Floculación

La floculación es un término que se refiere a varios mecanismos de agregación o asociación de las gotas (ver Figura 5), mediante el cual la capa interfacial de las gotas permanece intacta (Lissant, 1974). Los fenómenos de floculación y cremado están muy relacionados debido a que, al formarse agregados de gotas que tienen un mayor radio efectivo, comparado con las gotas individuales, se incrementa la velocidad de desplazamiento de los flóculos hacia la parte superior del sistema, cremando rápidamente (Robins et al, 2002).

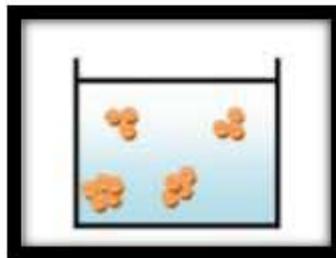


Figura 2. Representación esquemática de floculación en emulsiones

1.2.5.3 Degradación

La degradación física se debe a la tendencia espontánea de las emulsiones de presentar un área interfacial mínima entre la fase dispersada y el medio dispersante, esto se logra debido a la difusión de las gotas en el sistema a través de dos mecanismos principalmente: primero una coagulación de las gotas, seguida de coalescencia y segundo por medio de maduración de Ostwald (Capek, 2004). Dichos mecanismos son descritos más adelante.

1.2.5.4 Coalescencia

La coalescencia consiste en la ruptura de la capa delgada que se forma entre las gotas adyacentes, originando que las dos gotas se conviertan en una sola, entonces las gotas se combinan o fusionan para formar gotas más grandes (ver Figura 6), y consecuentemente se presenta una reducción en el número de gotas (Capek, 2004 y Lissant, 1974).

La coalescencia es el mecanismo más importante de desestabilización y puede prevenirse con una cuidadosa selección de estabilizantes (Capek, 2004). El cremado y la floculación no involucran un incremento en el tamaño de las gotas, pero son precursores de la coalescencia debido a que este proceso requiere que las gotas se encuentren muy próximas (Capek, 2004).

La velocidad de coalescencia se determina midiendo la cantidad de aceite separada de la emulsión como función del tiempo, y depende, del tipo y concentración del emulsionante, de la viscosidad de la emulsión, del tamaño de las gotas dispersas, de la carga de las partículas y de las condiciones de almacenado a la que esté sujeta la emulsión (Capek, 2004 y Lissant, 1974).

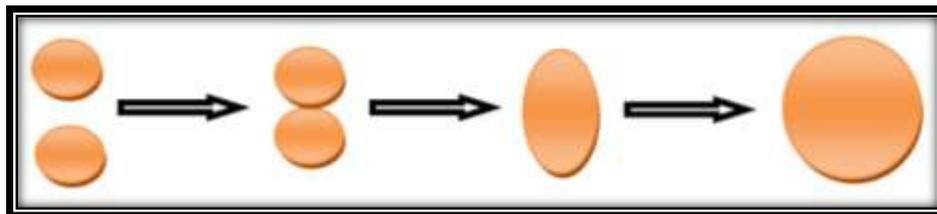


Figura 4. Representación esquemática de coalescencia de gotas en emulsiones

1.2.5.5 Maduración de Ostwald

La maduración de Ostwald involucra el movimiento de moléculas de aceite pequeñas para formar gotas más grandes (ver Figura 7). Es decir, es el proceso por el cual, las partículas grandes crecen a expensas de las más pequeñas, debido a la

alta solubilidad de las partículas pequeñas y su difusión molecular hacia la fase continua. La maduración de Ostwald no requiere que las gotas se encuentren cerca, puesto que este proceso ocurre debido al transporte de la materia disuelta a través del medio de dispersión (Capek, 2004).

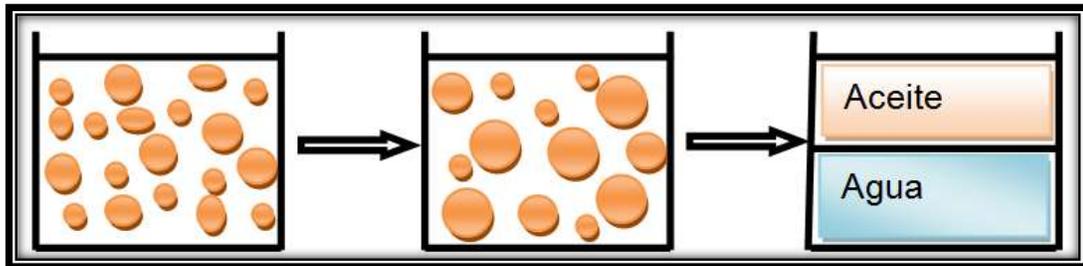


Figura 5. Representación esquemática del proceso de maduración de Ostwald

1.2.6 Emulsiones alimentarias

Las emulsiones alimentarias son sistemas multifase que contienen mezclas de proteínas y polisacáridos, es decir, contienen más de un biopolímero. Es de gran importancia estudiar su comportamiento con el fin de entender mejor sus propiedades (Cubero et al., 2002).

Muchos alimentos de conveniencia como postres congelados, productos cárnicos, mayonesa y margarina, y algunos alimentos naturales como leche y mantequilla son emulsiones (Vaclavic y Christian, 2008). En los alimentos el comportamiento de las emulsiones aceite en agua se define como un sistema de tres partes: la grasa o aceite en el interior de las gotas de la emulsión, la materia interfacial entre la materia lipídica y la fase acuosa. Los lípidos pueden ser parcialmente o completamente cristalinos, y pueden estar sujetos a un cambio químico como la lipólisis o la oxidación. El material interfacial puede estar compuesto por proteínas o de pequeñas moléculas de emulsionantes como monoglicéridos, ésteres o fosfolípidos, o mezclas de estos componentes. Finalmente, la fase acuosa, contiene iones que pueden desestabilizar a las emulsiones al unirse a moléculas cargadas, que actúan como estabilizantes (ejemplo: proteínas), disminuyendo su adsorción, o también puede

contener macromoléculas, como polisacáridos, que pueden ejercer efectos de estabilización, al atrapar las gotas de aceite y evitar su floculación o coalescencia, ó desestabilización, al adsorberse difícilmente en la superficie lipídica de las gotas por su falta de naturaleza hidrofóbica (Dalgleish, 2006).

1.3 Colesterol

El colesterol es el esteroide del tejido animal más abundante, su estructura química se puede observar en la Figura 8. El colesterol forma parte de las membranas celulares y es de vital importancia para el hombre en la síntesis de un gran número de hormonas, así como de la vitamina D y de las sales biliares. El organismo lo obtiene por medio de dos fuentes: endógena y exógena. La fuente endógena, procede de la síntesis que realiza principalmente el hígado, según la ruta de ácido mevalónico, y la fuente exógena, se obtiene a través de la ingesta de alimentos con alto contenido en grasas saturadas como los productos lácteos, yema de huevo, carnes rojas y mariscos. Aproximadamente el 35% proviene de la dieta (Badui, 1993 y López y Macaya, 2009).

Al ser poco soluble en agua, el colesterol no es transportado en forma libre en la sangre, si no que lo hace unido a proteínas formando lipoproteínas, principalmente lipoproteínas de alta densidad (HDL) y lipoproteínas de baja densidad (LDL). El colesterol transportado por las HDL se identifica como el colesterol bueno, pues elimina el exceso de colesterol del organismo. Las LDL transportan casi tres cuartas partes de colesterol en la sangre y este colesterol es identificado como el colesterol malo, debido a que las LDL se pueden acumular en las paredes de las arterias, donde pueden participar en el desarrollo de la placa aterosclerótica. El consumo excesivo de colesterol, así como de ácidos grasos saturados, incrementa el contenido del colesterol en la sangre, provocando la deposición de plaquetas lipídicas y el endurecimiento de las arterias (arterosclerosis) u ocasiona que no circule suficiente sangre, y en consecuencia, oxígeno al corazón (Badui, 1993 y López y Macaya, 2009).

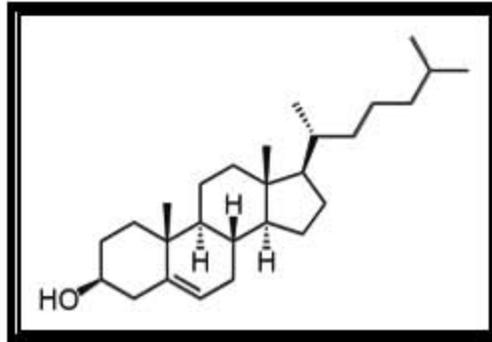


Figura 1. Estructura química de la molécula del colesterol (Méndez, 2010)

1.4 Quitina

La quitina es un biopolímero encontrado en crustáceos, insectos y en gran cantidad de microorganismos. Es el segundo biopolímero más abundante de la Tierra, seguido de la celulosa. La quitina es para los crustáceos lo que la celulosa para los árboles.

La quitina se diferencia de la celulosa, químicamente, en que el grupo funcional amida reemplaza al grupo hidroxilo en el segundo carbono de cada subunidad de azúcar, componiendo un polímero de monómeros de 2-acetamida-2-deoxy-β-D-glucopiranososa unidos con enlaces β (1→4), ver Figura 9. El grupo amida es bastante reactivo y permite que la quitina sea fácilmente derivatizada (Savage, 1998 y Shahidi et al., 1999).

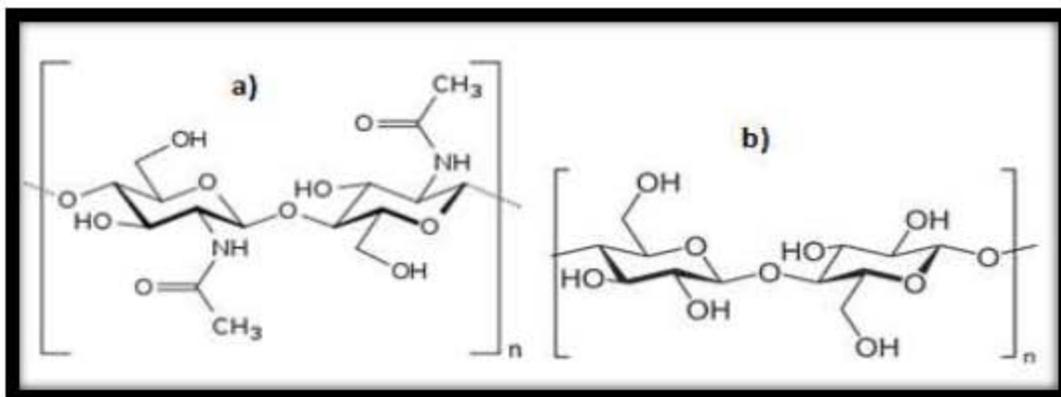


Figura 2. a) Monómeros de la quitina, b) Monómeros de la celulosa
(<http://es.wikipedia.org/wiki/Quitina>; <http://es.wikipedia.org/wiki/Celulosa>)

1.5 Quitosán

1.5.1 Definición

El quitosán es el principal derivado de la quitina, se obtiene removiendo el grupo acetilo de la amida, dejando un grupo amino primario, que se vuelve catiónico (cargado positivamente) en una solución ácida acuosa (Savage, 1998), su estructura química puede observarse en la Figura 10.

La quitina por sí misma posee un grado de desacetilación, pero se ha establecido que este material puede ser llamado quitosán después de que del 60 al 70% de los grupos acetilo fueron removidos (Savage, 1998). El parámetro más importante que determina la solubilidad del quitosán es el grado de desacetilación (DD). La conversión de quitina a quitosán incrementa el DD, y por lo tanto altera la distribución de carga de las moléculas de quitosán (Kima y Rajapakse, 2005). El grupo amino del quitosán también es reactivo, y por ello puede ser derivado en un gran número de formas (Savage, 1998).

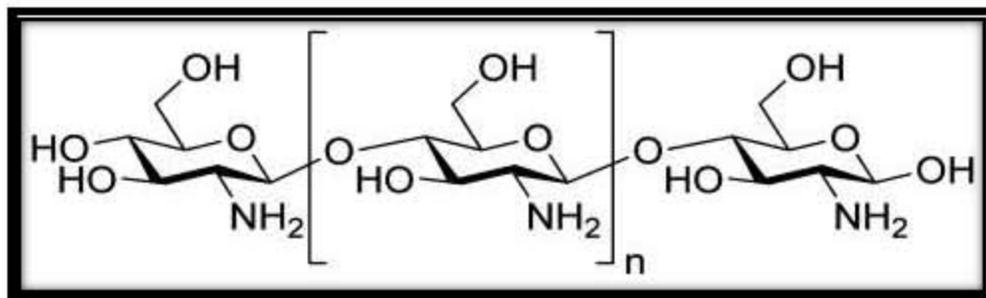


Figura 1. Estructura química de la molécula del quitosán
(<http://en.wikipedia.org/wiki/File:Chitosan2.jpg>)

1.5.2 Propiedades

El quitosán tiene excelentes propiedades como biocompatibilidad, biodegradabilidad, no es tóxico, propiedades de adsorción, entre otros. Además es soluble en soluciones diluidas de ácido acético y ácido fórmico (Kumar, 2000).

A diferencia de otros biopolímeros, el quitosán posee propiedades inusuales como antifúngico y antibacterial, y se biodegrada dentro del cuerpo humano con la acción de la enzima lisozima. Esta combinación de propiedades únicas, lo hace propicio para ser usado en muchas aplicaciones de textiles, pulpa y papel, cosméticos, químicos especiales y control de plagas. El quitosán puede ser usado en forma de películas, membranas, geles y fibras. También funciona como un buen floculante para el tratamiento en agua y procesos de clarificación (Savage, 1998).

Dentro de los abundantes polisacáridos naturales, que son neutros o ácidos, el quitosán se distingue por su naturaleza catiónica ($pK_a \sim 6.5$), debido a ello, se puede unir a aniones como los ácidos de la bilis o ácidos grasos libres a bajo pH por medio de uniones iónicas, resultado de su grupo amino. Dichos lípidos son entonces excretados en vez de ser absorbidos al flujo sanguíneo. Al unirse el quitosán a los ácidos de la bilis se incrementa la pérdida de LDL, entonces se mejora la relación de LDL y HDL en el flujo sanguíneo. Estas propiedades hacen que el quitosán sea anticolesterolémico, antiuricémico y actúe contra las úlceras cuando es administrado oralmente, y tiene un potencial conveniente en prevención de la enfermedad celíaca (Muzzarelli, 1996 y Hennen, 1996).

1.5.2.1 Propiedades como agente emulsificante

El quitosán tiene el potencial de ser utilizado como ingrediente funcional para crear una emulsión estructuralmente estable, debido a que forma una red tridimensional alrededor de las gotas de la emulsión, como se puede observar en la Figura 11 (Mey et al., 2009). Su capacidad como emulsificante se debe a que cuenta con zonas hidrofílicas (ricas en glucosamina) y zonas hidrofóbicas (ricas en N-acetilglucosamina), que hacen posible su adsorción en la interface de aceite-agua y su interacción con las proteínas presentes en la emulsión, favoreciendo los mecanismos estabilizadores interfaciales de repulsión electrostáticos (cuando el quitosán genera una doble capa eléctrica alrededor de las gotas de aceite, estabilizándolas) y estéricos (cuando el quitosán es adsorbido en la interface impidiendo estéricamente

el acercamiento de las gotas de aceite, evitando así la coalescencia) (Laplante et al., 2005).

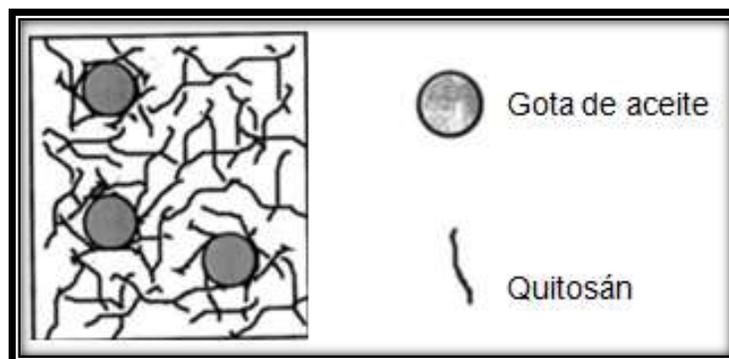


Figura 6. Representación esquemática de la red tridimensional formada por el quitosán alrededor de gotas de aceite en una emulsión (Dickinson, 2003)

El quitosán actúa como polímero catiónico generando una carga de superficie positiva en las emulsiones. Existe una interacción entre el quitosán positivamente cargado y los ácidos grasos negativamente cargados, los cuales están contenidos en la fase aceite. La adición de quitosán positivamente cargado a las emulsiones lipídicas conduce a un cambio de carga de la superficie de las gotas de aceite de positiva a negativa. Además se encontró que las moléculas del quitosán se localizan en la interface e intercaladas entre los surfactantes no iónicos (Jumaa y Muller, 1999).

Se pueden formar emulsiones más estables a altas concentraciones de quitosán (mayor a 1%), esto produce que la carga de las gotas vaya de altamente negativa a altamente positiva, debido a la saturación de la superficie de la gota con el polisacárido (Mun et al., 2006). Además un incremento en la concentración del quitosán resulta en una disminución en el tamaño de gota y viscosidad más alta, el incremento en la viscosidad de la fase continua por la adición de quitosán, mejora la estabilidad al cremado por medio de disminución de la difusión de las gotas y flóculos. (Speiciene et al, 2007). A pesar de ello, se debe considerar, que existe un poco de agregación de las gotas en las emulsiones a concentraciones altas de quitosán (≥ 4 wt%) (Klinkesorn y Namatsila, 2009).

Se reduce la estabilidad de la emulsión con bajos pesos moleculares de quitosán (319 kDa) o bajo grado de desacetilación (67.7%). La desfavorable estabilidad para el quitosán de bajo peso molecular, se puede explicar debido a que su adsorción interfacial genera atracciones electrostáticas débiles, permitiendo el contacto directo de las gotas de aceite y por lo tanto su coalescencia, y con respecto al bajo grado de desacetilación, es debido a la pérdida de la carga neta interfacial (Laplante et al., 2005).

1.5.3 Obtención

A grandes rasgos, el quitosán es preparado tratando la quitina con una base fuerte para remover el grupo acetilo, dejando el grupo amino libre. La desacetilación es raramente completa en preparaciones comerciales, el quitosán tiene comúnmente un grado de desacetilación del 80% (Savage, 1998).

Las sustancias minerales y las proteínas deben de ser separadas de la quitina, típicamente se remueve el carbonato de calcio y el fosfato de calcio con ácido. Después de varias horas de mezclado, el material es enjuagado para eliminar el ácido y luego es transferido como un compuesto acuoso a un recipiente, donde es calentado por pocas horas con hidróxido de sodio o cualquier otro álcali capaz de separar la proteína de la quitina. Después de enjuagar y secar, la quitina es obtenida como un polvo blanco (Savage, 1998).

1.5.4 Aplicaciones en alimentos

En la Tabla 1 se presentan las aplicaciones que tiene el quitosán en la industria alimentaria.

Tabla 1. Aplicaciones alimenticias del quitosán (Shahidi et al., 1999 y Savage, 1998)

ÁREA DE APLICACIÓN	EJEMPLOS
Agente antimicrobiano	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Bactericida ▪ Fungicida ▪ Medida de contaminación de mohos en productos agrícolas
Industria de películas comestibles	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Transferencia de humedad controlada entre el alimento y el entorno circundante ▪ Control en liberación de sustancias antimicrobianas ▪ Control en liberación de antioxidantes ▪ Control en liberación de nutrientes y sabores ▪ Reducción de la presión parcial de oxígeno ▪ Control de velocidad de respiración ▪ Control de Temperatura ▪ Control de obscurecimiento enzimático en frutas ▪ Membrana de ósmosis inversa
Aditivo	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Clarificación y desacidificación de frutas y bebidas ▪ Extensor natural del sabor ▪ Agente en el control de textura ▪ Agente emulsionante ▪ Imitador de alimento ▪ Agente espesante y estabilizante ▪ Estabilizador de color
Calidad nutricional	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Fibra dietética ▪ Efecto hipocolesterolémico ▪ Aditivo en alimento de ganado y de peces ▪ Reducción en la absorción de lípidos ▪ Producción de proteína unicelular ▪ Agente antigástrico ▪ Ingrediente de alimentación infantil
Recuperación de materiales sólidos de desechos alimentarios	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Afinidad a la floculación ▪ Fraccionamiento de agar
Purificación de agua	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Recuperación de iones metálicos, pesticidas, fenoles y PCB's ▪ Eliminación de colorantes
Otras aplicaciones	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Inmovilización de enzimas ▪ Reactivo analítico ▪ Eliminación de la turbidez de líquidos ▪ Productos para pérdida de peso ▪ Envasado biodegradable

1.5.5 Otras aplicaciones

En la Tabla 2 se presentan ejemplos de las aplicaciones de quitosán y de la quitina en diferentes áreas.

Tabla 1. Aplicaciones de la quitina y el quitosán en diferentes áreas (Savage, 1998)

ÁREA DE APLICACIÓN	EJEMPLOS
Tratamiento de agua	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Eliminación de iones metálicos ▪ Floculante/coagulante ▪ Filtración ▪ Desalinización
Pulpa y papel	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Tratamiento de superficie ▪ Papel fotográfico ▪ Aditivo en el proceso
Textiles	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Tratamiento de terminado ▪ Fijador de color ▪ Tinte decolorante de aguas residuales
Medicina	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Vendas, esponjas ▪ Vasos sanguíneos artificiales ▪ Control del colesterol de la sangre ▪ Antiinflamatorio ▪ Inhibición de tumor ▪ Propiedades antivirales ▪ Inhibición de placa dental bacteriana ▪ Vendaje de quemaduras ▪ Piel artificial ▪ Liberación controlada de medicamento ▪ Tratamiento de curación de huesos
Cosméticos	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Maquillaje en polvo ▪ Esmalte de uñas ▪ Crema hidratante ▪ Fijador ▪ Loción de baño ▪ Crema para manos ▪ Pasta dental ▪ Shampoo
Biotecnología	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Inmovilización de enzimas ▪ Recuperación de células ▪ Inmovilización de células ▪ Electrodo de glucosa
Agricultura	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Recubrimiento de semillas ▪ Recubrimiento de hojas ▪ Fertilizador hidropónico ▪ Liberación controlada de agroquímicos
Separación de productos	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Separación de drogas quirales ▪ Bioseparación ▪ Pervaporación
Medio ambiente	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Eliminación de PCB ▪ Agente de desintoxicación química por guerras

1.5.5 Ventajas de uso

La materia prima para la obtención de quitosán es abundante y prácticamente gratis. Una enorme cantidad de quitina es desechada cada año en forma de material de desperdicio de la industria marina. Otras fuentes adicionales de suministro de quitina son los microbios, hongos y varios insectos (Savage, 1998).

1.5.6 Desventajas de uso

La quitina es relativamente costosa para recaudarse, extraerse y purificarse. La mayor parte del desecho marino proviene de restaurantes de comida marina o de basureros, por lo que es difícil que pueda ser acumulada en un solo lugar para ser recopilada. Se debe aplicar un procedimiento vigoroso de extracción para obtener la quitina, debido a que los caparazones de los crustáceos, son materiales bastante duros (Savage, 1998).

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2.1 Definición de objetivos

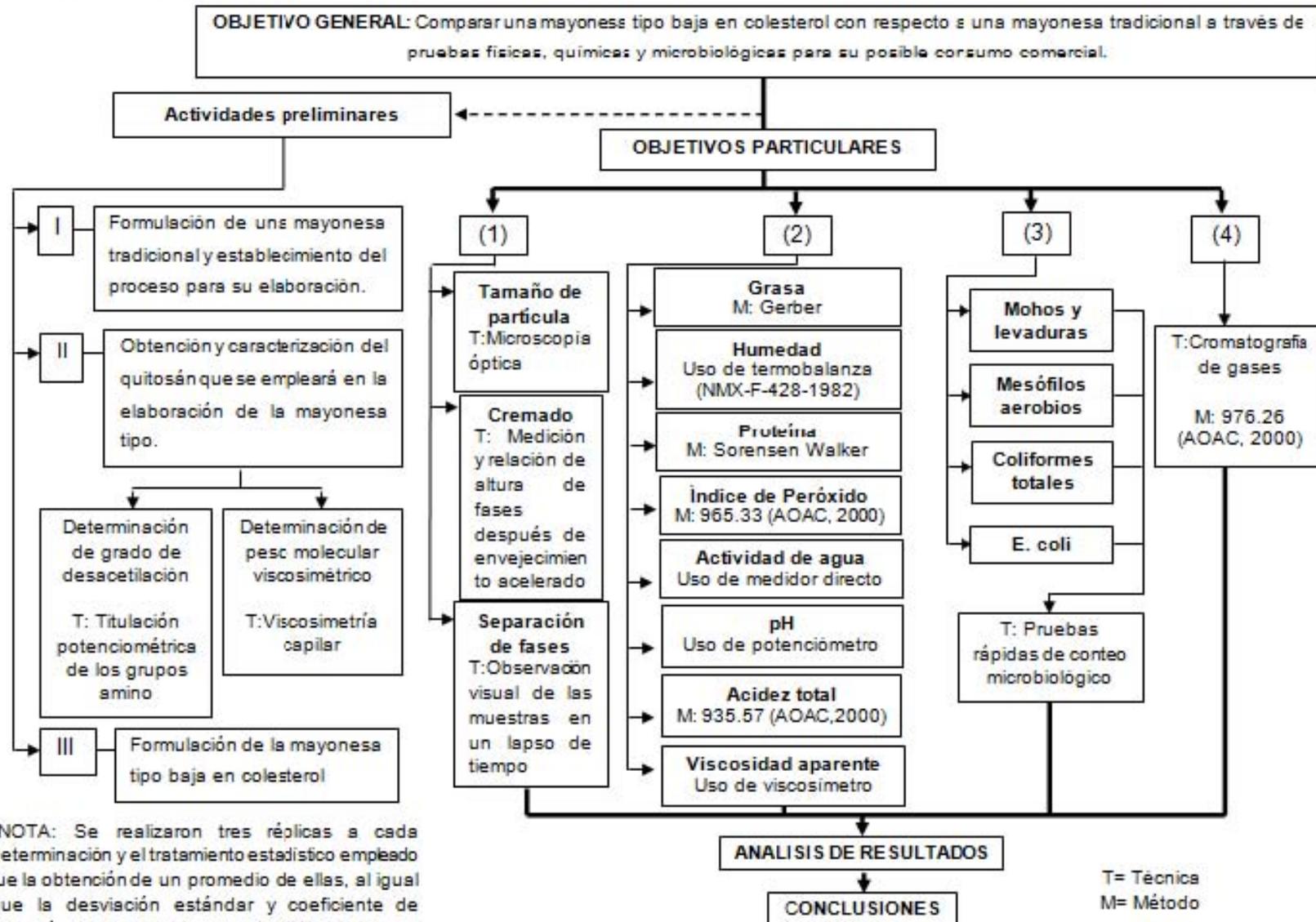
Objetivo general

Comparar una mayonesa tipo baja en colesterol con respecto a una mayonesa tradicional a través de pruebas físicas, químicas y microbiológicas para su posible consumo comercial.

Objetivos particulares

- (1) Evaluar la estabilidad de una mayonesa baja en colesterol, mediante la determinación de tamaño de partícula, cremado y separación de fases, para compararla con la de una mayonesa tradicional.
- (2) Evaluar las propiedades químicas y físicas de una mayonesa baja en colesterol y una mayonesa tradicional, a través de la determinación de grasa, humedad, proteínas, índice de peróxido, actividad de agua, pH, acidez y viscosidad aparente, para establecer la comparación entre ambas.
- (3) Establecer la calidad microbiológica de una mayonesa baja en colesterol y de una mayonesa tradicional, a través de pruebas rápidas de conteo microbiológico, para verificar que cumplan con las especificaciones de la norma NMX-F-021-S-1979.
- (4) Determinar el contenido de colesterol de una mayonesa tipo, por medio de cromatografía de gases, para comprobar que su valor es menor que en la mayonesa tradicional.

2.2 Cuadro metodológico



2.3 Actividades preliminares

(I) Formulación de una mayonesa tradicional y establecimiento del proceso para su elaboración.

- Formulación de mayonesa tradicional

La formulación de la mayonesa tradicional, que fue empleada como control en este estudio, se presenta en la Tabla 3. Para su establecimiento se consideraron los ingredientes presentados en las formulaciones de la literatura (Liu et al., 2007; Nahla et al., 2011; Wendin et al., 1997 y Worrasinchai et al., 2006), los cuales son; aceite, yema de huevo, vinagre, agua, sal, azúcar y gotas de limón. Además se tomaron en cuenta las especificaciones de la norma NMX-F-021-S-1979, la cual establece que el contenido de yema de huevo líquida no será menor de 6% en peso y el contenido de aceite vegetal comestible de 65%. En este caso se empleó aceite de soya, debido a que, comparado con otros aceites como el de maíz, es menos susceptible a la oxidación (Hsieh y Regenstein, 1992)

Tabla 3. Formulación de la mayonesa tradicional

INGREDIENTE	%
Aceite de soya	78.04
Yema de Huevo	9.89
Vinagre	4.95
Agua	4.95
Sal	0.99
Azúcar	0.39
Limón	0.79

Es importante mencionar, que la yema de huevo, aporta las proteínas y la lecitina (es el emulsificante y está formada por fosfolípidos), que son básicos para mantener estable la emulsión (Boatella et al., 2004).

- Establecimiento del proceso para elaboración de la mayonesa tradicional

El orden de adición de los ingredientes en la elaboración de la mayonesa, es muy importante para la formación de la emulsión, en este trabajo, se prosiguió de acuerdo a lo hecho en Worrasinchai et al., 2006, el diagrama de proceso se muestra en la Figura 12 y más adelante se presenta su descripción. La mayonesa se elaboró a temperatura ambiente y se procuró que todos los ingredientes se encontrarán a temperatura ambiente también. Se empleó una batidora marca Braun modelo MR 430 CA con potencia de 100 watts (Ver Figura 13).

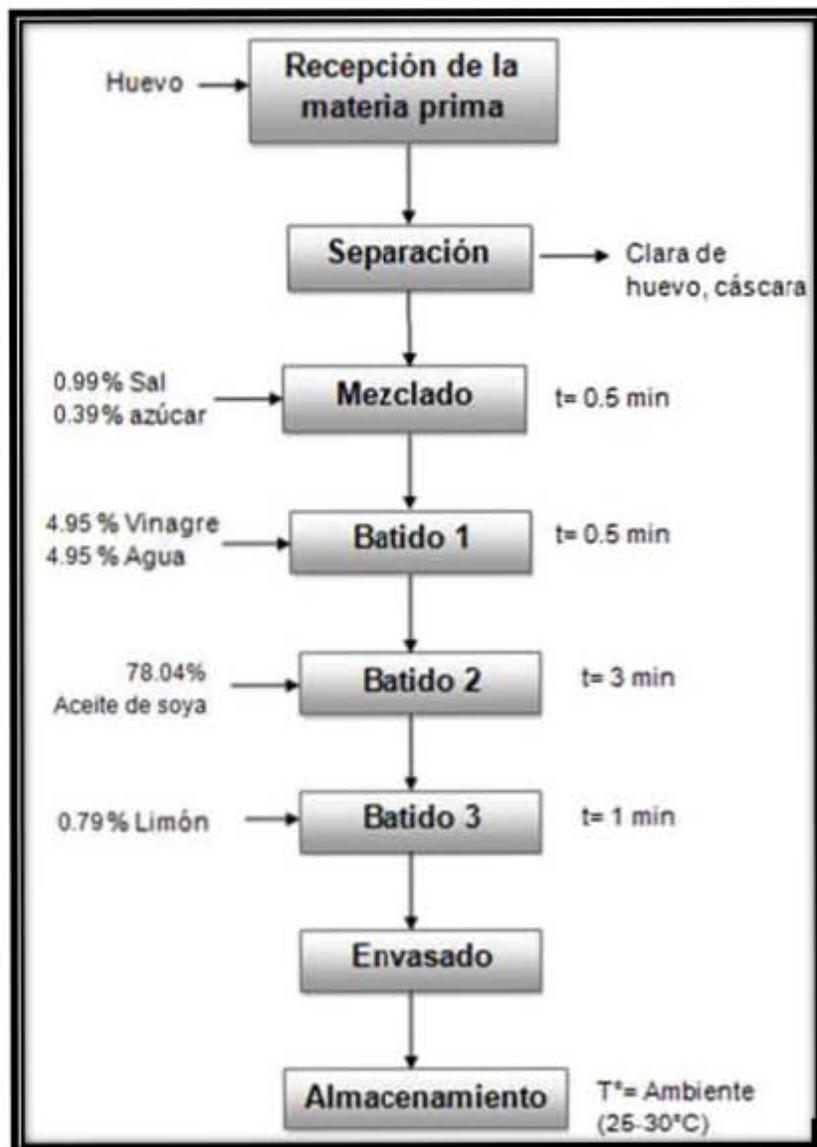


Figura 12. Diagrama de proceso para la elaboración de mayonesa tradicional

A continuación se presenta la descripción del diagrama de proceso:

1. Recepción de la materia prima. Se trabajó con huevos de gallina blancos marca “El calvario”, y se lavó la superficie cuidadosamente con agua.
2. Separación. Se fragmentaron cuidadosamente los huevos y se separaron la clara y la yema. La yema es la parte del huevo que se emplea para la elaboración de la mayonesa, mientras la clara y la cáscara, se eliminan.
3. Mezclado. Se adicionó sal y azúcar a la yema de huevo y se mezcla manualmente con un agitador de vidrio durante medio minuto.
4. Batido 1. Se agregó vinagre e inmediatamente después agua, ambos conforman la fase acuosa de la emulsión de mayonesa. Se bate durante 0.5 minutos.
5. Batido 2. Se añadió el porcentaje correspondiente al aceite de oliva, esto se hace en forma de hilo y gradualmente, sin dejar de batir, para que el aceite se encuentre disperso en la fase acuosa en forma de pequeñas gotas. La duración de esta operación es de 3 minutos.
6. Batido 3. Se adicionó limón y se bate durante un minuto para dispersar dicho ingrediente en toda la mezcla.
7. Envasado. Una vez elaborada la mayonesa, fue transferida a un recipiente de vidrio estéril, y posteriormente se selló el recipiente.
8. Almacenamiento. Se almacena la mayonesa a temperatura ambiente (25-20°C) para su posterior análisis.

NOTA: Los Batidos 1, 2 y 3 se llevaron a cabo con la batidora Braun (Figura 13).



Figura 13. Batidora Braun modelo MR 430 CA

(I) Obtención y caracterización del quitosán que se empleará en la elaboración de la mayonesa tipo baja en colesterol.

- Obtención del quitosán

Se emplearon caparazones de camarón obtenidos de un establecimiento proveedor de camarones sin caparazón. El tratamiento que se les dio fue el siguiente:

1. Se limpiaron los caparazones de los camarones de tal manera que se eliminó cualquier resto de carne, como se muestra en la Figura 14.

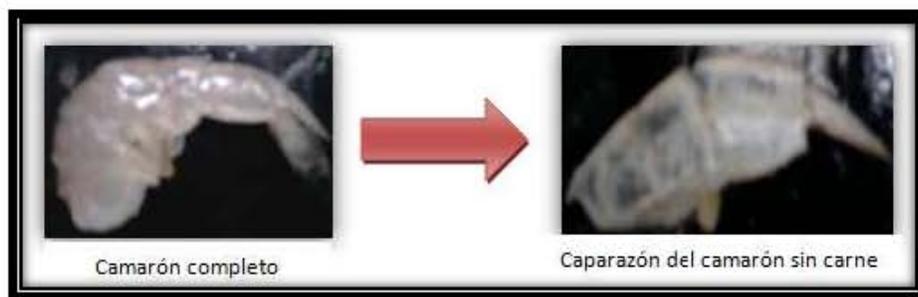


Figura 14. Obtención de los caparazones del camarón eliminando la carne.

2. Los caparazones fueron remojados en una solución de agua con cloro doméstico (3% v/v) para su desinfección y para eliminar el olor característico del camarón. El tiempo de remojo fue de 24 horas.
3. Una vez desinfectados, los caparazones fueron lavados y escurridos y después distribuidos en una charola para su posterior secado, el cual se efectuó en una estufa Quincy Lab Modelo 30-GC (Figura 15) a una temperatura de 50°C durante 24 horas.



Figura 15. Estufa Quincy Lab Modelo 30-GC

1. Los caparazones secos fueron sometidos a molienda para reducir su tamaño. Se utilizó un Molino casero (Figura 16).



Figura 16. Molino casero

1. Una vez molidos los caparazones, fueron sometidos al proceso para la obtención del quitosán. Para ello se aplicó el protocolo del Laboratorio de Biotecnología de acuerdo a la Patente Mexicana No. 293022 y Miranda, 2004.
2. Una vez obtenido el quitosán, se almacenó en recipientes de vidrio a temperatura ambiente (ver Figura 17).



Figura 17. Caparazones molidos contenidos en frascos de vidrio

- Caracterización del quitosán obtenido

Determinación del grado de desacetilación

Técnica: Titulación potenciométrica de los grupos aminos. (Balanta et al., 2010 y Solis et al., 2007).

Materiales y Equipo:

- Vaso de precipitados de 100 ml
- Parrilla con agitación
- Mosca
- Potenciómetro modelo 5997-20, marca HORIZON ECOLOGY CO, con escala de pH de 0-14 y rango de temperatura de 0 a 100°C (ver Figura 18)
- Bureta de 25 ml
- Soporte universal
- Pizeta



Figura 18. Potenciómetro HORIZON ECOLOGY CO.

Reactivos:

- Ácido clorhídrico 0.2 M
- Hidróxido de sodio 0.1M
- Solución buffer (pH=7)

Procedimiento:

1. Se disolvieron 0.3 gramos de quitosán en 45 ml de HCL 0.2 M.
2. Se calibró el potenciómetro con la solución buffer con pH de 7.

1. Se valoró la solución de quitosán/HCL adicionando NaOH 0.1 M. Se midió el cambio de pH después de cada mililitro de NaOH 0.1 M añadido hasta llegar a un pH de 11. La adición se realizó de manera lenta y con agitación para asegurar la homogeneización de la solución. (Se realizaron 3 réplicas y se obtuvo el promedio de cada medida de pH después de cada mililitro añadido).

Una vez obtenidos los datos se construyó una curva de pH frente a volumen de NaOH añadido. Dicha curva presenta dos puntos de inflexión, cuya diferencia corresponde a la cantidad de hidróxido de sodio requerido para neutralizar los grupos aminos protonados del quitosán, lo que permite determinar el porcentaje de grupos amino de la muestra, y en consecuencia, el grado de desacetilación del quitosán.

Secuencia de Cálculo:

- 1) Obtención del volumen gastado en litros:

$$Volumen_{gastado} (L) = \frac{Punto\ de\ inflexión\ 2\ (ml) - Punto\ de\ inflexión\ 1(ml)}{1000}$$

Ecuación 1

- 2) Cálculo de la masa equivalente del quitosán:

$$m_{eq} = \frac{m\ (g)}{[NaOH](N) * Volumen_{gastado}\ (L)}$$

Ecuación 2

Donde:

m= Gramos de quitosán empleado (g)

[NaOH]= Concentración Normal de NaOH (N)

- 3) Cálculo del grado de desacetilación:

$$\%DD = \left(\frac{203}{m_{eq}(g/equivalentes) + 42} \right) 100$$

Ecuación 3

Determinación del peso molecular del quitosán

La ecuación de Mark-Houwink-Sakurada proporciona una dependencia entre la viscosidad intrínseca de un polímero y su peso molecular. Es por ello, que se puede utilizar la técnica viscosimétrica, para determinar el peso molecular promedio viscosimétrico de muestras de un polímero como el quitosán.

Técnica: Viscosimetría capilar (Rinaudo et al., 1993 y Balanta et al., 2010)

Materiales y equipo:

- Equipo montado de la Figura 19
- Viscosímetro Ostwald
- Cronómetro
- Papel filtro
- Embudo

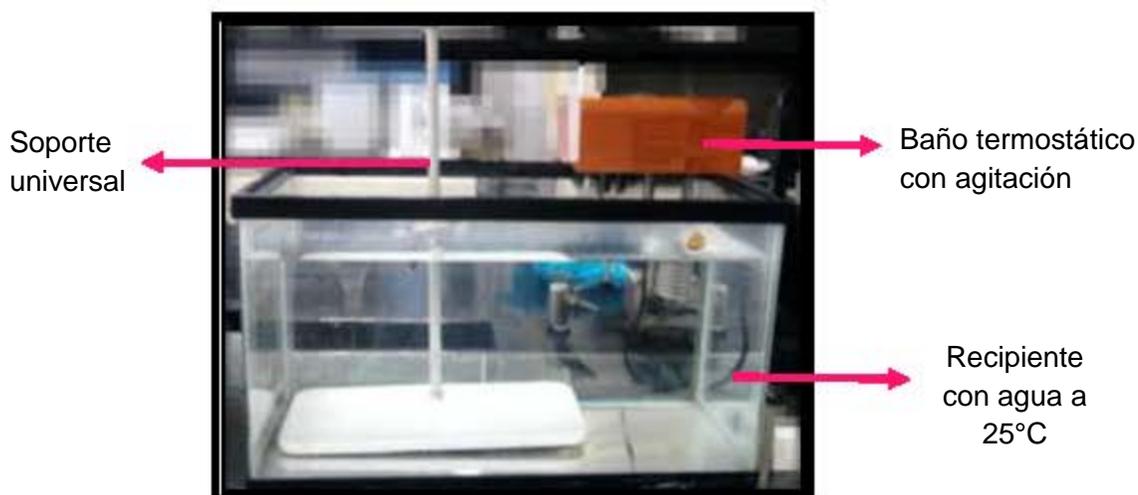


Figura 19. Equipo montado para determinación de peso molecular del quitosán

Reactivos:

- Acetato de sodio 0.2 M
- Ácido acético 0.3 M

Procedimiento:

1. Se preparó una solución buffer a pH de 4.6 con acetato de sodio 0.2M y ácido acético 0.3M.
2. Se prepararon 5 disoluciones de quitosán en la solución buffer, las concentraciones de las disoluciones fueron [0.002], [0.0008], [0.00064], [0.0004] y [0.0002] (g/ml).
3. Se filtraron las disoluciones (Figura 20) para eliminar la presencia de cualquier partícula que genere problemas al pasar a través de viscosímetro Ostwald, lo cual es descrito más adelante.



Figura 20. Filtración de disoluciones de quitosán

4. Se colocó el viscosímetro de la manera mostrada en la Figura 21, manteniendo una temperatura de 25°C con ayuda del baño térmico.



Figura 21. Viscosímetro Ostwald y equipo para determinación de peso molecular

5. Se adicionaron 4 mililitros de la solución buffer en el viscosímetro de Ostwald de manera que se cubra desde el punto 1 al punto 2 de la Figura 22.

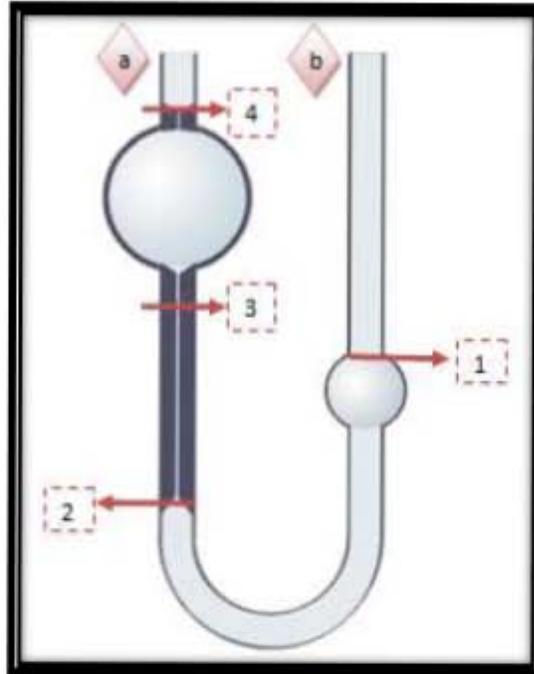


Figura 22. Viscosímetro Ostwald

1. Con ayuda de una propipeta se succionó del lado a del viscosímetro de manera que la solución buffer sobrepasara el punto 4.
2. Se eliminó la succión y, con ayuda del cronómetro, se contó el tiempo que tarda el fluido en pasar desde el punto 4 al punto 3. Se realizaron 3 repeticiones y se obtuvo un promedio.
3. Se repitieron los puntos 4, 5, 6 y 7 para todas las disoluciones de quitosán, teniendo cuidado en limpiar bien el viscosímetro antes de adicionar la disolución correspondiente.

Secuencia de cálculo:

- 1) Determinación de la viscosidad relativa:

$$\eta_{rel} = \frac{t_m}{t_o}$$

Ecuación 1

Donde:

t_m = Tiempo de caída de la solución de quitosán (min)

t_o = Tiempo de caída de la solución de referencia ó buffer (min)

1) Determinación de la viscosidad específica:

$$\eta_{específica} = \eta_{rel} - 1$$

Ecuación 1

2) Calcular viscosidad reducida:

$$\eta_{reducida} = \frac{\eta_{específica}}{C}$$

Ecuación 2

Donde:

C= Concentración de quitosán (g/dl)

3) Obtención de la viscosidad intrínseca. Se realiza una gráfica para representar la viscosidad reducida en función de la concentración del quitosán y se obtiene una ecuación para tendencia lineal, en donde la ordenada al origen corresponde al valor de la viscosidad intrínseca.

4) Cálculo de peso molecular del quitosán. Como se mencionó anteriormente, por medio de la viscosidad intrínseca se puede conocer el peso molecular promedio viscosimétrico \bar{M}_v , utilizando la ecuación de Mark Houwink Sakurada:

$$[\eta] = K\bar{M}_v^a$$

Ecuación 3

Donde K y a son constantes típicas que dependen del solvente empleado (solución buffer), el polímero y la temperatura y han sido determinados experimentalmente por diversos autores. En este caso las constantes al usar un solvente de ácido acético 0.3M/ acetato de sodio 0.2M son: $K=76 \times 10^{-5}$ dL/g y $a= 0.76$ (Rinaudo et al., 1993).

Expresada en forma logarítmica la ecuación de Mark Houwink Sakurada queda de la siguiente forma:

$$\log[\eta] = \log K + a \log \bar{M}_v$$

Ecuación 4

Despejando el peso molecular promedio viscosimétrico:

$$\bar{M}_v = 10^{(\log \eta - \log k)/a}$$

Ecuación 1

(I) Formulación de la mayonesa tipo baja en colesterol

Para establecer la formulación de la mayonesa tipo baja en colesterol primero se determinó la concentración de solución de quitosán/vinagre a emplear y posteriormente el porcentaje de sustitución por yema de huevo.

- Determinación de la concentración de quitosán para elaborar la mayonesa tipo baja en colesterol.

El quitosán es un biopolímero soluble en un medio acuoso ácido como es el caso de soluciones diluidas de ácido acético (Kumar, 2000), por lo tanto la manera de integrarlo en la formulación fue disolviéndolo en el vinagre. Para seleccionar la concentración en %p/p de quitosán/vinagre a utilizar se aplicó la siguiente metodología:

1. Se tomó como base la formulación para elaborar la mayonesa tradicional establecida en la Actividad preliminar I y mostrada en la Tabla 3.
2. Se elaboraron 5 soluciones de quitosán/vinagre al 1%, 1.5%, 2%, 2.5% y 3% (p/p). La concentración máxima de 3% a utilizar se debe a que, según Speiciene et al., 2007, a concentraciones más altas de quitosán ($\geq 3\%$), existe una separación completa de la emulsión en una capa de grasa al fondo y una capa de crema en la parte superior, además que a concentraciones más altas, la disolución del quitosán en el vinagre fue difícil, resultando en una mezcla no homogénea y grumosa.
3. De la formulación establecida (Tabla 3), se eliminó un 20% del huevo y se adicionó en su lugar cada una de las soluciones de quitosán/vinagre.

4. Se compararon las mayonesas sustituidas al 20% para las 5 diferentes concentraciones de quitosán/vinagre con respecto a la mayonesa elaborada con la formulación base. La comparación que se llevo a cabo fue con respecto a lo siguiente:
- Apariencia física. Establecer visualmente el grado de similitud entre las mayonesas sustituidas con la mayonesa control.
 - Resabio astringente. La adición del quitosán proporcionó un resabio astringente a las mayonesas, por lo tanto se comparó la intensidad de astringencia que presentaron, esto, con la finalidad de elegir una concentración que no presentará el resabio acentuadamente.
 - Estabilidad. Se evaluó la estabilidad al cremado de la mayonesa control y de las mayonesas sustituidas para definir cual concentración tendría una estabilidad más parecida a la de la mayonesa control.

La técnica para la **determinación de cremado** se refiere a la medición y relación de altura de fases después de envejecimiento acelerado (Nahla et al., 2011, Wang et al., 2010 y Wu et al., 2012).

Fundamento: Después de un envejecimiento acelerado bajo condiciones de temperatura y centrifugación las gotas de aceite de la emulsión son forzadas a cremar y se determina el volumen de la fase acuosa más baja y el volumen de la fase de aceite de arriba, y se relacionan, con el volumen total de la muestra de emulsión.

Equipo:

- Centrífuga Clínica IEC, 115 VAC, 50/60 Hz, 1.2 AMP. Con rango de velocidad de 1-7. Marca International Equipment Co (Figura 23).



Figura 23. Centrífuga Clínica IEC

- Incubadora bacteriológica, Blue M. Rango de temperatura de 30 a 65°C. Marca Equipar (Figura 24).



Figura 24. Incubadora bacteriológica Blue M

Procedimiento:

1. Se homogeneizó la muestra y se colocó una alícuota de aproximadamente 7 ml dentro un tubo cónico de vidrio de 10 ml tapado. Posteriormente se almacenó el tubo en la incubadora durante 48 h a 50°C para envejecer a la muestra (Nahla et al., 2011).
2. Se colocó el tubo de ensayo con muestra en una camisa de la centrífuga y, esta a su vez, es colocada en la centrífuga, considerando que el número de muestras a centrifugar debe ser número par y de igual peso (Ver figura 25).
3. Se centrifugaron las muestras durante 3.5 horas a 1100 gs.
4. Se midieron el volumen cremado en la parte superior (V_C) y el volumen sedimentado de la fase agua (V_S), así como el volumen total de la muestra (V_T).

5. Se realizaron 3 réplicas para cada tipo de mayonesa.



Figura 25. Ingreso de los tubos con muestra en la centrífuga

Cálculos:

Se determinó el grado de cremado utilizando las siguientes definiciones:

a) Índice de cremado para la capa de suero (% C_{cs}). La capa de suero es definida como la fase clara y semi-transparente formada en la parte inferior de la emulsión. Provee información indirecta sobre el grado de agregación de las gotas en una emulsión, entre más grande el índice de cremado existe más agregación, y son más grandes los flóculos formados (Wang et al., 2010).

$$\% C_{cs} = 100 \times \frac{V_s}{V_T}$$

Ecuación 2

b) Gradiente de cremado para la capa cremada (% C_{cc}). Corresponde a la capa de aceite formada en la parte superior de la emulsión como consecuencia de la coalescencia de las gotas (Wu et al., 2012).

$$\% C_{cc} = 100 \times \frac{V_c}{V_T}$$

Ecuación 3

- Selección del porcentaje de huevo a sustituir por quitosán.

Una vez establecida la concentración de quitosán con la que se trabajó, se seleccionó el porcentaje de yema a sustituir. Para ello se prepararon mayonesas con sustitución de yema de huevo por quitosán de 20, 25, 30, y 40% y se compararon de acuerdo a las siguientes características:

- Apariencia física de la mayonesa una vez elaborada y después 40 días de almacenamiento: Se determinó visualmente si la apariencia de la mayonesa permanece similar después de un tiempo y también se comparó con la mayonesa control.
- Resabio astringente. Se comparó la intensidad de astringencia que presentaron las mayonesas.
- Estabilidad. Se evaluó la estabilidad al cremado de las mayonesas comparando con la mayonesa control.

2.4 Materiales y métodos

Para ambas mayonesas (control y tipo) se realizaron las determinaciones que son descritas en esta sección. Dichas determinaciones se presentan agrupadas de acuerdo al objetivo particular que cumplen.

Cabe mencionar que se obtuvo un promedio de las réplicas llevadas a cabo en cada determinación y además de la desviación estándar y coeficiente de variación empleando las ecuaciones mostradas en el Anexo I.

2.4.1 Objetivo Particular 1

2.4.1.1 Tamaño de partícula.

Para la determinación de tamaño de partícula se empleó como técnica la microscopía óptica para obtener información acerca del tamaño, forma y distribución

de las gotas de aceite dentro de la emulsión (mayonesa). Se realizó la microscopía de las dos mayonesas (control y tipo) recién elaboradas, y además, para conocer los cambios de tamaño, forma y distribución que mostrarían las gotas después de un tiempo de su elaboración, también se realizó la microscopía de ambas mayonesas después de un envejecimiento acelerado de 2 días a 40°C según Nahla et al., 2011.

Equipo: Microscopio Axioskop 40 marca ZEISS, adaptado con una cámara Evolution VE cooled marca Media Cybernetics y un analizador de imagen Qcapture Pro 6.0 (Ver figura 26).

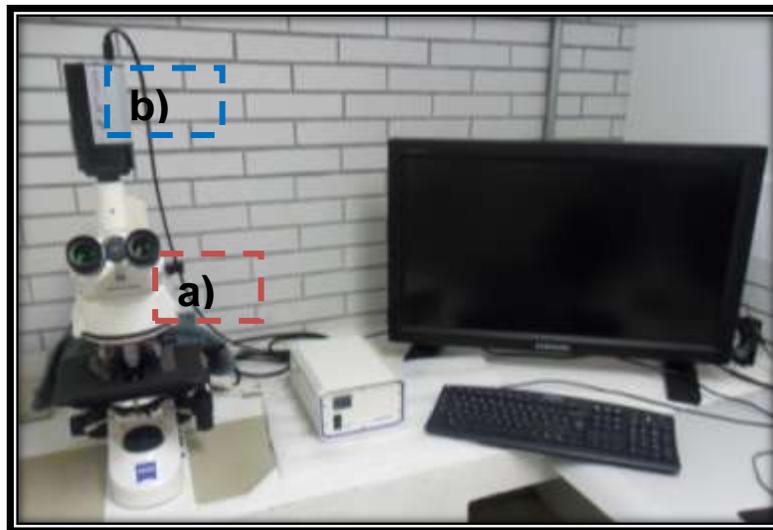


Figura 26. Equipo empleado para realizar la microscopía óptica de las mayonesas.
a) Microscopio Axioskop 40, b) cámara Evolution VE cooled.

Procedimiento:

1. Las muestras se homogeneizaron, lenta y cuidadosamente, con un agitador de vidrio y se colocó una gota de mayonesa en un portaobjetos, después se ubicó un cubreobjetos encima de la gota.
2. Se colocó el portaobjetos en la platina del microscopio y se utilizó el objetivo 40X para observar las muestras.
3. Se capturó la imagen con la cámara adaptada y posteriormente se sometió la foto a un análisis de imagen para determinar el tamaño de las gotas de aceite tomando 10 medidas para obtener un promedio. Para determinar si existe

diferencia significativa entre los diámetros de las mayonesas una vez elaboradas y después del envejecimiento se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism 5 portable.

2.4.1.2 Cremado

Se empleó la misma técnica descrita para la Actividad Preliminar III en la página 36.

2.4.1.3 Separación de fases

Técnica: Observación visual de las muestras en un lapso de tiempo (Laplante et al., 2005 y Magnusson et al., 2011).

Fundamento: Se determina la estabilidad durante un tiempo determinado por medio de observación visual y en caso de presentar separación de fases se mide la altura de fases presentes en la muestra.

Procedimiento:

1. Se homogenizó la muestra
2. Se transfirieron aproximadamente 10 ml de la muestra a un tubo cónico de plástico de 15 ml con tapa de rosca y se cerró el tubo.
3. Se realizaron observaciones cada 7 días durante un mes con tres réplicas para cada tipo de mayonesa.

2.4.2 Objetivo Particular 2

2.4.2.1 Grasa

Se decidió utilizar un método para la determinación de grasa en las mayonesas que permitiera la ruptura de la emulsión y por consiguiente la separación de la grasa.

El método seleccionado fue el método Gerber, que es comúnmente utilizado para productos lácteos. El método Gerber fue desarrollado por el año 1892 como método rápido para la determinación práctica de grasa. Debido a su ejecución y empleo es un método extraordinariamente sencillo, con buena reproductibilidad y exactitud (Matissek et al., 1992).

Fundamento: Este método se basa en la digestión parcial de los componentes del alimento, excepto de la grasa en ácido sulfúrico. Se emplea alcohol isoamílico para ayudar a romper la emulsión y evitar que se quemé la capa de grasa. El alcohol isoamílico reacciona con el ácido sulfúrico formando un éster que es completamente soluble en dicho ácido. La grasa liberada se separa por centrifugación, y tras ello, se lee el contenido de grasa en la escala del butirómetro (Matissek et al., 1992; NMX-F-387-1982).

Reactivos:

- Ácido sulfúrico al 80%
- Alcohol, isoamílico de densidad de 0.811 ± 0.002 g/ml a 20°C

Equipo y materiales:

- Butirómetro para mantequilla (Figura 27)
- Tapones para butirómetro
- Pipetas volumétricas de 1 ml y 10 ml
- Baño de agua
- Centrífuga para determinación de grasa por método de Gerber, ver Figura 28.



Figura 27. Butirómetro de mantequilla para determinación de grasa



Figura 28. Centrífuga para butirómetro

Procedimiento:

1. Se homogeneizó la muestra de mayonesa y se pesaron aproximadamente 5 g en el vaso de vidrio del tapón del butirómetro (Ver figura 29).
2. Se adicionaron 10 ml de ácido sulfúrico y 1 ml de alcohol isoamílico al butirómetro, evitando bañar las paredes internas del cuello.
3. Se cerró el butirómetro con el tapón que contiene la muestra y se agitó energéticamente hasta que la muestra se disolvió completamente, se invirtió varias veces el butirómetro para que se dispersará el ácido sulfúrico sobre la muestra. Se realizó esta operación con ayuda de un trapo húmedo puesto que la mezcla de los dos líquidos genera calor.
4. Una vez que la muestra se disolvió completamente, se colocó el butirómetro en baño maría a 65°C durante 10 minutos.
5. Se centrifugó durante 10 minutos y después se colocó de nuevo el butirómetro en baño maría a 65°C durante otros 10 minutos, posteriormente se sacó el butirómetro y se colocó en posición vertical para leer el espesor de la capa de grasa acumulada en la parte superior.
6. Se realizaron 3 repeticiones por cada tipo de mayonesa.



Figura 29. Tapones de butirómetro con muestras de mayonesa tipo

2.4.2.2 Humedad

Para la determinación de la humedad en las mayonesas se utilizó una termobalanza digital marca OHAUS modelo MB45 (Figura 30), este equipo es un instrumento de humedad, el cual emplea una balanza de torsión sensible para pesar la muestra y una lámpara infrarroja para secar. La humedad se considera como la pérdida de peso al secado.

Se trabajó con un intervalo de temperatura de 60 a 95°C empleando de 0.6 a 2 gramos de muestra de cada mayonesa. La determinación se hizo tres veces para cada mayonesa.



Figura 30. Termobalanza OHAUS modelo MB45 para determinación de humedad

2.4.2.3 Proteína

Método: Titulación acidimétrica (Método Sorensen Walker)

Fundamento: Se adiciona formalina a una solución acuosa neutralizada que contiene proteínas, el formaldehído se une a los grupos amino de los aminoácidos de las proteínas para formar el grupo metilenoimino, dejando los grupos carboxilos libres, que pueden titularse con hidróxido de sodio, usando como indicador fenolftaleína. El volumen de hidróxido de sodio necesario para neutralizar la acidez resultante de la adición del formol es proporcional a la cantidad de proteínas. Se usa

un factor de conversión empírico para expresar el porcentaje de proteínas, el cual varía sensiblemente para las diferentes regiones (AEEIQ, 2001 y OCUM, 2010).

Consideraciones: No existe en la bibliografía un factor empírico para ser empleado en mayonesas, por lo tanto este se obtuvo experimentalmente determinándolo para la yema de huevo, que es el ingrediente que proporciona las proteínas en la mayonesa. Se realizó todo el procedimiento más adelante descrito para la yema de huevo marca El Calvario considerando que dentro de su composición química 15% pertenece a proteínas (Matteini y Moles, 2001) y se hizo el cálculo para obtener el factor empírico empleando la Ecuación 12. Una vez obtenido dicho factor se realizó la titulación para cada mayonesa y utilizando el factor se realizó el cálculo de la Ecuación 13 para obtener así el porcentaje de proteínas que contienen.

Reactivos:

- NaOH 0.1N
- Solución del 40% de formaldehído (37% formaldehído y 3% de alcohol metílico)
- Indicador, solución de 1% de fenolftaleína en alcohol etílico de 95%

Procedimiento:

1. Se tomaron 10 ml de muestra problema en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y se añadieron 20 ml de agua destilada. Se homogenizó la mezcla por medio de agitación y se añadieron unas gotas de fenolftaleína.
2. Se neutralizó la acidez titulable natural de la muestra con la solución de hidróxido sódico hasta la aparición de un color rosa.
3. Se añadieron 2 ml de formol a la solución neutralizada. Tras la adición del formol la muestra se volvió a acidificar y se mostró nuevamente de color blanco. Se añadieron de nuevo unas gotas de fenolftaleína
4. Se valoró la acidez con hidróxido de sodio, hasta la aparición nuevamente del color rosa.

5. Se realizaron 4 repeticiones para la yema de huevo, y 3 repeticiones para ambas mayonesas.

Cálculos:

$$\text{Factor empírico} = \frac{\% \text{ proteínas}}{\text{ml NaOH 0.1 N gastados}}$$

Ecuación 4

$$\% \text{ proteínas} = \text{ml NaOH 0.1N gastados} * \text{factor empírico}$$

Ecuación 5

2.4.2.4 Índice de peróxidos

El índice de peróxidos es una medida del oxígeno unido a las grasas en forma de peróxido. Proporciona información acerca del grado de oxidación de la muestra, siendo un método útil para predecir comienzo de la rancidez, y permite, en cierto grado, una estimación de hasta qué punto se ha alterado la grasa (Matissek et al., 1992). El índice de peróxidos (IP) indica los miliequivalentes de oxígeno en forma de peróxido por kilogramo de grasa o aceite (NMX-F-154-1987).

Técnica: Titulación (AOAC, 2000. Método 41.1.16)

Fundamento: Este método se basa en la determinación en la solución de prueba de la cantidad de peróxidos contenidos por medio de una titulación. Se disuelve la muestra en una mezcla de cloroformo y ácido acético glacial y se mezcla con una disolución de yoduro potásico. La cantidad de yodo liberada por reacción de los grupos peróxido se determina finalmente por valoración con una disolución de tiosulfato sódico (Matissek et al., 1992 y NMX-F-154-1987).

Reactivos:

- Solución de ácido acético-cloroformo ($\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CHCl}_3$). En proporción de tres volúmenes de ácido acético por dos de cloroformo.
- Solución saturada de yoduro de potasio (KI) (Blanco). Se disuelve un excedente de yoduro de potasio (KI) en agua destilada recientemente hervida y enfriada a temperatura ambiente (18 a 20°C) en cantidad tal, que quede un exceso de potasio sin disolver.
- Solución indicadora de almidón (1%). Se mezcla aproximadamente 1.0 g de almidón con agua fría hasta formar una pasta delgada; se añade esta mezcla a 100 ml de agua hirviendo y se agita constantemente.
- Soluciones estándar de tiosulfato sódico ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) a 0.1M y 0.01M. Se prepara y estandariza la solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.1M y para la solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.01M se diluye la de 0.1M con agua destilada recientemente hervida y enfriada a temperatura ambiente.

Equipo:

- Incubadora bacteriológica, Blue M. Rango de temperatura de 30 a 65°C. Marca Equipar (Figura 24)

Procedimiento:

1. Para acelerar el proceso de oxidación se colocaron aproximadamente 10 ml de mayonesa recién elaborada en un tubo de ensayo de vidrio con tapón esmerilado y fue colocado en la incubadora a 40°C y durante 7 días (Kargar et al., 2011), ver Figura 31.
2. Se pesó una porción de $5 \pm 0.5\text{g}$ de muestra de mayonesa en un matraz Erlenmeyer de 250 ml
3. Se adicionaron 30 ml de solución de ácido acético-cloroformo y se agitó hasta disolver.
4. Se adicionaron 0.5 ml de solución saturada de KI, se agitó vigorosamente y se dejó reposar en obscuridad durante 1 minuto.
5. Se adicionaron 30 ml de agua y 0.5 ml de solución indicadora de almidón 1%.

6. Se tituló lentamente con 0.1 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ sin dejar de agitar para liberar todo el I_2 de la capa de CHCl_3 hasta obtener un color blanco lechoso.
7. Cuando el gasto de solución 0.1 N de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ fue menor de 0.5 ml, se repitió la determinación utilizando solución 0.01 N de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

La determinación se efectuó para ambas mayonesas por triplicado.

Se hizo una prueba en blanco en las mismas condiciones en las que se efectuó la de la muestra, en la que no se debió exceder 0.1 ml de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, y también se realizaron 3 réplicas.



Figura 31. Tubos de vidrio con muestra de mayonesa dentro de la incubadora

Cálculos:

Se calculó el índice de peróxidos (IP) expresando los miliequivalentes de peróxido contenidos en un kilogramo de muestra mediante la siguiente fórmula:

$$I.P. = (A - A_1) \times N \times \frac{1000}{m}$$

Ecuación 6

Donde:

I.P = Índice de Peróxido (miliequivalentes de peróxido/kg de muestra).

A = ml de solución de tiosulfato de sodio gastados en la titulación de la muestra.

A₁ = ml de solución de tiosulfato de sodio gastados en la titulación del blanco.

N = Normalidad de la solución de tiosulfato de sodio.

m = Masa de la muestra (g)

2.4.2.5 Actividad de agua (aw)

Esta determinación se hizo por medio de un medidor de actividad de agua marca Testo modelo 650 (ver Figura 32), el cual realiza la medida cuando se ha llegado a la temperatura de equilibrio. La medición se efectuó a temperatura ambiente ($21\pm 0.5^{\circ}\text{C}$), y se realizaron tres réplicas para cada mayonesa, de las que se obtuvo un promedio.



Figura 32. Medidor de actividad de agua marca Testo modelo 650

2.4.2.6 pH

El valor de pH de las mayonesas se obtuvo a través del uso de un potenciómetro modelo 5997-20, marca HORIZON ECOLOGY CO, con escala de pH de 0-14 y rango de temperatura de 0 a 100°C (ver Figura 18), el cual se calibró empleando una solución reguladora de pH 7. Se siguió el procedimiento descrito por la norma NMX-F-317-S-1978, donde se usó una dispersión de 10% de mayonesa en agua destilada. Se llevaron a cabo 3 repeticiones para cada mayonesa.

2.4.2.7 Acidez total

La acidez de la mayonesa se realizó por medio de titulación empleando el método 935.57 del AOAC, 2000, donde se valoró la muestra con una solución patrón de

hidróxido de sodio usando como indicador fenolftaleína y se expresó la acidez total en ácido acético.

Se calculó el porcentaje de acidez expresado en ácido acético (CH₃COOH) empleando la ecuación 15, considerando que 1 ml de NaOH 0.1M equivale a 6.005 mg de ácido acético (NMX-F-102-S-1978). Se realizaron tres réplicas para cada mayonesa.

$$\% \text{ acidez} = \frac{\text{mg de CH}_3\text{COOH} \times 100}{\text{mg de muestra}}$$

Ecuación 7

2.4.2.8 Viscosidad aparente

Para esta determinación se empleó un Viscosímetro Brookfield modelo RVDV-II+PRO (Ver Figura 33) y la aguja S06. La prueba se realizó un día después de elaboradas ambas mayonesas, y la muestra fue colocada en un vaso de precipitados de forma alta de 200 ml con diámetro de 50 mm y altura 100 mm, cubriendo hasta la marca de 200 ml. La determinación se ejecutó a temperatura ambiente (25°C), para mantener dicha temperatura se colocó el recipiente con la muestra en un baño serológico Marca Quimis modelo Q304M1105 (Ver Figura 34) a 25°C.

La mayonesa muestra un comportamiento reológico tixotrópico pues presenta una disminución de viscosidad aparente (η) con el tiempo a velocidad de cizalla constante (Abu-Jdayil, 2003). Debido a este hecho se realizó una determinación en la que se aplicó una velocidad de 1 rpm durante 5 minutos para evaluar el decremento de viscosidad con respecto al tiempo. La prueba se realizó por triplicado y se obtuvo un promedio de cada valor de viscosidad para cada tiempo.



Figura 33. Viscosímetro Brookfield modelo RVDV-II+PRO



Figura 34. Baño serológico Marca Quimis modelo Q304M1105

2.4.3 Objetivo Particular 3

A continuación se presenta el procedimiento general que se siguió para todas las determinaciones microbiológicas (Mohos y levaduras, Mesófilos aerobios, Coliformes totales y *E. coli*). Posteriormente se describen las consideraciones individuales de cada determinación, como la temperatura y tiempo de incubación.

Las determinaciones se llevaron a cabo una vez elaborada cada mayonesa y con tres repeticiones.

Técnica: Uso de pruebas rápidas de conteo microbiológico (Placa Petrifilm^{MR} marca 3M), ver Figura 35.



Figura 35. Placa Petrifilm^{MR} marca 3M

(http://solutions.3m.com.mx/wps/portal/3M/es_MX/FSD_LA/FoodSafety/product-applications/one/)

Equipo:

- Incubadora bacteriológica marca Equipar modelo Blue M. Rango de temperatura de 30 a 65°C (Figura 24).
- Autoclave marca ALLAMERICAN modelo 25X-1 (Figura 36).



Figura 36. Autoclave ALLAMERICAN mod 25X-1

Reactivos:

- Solución de hidróxido de sodio 0.1N

Procedimiento:

1. Preparación de la muestra: Se preparó una dilución 1:10 de la muestra con agua destilada en un tubo de ensayo previamente esterilizado. Posteriormente, a esta muestra diluida, se le ajustó el pH entre 6.6 y 7.2 adicionando la solución de hidróxido de sodio, para la mayonesa control, se le adicionaron 0.34 ml y, para la mayonesa tipo, 0.61 ml. Se homogenizó invirtiendo el tubo.
2. Inoculación: Se colocó un mililitro de la muestra diluida en el centro de la película cuadrículada interior de la Placa Petrifilm^{MR}. Después se deslizó la película hacia abajo evitando atrapar burbujas de aire (Ver Figura 37). En seguida se dispersó la muestra en la placa con ayuda del dispersor adecuado para dicha placa marca 3M.

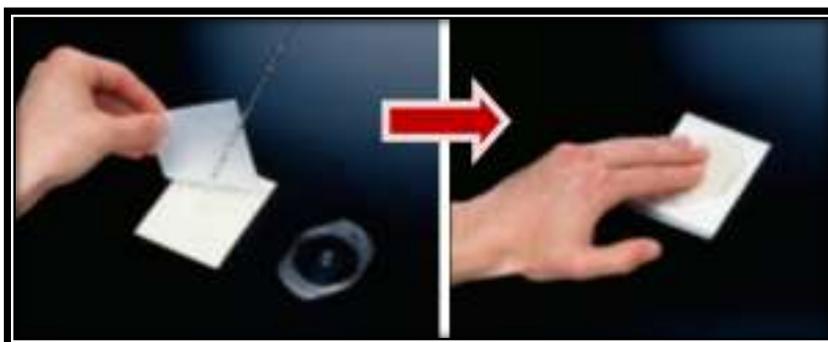


Figura 37. Inoculación de la muestra

(http://solutions.3m.com.mx/wps/portal/3M/es_MX/FSD_LA/FoodSafety/product-applications/one/)

3. Incubación: Se incubaron las placas en la Incubadora bacteriológica, además para mantener el ambiente humectado se colocó un recipiente pequeño con agua estéril. El tiempo y temperatura de incubación depende de cada determinación.
4. Interpretación: Las colonias en las placas fueron contadas y después se empleó la Guía de Interpretación 3M específica para cada determinación para leer los resultados.

Cálculos:

Para la determinación del número de unidades formadoras de colonia (UFC) presentes por cada gramo de muestra se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{UFC}{g} = \frac{\text{Cuenta de la placa} * \text{Factor de dilución}}{\text{Volumen de la muestra}}$$

Ecuación 8

2.4.3.1 Mohos y Levaduras

Cuando los mohos se desarrollan en los alimentos dan lugar a cambios físicos y químicos que se traducen en descomposición y alteración. Las levaduras con frecuencia deterioran mayonesas, debido a que toleran bien el pH ácido, que no es soportado por la mayoría de las bacterias, quedando sin competencia (Olivas y Alarcón, 2001), por lo tanto es muy importante esta determinación en este estudio. Se tiene que considerar la estimación cuantitativa además de la cualitativa, pues un mayor número en el conteo total indicará una mayor posibilidad de descomposición en el alimento (Olivas y Alarcón, 2001).

Técnica: Uso de pruebas rápidas de conteo microbiológico (Placa Petrifilm^{MR} marca 3M) para recuento de Mohos y Levaduras.

Fundamento: Esta placa es un sistema de medio de cultivo que contiene nutrientes de "Sabhi", dos antibióticos, indicador de fosfatos (BCIP), un agente gelificante soluble en agua fría y un tinte indicador que facilita la enumeración de las colonias.

Incubación: A temperatura entre 21°C 25°C durante 5 días (Método oficial 997.02 de AOAC, 2000).

Interpretación: Las levaduras son colonias pequeñas con un rango de color desde beige o crema hasta azul verdoso y no difusas, pueden también tener tonos rosas, tienen apariencia abultada, es decir con una tercera dimensión.

Los mohos son colonias grandes, con bordes difusos, de colores variables, por ejemplo: café, beige, naranja, azul verdoso, etc., tienen apariencia plana y un centro oscuro y se expanden difusamente alrededor del mismo (Ver Figura 38).



Figura 38. Ejemplo de placa para conteo de mohos y levaduras. Conteo de levaduras=12, conteo de mohos=4
(http://solutions.3m.com.mx/wps/portal/3M/es_MX/FSD_LA/FoodSafety/product-applications/one/)

2.4.3.2 Mesófilos aerobios

La determinación de bacterias aerobias es empleada como índice microbiano de calidad de los alimentos determinando, en forma aproximada, la flora total pero sin especificar tipos de colonias (Olivas y Alarcón, 2001).

Técnica: Uso de pruebas rápidas de conteo microbiológico (Placa Petrifilm^{MR} marca 3M) para recuento de aerobios.

Fundamento: Esta placa contiene los nutrientes de los Métodos Estándar, un agente gelificante soluble en agua fría y un indicador tetrazolio que facilita la numeración de colonias coloreándolas de rojo.

Incubación: A temperatura de 35°C durante 48 hrs (Método oficial 990.12 del AOAC, 2000).

Interpretación: Cada colonia de color rojo pertenece a aerobios, un ejemplo de ello se puede observar en la Figura 39.

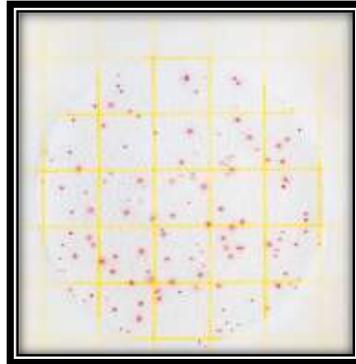


Figura 39. Ejemplo de placa para conteo de aerobios

(http://solutions.3m.com.mx/wps/portal/3M/es_MX/FSD_LA/FoodSafety/product-applications/one/)

2.4.3.3 Coliformes totales

Las bacterias coliformes son bacilos Gram negativos, aerobios o anaerobios facultativos, no esporulados, que fermentan la lactosa con producción de gas a las 48 horas de incubación a 35°C. Se encuentran en forma abundante y constante en heces humanas y en menor grado en la de los animales. La presencia de coliformes en alimentos indica contaminación fecal o malas prácticas de trabajo en el manejo de los alimentos. Las dos especies representativas más importantes son *Escherichia coli* y *Enterobacter aerogenes* (Olivas y Alarcón, 2001).

Técnica: Uso de pruebas rápidas de conteo microbiológico (Placa Petrifilm^{MR} marca 3M) para recuento de coliformes.

Fundamento: La Placa Petrifilm^{MR} para Recuento de Coliformes Totales (Coliform Count CC) contiene nutrientes de bilis rojo violeta (VRB), un agente gelificante en agua fría y un indicador (TTC = tri-phenyl tetrazolium chloride) que facilita la enumeración de las colonias. La lámina superior atrapa el gas producido por la fermentación de la lactosa de los Coliformes.

Incubación: A temperatura de 32°C durante 24 hrs (Método oficial 991.14 del AOAC, 2000).

Interpretación: Colonias de color rojo con gas como en la Figura 40.

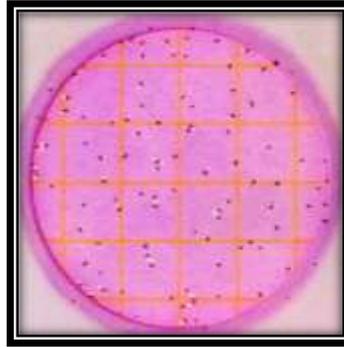


Figura 40. Ejemplo de placa para conteo de coliformes totales= 69

(http://solutions.3m.com.mx/wps/portal/3M/es_MX/FSD_LA/FoodSafety/product-applications/one/)

2.4.3.4 *E. coli*

Como se mencionó anteriormente, la bacteria *Escherichia coli* pertenece a las bacterias coliformes, este organismo está siempre presente en los intestinos y normalmente no se encuentra presente ni en el suelo ni en el agua; por lo tanto su presencia indica contaminación fecal (Olivas y Alarcón, 2001).

Técnica: Uso de pruebas rápidas de conteo microbiológico (Placa Petrifilm^{MR} marca 3M).

Fundamento: *E. coli* es capaz de crecer en medios conteniendo los nutrientes del Violeta Rojo Bilis (VRB). La mayoría de *E. coli* (aprox. el 97%) producen beta-glucuronidasa, que reacciona con un indicador (colorante) BCIG presente en la placa Petrifilm EC y que hace que la colonia sea de color azul a rojo-azul. Aproximadamente el 95% de *E. coli* producen gas a partir de la lactosa, lo que viene indicado como colonias asociadas (aproximadamente el diámetro de una colonia) a gas atrapado.

Incubación: A temperatura de 35°C durante 48 hrs (Método oficial 991.14 del AOAC, 2000).

Interpretación: Colonias azules con gas para *E. coli* y todas las colonias con gas (azules y rojas) para coliformes, ver Figura 41.

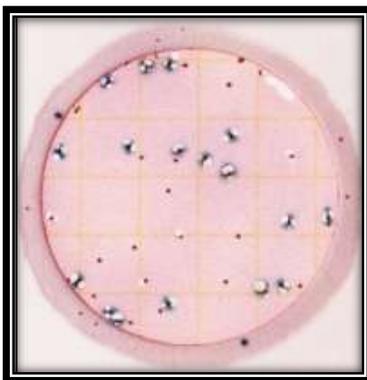


Figura 41. Ejemplo de placa para conteo de *E. coli*

(http://solutions.3m.com.mx/wps/portal/3M/es_MX/FSD_LA/FoodSafety/product-applications/one/)

2.4.4 Objetivo Particular 4

Método: 976.26 (AOAC, 2000)

El equipo utilizado fue un cromatógrafo de gases Buck Scientific Inc, modelo 910, que cuenta con un detector de ionización de flama (Figura 42) y el Software PeakSimple 3.29 para el análisis de la muestra. Se empleó una columna capilar no polar marca Agilent J&W, tipo DB-5MS cuya longitud es de 30 m, diámetro interno de 0.53 mm y grosor de 1.5 μm , usando nitrógeno como gas acarreador. Se empleó una temperatura inicial de 60°C, aumentando 30°C por minuto hasta la temperatura final de 300°C, y manteniendo en dicha temperatura durante 30 minutos.

Para la derivatización de las soluciones estándar de colesterol y de las muestras de mayonesa, se adicionó una cantidad mayor de los derivatizantes de lo indicado por el método, esto debido a que no se formaba el complejo derivatizado y por lo tanto no se presentaba la señal del colesterol. Por tal razón, para lograr la correcta

derivatización del colesterol, se adicionaron 0.4 ml de Hexametildisilazano y 0.2 ml de Trimetilclorosilano.

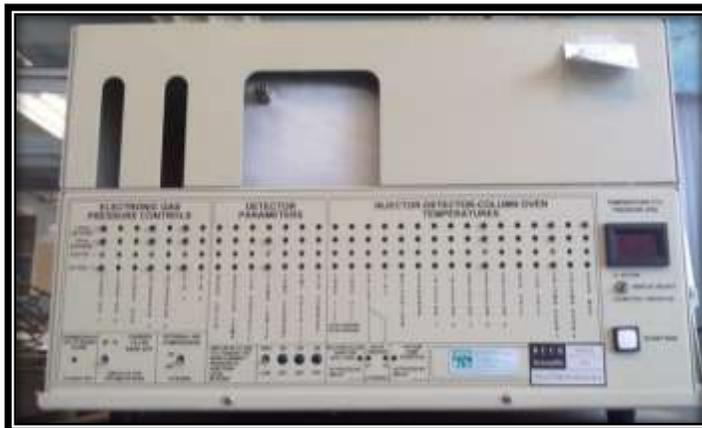


Figura 42. Cromatógrafo de gases Buck Scientific Inc, modelo 910

Se usó un blanco que consistió en 1 ml de hexano, 1 ml de N-N dimetilformamida y de los derivatizantes, también inyectando 1 μ l por triplicado.

Se realizó una curva de calibración empleando un estándar de colesterol de grado analítico marca Sigma-Aldrich de concentración 10mg/ml en cloroformo, a partir del cual se prepararon 6 soluciones estándar de trabajo de concentraciones de 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mg/ml, las cuales fueron derivatizadas. Se inyectó por triplicado 1 μ l de cada solución estándar al cromatógrafo. Se determinó el área de pico para cada concentración de solución estándar y se construyó una curva de calibración con la concentración de colesterol en función del área de cada pico (Ver Figura 43).

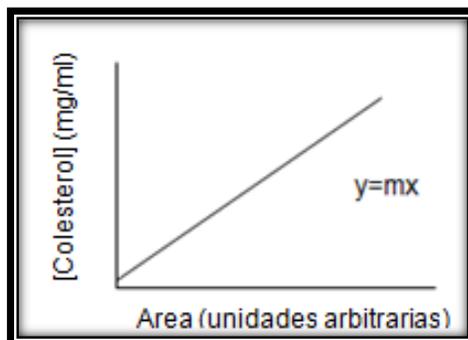


Figura 43. Concentración de colesterol en función del área de pico

Una vez construida la curva se realizó una regresión lineal ($y=mx$), donde “y” es la concentración de cada solución de colesterol y “x” el área de cada pico.

Posteriormente se prosiguió al análisis de las muestras de mayonesa, las cuales también fueron derivatizadas. El volumen de inyección fue también de 1 μ l, y el análisis se realizó por triplicado. Se obtuvo el valor de área de pico y fue sustituido como la variable “x” y multiplicado por la pendiente “m” obtenida en la regresión lineal de la curva de calibración, obteniendo así el valor de la variable “y”, es decir la concentración de colesterol en la muestra de mayonesa.

Finalmente se obtienen los miligramos (mg) de colesterol por cada 100 g de muestra de mayonesa sustituyendo en la Ecuación 17 los datos requeridos.

$$\begin{aligned} & \text{mg colesterol} / 100 \text{ g de muestra} \\ & = \frac{\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \text{ de colesterol en la solución de la muestra a partir de la curva estándar} \times 100}{\frac{\text{g}}{\text{ml}} \text{ de solución de muestra usada para la derivatización.}} \end{aligned}$$

Ecuación 17

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Actividades preliminares

- Obtención de quitosán

Se obtuvieron 325 g de caparazones molidos, los cuales fueron sometidos al proceso anteriormente descrito para la obtención del quitosán, generando 75.1 g de quitosán, lo cual representa un rendimiento del 23.11% con respecto del total de caparazones molidos. Posteriormente se caracterizó al quitosán obtenido, el cual fue usado para la elaboración de la mayonesa tipo baja en colesterol.

Grado de desacetilación: En la Figura 44, se puede observar la curva de valoración del quitosán. Se presentan los dos puntos de inflexión obtenidos, el primero corresponde a 9.5 ml de NaOH 0.1 M y el segundo a 24.5 ml. Sustituyendo estos datos en la ecuación 1 (ver página 30) y realizando los cálculos correspondientes se obtuvo un grado de desacetilación para el quitosán de **83.88%**, este valor es parecido a lo obtenido por Balanta et al., 2010 (80.68%) y Solis et al., 2007 (80.83%), que emplearon también el método potenciométrico. El quitosán obtenido posee un grado de desacetilación que se encuentra dentro del intervalo que identifica a un quitosán de alto peso molecular (70 y 90%) (Balanta et al., 2010). Esta característica es provechosa en este estudio debido a que, un quitosán con alto grado de desacetilación, puede neutralizar más fácilmente las cargas negativas en la superficie de las gotas en una emulsión al poseer un alta densidad de carga (número de grupos cargados positivamente por unidad de longitud), formando una red tridimensional alrededor de las gotas de la emulsión más estable (Mey et al., 2009 y Mun et al., 2006).

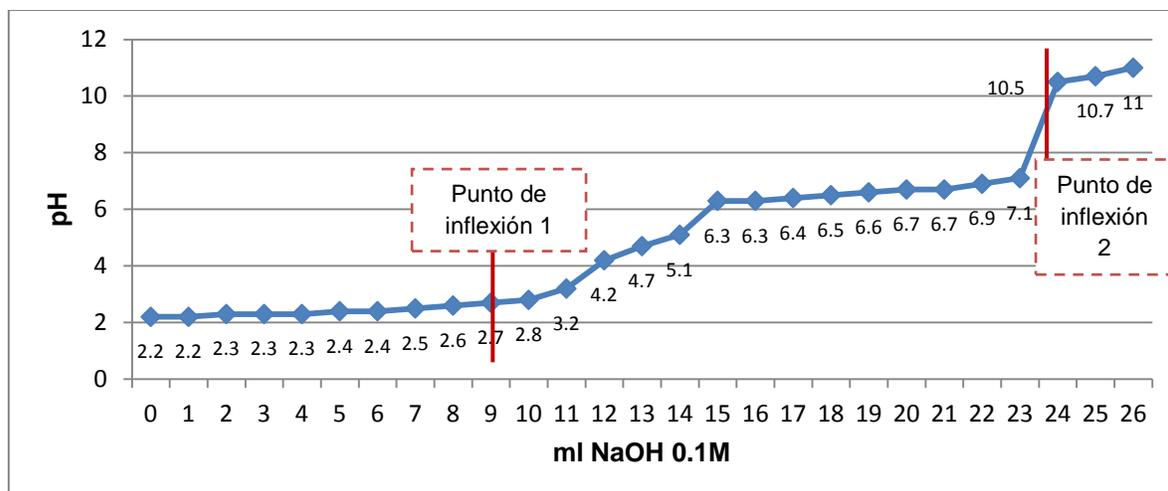


Figura 44. Curva de valoración del quitosán

Peso molecular: Los resultados de los cálculos para obtener las viscosidades relativa, específica y reducida se encuentran en la tabla 4.

Tabla 4. Viscosidad relativa, específica y reducida de las soluciones de quitosán y buffer

Solución	Tiempo (s)	η_{rel}	$\eta_{especifica}$	$\eta_{reducida}$ (dl/g)
Buffer	85.3	-	-	-
[0.2] (g/dl)	260	3.0480	2.0480	10.2403
[0.08] (g/dl)	138.4	1.6225	0.6225	7.7813
[0.064] (g/dl)	127.3	1.4923	0.4923	7.6934
[0.04] (g/dl)	108.4	1.2708	0.2708	6.7702
[0.02] (g/dl)	90	1.0550	0.0551	2.7549

En la Figura 45 se presenta el gráfico de la viscosidad reducida de cada solución en función de la concentración. Con ello se obtuvo la viscosidad intrínseca, que es usada para obtener el peso molecular promedio viscosimétrico.

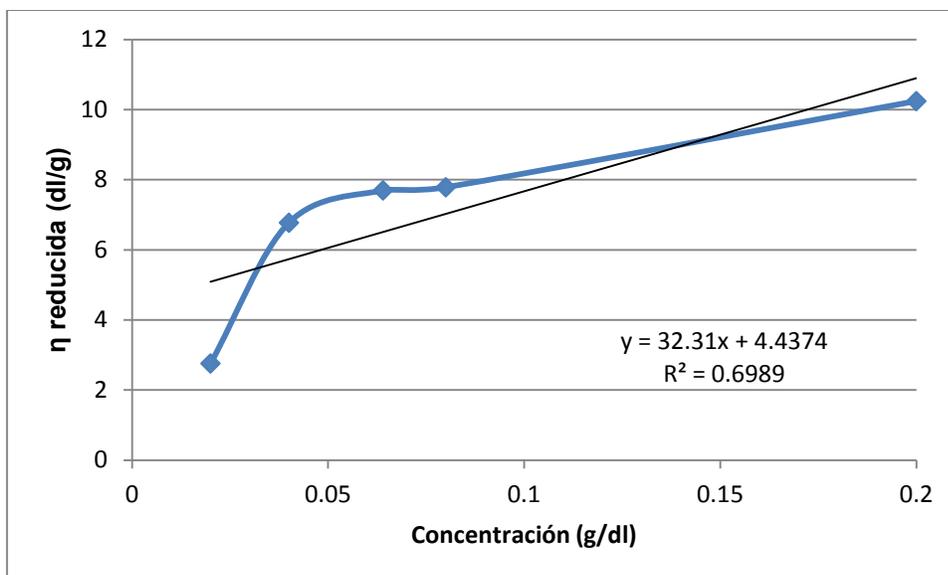


Figura 45. Viscosidad reducida de las concentraciones de quitosán en función de la concentración para la obtención de viscosidad intrínseca

$$Y = 32.31X + 4.4374$$

$$\eta_{intrínseca} = 4.4374 \text{ dl/g}$$

Sustituyendo el valor de la viscosidad intrínseca en la ecuación 9 (ver página 35), así como el valor de las constantes requeridas mencionadas anteriormente (k y a), el peso molecular promedio viscosimétrico que se obtuvo fue de **90,297.89 g/mol ó 90.297 KDa**. Según Klinkesorn y Namatsila, 2009, se considera un quitosán de bajo peso molecular cuando tiene un valor de 1-300 kDa, así que de acuerdo a ello se considera que el peso molecular del quitosán obtenido es bajo, dicho resultado es conveniente en este estudio ya que, un quitosán con bajo peso molecular, exhibe una mejor actividad de emulsionante que uno con alto peso molecular, al generar gotas más pequeñas durante la formación de la emulsión, favoreciendo con ello la formación de la red tridimensional de quitosán, que atrapa las gotas de aceite (Li y Xia, 2011).

- Formulación de mayonesa tipo baja en colesterol

Determinación de la concentración de quitosán para elaborar la mayonesa tipo baja en colesterol.

En la Tabla 5 se presentan las observaciones y los índices de cremado que obtuvieron las mayonesas con diferentes soluciones de concentración de quitosán/vinagre 1%, 1.5%, 2%, 2.5% y 3% (p/p). Los resultados muestran que, a mayor concentración de quitosán adicionado, el resabio astringente fue más perceptible. Las mayonesas de concentraciones de 2.5% y 3% tuvieron una apariencia visual más parecida a la de la mayonesa control, sin embargo la concentración de 3% presentó índices de cremado muy altos con respecto a la mayonesa control. Por lo tanto, se eligió la concentración de **2.5%** puesto que fue la que proporcionó una apariencia más parecida a la mayonesa control, con un resabio astringente poco marcado y con índices de cremado similares a los obtenidos con la mayonesa tradicional.

Tabla 5. Características de mayonesas control y con sustituciones de concentración quitosán/vinagre

MAYONESA	IMAGEN	OBSERVACIONES	% C _{cs}	% C _{cc}
Control		Apariencia de masa homogénea cremosa Sabor característico de la mayonesa	1.46	13.59
1%		Apariencia no cremosa No es astringente	2	14.34

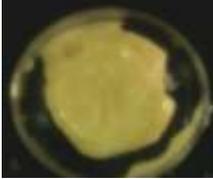
1.5%		Apariencia no cremosa Muy ligero resabio astringente	2.3	14.39
2%		Apariencia espesa Ligero resabio astringente.	1.27	12.38
2.5%		Apariencia cremosa Ligero resabio astringente	1.54	13.23
3%		Apariencia cremosa Acentuado resabio astringente	4.02	16.89

- Selección del porcentaje de huevo a sustituir por quitosán.

A continuación se presentan las observaciones en cuanto a apariencia física, resabio astringente e índices de cremado para cada una de las mayonesas con porcentajes de sustitución de yema 20%, 25%, 30% y 40% (Ver Tabla 6). Todas

estas mayonesas fueron elaboradas con la concentración de quitosán elegida de 2.5%.

Tabla 6. Características de mayonesa patrón y mayonesas con diferentes sustituciones de yema de huevo.

Mayonesa	Apariencia física		Resabio astringente	% C_{cs}	% C_{cc}
	Recién elaborada	40 días de almacenamiento			
Control			Ausencia	1.56	13.59
Sustitución de 20%			Ligero	3.22	12.45
Sustitución de 25%			Ligero	5.11	12.56
Sustitución de 30%			Ligero	2.75	11.25
Sustitución de 40%			Acentuado	3.10	14.87

Como se observa en la Tabla 6 las mayonesas con sustitución de 20 y 25% tuvieron una apariencia diferente (menos cremosa) después de un tiempo de almacenamiento (40 días), en cambio, las mayonesas con sustitución de 30 y 40%,

presentaron una apariencia física similar a cuando fueron recién elaboradas, después del almacenamiento. Con la sustitución de 40% el resabio astringente producido por la integración de quitosán a la formulación fue muy marcado y esto no es deseable. El porcentaje de sustitución elegido fue de **30%**, puesto que esta mayonesa presentó una apariencia física más parecida a la mayonesa control y después del tiempo de almacenamiento se mantuvo similar a la apariencia física que poseía una vez elaborada, presentó un resabio astringente ligero, el índice de cremado de la capa de suero fue el más parecido al índice de cremado de la mayonesa control y el valor de gradiente de cremado de la capa cremada fue inclusive menor que para la mayonesa control.

Para eliminar el ligero resabio astringente, que se presentó por la adición de quitosán, se modificó la formulación de la mayonesa tradicional incrementando tanto el porcentaje de azúcar, (que de acuerdo a Ares G. et al., 2009 reduce la astringencia) como el porcentaje de limón (para que la mayonesa presentará este sabor más acentuado). Con estas modificaciones hechas, la formulación de la mayonesa, que se muestra en la Tabla 7, no presentó astringencia.

Tabla 7. Formulación de la mayonesa tipo baja en colesterol

INGREDIENTE	%
Aceite	77.63
Yema de huevo	6.88
Solución Quitosán/Vinagre	7.88
Agua	4.92
Sal	0.98
Azúcar	0.55
Limón	1.14

3.2 Objetivo Particular 1

3.2.1 Tamaño de partícula

Una emulsión ideal consiste en gotas esféricas muy juntas dentro de la fase continua (comúnmente en emulsiones alimenticias el diámetro de las gotas varía entre $0.1\mu\text{m}$ y $50\mu\text{m}$). Sin embargo en la mayonesa, por su alto contenido en aceite, se presenta una cercanía y aglomeración de las gotas, de tal manera, que su forma esférica se distorsiona y además se forman gotas más pequeñas, que se localizan entre las gotas esféricas más grandes (Coupland y McClements, 1996; Depree y Savage, 2001; Laca et al., 2010 y Langton et al., 1999). Esto puede observar en las figuras 46, 47, 48 y 49. Por la misma razón (alta concentración de gotas de aceite), las micrografías de dichas figuras no fueron muy informativas en cuanto a detectar si las gotas están floculadas o sólo muy juntas.

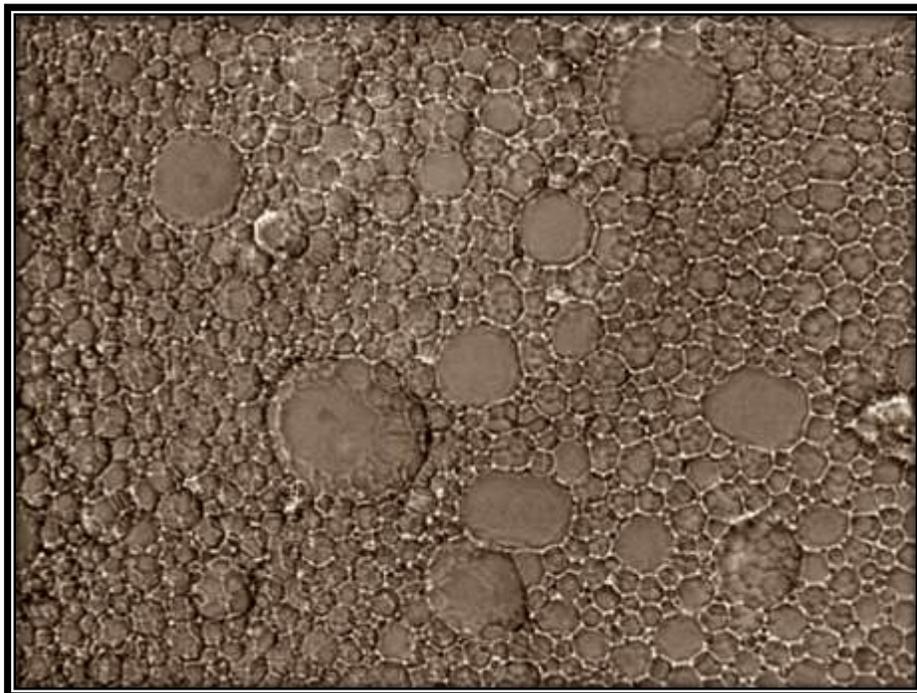


Figura 46. Microscopía óptica de mayonesa control recién elaborada (magnificación de 40x)



Figura 47. Microscopía óptica de mayonesa control envejecida (magnificación de 40x)

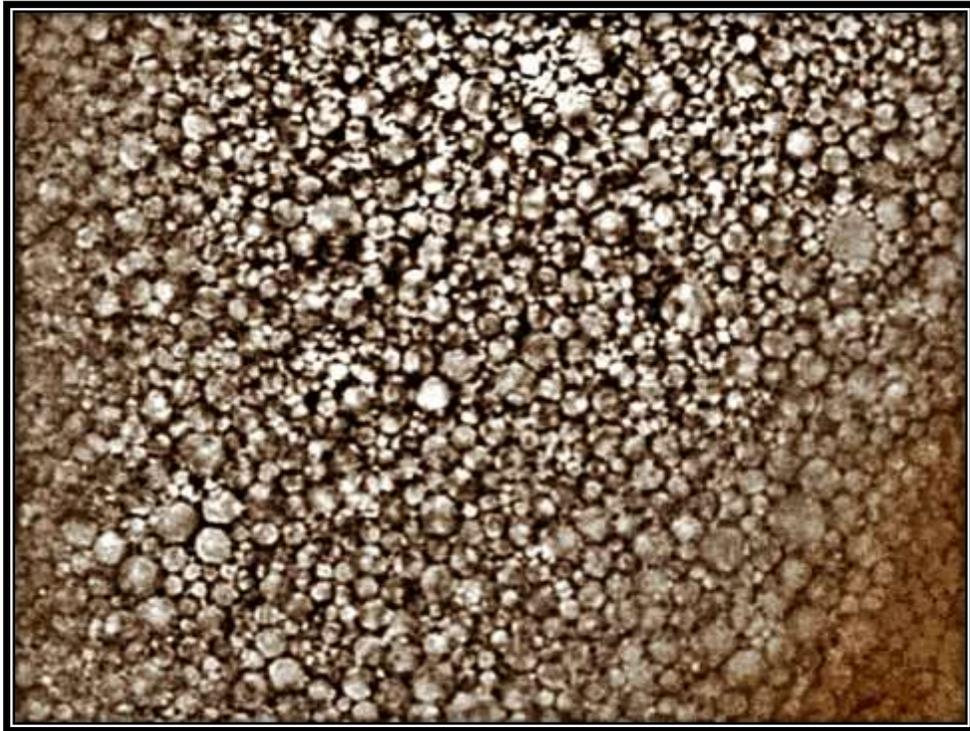


Figura 48. Microscopía óptica de mayonesa tipo recién elaborada (magnificación de 40x)

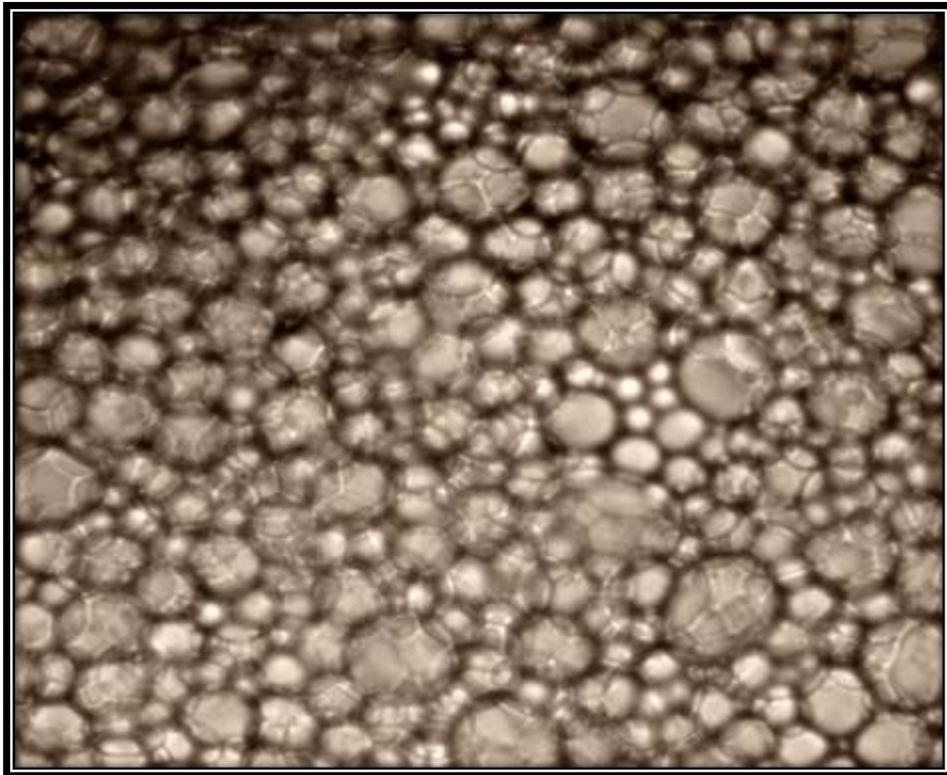


Figura 49. Microscopía óptica de mayonesa tipo envejecida (magnificación a 40x)

Diámetro promedio de gota

Como se mencionó previamente, se utilizó un analizador de imagen para determinar el tamaño de gota. El promedio de diámetro de gota de las diez mediciones realizadas para cada mayonesa se presenta en la Tabla 8.

Tabla 8. Diámetro promedio de gota de las mayonesas control y tipo recién elaboradas y envejecidas

Mayonesa	Diámetro (μm)	S	C. V. (%)
Control	5.0477	1.68	33.43
Control envejecida	13.5987	2.26	16.63
Tipo	4.4610	1.43	32.03
Tipo envejecida	8.6430	1.74	20.08

Es importante mencionar que el tamaño de gota de ambas mayonesas, tanto una vez elaboradas como después de un envejecimiento, resultó ser polidisperso, es decir que el diámetro de todas las gotas es diferente, esto se puede confirmar en la micrografías mostradas anteriormente (Figuras 46, 47, 48 y 49). La polidispersidad en el tamaño de las gotas es característico de las emulsiones y se debe al alto contenido en aceite de la emulsión, inclusive, existe un límite teórico de 74% de contenido en aceite (en volumen) para la formación de gotas de igual tamaño, y al sobrepasarlo se presenta la polidispersidad en el tamaño de las gotas y su deformación (Langton et al., 1999 y Robins et al., 2002).

Lo anterior explica la razón por la que los coeficientes de variación presentados en la Tabla 8 son muy grandes. Dicho comportamiento también se presentó en las mayonesas evaluadas en Langton et al., 1999 y en Worrasinchai et al., 2006.

Los diámetros de gota de todas las muestras de mayonesas mostrados en la Tabla 8 se encuentran entre 3-14 μm , que es el rango de tamaño de gota que posee una mayonesa (Laca et al., 2010), además también se encuentran dentro del intervalo de diámetro de gota para mayonesa de otros estudios (Kerkhofs et al., 2011; Su et al., 2010 y Worrasinchai et al., 2006), lo que significa que se obtuvo un diámetro de gota aceptable.

Existen muchos factores que pueden influenciar el diámetro del glóbulo de aceite de una emulsión como son el tipo de emulsificante, cantidad de fase de aceite, tipo de preparación y orden de adición de los ingredientes (Wendin et al., 1997). En este estudio la mayonesa tipo contiene, además de yema de huevo como emulsificante, quitosán, y está diferencia en el emulsificante tuvo un efecto en el diámetro de gota de aceite, puesto que comparando los diámetros de gota de la mayonesa control con la mayonesa tipo, ambas recién elaboradas, la mayonesa tipo resultó tener un diámetro 11.63% menor que la mayonesa control con una diferencia significativa ($p < 0.0001$). Esto concuerda con Speiciene et al., 2007, donde la adición de quitosán permitió la formación de gotas más pequeñas. Este efecto es atribuido a que, al

adicionar el quitosán durante la formación de la emulsión, las gotas de aceite obtienen una carga altamente positiva (generando fuerzas de repulsión electrostática entre ellas), entonces se disminuye la tensión interfacial (entre la fase acuosa y la fase de aceite) y se promueve su fragmentación en gotas más pequeñas, que quedan atrapadas en la red tridimensional que forma el quitosán al incrementar la viscosidad de la fase continua (Bajaj et al., 2011).

Acorde a la Tabla 8, se presentó un incremento en el diámetro promedio de gota de las mayonesas envejecidas con respecto al de las mayonesas recién elaboradas, el incremento en el tamaño de gota de la mayonesa durante el almacenamiento es debido a que, al tratarse de una emulsión con alta concentración de aceite, tiende a presentar coalescencia de las gotas de aceite, lo cual ocurre después de que las gotas han tenido contacto por un largo periodo de tiempo (Laca et al., 2010 y Worrasinchai et al., 2006). Sin olvidar que, las emulsiones son inestables termodinámicamente, debido al carácter inmisible de las dos fases que la componen, y por lo tanto tienden regresar a su forma estable, incrementando el tamaño de gota a través de la difusión del aceite en el sistema, exhibiendo posteriormente floculación y coalescencia (Capek, 2004).

Sin embargo la diferencia de diámetros fue 44% menor para la mayonesa tipo, presentando diferencia significativa ($P < 0.0005$) con un incremento del 94%, por otro lado, para la mayonesa control, el aumento en el diámetro de gota después del envejecimiento, fue del 169%, esto quiere decir que la mayonesa tipo es más estable a la coalescencia de las gotas de aceite, esto es debido a que la adición de quitosán satura la superficie de las gotas generando sobre su superficie una carga altamente positiva, generando fuerzas de repulsión entre ellas (Mun et al., 2006). Además la presencia de quitosán en el sistema coloidal puede mejorar la estabilidad de la emulsión retardando o previniendo el movimiento de las gotas debido al incremento de la viscosidad de los alrededores de la fase continua, previendo o inhibiendo la separación de fases (Moschakis et al., 2010).

Considerando que para preparar una emulsión estable, se debe lograr un tamaño de partícula pequeño, y para ello, se debe utilizar un emulsificante adecuado que evite la difusión de las gotas de aceite en el sistema y así prevenga la coalescencia (Lissant, 1974), el uso del quitosán como emulsionante en una mayonesa resulta conveniente, pues proporcionó un tamaño de partícula más uniforme en la mayonesa, esto puede comprobarse al comparar las Figuras 46 y 47, en donde se observa que la mayonesa tipo presentó gotas de aceite con diámetros más parecidos, siendo menos polidispersa. Además, la adición de quitosán en la mayonesa, también generó un diámetro de gota más fino que el de la mayonesa control, generando así, una mejor estabilidad a la coalescencia, que usando sólo yema de huevo como en el caso de la mayonesa tradicional.

3.2.2 Cremado

Después del tiempo de centrifugación establecido se observaron 3 capas: la capa de grasa sedimentada, la capa intermedia “emulsión” y la capa de cremado hasta arriba (rico en aceite) como se puede ver en la Figura 50.

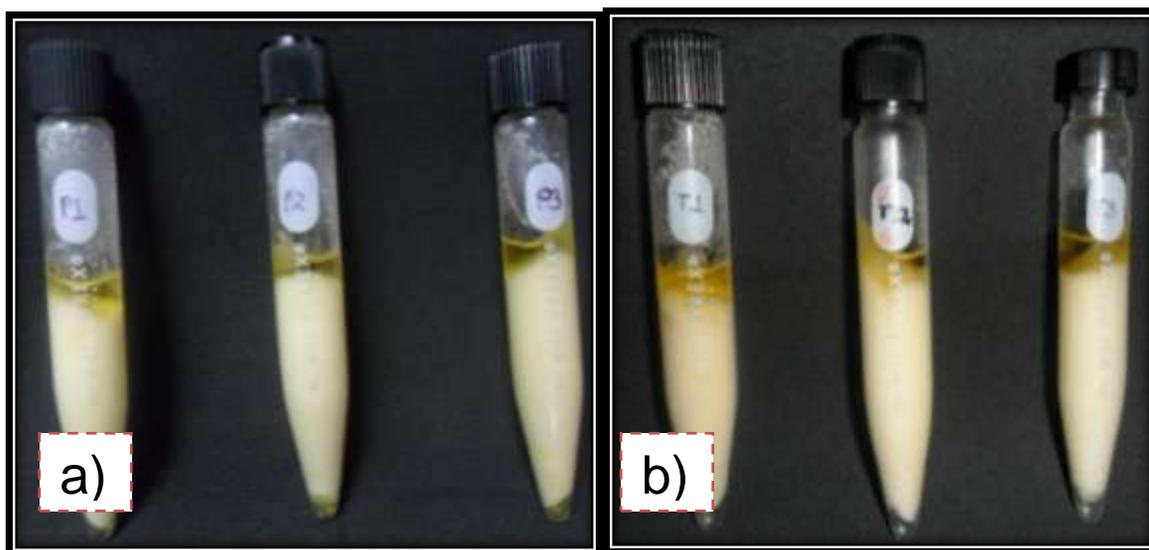


Figura 50. Tubos cónicos de vidrio con muestra después de la centrifugación.
a) Mayonesa control, b) Mayonesa tipo (3 réplicas para ambas)

Como se puede observar en la Tabla 9, el porcentaje del índice de cremado de la capa de suero de la mayonesa tipo es mayor que el de la mayonesa control, lo que quiere decir que la primera presenta un mayor grado de agregación (Wang et al., 2010), esto se puede deber a que la mayonesa control contiene mayor porcentaje de yema de huevo en la formulación, lo que resulta en una mayor concentración de proteína que atrapa a las gotas de aceite en la red que forman dichas macromoléculas, incrementando así el espesor la capa interfacial, que es una resistencia suficiente a la inestabilidad (Anton et al., 2000 y Nikovska, 2010), de la que carece en cierto grado la mayonesa tipo, al contener un porcentaje menor de yema de huevo (30%), con respecto a la mayonesa control.

Por otro lado, el gradiente de la capa cremada de la mayonesa tipo, fue 17% menor, con respecto a la mayonesa control, lo que indica que existe una menor coalescencia de gotas de aceite en la mayonesa tipo, lo que también se mostró en los resultados del tamaño de partícula, resultado de la adición de quitosán y la doble capa interfacial relativamente gruesa y eléctricamente cargada que produce este biopolímero (Mey et al., 2009), pues dicha película interfacial alrededor de las gotas de aceite regula las interacciones entre las gotas (Denmat et al., 2000) evitando a las gotas de aceite coalescer. Por consiguiente estos resultados demuestran que existe una interacción entre el quitosán positivamente cargado y los ácidos grasos negativamente cargados, los cuales están contenidos en la fase aceite (Jumaa y Muller, 1999).

La mayonesa tipo tiene una menor tendencia a coalescer que la mayonesa control, considerando que la coalescencia acelera el proceso de cremado (Worrasinchai et al., 2006), se considera entonces que la mayonesa tipo es más estable al cremado que la mayonesa control, este resultado coincide con Speiciene et al., 2007 en el que la adición de quitosán mejora la estabilidad al cremado al disminuir la difusión de las gotas y flóculos.

Tabla 9. Resultados de cremado de mayonesa control y mayonesa tipo

Muestra	% C_{cs}	S	C. V. (%)	% C_{cc}	S	C.V. (%)
Mayonesa Control	1.46	0.0946	6.48	13.59	0.2173	1.60
Mayonesa tipo	2.75	0.0036	2.20	11.25	0.2902	2.58

3.2.3 Separación de fases

La mayonesa tipo no mostró separación de fases después del tiempo de observación señalado, al igual que la mayonesa control. Esto puede ser observado en la Figura 51. Al no presentarse separación de fases en ambas mayonesas, se puede decir que son emulsiones estables. Esto demuestra que la adición de quitosán en la mayonesa tipo, permitió la misma estabilidad en cuanto a separación de fases, que si hubiera contenido sólo yema de huevo como emulsificante como en la mayonesa control.

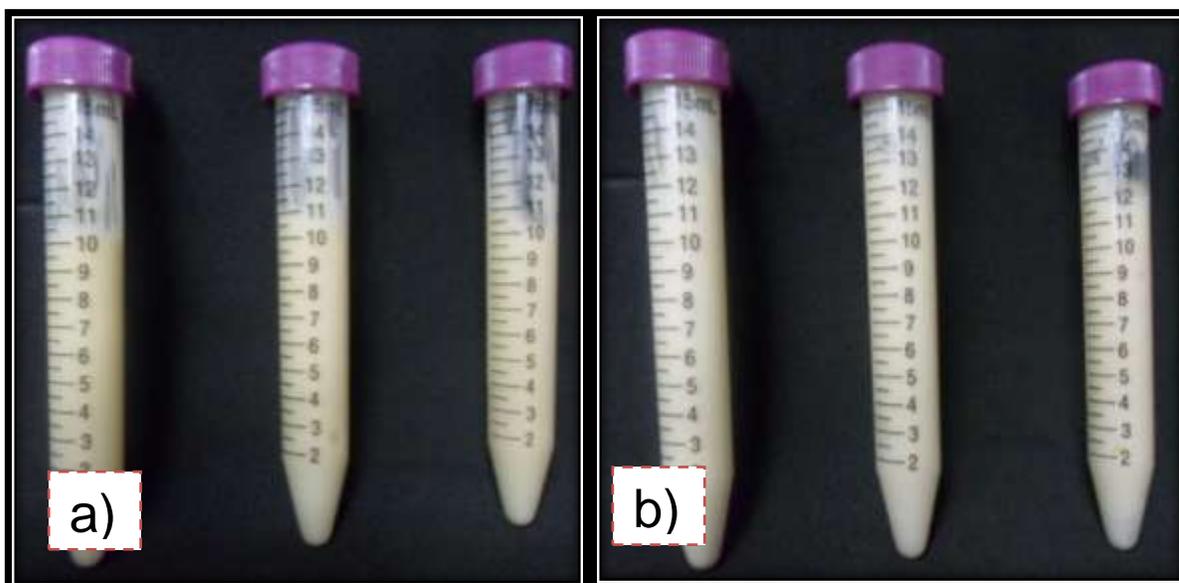


Figura 51. Prueba de separación de fases después de 30 días.
a) Mayonesa control, b) Mayonesa tipo (3 réplicas para ambas)

3.3 Objetivo Particular 2

3.3.1 Grasa

Los resultados presentados en la Tabla 10 muestran que el porcentaje de grasa de la mayonesa tipo es menor que el porcentaje de grasa de la mayonesa control (3.7% menor). Dentro de la composición química de la yema de huevo, 22% pertenece a grasas y aceites (Matteini y Moles, 2001), por lo que el menor porcentaje de grasa que presenta la mayonesa tipo se debe a la menor adición de yema de huevo.

Según la literatura una mayonesa contiene de entre 74.88 a 84.88% de grasa (Morales y Tenuta, 2005; Worrasinchai et al., 2006) por lo tanto los resultados obtenidos en esta experimentación se consideran veraces debido a que se encuentran dentro de dicho rango, lo que significa que el método Gerber fue adecuado para determinar el porcentaje de grasa de las mayonesas, obteniendo coeficientes de variación excelentes (ver Tabla 10).

Tabla 10. Porcentaje de grasa de mayonesa control y mayonesa tipo

Mayonesa	% Grasa	S	C.V. (%)
Control	81	1	1.23
Tipo	78	0	0

3.3.2. Humedad

De acuerdo los resultados mostrados en la Tabla 11 la mayonesa control presentó un menor porcentaje de humedad que la mayonesa tipo, y además ambos valores de humedad en las mayonesa son similares a los encontrados a la literatura, que van desde un 11.49% (Worrasinchai et al., 2006) a un 16.79% (Morales y Tenuta, 2005).

Tabla 11. Porcentaje de humedad de mayonesa control y mayonesa tipo

Mayonesa	% Humedad	S	C.V. (%)
Control	12.06	1.08	8.96
Tipo	14.52	0.63	4.34

3.3.3 Proteína

Para determinar el porcentaje de proteína de las mayonesas, se utilizó un método comúnmente empleado para determinación en proteínas en leches y quesos, pues otros métodos realizados no sirvieron como en el caso del método micro Kjeldahl, que resultó inconveniente debido al bajo contenido en proteína, (según lo reportado por Laca et al., 2010; Liu et al., 2007; Nahla et al., 2011; Pons et al., 1994 y Worrasinchai et al., 2006 se encuentra en un rango de 1.04 a 2.8%) y alto contenido en grasa de la mayonesa.

El factor empírico obtenido para la yema de huevo fue de 1.25 con coeficiente de variación de 0.57%, y los resultados de % de proteína de cada mayonesa se observan en la Tabla 12. Como era esperado, el porcentaje de proteína de la mayonesa tipo fue menor que el de la mayonesa control, pues al poseer la primera menor cantidad de yema de huevo su porcentaje de proteína es menor también. Además el resultado de proteína para mayonesa control es similar a lo reportado por Laca et al., 2010 (1.7-2%). Esto quiere decir que el método Sorensen Walker, que fue el empleado para esta determinación, resultó apropiado.

Tabla 12 Porcentaje de proteína para mayonesa control y mayonesa tipo

Mayonesa	% Proteína	S	C.V. (%)
Control	1.71	0.0346	2.03
Tipo	1.13	0	0

3.3.4 Índice de Peróxidos

En la mayonesa, un área del aceite bastante grande, está expuesto a una fase acuosa, la cual podría contener gran cantidad de oxígeno disuelto. Además durante el batido o mezclado se introducen burbujas de aire, que quedan atrapadas en la emulsión. Todo esto hace que la mayonesa sea susceptible a la oxidación, por ello la importancia de su determinación en este estudio (Depree y Savage, 2001).

En la titulación del blanco se gastaron 0.1 ml de solución de tiosulfato de sodio, cuya concentración resulto ser 0.01055 N, considerando estos datos, se obtuvieron los resultados de índice de peróxidos de las mayonesas mostrados en la Tabla 13. Ambos valores de índice de peróxidos son menores al máximo permitido por la norma NMX-F-021-S-1979, que es de 20 meq por kg de muestra. Además, para aceites o grasas en perfecto estado, se obtienen I.P. <6, por lo general entre 0 y 3 (Matissek et al., 1992), con lo que se puede decir que ambas mayonesas se consideran estables a la oxidación.

El I.P. de la mayonesa tipo fue mayor que el de la mayonesa control debido a que la oxidación toma lugar en la superficie de las gotas, por lo tanto una gota más pequeña proporciona una alta velocidad de oxidación debido a que se incrementa el área superficial a la que se expone la fase acuosa (Kargar et al., 2011), y como se mencionó anteriormente, el diámetro de gotas de la mayonesa tipo fue menor que el de la mayonesa control. Aumentando a ello, el hecho de que se obtiene una alta estabilidad a la oxidación por el efecto de barrera de una película de proteína alrededor de las gotas de aceite (Nikovska, 2010) de la cual carece un poco la mayonesa tipo. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, el índice de peróxidos de la mayonesa tipo fue adecuado por encontrarse dentro del rango permitido por la norma NMX-F-021-S-1979.

Tabla 13. Índice de peróxidos de mayonesa control y mayonesa tipo

Mayonesa	I.P. (meq peróxido/kg muestra)	S	C.V. (%)
Control	1.19	0.0552	4.64
Tipo	2	0.1051	5.26

3.3.5 Actividad de agua (a_w)

La actividad de agua (a_w) indica la fracción del contenido de humedad total de un producto que está libre (no ligada) y en consecuencia, disponible para el crecimiento de microorganismos y para sustentar reacciones hidrolíticas, químicas, enzimáticas, etc. (Badui, 1993), por ello es muy importante su determinación para conocer qué tipo de microorganismos podrían afectar a la mayonesa con la actividad de agua que presente, por ejemplo la mayonesa es susceptible al crecimiento de levaduras, las cuales requieren una actividad de agua mayor a 0.88 y al crecimiento de mohos que requieren arriba de 0.80 para su desarrollo (Badui, 1993).

Como se observa en los resultados de la tabla 14, los valores de a_w de las dos mayonesas se encuentran por arriba de la actividad de agua que requieren los mohos y levaduras para desarrollarse, es por esta razón que las determinaciones microbiológicas para mohos y levaduras son fundamentales.

Cabe mencionar que la actividad de agua de la mayonesa tipo es menor que la de la mayonesa control, esto es atribuido a la formulación, considerando que la mayonesa tipo tenía un porcentaje de sacarosa mayor, la cual es un soluto de bajo peso molecular que tiene la propiedad de reducir la a_w (Badui, 1993) y además que el porcentaje de agua añadido es menor en la formulación de esta mayonesa.

Tabla 14. Actividad de agua de mayonesa control y mayonesa tipo

Mayonesa	a_w	S	C.V. (%)
Control	0.9206	0.0015	0.1662
Tipo	0.9196	0.0015	0.1663

3.3.6 pH

El pH es otro de los parámetros que controlan el crecimiento de microorganismos, por lo tanto es muy significativa su determinación en este estudio. En la mayonesa, el ácido acético contenido en el vinagre actúa como conservador al reducir el pH en este alimento, debido a su capacidad de liberar iones hidrógeno (Boatella et al., 2004).

De acuerdo a los resultados presentados en la tabla 15 el pH de la mayonesa tipo es más bajo que el de la mayonesa control. Este menor valor de pH en la mayonesa tipo es beneficioso, puesto que en esta condición, la mayoría de las bacterias no se desarrollan por crecer a pH óptimos próximos a la neutralidad (Boatella et al., 2004), lo cual asegura una barrera al desarrollo microbiano, que se ve reflejada en los resultados de determinaciones microbiológicas que se presentan más adelante.

Tabla 15. pH de mayonesa control y mayonesa tipo

Mayonesa	pH	S	C.V. (%)
Control	4.1	0	0
Tipo	3.93	0.0579	1.48

3.3.7 Acidez Total

La acidez total es la suma de los ácidos valorables cuando se lleva el pH a 7 añadiendo una solución alcalina valorada (Madrid et al., 2003). Para la mayonesa, la acidez total se expresa como porcentaje de ácido acético debido a que el vinagre proporciona el carácter ácido, contribuyendo de forma fundamental a la conservación del producto, pues la acidez de la mayonesa actúa como barrera al crecimiento microbiológico (Boatella et al., 2004).

De acuerdo a lo establecido por la norma NMX-F-021-S-1979, el porcentaje de acidez total, como ácido acético, para una mayonesa debe estar dentro del rango de

0.25 y 0.50. Acorde con los resultados presentados en la Tabla 16, ambas mayonesas se encuentran dentro de este rango. Sin embargo la mayonesa tipo presentó un valor más alto de porcentaje de acidez (0.5%). Este mayor porcentaje de acidez se puede deber a la adición de quitosán, puesto que al poseer carácter catiónico cuando es disuelto en la solución ácida acuosa (Savage, 1998), la concentración de iones activos H^+ es más alta, incrementando con ello la acidez de la mayonesa. Estos resultados son compatibles con los resultados de pH, ya que la mayonesa tipo, al tener un porcentaje mayor de acidez, presentó también un pH menor que el de la mayonesa control, lo que se debe también de la adición de quitosán.

Tabla 16. Acidez total como ácido acético de mayonesa control y mayonesa tipo

Mayonesa	% Acidez	S	C.V. (%)
Control	0.41	0.0057	1.40
Tipo	0.50	0	0

3.3.8 Viscosidad aparente

En la Figura 52 se presenta el gráfico obtenido para la determinación de viscosidad con respecto al tiempo para ambas mayonesas. El gráfico presenta la línea de tendencia, que predice la disminución de viscosidad aparente con respecto al tiempo de las mayonesas, lo cual corresponde a una ecuación polinómica.

Como se puede observar la mayonesa tipo mostro valores de viscosidad mayores que la mayonesa control durante el tiempo de prueba y además en 54 segundos se obtuvo la primer lectura de viscosidad estable ($2.39E+05$ cP), en cambio para la mayonesa control pasaron cien segundos antes de obtener una medida estable ($1.30E+05$ cP), resultando en los dos casos un coeficiente de variación menor a 10%.

La mayor viscosidad aparente de la mayonesa tipo se debe a la adición de quitosán en la formulación, esto concuerda con lo reportado por Speiciene et al.,

2007 donde el incremento en la viscosidad de la fase continua por la adición de quitosán conduce al incremento de la estabilidad de emulsiones aceite en agua. Esta mayor viscosidad de la mayonesa tipo es favorable puesto que una alta viscosidad reduce la tendencia de que se separe la emulsión haciéndola más estable. Esto se logra debido a que el quitosán forma una red tridimensional alrededor de las gotas de aceite, disminuyendo su difusión y posterior floculación y coalescencia (Lissant, 1974).

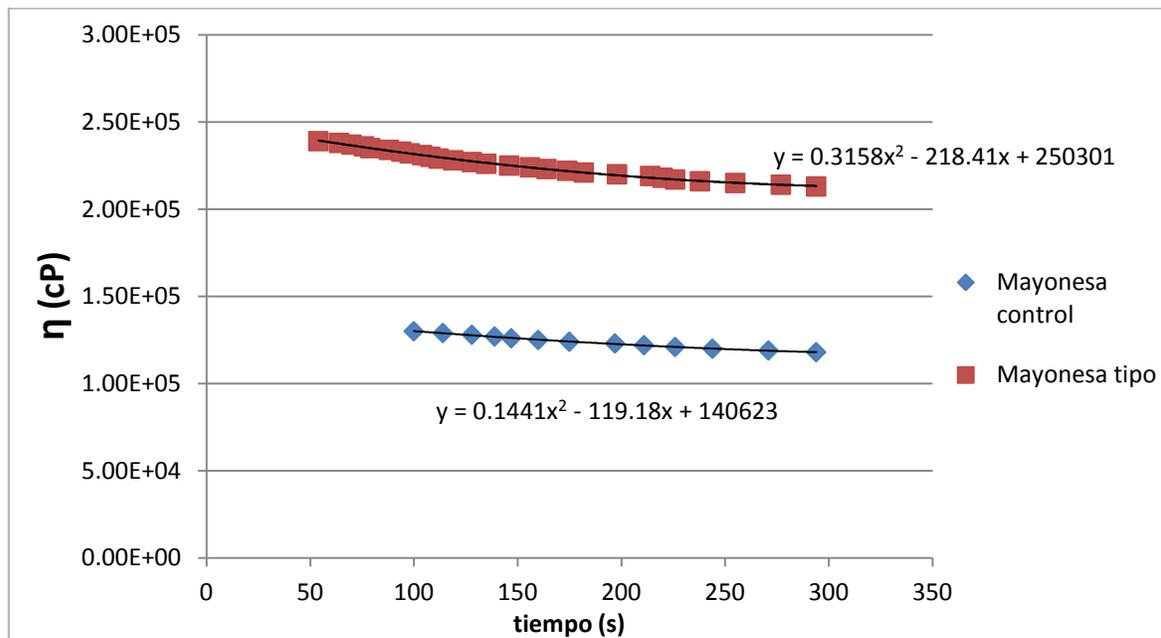


Figura 52. Gráfico de viscosidad aparente con respecto al tiempo a 1 rpm de mayonesa control y mayonesa tipo

3.4 Objetivo Particular 3

3.4.1 Mohos y Levaduras

De acuerdo a las imágenes mostradas en las Figuras 53 y 54, ambas mayonesas presentaron ausencia de mohos y levaduras, y considerando que el deterioro en mayonesas que se presenta deberse principalmente a levaduras o mohos (Depree y Savage, 2001), se puede decir que ambas mayonesas son resistentes al deterioro debido a estos microorganismos evitando alteraciones a las mayonesas. Conforme a

la norma NMX-F-021-S-1979, las especificaciones microbiológicas que debe cumplir una mayonesa son como máximo de mohos de 20 UFC/g y máximo de levaduras de 50 UFC/g, con lo que ambas mayonesas cumplen.

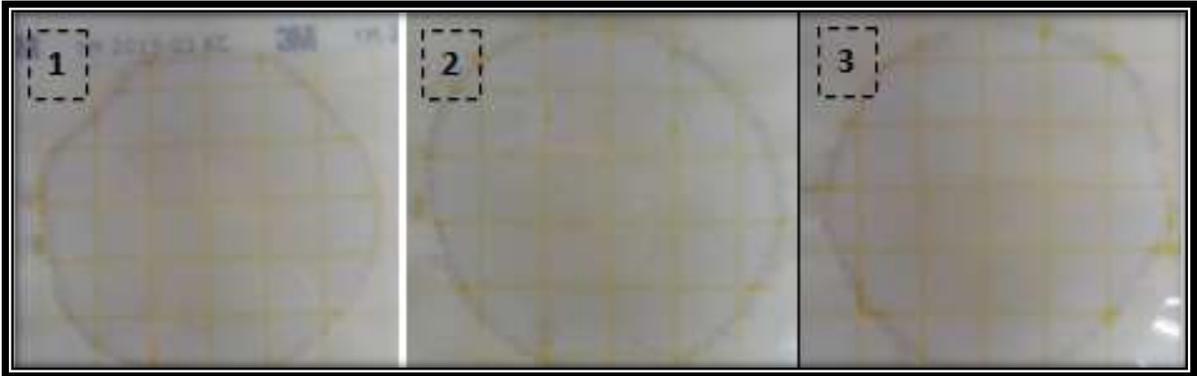


Figura 53. Placas para el conteo de Mohos y Levaduras de mayonesa control (3 repeticiones)

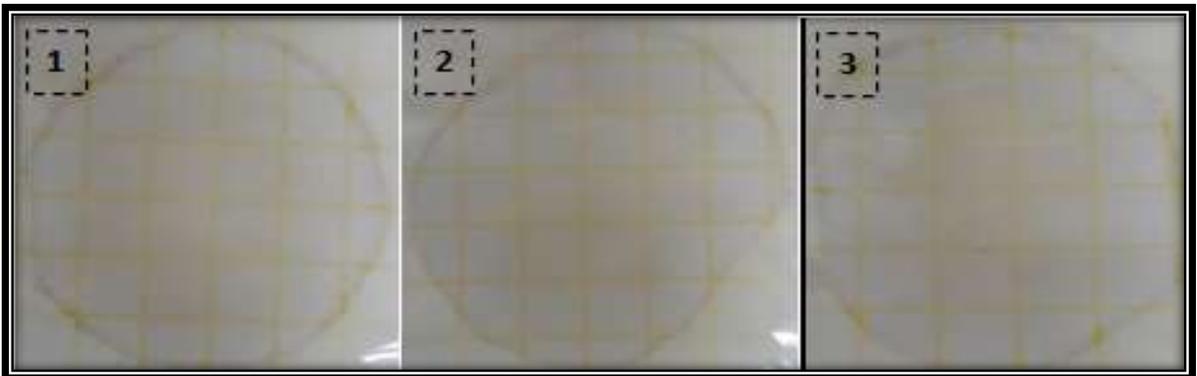


Figura 54. Placas para el conteo de Mohos y Levaduras de mayonesa tipo (3 repeticiones)

3.4.2 Mesófilos aerobios

Considerando las imágenes mostradas en las Figuras 55 y 56 no existió presencia de microorganismos mesófilos aerobios en ambas mayonesas, lo cual se adecúa a lo especificado por la norma NMX-F-021-S-1979, que establece como máximo de presencia de mesofílicos aerobios 3000 UFC/g. Estos resultados reflejan que la calidad sanitaria de la materia prima empelada en la elaboración de la mayonesa fue

buena, al igual que existió una adecuada manipulación durante su elaboración (Pascual y Calderón, 2000).

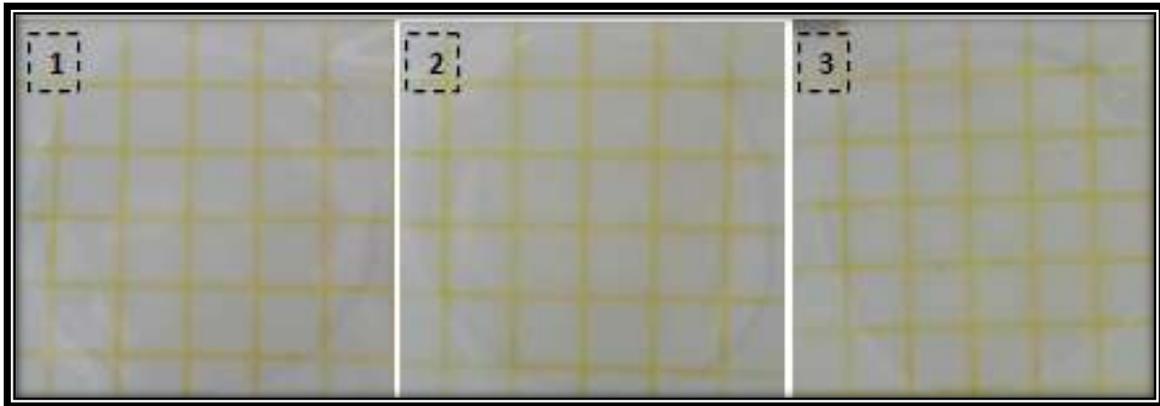


Figura 55. Placas para conteo de mesófilos aerobios de la Mayonesa Control (3 repeticiones)

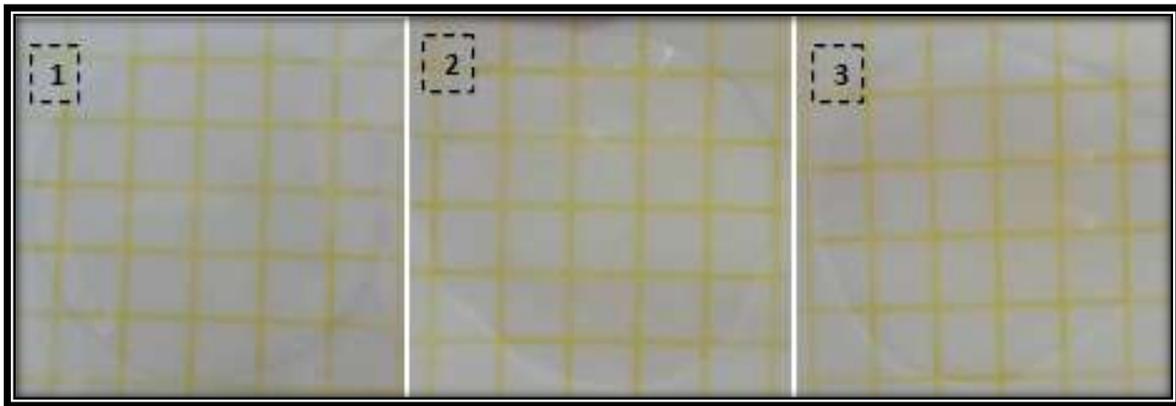


Figura 56. Placas para conteo de mesófilos aerobios de la Mayonesa Tipo (3 repeticiones)

3.4.3 Coliformes totales

Para las tres repeticiones de ambas mayonesas se obtuvo un conteo de coliformes totales igual a cero, esto se puede verificar en la Figuras 57 y 58. La norma NMX-F-021-S-1979 especifica que una mayonesa debe contener una cantidad menor de 10 UFC/g de grupos coliformes, ambas mayonesas tuvieron un conteo de 0 UFC/g, estos resultados indican que el proceso de elaboración y envasado de las mayonesas fue realizado bajo buenas condiciones higiénicas.

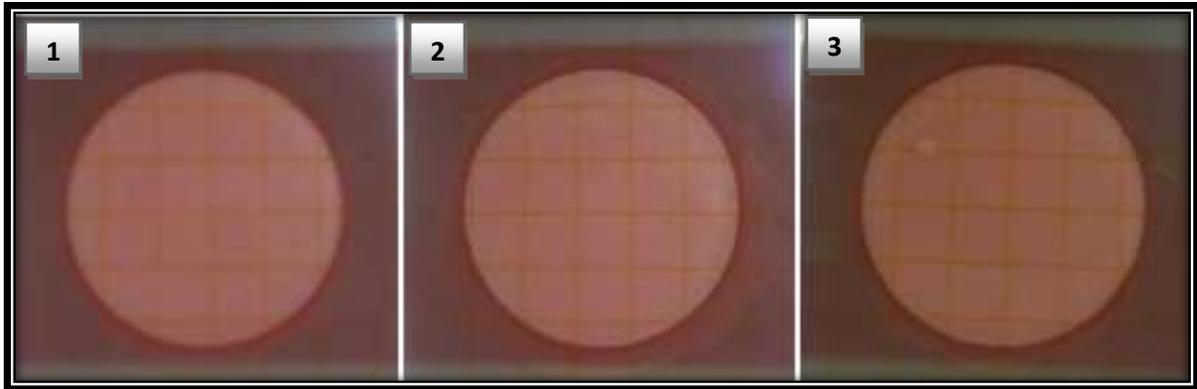


Figura 57. Placas para el conteo de coliformes totales de mayonesa patrón (3 repeticiones)

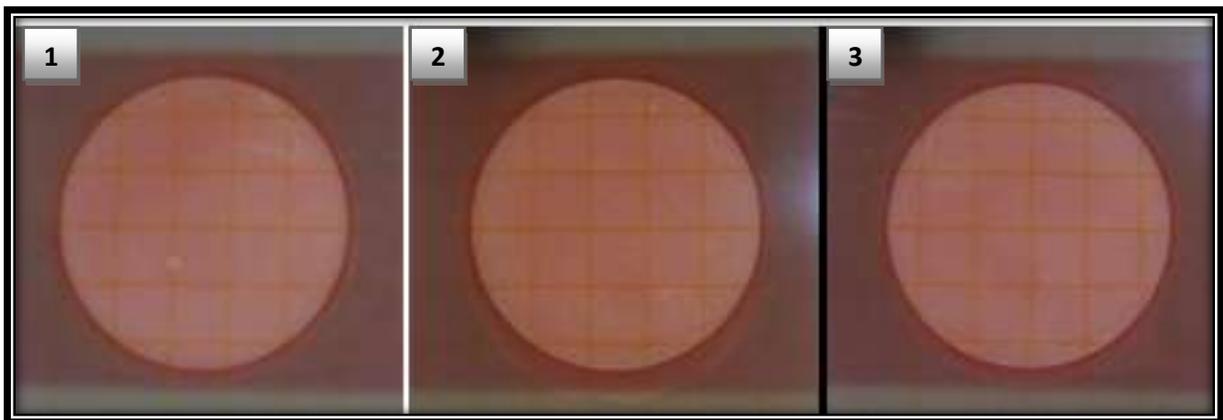


Figura 58. Placas para el conteo de coliformes totales de mayonesa tipo (3 repeticiones)

3.4.3 *E. coli*

E. coli resulto ser negativa en todas las réplicas de ambas mayonesas (Ver Figuras 59 y 60). Este resultado era el esperado puesto que según la norma NMX-F-021-S-1979 para un gramo de mayonesa *E coli* debe ser negativa, lo cual además indica la ausencia de contaminación fecal.

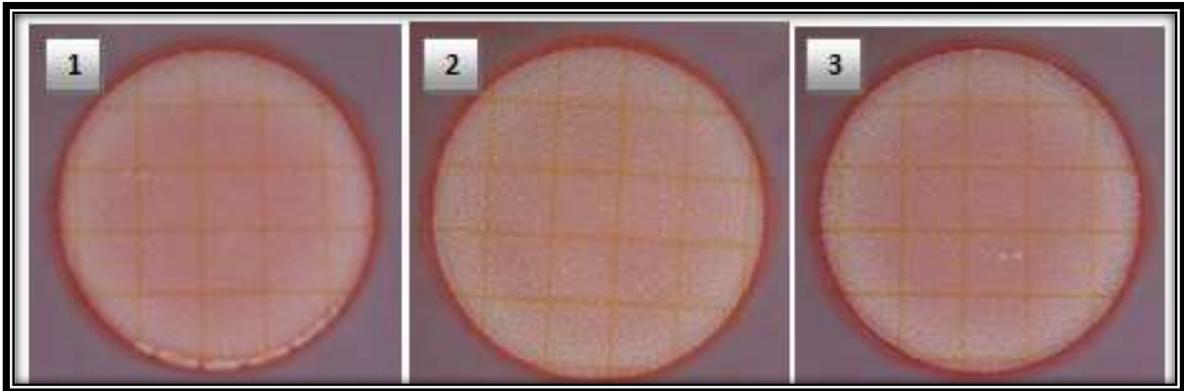


Figura 59. Placas para el conteo de *E. coli* de la mayonesa control (3 repeticiones)

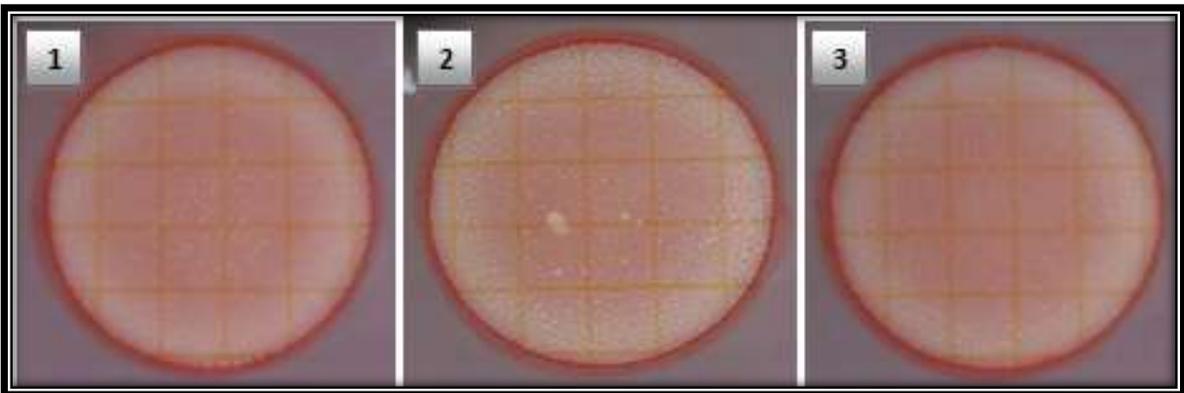


Figura 60. Placas para el conteo de *E. coli* de la mayonesa tipo (3 repeticiones)

3.5 Objetivo Particular 4

La curva de calibración se presenta en el Apéndice 1, al igual que el área promedio de pico de cada solución de colesterol. También se presenta en el mismo apartado el área de pico de las muestras de mayonesa y la concentración de colesterol que presentaron acorde a la curva de calibración.

En la Tabla 17 se presentan los resultados de la determinación de colesterol de ambas mayonesas al sustituir en la ecuación 19 los datos requeridos. Dichos resultados comprueban que la mayonesa tipo tiene un menor contenido de colesterol (52% menor) que la mayonesa control debido a la menor adición de yema de huevo

(30% menor). Por lo tanto la mayonesa tipo resultó, como era esperado, una mayonesa baja en colesterol.

Además el resultado de contenido de colesterol de la mayonesa control, concuerda con Morales y Tenuta, 2005 que presentan valores de contenido de colesterol de mayonesa tradicional en un intervalo de 66 a 79 mg por cada 100 g de muestra.

Tabla 17. Contenido de colesterol de mayonesa control y mayonesa tipo

Mayonesa	mg colesterol/100g de muestra	S	C.V. (%)
Control	66.38	17.58	0.15
Tipo	34.48	8.199	0.20

CONCLUSIONES

87

En este trabajo se compararon, por medio de pruebas de estabilidad, físicas, químicas y microbiológicas, una mayonesa tradicional y una mayonesa tipo baja en colesterol. Después de obtenidos los resultados, se observó que, la adición de solución de quitosán/vinagre de concentración 2.5% (p/p) sustituyendo 30% de la yema de huevo, resultó beneficiosa, ya que se obtuvieron resultados similares a los obtenidos con la mayonesa control en cuanto pruebas físicas y químicas y a calidad microbiológica y superiores en cuanto a estabilidad. Esto significa que el potencial del quitosán como emulsionante para la elaboración de mayonesa fue conveniente, aumentando el hecho de que el quitosán es un biopolímero natural, y que su uso es una ventaja, ya que proporciona un mayor valor agregado a los subproductos de camarón, que son comúnmente desperdiciados.

La estabilidad a la coalescencia de la mayonesa tipo, resulto ser mejor con respecto a la mayonesa control, presentando un tamaño de diámetro de gota 11.63% menor, y esta distribución de tamaño fue menos polidispersa que en la mayonesa control, lo que fue reflejado en un menor aumento en el tamaño de gota después del envejecimiento, causando una mayor estabilidad a la coalescencia. Además esta menor susceptibilidad a coalescer, hace que la mayonesa tipo también posea un menor grado de cremado por disminuir la difusión de las gotas de aceite, y por lo tanto no se presento una separación de fases en la emulsión. También se demostró que la adición de quitosán produjo un incremento en la viscosidad aparente de la mayonesa, aportando también con ello, una mayor estabilidad.

El porcentaje de humedad que presentó la mayonesa tipo fue mayor que el de la mayonesa control. Por otro lado, los porcentajes de grasa y proteína resultaron ser menores en la mayonesa tipo debido a la disminución de yema de huevo en la formulación, generando también una menor cantidad de colesterol, lo cual resulta beneficioso, pues hace de la mayonesa tipo un producto funcional proporcionando

88

una buena alternativa para reducir el consumo de productos con contenido de colesterol considerable, lo cual podría generar problemas de salud.

Acorde al índice de peróxidos ambas mayonesas se consideran estables a la oxidación, y por consiguiente a la posible rancidez en el producto.

La calidad microbiológica de la mayonesa tipo cumplió con las especificaciones de la norma NMX-F-021-S-1979 al presentar ausencia de microorganismos coliformes, *E. coli*, mesófilos aerobios, y mohos y levaduras. Esto significa que la materia prima empleada, su manipulación, el proceso de elaboración y almacenado de la mayonesa se produjo bajo buenas condiciones higiénicas. Además considerando que se obtuvo un menor valor de actividad de agua y de pH y mayor porcentaje de acidez total que en la mayonesa tradicional, se puede decir que la mayonesa tipo es más estable al crecimiento microbiano que la mayonesa tradicional, sin considerar en este estudio, el hecho de que el quitosán tiene propiedades antifúngicas y antimicrobianas (Shahidi et al., 1999 y Savage, 1998), las cuales podrían ser evaluadas en trabajos posteriores.

RECOMENDACIONES

Debido a que la estabilidad de una emulsión puede mejorar modificando los parámetros del proceso, se podría emplear una batidora con mayor potencia para incrementar la energía de entrada produciendo un menor tamaño medio de gota y mejor distribución de tamaño (Franco et al., 1995), que produciría aún una mejor estabilidad.

El quitosán podría ser empleado para producir otro tipo de emulsiones alimentarias considerando que funcionó bien en la mayonesa, además en una mayonesa podría seguirse el estudio empleando quitosán con diferentes pesos moleculares o grados de desacetilación y determinar en qué grado los valores en estas propiedades modificarían las propiedades de la mayonesa.

Para determinar la aceptabilidad de consumo de la mayonesa tipo se podría realizar un análisis sensorial, además de usar un colorante que iguale el color de la mayonesa tipo al de una mayonesa tradicional, pues la mayonesa tipo posee un color pálido, resultado de la menor adición de yema de huevo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abu-jdayil B. (2003). Modelling the time-dependent rheological behavior of semisolid foodstuffs. *Journal of Food Engineering*, 57, 97-102.
- AEEIQ (Asociación de escuela de estudiantes de Ingeniería Química). (2001). Termodinámica química. *Recitela*, 1, 13.
- Alben E. e Ibanoglu E. (2007). Influence of hydrocolloids on phase separation and emulsion properties of whey protein isolate. *Journal of Food Engineering*, 80, 454-459.
- Anton M., Beaumal V. y Gandemer G. (2000). Adsorption at the oil-water interface and emulsifying properties of native grabulates from egg yolk: effect of aggregated state. *Power*, 14, 327-335.
- AOAC (2000). *Methods of Analysis*. 17th ed. Association of Official Analytical Chemist, Washington, D.C.
- Ares G., Barreiro C., Deliza R. y Gámbaro A. (2009). Alternatives to reduce the bitterness, astringency and characteristic flavor of antioxidant extracts. *Food Research International*, 42, 871-878.
- Badui D. S. (1993). *Química de los Alimentos*. México. Pearson.
- Balanta D., Grande C. D. y Zuluaga F. (2010). "Extracción, identificación y caracterización de quitosano del micelo de *Aspergillus niger* y sus aplicaciones como material bioadsorbente en el tratamiento de aguas". *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 5, 297-316.
- Berasategui, Martín. (2005). *Patente no. 01997229.8*. Salsa mayonesa y método para su preparación. España.
- Boatella R. J., Condon S. R. y López A. P. (2004). *Química y Bioquímica de los Alimentos II*. Barcelona, España. I Editions.
- Capek I. (2004). Degradation of kinetically-satable o/w emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 107, 125-155.
- Coupland J. N. y McClements D. J. (1996). "Lipid oxidation in food emulsions". *Alternatives*, 71, 944-948.
- Cruz A. (2004). *Comida sin colesterol*. México. Selector.

- Cubero N., Monferrer A., Villalta J. (2002). *Aditivos alimentarios*. España. Mundi Prensa Libros S. A.
- Daimer K. y Kulozik U. (2009). Oil-in-water emulsion properties of egg yolk: Effect of enzymatic modification by phospholipase A₂. *Food Hydrocolloids*, 23, 1366-1373.
- Dalgleish D. G. (2006). Food emulsions-their structures and structure-forming properties. *Food Hydrocolloids*, 20, 415-422.
- Denmat M., Anton M. y Beaumal V. (2000). Characterization of emulsion properties and of interface composition in O / W emulsions prepared with hen egg yolk, plasma and granules *Analysis*, 14, 539-549.
- Depree J. A. y Savage G. P. (2001). Physical and flavour stability of mayonnaise. *Trends in Food Science and Technology*, 12, 157–163.
- Dickinson E. (2003). Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*, 17, 25-39.
- Bajaj H., Bisht S., Yadav M, Singh V. y Singh M. (2011). “Design and development of nevirapine loaded surfactant free chitosan microemulsion”. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*, 68, 981-988.
- Hennen W. J. (1996). *Chitosan*. Woodland Publishing Inc. E. U. A.
- Hsieh Y. L. y Regenstein J. M. (1992) Storage stability of fish oil, soy oil and corn oil mayonnaises as measured by various chemical indices. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 1, 97-106.
- INEGI. (1999). Página del Instituto Nacional de Estadística y Geografía. *XV Censo Industrial, censos económicos 1999*. Recuperado el 20 de octubre del 2012 de http://www.inegi.org.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/censos/economicos/1999/industrial/ssec31pm.pdf.
- INEGI. (2003). Página del Instituto Nacional de Estadística y Geografía. *Estadísticas del sector salud y seguridad social. Cuaderno N° 20*. Recuperado el 20 de septiembre del 2011 de http://www.inegi.gob.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/continuas/sociales/salud/2003/cuaderno20a.pdf.

- INEGI. (2011). Página del Instituto Nacional de Estadística y Geografía. *Banco de Información Económica*. Recuperado el 20 de octubre del 2012 de <http://www.inegi.org.mx/sistemas/bie/default.aspx#D104001000142>.
- Huck I C., Álvarez C. M. S., Candal J. R. y Herrera M. L. (2011). Structures and stability of lipid emulsions formulated with sodium caseinate. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 5, 412-420.
- Jumaa M. y Muller B. W. (1999). Physicochemical properties of chitosan-lipid emulsions and their stability during the autoclaving process. *International Journal of Pharmaceutics*, 183, 175-184.
- Kargar M., Spyropoulos F. y Norton I. T. (2011). The effect of interfacial microstructure on the lipid oxidation stability of oil-in-water emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 357, 527-533.
- Kerkhofs S., Lipkens H., Velghe F., Verlooy P., Martens J. A. (2011). Mayonnaise production in batch and continuous process exploiting magnetohydrodynamic force. *Journal of Food Engineering*, 106, 35–39.
- Kima S. y Rajapakse N. (2005). Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. *Carbohydrate Polymers*. 62, 357–368.
- Klinkesorn U. y Namatsila Y. (2009). Influence of chitosan and NaCl on physicochemical properties of low-acid tuna oil-in-water emulsions stabilized by non-ionic surfactant. *Food Hydrocolloids*, 23, 1374-1380.
- Kumar M. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Science*, 46, 1-27.
- Laca A., Sáenz M., Paredes B. y Díaz M. (2010) Rheological properties, stability and sensory evaluation of low-cholesterol mayonnaises prepared usin egg yolk granules as emulsifying agent. *Food Engineering*, 97, 243-252.
- Langton M., Jordansson E., Altskar A., Sorensen C. y Hermansson A. (1999). Microstructure and image analyllis of mayonnaise. *Food Hydrocolloids*, 13, 113-125.
- Laplante S., Turgeon S. L., Paquin P. (2005). Emulsion stabilizing properties of various chitosans in the presence of whey protein isolate. *Carbohydrate Polymers*, 59, 425-434.

- Li X. y Xia W. (2011). Effects of concentration, degree of deacetylation and molecular weight on emulsifying properties of chitosan. *Int J Biol Macromol.*, 48, 768-772.
- Lissant K. J. (1974). *Emulsions and emulsion technology*. Marcel Dekker, INC. Nueva York.
- Liu H., Xu X. M. y Guo Sh. D. (2007). Rheological, texture and sensory properties of low-fat mayonnaise with different fat mimetics. *LWT - Food Science and Technology*, 40, 946-954.
- López F. A y Macaya M. C. (2009). *Libro de la salud cardiovascular del Hospital Clínico San Carlos y la fundación BBVA*. Madrid, España. Fundación BBVA.
- Madrid C. J., Madrid V. A. y Moreno T. G. (2003). *Análisis de Vinos, Mostos y Alcoholes*. Madrid, España. Mundi Prensa.
- Magnusson E., Rosén C. y Nilsson L. (2011). Freezee thaw stability of mayonnaise type oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 25, 707-715.
- Martínez R. S. E. (2001). La canasta básica alimentaria en México, 1980-1998: Contenido y determinantes. Tesis de licenciatura. Facultad de Economía, UNAM, México.
- Matissek R., Schnepel F. y Steiner G. (1992). *Análisis de los alimentos. Fundamentos, métodos y aplicaciones*. Ed. Acribia S. A. Zaragoza, España.
- Matteini M. y Moles A. (2001). *La química en la restauración*. Ed. Nerea. Santiago de Chile.
- Méndez A. (2010). *Química del Colesterol* (en línea). Recuperado el 15 de marzo de 2012 de <http://quimica.laguia2000.com/quimica-organica/quimica-delcolesterol>.
- Mey A., Kuroiwa T., Kobayashi I. y Nakajima M. (2009). Effect of chitosan on the stability and properties of modified lecithin stabilized oil-in-water monodisperse emulsion prepared by microchannel emulsification. *Food hydrocolloids*, 3, 600-610.
- Miranda, S. P. (2004). *Patente con Núm. de expediente 005444. No de folio 1175930-5*. "Proceso para la extracción de quitina a partir de crustáceos y su conversión a quitosán". Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, México.
- Morales A. y Tenuta F. A. (2005). Oxidation of cholesterol in mayonnaise during storage. *Food chemistry*, 89, 611-615.

- Moschakis T., Murray B. S. y Biliaderis C. G. (2010). Modifications in stability and structure of whey protein-coated o / w emulsions by interacting chitosan and gum arabic mixed dispersions. *Food Hydrocolloids*, 24, 8-17.
- Mun S., Decker E. A. y McClements D. J. (2006). Effect of molecular weight and degree of deacetylation of chitosan on the formation of oil-in-water emulsions stabilized by surfactant–chitosan membranes. *Journal of Colloid and Interface Science*, 296, 581–590.
- Muzzarelli R. (1996). Chitosan-based dietary foods. *Carbohydrate Polymers*, 29, 309-316.
- Nahla A., Gaafar M. y Salem A. (2011). Development of light mayonnaise formula using carbohydrate-based fat replacement. *Food Technology*, 5, 673-682.
- Nikovska K. (2010). Oxidative Stability and Rheological Properties of Oil-In-Water Emulsions with Walnut Oil. *Journal of Food Science*, 2, 172-177.
- NMX-F-021-S-1979. Mayonesa. Mayonnaise. Normas mexicanas. Dirección general de normas.
- NMX-F-102-S-1978. Determinación de la acidez titulable en productos elaborados a partir de frutas y hortalizas. Norma mexicana. Dirección general de normas.
- NMX-F-154-1987. Alimentos. Aceites y grasas vegetales o animales. Determinación del índice de peróxido. Foods. Vegetables or Animals oils and fats. Peroxide index determination. Normas Mexicanas. Dirección general de normas.
- NMX-F-317-S-1978. Determinación de pH en alimentos. Determination of pH in foods. Normas mexicanas. Dirección general de normas.
- NMX-F-387-1982. Alimentos de leche fluida. Determinación de grasa butírica por el método de gerber. Normas mexicanas. Dirección general de normas.
- NMX-F-428—1982. Alimentos. Determinación de humedad (Método rápido de la termobalanza) Normas mexicanas. Dirección general de normas.
- No H. K., Meyers S. P. (1995). Preparation and characterization of chitin and chitosan-a review. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 4(2), 27–52.
- OCUM. (2010). Tema 2. Higiene, inspección y control de la leche. Recuperado el 2 de Abril del 2012 de <http://ocw.um.es/cc.-de-la-salud/higiene-inspeccion-y-control-alimentario/practicas-1/tema-2.pdf>

- Olivas E. E. y Alarcón L. R. (2001). *Manual de prácticas de microbiología básica y microbiología de alimentos*. UACJ. Chihuahua, México.
- Pascual A. M. R. y Calderón P. V. (2000). *Microbiología alimentaria*. Díaz de Santos. España.
- Pons M., Galotto M., y Subirats S. (1994). Comparison of the steady rheological characterization of normal and light mayonnaises. *Food Hydrocolloids*, 8, 389-400.
- Rinaudo M., Milas Michel y Le Dung P. (1993). "Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion". *Int. J. Macromol.*, 15, 281-285.
- Robins M. M., Watson A. D. y Wilde P. J. (2002). Emulsions creaming and rheology. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 7. 419-425.
- Rodríguez G. E. (2006). Mitos y verdades del colesterol. *Acta Universitaria*, 16, 8-11.
- Ross Marjorie. (2001). *Entre el comal y la olla: fundamentos de gastronomía costarricense*. Ed. EUNED. Costa Rica.
- Savage P. R. (1998). *Chitin and Chitosan: An Expanding Range of Markets Await Exploitation*, 3ra. Ed. E U. A. John Wiley & Sons, nc.
- Shahidi F., Vidana A. J. K. y Jeon Y. (1999). Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science and Technology*, 10, 37-51.
- Solis Y., Peniche C., García R. y Davidenko N. (2007). Un procedimiento biomimético novedoso para obtener composites de quitosana.hidroxiapatita. *VII Congreso de la Sociedad Cubana de Bioingeniería Habana*. Cuba.
- Speiciene V., Guilmineau F., Kulozik U. y Leskauskaite D. (2007). The effect of chitosan on the properties of emulsions stabilized by whey proteins. *Food Chemistry*, 102, 1048-1054.
- Su H., Lien C., Lee T. y Ho J. (2010). Development of low-fat mayonnaise containing polysaccharide gums as functional ingredients. *Journal of the science of food and agriculture*, 90, 806-812.
- Torres T. F. (2000) *La alimentación de los mexicanos al final del milenio: De la diversidad a la homogeneidad regional*. Notas, revista de información y análisis del Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 10, 47-58.

Recuperado el 20 de septiembre del 2011 de <http://www.bvsde.ops-oms.org/texcom/nutricion/pr27.pdf>

- Vaclavic V. A. y Christian E. W. (2008). *Essentials of Food Science*. 3ra. Ed. E.U.A. Springer Science.
- Wang B., Li D., Wang L. y Ozkan N. (2010). Effect of concentrated flaxseed protein on the stability and rheological properties of soybean oil-in-water emulsions. *Journal of Food Engineering*, 96, 555-561.
- Wendin K., Aabyl K., Edris A., Ellekjaerl M. R., Albin R., Bergenstahl B., Johansson L., Willers E. P. y Solheiml R. (1997). Low-fat mayonnaise: influences of fat content, aroma compounds and Thickeners. *Food Hydrocolloids*, 11, 87-99
- Worrasinchai S., Suphantharika M., Surinya P. y Pimon J. (2006). β -Glucan prepared from spent brewer's yeast as a fat replacer in mayonnaise. *Food Hydrocolloids*, 20, 68-78.
- Wu N., Huang X., Yang X., Guo J., Zheng E., Yin S., Zhu J., Qi J., He X. y Zhang J. (2012). Stabilization of soybean oil body emulsions using i-carrageenan: Effects of salt , thermal treatment and freeze-thaw cycling. *Food Hydrocolloids*, 28, 110-120.

ANEXO 1

ECUACIONES PARA ANÁLISIS ESTADÍSTICO

- Media aritmética ó Promedio

$$\bar{X} = \frac{\sum Xi}{n}$$

Ecuación A1

- Desviación estándar

$$S = \sqrt{\frac{\sum (Xi - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

Ecuación A2

- Coeficiente de variación

$$C.V. (\%) = \left(\frac{S}{\bar{X}} \right) \times 100$$

Ecuación A3

Donde:

Xi = Valores i de la variable

n = Número de datos

APÉNDICE 1

En la Tabla A1 se presentan los resultados del análisis cromatográfico de las soluciones estándar de colesterol, además en la Figura A1 se presenta la curva de calibración obtenida.

Tabla A1. Datos obtenidos para la curva patrón de colesterol

Soluciones estándar de colesterol (mg/ml)	Tiempo de retención (min)	Área Promedio (unidades arbitrarias)	S	C. V. (%)
0.025	20.500	163.65	14.87	0.11
0.05	20.500	169.32	18.81	0.09
0.1	20.500	178.56	6.37	0.28
0.2	20.500	205.42	22.82	0.09
0.3	20.500	231.23	25.98	0.089
0.4	20.500	263.34	29.92	0.088
0.5	20.500	297.01	33.00	0.09

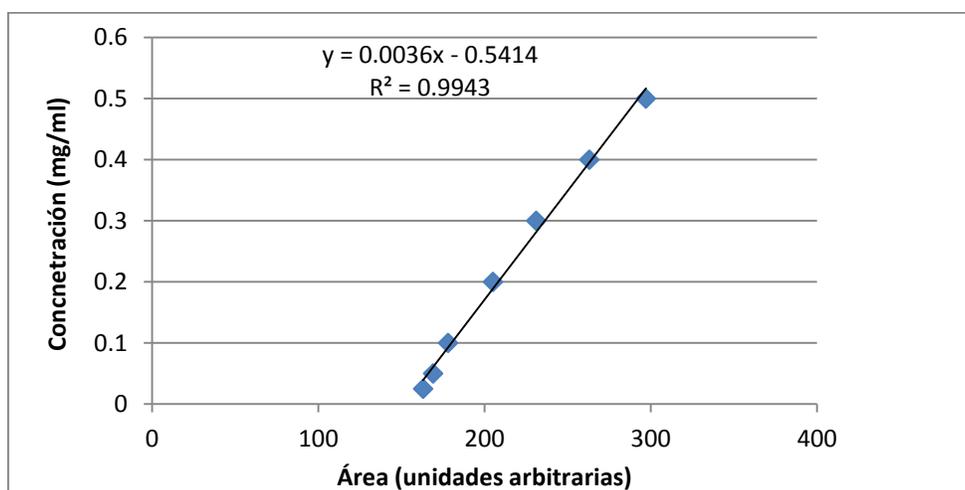


Figura A1. Curva de calibración del colesterol

$$y = 0.0036x - 0.5414$$

Los resultados del análisis cromatográfico de las mayonesas se presentan en la Tabla A2

Tabla A2. Datos obtenidos para el análisis cromatográfico de las mayonesas

Mayonesa	Área promedio (unidades arbitrarias)	S	C. V. (%)	[colesterol] (mg/ml)
Control	263.74	17.58	0.15	0.7965
Tipo	163.98	8.199	0.20	0.4137