



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE MATERIALES CON BASE
EN QUITOSANO, OBTENIDO MEDIANTE DESACETILACIÓN
HETEROGÉNEA DE QUITINA EXTRAÍDA POR UN MÉTODO
BIOLÓGICO**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

LÓPEZ CHÁVEZ MONSERRAT



MÉXICO, D.F.

2013



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: MARIA DE LOS ANGELES VALDIVIA LOPEZ
VOCAL: MIQUEL GIMENO SECO
SECRETARIO: CONCEPCION KEIKO SHIRAI MATSUMOTO
1er. SUPLENTE: HIRAM FERNANDO RAMIREZ CAHERO
2° SUPLENTE: ALEJANDRO ZAVALA RIVAPALACIOS

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Biopolímeros (S-157) del Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. El trabajo experimental se llevó a cabo con financiamiento del Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (No. de Proyecto PICSA 11-69).

ASESOR DEL TEMA:



**DRA. CONCEPCIÓN KEIKO
SHIRAI MATSUMOTO**

SUSTENTANTE:



MONSERRAT LÓPEZ CHÁVEZ

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	15
1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	15
2. TRATAMIENTOS DE QUESOS CON QUITOSANO REPORTADOS.....	16
MARCO TEÓRICO.....	18
1. ENVASES.....	18
1.1 Definición y función	18
1.2 Clasificación	18
2. ENVASADO ACTIVO	19
2.1 Definición y función	20
2.2 Clasificación	21
2.3 Integración de los componentes activos al envase	21
2.4 Materiales empleados en el diseño de envases activos	24
3. BIOPOLÍMEROS Y BIOPLÁSTICOS	25
3.1 Quitina y quitosano	26
3.2 Obtención de quitina y quitosano a partir de desechos de crustáceos	29
3.3 Extracción química de la quitina.....	29
3.4 Extracción biológica-química de quitina	30
3.5 Desacetilación química	30
3.6 Propiedades de importancia en el quitosano.	31
3.6.1 Formación de películas	31
3.6.2 Modificación del quitosano	32
3.6.2.1 Quitosano-ácido láctico	32
3.6.2.2 Quitosano-co-cítrico	33
3.6.2.3 Quitosano-cítrico-HPMC	33

3.6.3 Capacidad antimicrobiana.....	34
4. QUESO RANCHERO	35
4.1 Definición	35
4.2 Clasificación	37
4.3 Características del queso “ranchero”	37
4.4 Microorganismos patógenos de importancia en el queso	40
4.4.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	41
4.5 Envasado y conservación de los quesos	43
4.5.1 Tratamientos antimicrobianos.	43
4.6 El Queso en México	45
4.7 Producción de leche y queso en México	45
JUSTIFICACIÓN	48
HIPÓTESIS	49
OBJETIVOS	50
Objetivo general	50
Objetivos particulares.....	50
METODOLOGÍA.....	51
1. Materiales.....	51
2. Metodología.....	51
2.1 ETAPA I. Extracción y caracterización de quitina y quitosano	52
2.1.1 Extracción de quitina a partir de desechos de camarón.....	52
2.1.2 Purificación de quitina cruda	52
2.1.3 Obtención de quitosano	52
2.1.4 Caracterización de quitina.....	54

2.1.4.1 Determinación del porcentaje de humedad, cenizas y proteína residual.....	54
2.1.5 Caracterización de quitosano.....	54
2.1.5.1 Determinación del porcentaje de humedad y cenizas.....	54
2.1.5.2 Determinación del porcentaje de solubles en solución de ácido acético.....	54
2.1.5.3 Grado de acetilación	55
2.1.5.4 Peso molecular	55
2.1.5.5 Espectrometría de infrarrojo (ATR-FTIR)	56
2.2 ETAPA II. Obtención, caracterización y evaluación como envase activo en queso ranchero de las películas Q,QAL,QC,QH.....	56
2.2.1 Obtención de las soluciones formadoras de película	56
2.2.1.1 Películas de quitosano (Q)	56
2.2.1.2 Películas de quitosano-ácido láctico (QAL).....	56
2.2.1.3 Películas de quitosano co-cítrico (QC).....	57
2.2.1.4 Películas de quitosano co-cítrico-HPMC (QH)	57
2.2.2 Preparación de películas.....	57
2.2.3 Caracterización de las películas.....	57
2.2.3.1 Acondicionamiento	57
2.2.3.2 Peso de las películas	58
2.2.3.3 Espesor	58
2.2.3.4 Permeabilidad al vapor de agua (PVA)	58
2.2.3.5 Propiedades mecánicas	59
2.2.3.5.1 Fuerza de fractura en la extensión.....	59
2.2.3.5.2 Fuerza de fractura en la punción.....	60

2.2.4 Evaluación de los recubrimientos en queso ranchero.....	62
2.2.5 Análisis de los quesos.....	62
2.2.5.1 Pérdida relativa de peso	62
2.2.5.2 Humedad.....	62
2.2.5.3 pH y acidez total titulable	63
2.2.5.4 Análisis microbiológico.....	63
2.3 ETAPA III. Modificación de la PVA, caracterización, evaluación como envase activo y efecto inhibidor contra <i>L. monocytogenes</i> en queso ranchero inoculado.....	63
2.3.1 Modificación de la PVA	63
2.3.1.1 Obtención de las soluciones formadoras de película	64
2.3.1.1.2 Películas de quitosano-ácido láctico y proteína aislada de soya (QAL/SPI).....	64
2.3.1.2 Preparación de películas.....	64
2.3.1.3 Caracterización de las películas.....	64
2.3.2 Evaluación de la película en queso ranchero y queso ranchero inoculado con <i>L. monocytogenes</i>	65
2.3.2.1 Preparación del inóculo de <i>L. monocytogenes</i>	65
2.3.2.2 Inoculación de <i>L. monocytogenes</i> al queso ranchero	65
2.3.2.3 Envasado de los quesos	66
2.3.2.4 Diseño experimental	66
2.3.3 Análisis de los quesos.....	67
2.3.3.1 Pérdida relativa de peso	67
2.3.3.2 Humedad.....	67
2.3.3.3 pH y acidez total titulable	67
2.3.3.4 Análisis microbiológico: Cuenta en placa de <i>L. monocytogenes</i>	67

2.3.3.5 Microscopía electrónica de barrido (SEM)	67
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	69
1. ETAPA I. Extracción y caracterización de quitina y quitosano	69
2. ETAPA II. Obtención, caracterización y evaluación como envase activo en queso ranchero de las películas Q,QAL,QC,QH.....	72
2.1 Caracterización de las películas.....	72
2.2 Evaluación de los recubrimientos en queso ranchero.....	78
3. ETAPA III. Modificación de la PVA, caracterización, evaluación como envase activo y efecto inhibidor contra <i>L. monocytogenes</i> en queso ranchero inoculado.....	85
3.1 Evaluación de los recubrimientos en queso ranchero.....	90
3.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	98
CONCLUSIONES.....	104
REFERENCIAS.....	105
ANEXOS	113
1. Caracterización de quitosano.	113
1.1 Espectro de RMN de los quitosanos obtenidos.....	113
2. Análisis estadístico de varianza (ANOVA) y prueba de comparación de medias.	114
ETAPA II. Obtención, caracterización y evaluación como envase activo en queso ranchero de las películas Q,QAL,QC,QH.....	114
2.1 Peso de las películas.....	114
2.1.1 ANOVA	114
2.1.2 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer.....	115
2.2 Espesor de las películas	115
2.2.1 ANOVA	115

2.2.2 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer.....	115
2.3 PVA de las películas.....	115
2.3.1 ANOVA gradiente 22/75.....	115
2.3.2 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer.....	116
2.3.3 ANOVA gradiente 75/22.....	116
2.3.4 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer.....	116
Pérdida de peso de los quesos.....	116
2.4.1 ANOVA	116
2.4.2 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer.....	117
2.4 Humedad de los quesos.....	117
2.5.1 ANOVA	117
2.5.1 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer.....	117
2.5 pH de los quesos.....	117
2.6.1 ANOVA	117
2.6.2 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer.....	118
2.6 Acidez total titulable (ATT) de los quesos	118
2.7.1 ANOVA	118
2.7.2 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer.....	118
2.7 Cuenta en placa de mesófilos aerobios en queso.....	119
2.8.1 ANOVA	119
2.8.2 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer.....	119
2.8 Cuenta en placa de hongos y levaduras en queso.....	119
2.9.1 ANOVA	119
2.9.2 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer.....	120

ETAPA III. Modificación de la PVA, caracterización, evaluación como envase activo y efecto inhibidor contra <i>L. monocytogenes</i> en queso ranchero inoculado.....	120
2.10 PVA de las películas de QAL sin sorbitol(QALss) y QAL con sorbitol (QALcs).....	120
2.10.1 ANOVA	120
2.10.2 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer	120
2.11 Peso de las películas de QAL modificadas	121
2.11.1 ANOVA	121
2.11.2 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer	121
2.12 Espesor de las películas de QAL modificadas	121
2.12.1 ANOVA	121
2.12.2 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer	121
2.13 PVA de las películas de QAL modificadas	122
2.13.1 ANOVA	122
2.13.2 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer	122
2.14 Humedad en los quesos no inoculados	122
2.14.1 ANOVA	122
2.14.2 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer	122
2.15 Humedad en los quesos inoculados	123
2.15.1 ANOVA	123
2.15.2 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer	123
2.16 Pérdida de peso en los quesos no inoculados.....	123
2.16.1 ANOVA	123
2.16.2 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer.....	123
2.17 Pérdida de peso en los quesos inoculados.....	124

2.17.1 ANOVA	124
2.17.2 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer	124
2.18 pH de los quesos no inoculados	124
2.18.1 ANOVA	124
2.18.2 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer	124
2.19 Acidez total titulable de los quesos no inoculados	125
2.19.1 ANOVA	125
2.20 Acidez total titulable en los quesos inoculados	125
2.20.1 ANOVA	125
2.20.2 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer	125
2.21 Cuenta en placa de <i>L.monocytogenes</i>	126
2.21.1 ANOVA	126
2.21.2 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer	126

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Clasificación de los envases activos.....	23
Tabla 2 La familia de los biopolímeros y polímeros de origen natural.....	26
Tabla 3 Cantidad de quitina, proteína, cenizas y lípidos (% w/w) presentes en algunas especies de crustáceos.....	27
Tabla 4 Principales etapas en la producción química de quitina y quitosano.....	29
Tabla 5 Clasificación y tipos de quesos.....	38
Tabla 6 Análisis químico proximal del desperdicio de camarón, quitina cruda y quitina pura.....	70
Tabla 7 Caracterización de los quitosanos obtenidos.....	71
Tabla 8 Propiedades mecánicas de las películas Q, QAL, QC y QH.....	76
Tabla 9 PVA de las películas de QAL modificadas.....	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Representación del tipo de envase	19
Fig. 2 Estructura de la quitina y quitosano	28
Fig. 3 Representación de la reacción de desacetilación para la obtención de quitosano.....	31
Fig. 4 Copolimerización entre quitosano y ácido láctico.....	32
Fig. 5 Reacción general para la obtención de quitosano-co-cítrico.....	33
Fig. 6 Reacción de entrecruzamiento propuesta entre el quitosano, ácido cítrico, HPMC.....	34
Fig. 7 Principales productores de Leche en México durante el 2012.....	46
Fig. 8 Distribución en la producción de queso durante el 2012 en México.....	47
Fig. 9 Metodología general.....	53
Fig. 10 Unidades experimentales de quesos inoculados con <i>L. monocytogenes</i> y sin inocular almacenados a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ y 20%HR.....	66
Fig. 11 Variación del pH y la acidez total titulable en la fracción sólida con respecto al tiempo de fermentación	69
Fig. 12 Espectro ATR-FTIR de quitosano, obtenido mediante desacetilación de quitina extraída por un método biológico-químico.....	71
Fig. 13 Espectro ATR-FTIR de las películas: a) Q, b) QAL, c) QC, d)QH.....	73
Fig. 14 Peso y espesor de las películas.....	74
Fig. 15 PVA de las películas, a dos gradientes de HR 22/75 (A) y 75/22 (B) a $4^{\circ}\text{C}\pm 2$	75
Fig. 16 Pérdida relativa de peso (RWL)(A) y humedad (B) con respecto al tiempo de almacenamiento a 4°C y 20%HR en los quesos recubiertos.....	79
Fig. 17 pH (A) y Acidez total titulable (ATT) (B) con respecto al tiempo de almacenamiento a 4°C y 20%HR en los quesos recubiertos.....	81
Fig. 18 Cuenta total en placa de mesófilos aerobios (I) y hongos y levaduras (II) con respecto al tiempo de almacenamiento a 4°C y 20%HR en los quesos recubiertos.....	84

Fig. 19 PVA de las películas de QAL con sorbitol (QALCs) y las películas de QAL sin adición de sorbitol (QALss).....	86
Fig. 20 Peso y espesor de las películas de QAL modificadas.....	87
Fig. 21 Espectro ATR-FTIR de a) SPI, b) QAL, c) QAL/0.25%SPI	89
Fig. 22 Humedad (%) de los quesos no inculados (A) y los quesos inoculados con <i>L. monocytogenes</i> (B) a 4°C y 20%HR.....	91
Fig. 23 Pérdida relativa de peso (RWL) en los quesos no inculados (A) y los quesos inoculados con <i>L. monocytogenes</i> (B) a 4°C y 20%HR.....	92
Fig. 24 pH de los quesos no inculados (A) y los quesos inoculados con <i>L. monocytogenes</i> (B) a 4°C y 20%HR.....	94
Fig. 25 Acidez total titulable (ATT) de los quesos no inculados (A) y los quesos inoculados con <i>L. monocytogenes</i> (B) a 4°C y 20%HR. Datos promedio de tres determinaciones.....	95
Fig. 26 Cuenta en placa de <i>L. monocytogenes</i> en queso ranchero inoculado después de 14 días de almacenamiento a 4°C y 20%HR.....	97
Fig. 27 SEM superficie de queso Ranchero no inoculado a los 14 días de almacenamiento: a(x500),b(x3000),c(x5000) correspondiente al control sin recubrir; d(x1000),e(x1000),f(x3000) quesos empacados en LDPE; g(x1000),h(x3000),i(x5000) quesos empacados en QAL/SPI.....	99
Fig. 28 SEM superficie de queso Ranchero inoculado con <i>L.monocytogenes</i> a los 14 días de almacenamiento: a(x5000),b(x16000) inóculo <i>L.monocytogenes</i> ; c(x1000),d(x3000),e(x5000) correspondiente al control sin recubrir; f(x1000),g(x5000),h(x5000) quesos empacados en LDPE; i(x1000),j(x3000),k(x5000) quesos empacados en QAL/SPI.....	102
Fig. 29 Espectro de H-RMN de quitosano (lote 1) a partir de quitina extraída biológicamente de desperdicio de camarón.....	113
Fig. 30 Espectro de H-RMN de quitosano (lote 2) a partir de quitina extraída biológicamente de desperdicio de camarón.....	113
Fig. 31 Espectro de H-RMN de quitosano (lote 3) a partir de quitina extraída biológicamente de desperdicio de camarón.....	114

ABREVIATURAS

PVA	Permeabilidad al Vapor de Agua
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
UFC	Unidades Formadoras de Colonia
HR	Humedad Relativa
DA	Grado de Acetilación
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido
RWL	Pérdida de peso
ATT	Acidez Total Titulable
SPI	Proteína Aislada de Soya
HA	Harina de Arroz
HPMC	Hidroxi propil metil celulosa
Q	Película de quitosano
QAL	Película de quitosano-ácido láctico
QC	Película de quitosano-co-cítrico
QH	Película de quitosano-ácido cítrico- hidroxipropilmetil celulosa



INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

La conservación de alimentos contempla la aplicación de tecnologías encargadas de prolongar su vida útil y su disponibilidad, para el consumo humano, protegiéndolos de microorganismos patógenos y otros agentes responsables de su deterioro.

La necesidad de prolongar la vida de anaquel de los alimentos permitiendo extender su distribución más allá de las fronteras comerciales, así como, el empleo de envases y embalajes con menor impacto ambiental, a propiciado la mejora y modificación de los envases existentes, exigiendo la investigación de nuevos materiales con el fin de igualar e incluso superar sus características.

El envasado de los alimentos ha permitido la protección y aislamiento de los alimentos. Sin embargo, el uso indiscriminado de materiales de envasado derivados del petróleo (plásticos), se ha convertido en un problema de contaminación ambiental, debido a su baja degradabilidad abriendo campo a la investigación de materiales de envasados biodegradables, que puedan obtenerse de fuentes renovables.

El concepto de envases inertes, es decir aquellos que no interactúan con el alimento se ha ido transformando paulatinamente, y hoy en día se prefiere el uso de envases activos, que liberen agentes hacia el alimento, prolongando la vida de anaquel de los productos e interactuando positivamente con ellos.

El quitosano, biopolímero biodegradable y antimicrobiano, puede formar películas capaces de emplearse como envase de alimentos, con la ventaja de obtenerse de una fuente natural considerada un desecho de la industria camaronera, la cabeza y exoesqueleto del camarón. Aunque las películas de quitosano poseen cualidades superiores con respecto a los plásticos, cuentan con la desventaja de ser rígidas y muy permeables al vapor de agua. Por estas razones se han llevado



a cabo modificaciones químicas al quitosano, con la finalidad de obtener películas con características específicas y mejoradas.

Dado que los alimentos son una matriz muy compleja, se requieren investigaciones específicas dirigidas a evaluar las películas biodegradables, para obtener envases que puedan cubrir las necesidades de cada uno de ellos.

El queso ranchero, es un queso fresco producido en diversos estados de la República Mexicana, es un producto altamente perecedero debido a su elevado contenido de agua y la utilización de leche bronca para su fabricación. Para aumentar su distribución y comercialización fuera de su lugar de origen, se requiere extender su vida útil, protegiendo este alimento de la proliferación de microorganismos indeseables y patógenos, como lo es *Listeria monocytogenes*, causante de listeriosis, infección que provoca una de las tasas más altas de hospitalización y mortalidad de alrededor del 23% de las poblaciones susceptibles a este patógeno.

En el presente trabajo se probaron distintos recubrimientos con base en quitosano para extender la vida de anaquel del queso ranchero y se realizaron modificaciones con el fin de adaptar las películas obtenidas a las necesidades de este alimento, generando un envase activo, que le brindara protección, con el mínimo de impacto ambiental.

2. TRATAMIENTOS DE QUESOS CON QUITOSANO REPORTADOS

Prolongar la vida de anaquel en quesos frescos, ha sido motivo de diversas investigaciones, debido al reto que conlleva por las características particulares del producto como lo es su alto contenido de humedad, además se requiere considerar diversas variables que dependen del tipo de queso en estudio.



Cerqueira *et al.* en el 2007, probaron diversos polisacáridos como recubrimiento de queso comercial, emplearon galactomanano extraído de *Gleditsia triacanthos*, agar extraído de algas *Glacilariae birdiae* y quitosano comercial con un grado de desacetilación de 90%. El mejor recubrimiento fue de *G. triacanthos* por presentar los valores más bajos de permeabilidad al vapor de agua y de transferencia de oxígeno.

Martins *et al.* (2010), determinaron la vida de anaquel de queso Ricotta recubierto con Galactomanano al que le incorporaron nisina, para la inhibición de *Listeria monocytogenes*. Observaron que el empleo de este recubrimiento era una alternativa para reducir la poscontaminación con *Listeria monocytogenes* en queso Ricotta durante su almacenamiento.

Guldas *et al.* en 2010, evaluarón el empleo de recubrimientos de k-carragenina, quitosano, zeína (maíz) y proteína del lactosuero en la vida de anaquel de un postre Turco con base en queso fresco “Mustafakemalpasa”. Lograron prolongar la vida de anaquel del postre Mustafakemalpasa hasta 10 días empleando zeína y proteína del lactosuero.

Di Pierro *et al.* (2011), probaron una película de quitosano/proteína del lactosuero y una atmósfera modificada para extender la vida de anaquel de queso Ricotta. Obtuvieron que los quesos cubiertos con el recubrimiento de quitosano/proteína de lactosuero y atmósfera modificada mostraron una reducción en el crecimiento microbiano y la vida de anaquel del producto se extendió.

Gammariello *et al.* (2011), usaron quitosano, pero no como película, sino que una solución de quitosano comercial en ácido láctico fue mezclada con la leche durante la producción de queso Stracciatella. Se evaluó la vida de anaquel del queso empleando quitosano combinado con un empaque de atmósfera modificada. Se logró la modificación de la vida de anaquel de 3 días a 7 días empleando quitosano y atmósfera modificada.



MARCO TEÓRICO

1. ENVASES

1.1 Definición y función

El término envase, tradicionalmente, se ha definido como una barrera pasiva que actúa retrasando el efecto adverso del ambiente sobre los alimentos. Puede ser fabricado con materiales de cualquier naturaleza y se utiliza para contener, almacenar, proteger, manipular, distribuir y presentar los alimentos, conservando sus características físicas, químicas y microbiológicas, en cualquier fase de la cadena de fabricación, distribución y consumo, satisfaciendo las necesidades del consumidor para su conveniencia y seguridad (Castillo, 2010).

Además de sus funciones primarias de contención y protección, el envasado permite informar al consumidor acerca del producto, empleando colores y formas atractivos para la promoción del mismo, siendo hoy en día uno de los factores determinantes de la elección de compra por parte de los consumidores (Fernández, 2000).

Los materiales comúnmente empleados en el envasado de alimentos son vidrio, hojalata, aluminio, papel, cartón y plásticos. Los polímeros derivados del petróleo destacan como materiales empleados en el envasado, debido a su flexibilidad, transparencia, bajo peso y menor costo (Castillo, 2010).

1.2 Clasificación

De acuerdo al nivel de protección que brindan al producto los envases se clasifican como (fig. 1):



Primario: Aquel que está directamente en contacto con el producto, conteniéndolo y protegiéndolo. Constituye, en el punto de venta, una unidad de venta inseparable destinada al consumidor o usuario final.

Secundario: Tiene como función contener uno o varios envases primarios, otorgándole protección para su distribución comercial. Habitualmente se desecha cuando se utiliza el producto o cuando se almacenan de forma particular.

Terciario: Es el agrupamiento de envases primarios o secundarios en un contenedor que los unifica y protege a lo largo del proceso de distribución comercial. Facilita la manipulación y el transporte del producto a lo largo de la cadena comercial; es desechado en el momento de la comercialización (Cervera, 2003).

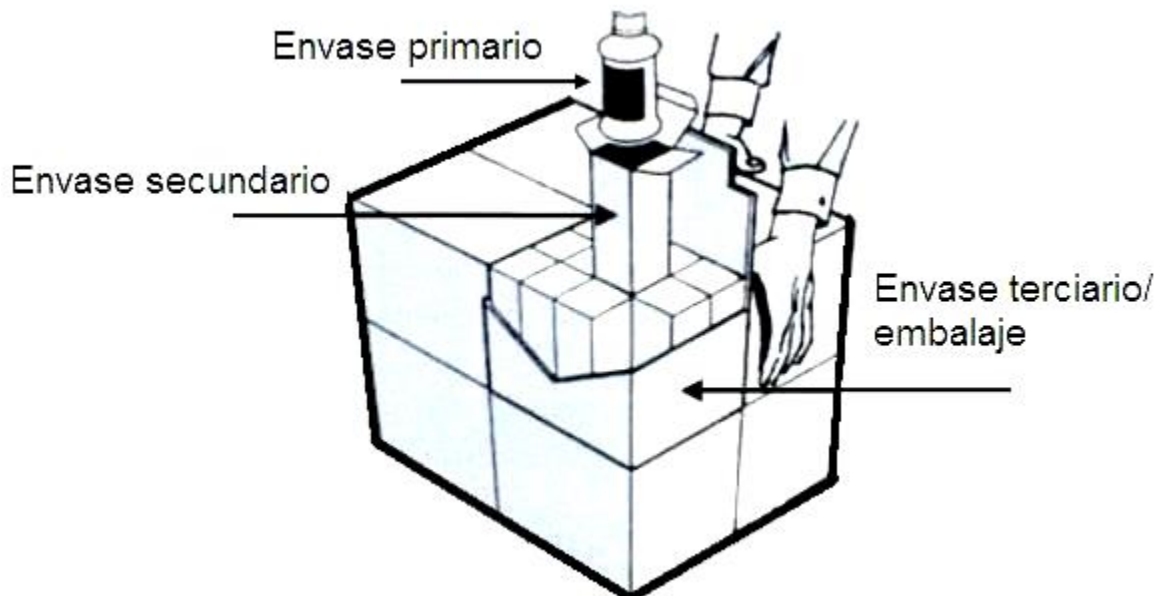


Fig. 1 Representación del tipo de envase (Cervera, 2003)

2. ENVASADO ACTIVO

La mejora continua en la calidad de los productos alimentarios, así como el incremento de su vida útil, con un contenido menor de aditivos o libres de ellos y que conserven sus propiedades nutritivas y organolépticas tras el procesado; ha



generado una continua necesidad de mejora de las propiedades intrínsecas de los envases y embalajes, propiciando cambios profundos en el diseño, los materiales y los procesos de envasado (Dainelli *et al.*, 2008). De este modo el concepto de envasado ha evolucionado desde la idea inicial de materiales inertes resistentes a los daños y que no permiten la migración de materiales del envase al alimento y que, consecuentemente, actúan como barrera pasiva, hacia planteamientos en los que el diseño del envase busca que éste interactúe de forma positiva con el alimento (Brody *et al.*, 2008). El desarrollo de este tipo de envases, ha permitido exportar e importar productos que hasta la aparición de los mismos era impensado, debido a su corta vida de anaquel.

2.1 Definición y función

Actualmente existen diversas definiciones de envase activo, ya que constituye un concepto heterogéneo que engloba a un rango de posibilidades tan amplio como lo son las formas en las que la interacción entre el envase y el alimento mejora su calidad y aceptabilidad. Podemos destacar las siguientes definiciones:

- ✓ Aquél que desarrolla alguna otra función que la de proporcionar una barrera inerte frente a las condiciones externas (Rooney, 1995).
- ✓ Aquél que interactúa directamente con el producto y/o con su entorno para mejorar uno o más aspectos de su calidad o seguridad (Hotchkiss, 2000).
- ✓ Toda técnica que pretende algún tipo de interacción favorable entre el envase y el producto, con el objeto de mejorar su calidad y aceptabilidad (Fernández, 2000).
- ✓ Sistema alimento-envase-entorno que actúa de forma coordinada para mejorar la salubridad y la calidad del alimento envasado y aumentar su vida útil (Catalá y Gavara, 2001).
- ✓ Aquél que permite la interacción con el alimento y juega un papel dinámico en la conservación del alimento (López-Rubio *et al.*, 2004).



En general los principales objetivos del envase activo son: aumentar la vida útil y facilitar el procesado y el consumo. Para aumentar la vida útil el envasado convencional se diferencia del activo en que, mientras el primero intenta minimizar el efecto de las variables causantes del deterioro, el segundo mantiene las variables en niveles predeterminados. Así pues, si en el interior del envase convencional los cambios que acontecían eran consecuencia de la evolución natural del producto; en el envasado activo el alimento está en un entorno que se va a modificar beneficiosamente a través de cambios inducidos gracias a su envolvente. Estos cambios son el resultado de las interacciones beneficiosas creadas entre alimento y envase y pueden basarse en la regulación del contenido en gases, en el control de la humedad, en la acción de diversas enzimas o en la liberación de sustancias antimicrobianas (Fernández, 2000).

2.2 Clasificación

Los envases activos pueden ser clasificados de acuerdo a la función que desempeñan, existen sistemas absorbedores, los cuales tienen como objetivo eliminar sustancias no deseadas, en esta clasificación se encuentran los sistemas secuestrantes de oxígeno, de control de la humedad, controladores de CO₂, absorbedores de olores y sabores indeseables. Los sistemas emisores aportan sustancias al alimento, pueden ser sistemas liberadores de antimicrobianos o bien, liberadores de aditivos. En la Tabla 1 se encuentra una descripción detallada de cada uno de ellos.

2.3 Integración de los componentes activos al envase

Existen dos estrategias para incluir los componentes activos al envase:

- 1) Sistema integrado. El componente activo se integra en el material de envasado de modo que forme parte de él.



Este sistema posee la ventaja de conseguir que toda la superficie del alimento este en contacto con el componente activo, reduciendo la necesidad de incorporación de aditivos al alimento, además, el consumidor no percibe el sistema activo como un elemento diferenciado del envase, lo que evita el posible rechazo del consumidor.

Es posible modificar los materiales plásticos empleados, con el fin de modificar su permeabilidad selectiva a diferentes gases, para lograr regular la composición de los gases presentes en la atmósfera del interior del envase (Brody *et al.*, 2008).

- 2) Sistema independiente. El componente activo se encuentra en algún dispositivo dentro del envase pero sin formar parte del material de envasado.

Este sistema es el más extendido debido a su bajo costo y facilidad de implementación en todo tipo de productos, suele consistir en sobres que contienen el principio activo, los sobres son fabricados con un material permeable por una sola cara, a través de la cual se realiza la transferencia de masa para permitir la acción del compuesto activo, sin tener contacto directo de éste con el alimento.

Su principal desventaja es el rechazo por parte de algunos consumidores, por considerarlo un elemento ajeno al alimento, además de la dificultad que existe para etiquetarlos convenientemente y evitar que se ingiera su contenido, así como garantizar que el material del que están hechos mantenga su integridad y resistencia (Fernández, 2000).



Tabla 1 Clasificación de los envases activos

Clasificación	Descripción	Ejemplos Comerciales
A B S O R B E D O R E S	Sistemas para el control de la humedad	Termarite® (Pty Ltd., Australia) Minipax® y Desimax® (Multisorb Technologies, USA)
	Sistemas para el control de etileno	Ever-Fresh® (Ever-Fresh Corporation, USA) PEAKfresh® (AT Plastics, Canadá) Power Pellet® (Ethylene Control, USA) Green Keeper® (Disgarmat, España)
	Sistemas para el control de oxígeno	Ageless® (Mitsubishi Gas Chemical, Japón) Freshlizer® (Toppan Printing, Japón) ATCO® (Atmosphere Controle, Francia) FreshMax® (Multisorb Technologies, USA)
	Sistemas para el control de dióxido de carbono	Ageless® (Mitsubishi Gas Chemical, Japón) FreshMax® (Multisorb Technologies, USA)



E M I S O R E S	Liberadores de antimicrobianos	Son sistemas capaces de liberar sustancias que actúan de forma efectiva sobre los microorganismos limitando su crecimiento mediante la prolongación de la fase de latencia, la reducción de la tasa de crecimiento o la reducción de los recuentos microbiológicos. Son empleados compuestos como etanol, dióxido de azufre, dióxido de cloro, ácidos orgánicos, aceites esenciales, compuestos quelantes, iones de plata, enzimas, bacteriocinas, antibióticos y fungicidas.	Zeopac® (Mitsubishi Gas Chemical, Japón) HealthShield® (B.F. Technologies, USA)
	Liberadores de aditivos	Permiten añadir a los alimentos toda una serie de ingredientes entre los que cabe citar aromas, edulcorantes, nutrientes y antioxidantes. La difusión de estos compuestos se consigue por evaporación, en el caso de los alimentos sólidos o por simple difusión en productos líquidos.	Resinas Bynel® 1100 (Dupont, USA) contienen BHT (antioxidante).

(Fernández, 2000)

2.4 Materiales empleados en el diseño de envases activos

Dada la gran variedad de polímeros desarrollados en los últimos 25 años, su uso en la fabricación de envases activos no se ha hecho esperar. Destaca el uso de polímeros con actividad antimicrobiana capaces de generar copolímeros y películas, sin embargo, en su mayoría se emplean los plásticos derivados del petróleo, tal como, el polietileno, polipropileno, poliestireno y polietilen-tereftalato (PET), los cuales debido al uso indiscriminado ha generado serios problemas ecológicos en la actualidad, contribuyendo a la contaminación ambiental provocada por desechos sólidos de baja degradabilidad, impulsando así el uso y la constante mejora e investigación de biopolímeros y bioplásticos con el fin de sustituirlos.



3. BIOPOLÍMEROS Y BIOPLÁSTICOS

Un polímero es una macromolécula constituida por la unión repetida de muchas unidades moleculares pequeñas, denominadas unidades de repetición, unidas entre sí por enlaces covalentes. En los polímeros sintéticos, estas unidades son formados por reacciones de polimerización a partir de monómeros (Sperling, 2006), como puede ser el estireno o cloruro de vinilo, entre muchos otros. En los polímeros naturales, o biopolímeros, y sus derivados, estos ya existen en la naturaleza como tal producidos en rutas metabólicas, por ejemplo, celulosa y quitina, este último tiene el derivado quitosano que es la forma desacetilada. Existe otra clasificación denominada polímeros de origen natural, en donde se engloba aquellos polímeros de síntesis a partir de monómeros existentes en la naturaleza, entre ellos destacan los polilácticos o poliglicólicos, aunque estos últimos no pueden denominarse biopolímeros.

Los biopolímeros tienen carácter biodegradable puesto que son sintetizados por sistemas biológicos, tal como microorganismos, plantas o animales (tabla 2). Una de las características más importantes de los biopolímeros es que pueden obtenerse a partir de fuentes renovables, procedentes directamente de plantaciones agrícolas o mediante la aplicación de determinados procesos biotecnológicos (OTA-BP-E-102, 1993).

Dentro de los biopolímeros, podemos encontrar a los bioplásticos, que comparten la característica de ser obtenidos de fuentes renovables y ser biodegradables, con la diferencia de que estos últimos presentan propiedades físico-químicas similares a los plásticos derivados de la industria petroquímica, tales como transparencia, permeabilidad, flexibilidad, elasticidad, resistencia eléctrica, solubilidad, resistencia química, estabilidad térmica, inflamabilidad o temperatura de combustión (De Eugenio, 2009).

**Tabla 2 La familia de los biopolímeros y polímeros de origen natural.**

Poliésteres <ul style="list-style-type: none">• Polihidroxicanoatos• Ácido poli-láctico	Polisacáridos (plantas/algas) <ul style="list-style-type: none">• Almidón (amilosa/amilopectina)• Celulosa• Agar• Alginato• Carragenina• Pectina• Konjac (glucomanano)• Diversas gomas (e.j., guar)
Proteínas <ul style="list-style-type: none">• Sedas• Colágeno/gelatina• Elastina• Resilina• Adhesivos• Poliamino ácidos• Soya, zeína, gluten de trigo, caseína, seroalbúmina	Polisacáridos (animal) <ul style="list-style-type: none">• Quitina/Quitosano• Ácido hialurónico
Polisacáridos (origen bacteriano) <ul style="list-style-type: none">• Xantano• Dextrano• Gelano• Levano• Poligalactosamina• Celulosa	Lípidos/ surfactantes <ul style="list-style-type: none">• Acetoglicéridos, ceras, surfactantes
Polisacáridos (origen fúngico) <ul style="list-style-type: none">• Pululano• Glucanos (levadura)	Polifenoles <ul style="list-style-type: none">• Lignina• Taninos• Ácido húmico Polímeros especiales <ul style="list-style-type: none">• Goma laca• Ácido poli-gama-glutámico• Caucho natural• Polímeros sintéticos obtenidos de grasas y aceites

3.1 Quitina y quitosano

La quitina y su principal derivado el quitosano han adquirido importancia científica debido a su amplio rango de aplicación, por poseer diversas propiedades como biodegradabilidad y biocompatibilidad, además de ser recursos abundantes y renovables (Pacheco, 2010).

La quitina es un componente ampliamente distribuido en la naturaleza, siendo el tercer polisacárido más abundante. Fue descubierta en 1811 por Braconot al aislar un material nitrogenado en sus estudios sobre la química de los hongos (Steinbüchel, 2005). Es un polisacárido estructural, presente en el exoesqueleto de animales pertenecientes al filo Arthropoda, tal como, insectos y crustáceos, además se ha encontrado en algas y las paredes celulares de algunos hongos (Dumitriu, 2005).



La producción industrial de este biopolímero prácticamente se basa en el tratamiento de las conchas de diversos tipos de crustáceos (camarones, langostas, cangrejos y krill) debido a la facilidad de encontrar estos materiales como desecho de las plantas procesadoras de estas especies (Shirai *et al.*, 1996). La quitina conforma una tercera parte del peso seco de dichas conchas, dependiendo de la especie y está asociada generalmente a otros componentes; en general el exoesqueleto contiene alrededor del 15-40% de quitina, proteínas alrededor del 20 al 40% y carbonato de calcio entre 20-50%, como componentes principales, y presenta en menor cantidad pigmentos (astaxantina) y otras sales metálicas. En la tabla 3 se muestran los porcentajes de proteínas, cenizas, lípidos y quitina presentes en algunas especies de crustáceos estudiados (Pacheco, 2010).

Tabla 3 Cantidad de quitina, proteína, cenizas y lípidos (% w/w) presentes en algunas especies de crustáceos

Fuente de quitina		Proteína	Quitina	Ceniza	Lípidos
Cangrejo	<i>Collinectes sapidus</i>	25.1	13.5	58.6	2.1
	<i>Chionoectes opilio</i>	29.2	26.6	40.6	1.3
	<i>Paralithodes camtschaticus</i>	22	31	46	1.0
Camarón	<i>Pandalus borealis</i>	41.9	17.0	34.2	5.2
	<i>Cragon cragon</i>	40.6	17.8	27.5	9.9
	<i>Penaeus monodon</i>	47.4	40.4	23.0	1.3
Langosta	<i>Procamborus clarkia</i>	29.8	13.2	46.6	5.6
Krill	<i>Euphausia superba</i>	41.0	24.0	23	11.6
Gamba		61.6	33.0	29.4	1.4

(Pacheco, 2010)



El quitosano es mucho menos abundante en la naturaleza que la quitina, pudiéndose encontrar sólo en la pared celular de ciertos hongos y algunas plantas (Shirai *et al.*, 1996). Este polímero es biodegradable, biocompatible, no posee toxicidad (Kanatt *et al.*, 2008) y tiene un carácter antimicrobiano, además es un biomaterial muy versátil que puede emplearse en forma de solución, película, fibra, hidrogel, ó nanopartícula; debido a éstas características se han incrementado sus aplicaciones en diversas áreas tales como: agricultura, industria alimenticia, medicina, farmacéutica, cosméticos, tratamiento de aguas, papel y textiles.

La producción comercial de quitosano se lleva a cabo empleando como materia prima quitina (Dumitriu, 2005), debido a la relación química que guardan entre sus estructuras, mediante un proceso de desacetilación químico o enzimático. La quitina es un biopolímero lineal de enlaces (1-4) 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopiranososa (unidad A); el quitosano (quitina desacetilada), es un copolímero lineal de enlaces (1-4) unidad A y 2-amino-2-deoxy- β -D-glucopiranososa. Se considera quitosano cuando la reacción de desacetilación de la quitina elimina al menos un 50% de sus grupos acetilo (fig. 2) (Lárez, 2006).

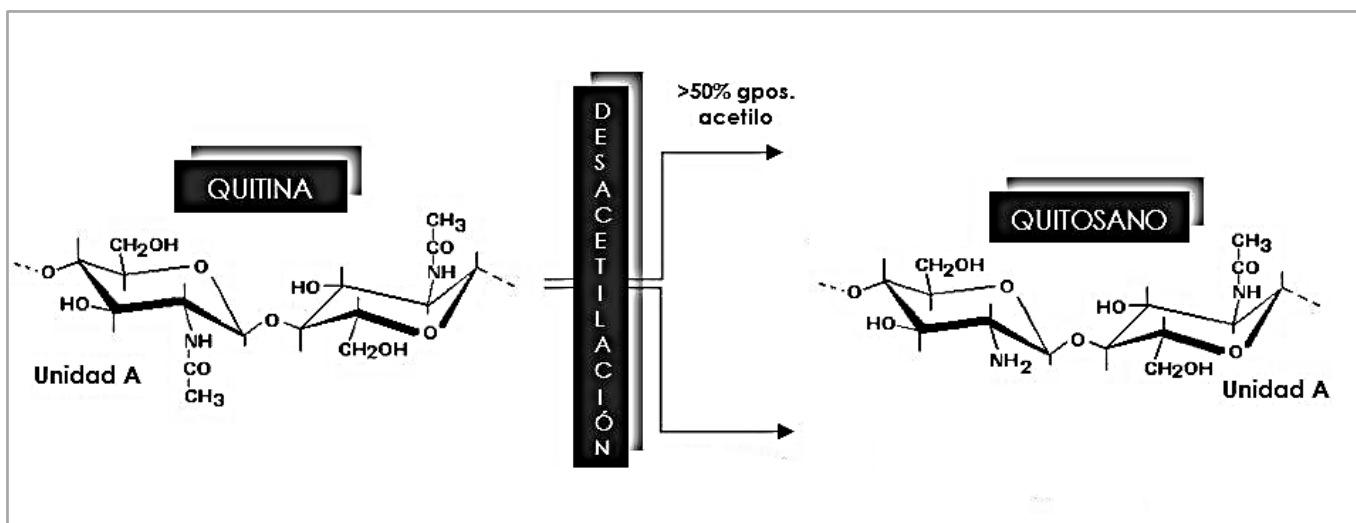


Fig. 2 Estructura de la quitina y quitosano.



3.2 Obtención de quitina y quitosano a partir de desechos de crustáceos

La obtención de quitosano a partir de desecho de crustáceos consiste en cuatro principales etapas: decoloración (extracción de pigmentos), desmineralización (eliminación de las sales inorgánicas como carbonato de calcio), desproteínización (remoción de proteínas) y desacetilación (hidrólisis del grupo acetilo de la quitina) (Shirai et al., 1996).

Tabla 4 Principales etapas en la producción química de quitina y quitosano

Etapas	Agente	T (°C)	t (h)
Decoloración	Disolventes orgánicos	20-30	1
Desmineralización	2.5-8% HCl	15-30	0.5-48
Desproteínización	0.5-15% NaOH	25-100	0.5-72
Desacetilación	39-69% NaOH	60-150	0.5-144

(Steinbüchel, 2005)

3.3 Extracción química de la quitina

La despigmentación solo se realiza cuando es indispensable tener un producto completamente puro. Se lleva a cabo empleando soluciones de hipoclorito de sodio, acetona, cloroformo, peróxido de hidrógeno, acetato de etilo, etanol o una mezcla de ellos (Pacheco, 2010).

Se emplean soluciones de ácidos como HCl, HNO₃, H₂SO₄, CH₃COOH, HCOOH para llevar a cabo la desmineralización. Es utilizado con mayor frecuencia HCl en concentraciones que varían de 2.5-8% (tabla 4) y un tiempo de 0.5 a 48h (Steinbüchel, 2005).

Para la eliminación de las proteínas, estas son extraídas con soluciones alcalinas de NaOH o KOH. La concentración de NaOH empleada (Tabla 4) varía de 0.5-15% con tiempos de 0.5-72 h (Steinbüchel, 2005).



Éste proceso, es un método agresivo, que genera desechos dañinos al medio ambiente, además de un elevado consumo de energía y agua, así como, la destrucción de subproductos de alto valor agregado como proteínas, astaxantina y calcio.

3.4 Extracción biológica-química de quitina

Se lleva a cabo mediante una fermentación ácido-láctica combinada con tratamientos químicos, que permite remover las proteínas mediante acción enzimática y la remoción de calcio por solubilización en ácidos orgánicos. Se emplea como microorganismo iniciador comúnmente, *Lactobacillus*, el cual producen ácido láctico a partir de una fuente de carbono adicionada al medio, entre las que se han estudiado, glucosa, sacarosa, lactosa, suero de leche, entre otros. El ácido producido genera un descenso en el pH durante las primeras horas de fermentación lo que evita el crecimiento de microorganismo de descomposición y la desmineralización de la quitina. Simultáneamente las enzimas proteolíticas producidas por el microorganismo o presentes en el desecho en combinación con la temperatura y el pH, llevan a cabo la desproteínización (Cira *et al.*, 2002).

Empleando este proceso, se logra una reducción de residuos contaminantes así como, una reducción en costos de producción, permitiendo la obtención de productos con características químicas de mayor calidad y la recuperación de compuestos de alto valor agregado que son: las proteínas, astaxantina y calcio, que pueden ser aprovechados en distintas áreas.

3.5 Desacetilación química

La desacetilación se lleva a cabo empleando como agente desacetilante una base fuerte, comúnmente NaOH en concentraciones que varían de 39-69% (fig. 3) (Steinbüchel, 2005).

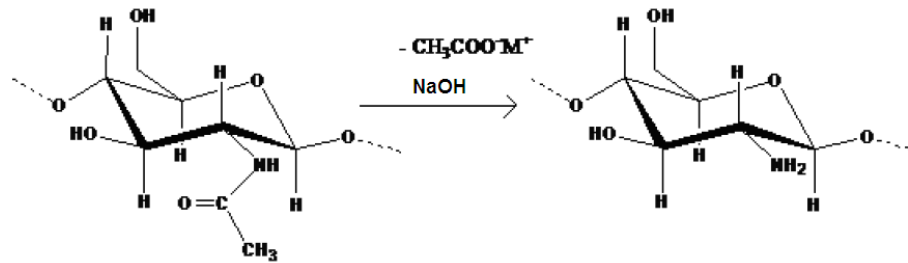


Fig. 3 Representación de la reacción de desacetilación para la obtención de quitosano.

Existen dos tipos de desacetilación química: la desacetilación homogénea y la heterogénea. La homogénea se lleva a cabo a bajas temperaturas, generalmente a temperatura ambiente, durante periodos de tiempo largos de aproximadamente 3 días, obteniéndose valores de desacetilación menores. La desacetilación heterogénea, emplea temperaturas altas, que varían de 100-140°C permitiendo obtener mayores valores de desacetilación (Juárez-Castelán, 2010).

3.6 Propiedades de importancia en el quitosano.

3.6.1 Formación de películas

El quitosano es soluble en soluciones diluidas de ácidos minerales como: el ácido clorhídrico, ó ácidos orgánicos como: el ácido acético, láctico y cítrico. Una vez disuelto, el quitosano es capaz de formar películas, mediante la evaporación del disolvente. Esta capacidad se debe a las interacciones electrostáticas entre el grupo amino protonado del quitosano y los iones carboxilato del ácido carboxílico (Ritthidej *et al.*, 2002).

Las películas de quitosano obtenidas mediante evaporación del disolvente, son amorfas y poseen propiedades de permeabilidad al vapor de agua similar a la del celofán (Li *et al.*, 1997), son rígidas, durables, flexibles y difíciles de rasgar; la mayoría de sus propiedades mecánicas son comparables a las de algunos polímeros comerciales de mediano esfuerzo. Se ha reportado que las películas



poseen valores moderados de permeabilidad al agua y pueden ser utilizadas para incrementar la vida de anaquel de productos frescos con altos valores de actividad de agua; asimismo también resultan ser excelentes barreras para la permeabilidad al oxígeno (Plascencia, 2004).

3.6.2 Modificación del quitosano

Pueden realizarse modificaciones químicas al quitosano, con el fin de cambiar sus propiedades físicas y químicas. Dichas modificaciones pueden llevarse a cabo en el grupo amino y en los hidroxilos primario y secundario. Las derivatizaciones posibles incluyen su entrecruzamiento, eterificación, esterificación y copolimerización (Lloyd *et al.*, 1998).

3.6.2.1 Quitosano-ácido láctico

La síntesis del copolímero quitosano-ácido láctico es llevada a cabo a 80°C durante 2h (Espadín, 2012). Como se muestra en la fig. 4, en primera instancia el grupo amino del quitosano se protona interactuando iónicamente con el ion carboxilato del ácido láctico. Posteriormente bajo determinadas condiciones de reacción se puede lograr la formación de un enlace amida entre el quitosano y ácido láctico y al mismo tiempo ocurre la policondensación del ácido láctico (Albertsson *et al.*, 1999).

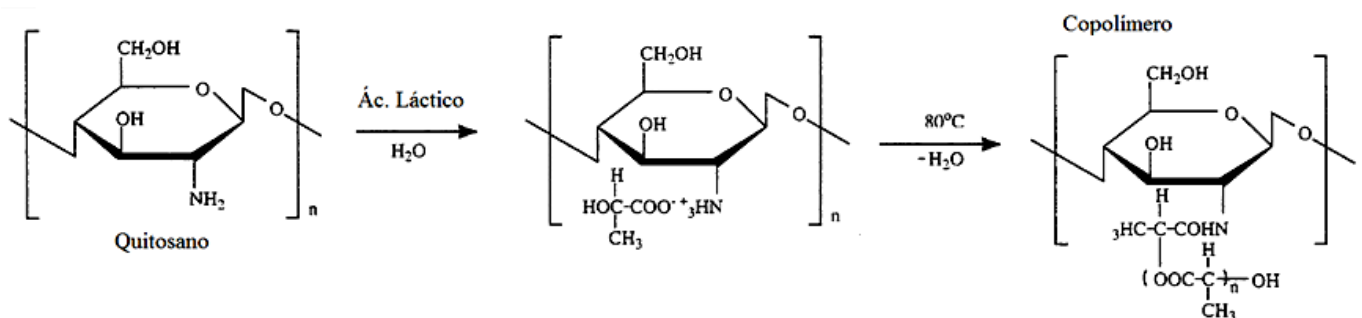


Fig. 4 Copolimerización entre quitosano y ácido láctico (Albertsson *et al.*, 1999)



3.6.2.2 Quitosano-co-cítrico

Obtenido mediante la reacción de esterificación a 70°C en presencia de catalizador, entre el quitosano y ácido cítrico (fig. 5). La reacción comienza debido a la electronegatividad del oxígeno del grupo hidroxilo que se encuentra unido al metileno del quitosano en el carbono 6, el cual, puede atacar al carbono del grupo carbonilo del ácido formando un enlace éster. Para esto se utiliza como catalizador al monofosfato de sodio debido a que éste favorece la nucleofilicidad del oxígeno (Alonso *et al.*, 2009; Corona-Suárez, 2011).

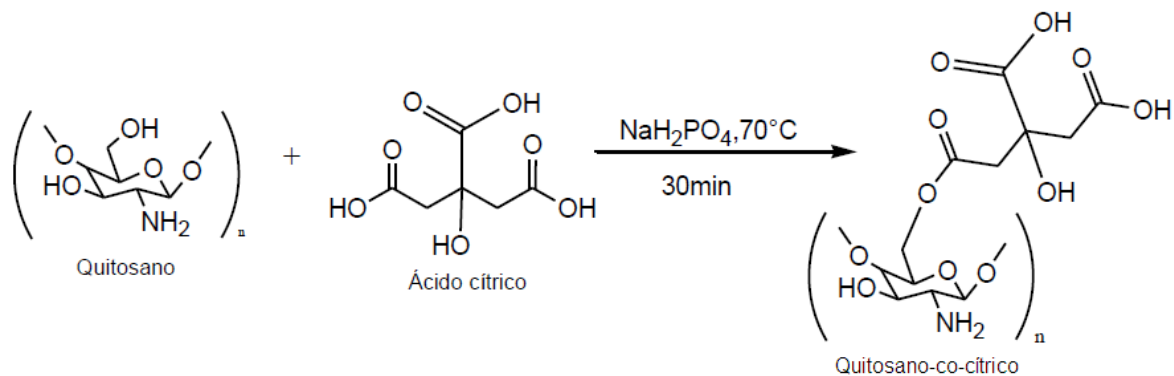


Fig. 5 Reacción general para la obtención de quitosano-co-cítrico (Corona-Suárez, 2011)

3.6.2.3 Quitosano-cítrico-HPMC

Obtenido mediante una reacción de entrecruzamiento (fig. 6) entre el quitosano y HPMC, empleando como agente de entrecruzamiento ácido cítrico y NaH_2PO_4 como catalizador a 100-110°C durante 3 min. Esta funcionalización, permite obtener un material con propiedades mecánicas químicas superiores, con una mejor resistencia al vapor de agua a altas humedades relativas y bajas temperaturas (Nicio, 2012).

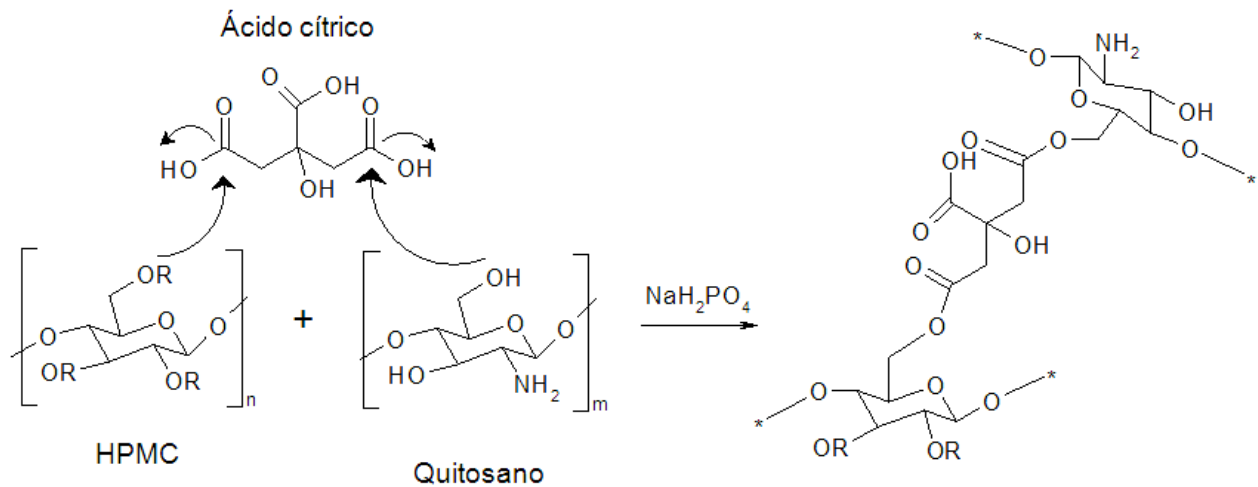


Fig. 6 Reacción de entrecruzamiento propuesta entre el quitosano, ácido cítrico, HPMC y NaH_2PO_4 como catalizador donde $\text{R}=\text{H}$, CH_3 o $\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ (Nicio, 2012)

3.6.3 Capacidad antimicrobiana

El quitosano ha mostrado poseer actividad antimicrobiana contra diversos microorganismos (Plascencia, 2004); es eficaz en la inhibición de hongos y levaduras, seguido de bacterias Gram positivas y finalmente Gram negativas (Dutta *et al.*, 2009). Destaca la inhibición de bacterias como: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacilo subtilis*, y *Staphylococcus aureus*; hongos: *Botritis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Drechtera sorokiana*, *Micronectriella nivallis*, *Piricularia orizae*, *Rhizoctonia solana*, *Trichophyton equinum*. Su acción antimicrobiana está influenciada por factores intrínsecos como el tipo de quitosano, el grado de depolimerización y desacetilación, el hospedero, la composición nutritiva y química del sustrato, pH del medio de cultivo, condiciones ambientales y la presencia o ausencia de sustancias que interfieran como lípidos y proteínas (Pacheco, 2010).

Los mecanismos de acción por los cuales el quitosano ejerce dicha acción, se desconocen; se han propuesto diversos mecanismos para intentar explicar el fenómeno, basados en la carga positiva que desarrolla el quitosano en medio



ácido, debido a la protonación del grupo amino. La interacción de estos grupos (NH_3^+) con las membranas celulares cargadas negativamente (bacterias Gram negativas), altera las propiedades de barrera de la membrana exterior del microorganismo; bloqueando físicamente la membrana celular externa, impidiendo el flujo normal de nutrientes y desechos, provocando la muerte bacteriana. Por otro lado, el efecto quelante del quitosano, podría disminuir la concentración de algunos metales necesarios en procesos enzimáticos, en la producción de toxinas y en el propio crecimiento del microorganismo (Lárez, 2008).

En cuanto a su acción fungicida, se ha observado que el quitosano inhibe diversas especies de hongos, exceptuando, o siendo menos efectivo con aquellos que lo poseen en sus paredes celulares. La presencia natural de quitosano en las paredes celulares no genera efectos adversos para los microorganismos. La actividad fungicida del quitosano se ha asociado a la interacción de los grupos amino libres cargados positivamente, con residuos negativos de las macromoléculas expuestas en la pared de los hongos, cambiando la permeabilidad de la membrana plasmática, con la alteración de sus principales funciones (Lárez, 2008).

4. QUESO RANCHERO

4.1 Definición

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) considera que:

“El queso es un producto fresco o afinado, sólido o semisólido obtenido por:

a) Coagulación de la leche entera, la leche descremada, leche parcialmente descremada, crema, crema de lactosuero, suero de mantequilla, solo o en



combinación gracias a la acción del cuajo o de otros agentes coagulantes apropiados y por desuerado parcial de lactosuero resultante de esta coagulación.

b) Por el empleo de técnicas de fabricación que implican la coagulación de la leche y/o de materia provenientes de ésta, a fin de obtener un producto terminado que posea las mismas características físicas, químicas y organolépticas que el producto definido en el apartado anterior a)” (Madrid, 1999).

La Norma Oficial Mexicana (NOM-121-SSA1-1994) Quesos: frescos, madurados y procesados. Define a los quesos, como “productos elaborados con la cuajada de leche estandarizada y pasteurizada de vaca o de otras especies animales, con o sin adición de crema, obtenida por la coagulación de la caseína con cuajo, gérmenes lácticos, enzimas apropiadas, ácidos orgánicos comestibles y con o sin tratamiento ulterior por calentamiento, drenada, prensada o no, con o sin adición de fermentos de maduración, mohos especiales, sales fundentes e ingredientes comestibles opcionales, dando lugar a las diferentes variedades de quesos pudiendo por su proceso ser: fresco, madurado o procesado”.

La transformación de la leche en queso comporta en general cuatro etapas:

- 1) Coagulación: Modificaciones fisicoquímicas de micelas de caseína bajo la acción de enzimas proteolíticas y/o de ácido láctico que determinan la formación de un entramado proteico denominado coágulo o gel.
- 2) Desuerado: Separación del suero después de la rotura mecánica del coágulo, por moldeado y en algunos casos con la ayuda de presión: esta operación conduce a la obtención de la cuajada.
- 3) Salado: Incorporación de sal en la superficie o en la masa o bien por inmersión en salmuera.



- 4) Afinado o maduración: Conjunto de transformaciones bioquímicas de los constituyentes de la cuajada bajo la acción de enzimas, la mayor parte de ellas de origen microbiano.

Según los parámetros tecnológicos que entran en estas etapas se puede obtener una gran variedad de quesos (Eck, 1990).

4.2 Clasificación

Clasificar a los quesos es una tarea difícil, ya que, además de existir una gran variedad, muchos de ellos están en las fronteras o límites de las clases que se establezcan, por esta razón existen diversos criterios que se pueden seguir para su clasificación. En la tabla 5, se resume los principales criterios de clasificación y los tipos de quesos que de ellos se derivan.

4.3 Características del queso “ranchero”

El queso “ranchero”, “molido” o “de aro”, es tal vez el más difundido en el país, pues su elaboración no requiere de profundos conocimientos técnicos, además goza de mucha aceptación y es consumido por amplios sectores sociales de la población mexicana, arraigándose en el gusto de la gente desde antaño. Es elaborado en varios estados de la República, probablemente en todos y es frecuente encontrarlo a la venta en los mercados públicos, fijos y ambulantes, vendiéndose por pieza, en general (Villegas, 1993).

Se considera un queso fresco, de pasta blanda no prensada, elaborado generalmente con leche de vaca bronca (Villegas, 1993); aunque también es posible encontrarlo fabricado con leche de vaca pasteurizada, no acidificado y de coagulación enzimática (López, 2004). Se presenta como un cilindro de escasa altura, con un peso que oscila entre unos 250g hasta cerca de 1kg (Villegas, 1993).



Tabla 5 Clasificación y tipos de quesos

Criterio	Clasificación	Descripción
Tipo de leche	Leche de vaca	En algunos países se emplea la leche de otros animales, tales como leche de búfala, camella, llama.
	Leche de cabra	
	Leche de oveja	
	Mezclas de éstas	
Método de coagulación	Por acción enzimática del cuajo	Con la enzima cuagulante renina, secretada en las membranas de las mucosas del cuarto estómago de los terneros jóvenes.
	Por acción enzimática de cuajos microbianos	Por ejemplo, la enzima cuagulante producida por el moho <i>Mucor miehei</i> .
	Por acidificación	Con la adición de ácidos tales como cítrico, láctico o acético.
	Combinada	En algunos tipos de quesos se combinan la acidificación y el cuajo.
	Por extractos vegetales	Por ejemplo el extracto vegetal "Ficus carica", o latex de la higuera.
Contenido de humedad	Frescos	Poseen un porcentaje de humedad entre el 68-80%. Su contenido de humedad es alto, no han sufrido un proceso de maduración por lo que su sabor es muy similar a leche fresca o leche acidificada.
	Blandos	Si su porcentaje de humedad oscila entre 55-57%. Son madurados durante algún tiempo, desarrollando aromas y sabores característicos de cada tipo.



	Semiduros	Cuando su porcentaje de humedad va de 42-55%. Son sometidos a maduración desde una semana a varios meses. La mayoría suelen tener corteza y pueden conservarse durante varios meses en las debidas condiciones.
	Duros	Su humedad se encuentra alrededor de 20-40%. Son sometidos a largos períodos de maduración (incluso superior a un año) y han sido prensados con intensidad de ahí su bajo contenido de humedad. Su pasta es dura y compacta, con o sin agujeros.
Contenido de grasa	Doble graso	Su contenido de grasa expresado en porcentaje sobre el extracto seco es mínimo de 60%.
	Extragraso	Posee un contenido mínimo del 45% de grasa sobre extracto seco.
	Graso	Con un contenido mínimo del 40% de grasa sobre extracto seco.
	Semigraso	Contiene como mínimo un 20% de grasa sobre extracto seco
	Magro	Contiene menos del 20% de grasa sobre extracto seco.
Textura	Con agujeros redondeados	Resultado de las fermentaciones de ciertas bacterias lácticas productoras de ácido láctico y anhídrido carbónico. Ejemplos son el queso Emmental, Gruyère y Gouda.



Granular	Poseen agujeros de tipo granular. Originados por la sustitución del aire atrapado durante el proceso de moldeado, por anhídrido carbónico generado en la fermentación láctica.
Cerrada	Este tipo de textura es producida cuando se emplean cultivos microbianos que desprenden muy poco anhídrido carbónico.

(Madrid, 1999)

Este queso es altamente perecedero debido a su elaboración con leche cruda y al elevado contenido de agua que oscila entre 45 y 55% (Villegas, 1993), por tales motivos, su vida de anaquel es máxima de 10 días (López, 2004).

La composición, sabor, aroma y textura del queso ranchero dependen de la calidad de la leche empleada en su elaboración. Contiene cerca de 45-55% de humedad, 18 a 29% de grasa, 17-21% de proteína, entre 1-3% de sal y un pH mayor o igual a 6.1 (López, 2004).

4.4 Microorganismos patógenos de importancia en el queso

La calidad microbiológica general de los quesos y la presencia de microorganismos patógenos, depende de la calidad de leche empleada, de la eficacia del tratamiento térmico de la misma, la prácticas de manufactura que incluyen la limpieza de la quesería, la calidad de los cultivos, el manejo de la cuajada, la temperatura de almacenamiento, así como, su manejo durante el transporte y la distribución del mismo (Farkye, 2002). Dentro de la microflora contaminante identificada destaca la presencia de *Escherichia coli*, *Pseudomonas spp.*, *Brucella spp.*, *Salmonella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Staphylococcus aureus* (Villanueva, 2010), *Bacillus cereus*, *Mycobacterium tub.*, *Campylobacter*,



Clostridium perfringens, *Coxiella burnetii*, *Yersinia* y *Listeria monocytogenes* (López, 2004).

4.4.1 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes produce dos tipos de listeriosis: invasiva y no invasiva. La listeriosis invasiva, manifestada como bacteriemia y/o meningoencefalitis, es una enfermedad grave, siendo la población más susceptible con tasas de mortalidad altas los niños recién nacidos, ancianos, individuos inmunodeprimidos y mujeres embarazadas. La infección puede ser transmitida de la madre al feto durante la gestación, esta bacteria es capaz de atravesar la barrera trasplacentaria. En mujeres embarazadas infectadas pueden presentarse nacimientos prematuros, bacteremia en el recién nacido e incluso abortos (MacDonald *et al.*, 2005).

El queso fresco posee múltiples condiciones que favorecen el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, tal como, su alto contenido de humedad (45-55%), bajo contenido de sal y un pH cercano a la neutralidad de 6.0-6.5, aunado a su capacidad para desarrollarse a temperaturas de refrigeración, la prevalencia de este microorganismo en el queso constituye un problema de seguridad alimentaria (Kamlesh *et al.*, 2012). Diversos brotes de infección con *Listeria monocytogenes* han sido reportados por consumo de queso fresco (Farkye, 2002), por tal motivo, han sido clasificados por la FDA como el principal grupo de productos alimenticios listos para el consumo, con mayor riesgo de contaminación por *Listeria monocytogenes* (Kamlesh *et al.*, 2012). Uno de los casos más importantes de listeriosis causados por consumo de quesos estilo mexicano, ocurrió en California, EUA, en donde el consumo de este queso estuvo implicado en 142 casos de listeriosis, donde murieron 48 personas (Linnan *et al.*, 1988). En el 2000, se reportó un brote de listeriosis en Carolina del Norte, por consumo de quesos blandos estilo Mexicanos, incluido queso fresco, que provocó 12 casos de listeriosis, de los cuales 11 eran mujeres y diez de ellas estaban embarazadas, la infección con *Listeria monocytogenes* dio lugar a 5 fetos muertos, 3 prematuros y 2 recién nacidos infectados (MacDonald *et al.*, 2005).



La presencia de *Listeria monocytogenes* en queso, es tan seria, que la legislación mexicana específica en la Norma Oficial Mexicana “NOM-121-SSA1-1994, Bienes y servicios. Quesos: frescos, madurados y procesados.”, que el microorganismo debe estar ausente en 25g de muestra, además señala que: “Cuando la Secretaría de Salud, de acuerdo al muestreo y los resultados del análisis microbiológico detecte la presencia de *Listeria monocytogenes*, ordenará la realización de un plan de trabajo por parte del fabricante o importador para controlar la presencia de dicho microorganismo”.

Listeria monocytogenes es un bacilo corto de aproximadamente 0.5 a 2.0 μ m de longitud y 0.4-0.5 μ m de diámetro, anaerobio facultativo, no esporulado ni ramificado, suele observarse en disposición individual o formando cadenas cortas. Es un microorganismo Gram positivo, con tendencia a variar entre Gram positivo y Gram negativo en cultivos viejos. Su temperatura óptima va de 30°C a 37°C, pero puede sobrevivir y multiplicarse a bajas y altas temperaturas (<1°C<50°C); crece en un rango de pH de 4.0-9.5 y resiste altas concentraciones de sal hasta de 10%. Es catalasa positiva y oxidasa negativa, las reacciones de Voges-Proskauer y rojo de metilo son positivas, no hidrolizan la urea ni la gelatina, no producen indol ni sulfuro de hidrógeno (H₂S), pero sí ácido a partir de la D-glucosa. Las colonias de *Listeria monocytogenes* en agar nutritivo tras 24-48h de incubación son pequeñas (0.5-1.5mm), redondas y translúcidas, presentan una coloración gris-azulado vistas con iluminación normal, pero tiene un brillo azul-verdoso cuando se observan con luz transmitida de manera oblicua (Robinson, 1999). Los medios selectivos utilizados para el aislamiento e identificación de *Listeria spp*, son PALCAM, LPM, Oxford y Oxford modificado, las colonias características de este microorganismo aparecen de color verde-grisáceo con halos negros alrededor de las colonias debido a la degradación de la esculina a esculetina y formación de un complejo con el hierro (Hegde *et al.*, 2007).



4.5 Envasado y conservación de los quesos

El envasado de los quesos, debe asegurar su protección frente a los agentes exteriores, durante el período que empieza en el envasado y termina en el momento del consumo del producto. También tiene por objetivo el regular intercambios de calor y gases con el medio exterior. De tal forma que, los films empleados para su envasado deben reunir numerosas exigencias, primeramente mecánicas y especialmente de porosidad o permeabilidad a los gases. Ello es tanto más importante cuanto mayor deba ser el período que deba permanecer envasado el queso.

Son diversos los materiales empleados en el envasado de quesos frescos, sin embargo los que se utilizan con mayor frecuencia son bolsas fabricadas con polietileno de baja densidad (LDPE) y recipientes termoformados fabricados con poliestireno (PS). El LDPE es transparente, suave y flexible, extensible y resistente al arrugamiento. Posee una buena resistencia a la rotura. Su permeabilidad al vapor de agua es extraordinariamente baja; por el contrario, su permeabilidad a los gases (especialmente al oxígeno) es elevada. El PS estándar, posee una densidad de 1.05, es muy transparente y brillante. Es inerte frente al producto envasado, pero su resistencia en contacto con compuestos grasos es escasa, se vuelve frágil y no resiste a los impactos mecánicos (Eck, 1990).

4.5.1 Tratamientos antimicrobianos.

Debido al alargamiento de los circuitos comerciales, la industria desea, en general, que los productos que fabrica, en particular los quesos frescos y envasados, estén protegidos frente a las alteraciones provocadas por el crecimiento de mohos, alteraciones que pueden afectar al aspecto como al gusto. Es por ello, que en determinados casos, se desea emplear envases antifúngicos con el objeto de inhibir el desarrollo superficial de los mohos.



Entre los diferentes fungicidas para envases de queso se encuentran, por ejemplo, las sales del ácido propiónico o del ácido benzoico. Sin embargo estos fungicidas no son aceptados en todos los países, al igual que el ácido salicílico y los ésteres. Uno de los fungicidas recomendado en envases alimentarios es el ácido sórbico y sus sales, debido a la similitud que guarda en su estructura química con el ácido cáprico. Generalmente se emplean sus sales, tal como, el sorbato potásico o el sorbato cálcico, los cuales son incorporados mediante una inducción ligante para ser aplicados al soporte. Una cantidad mínima de 3-4g de sorbato de calcio por m² de material de envase es precisa para ser eficaz (Eck, 1990).

Otro fungicida ampliamente utilizado en la industria de alimentos y en particular en la industria quesera, es la natamicina o pimaricina, antibiótico producido por *Streptomyces natalensis*, efectivo principalmente contra levaduras y mohos, siendo poco efectivo contra bacterias (García, 2004). La pimaricina, ha sido utilizada durante más de 20 años para impedir el crecimiento fúngico en quesos y embutidos. Los quesos se tratan por inmersión en una suspensión de natamicina en agua o se cubren con una emulsión de un polímero en agua, en la mayoría de los casos acetato de polivinilo. Normalmente, las suspensiones acuosas para tratamientos de inmersión contienen entre un 0,1% y un 0,2% (p/v) de natamicina, mientras que las emulsiones de polímeros para fines de revestimiento contienen entre un 0,01% y un 0,05% (p/v) de natamicina. La mayoría de estos tratamientos son muy eficaces para impedir el crecimiento fúngico en la superficie de quesos y embutidos, sin embargo, debido a la baja solubilidad de la natamicina, a veces, no se inhiben completamente algunas especies de mohos menos sensibles a la misma. Solo la natamicina que se halle en solución estará disponible para ejercer una actividad antifúngica (Patente, ES 2 153 074 T3). Además, en la actualidad, el uso indiscriminado de antibióticos, ha provocado la aparición de microorganismos resistentes, es decir, microorganismos capaces de seguir viviendo y (o) multiplicarse y causar una infección aún después de aplicar el agente antimicrobiano. Este problema, va en aumento, generando un crecimiento en el



número de bacterias resistentes y menos recursos para combatirlas (Álvarez, 2006).

4.6 El Queso en México

México, si bien no es un gran productor de leche y de queso, comparado con algunos países europeos, destaca por poseer, al menos unos 20 tipos diferentes. La mayor parte son elaborados con leche bronca a nivel artesanal y otros con leche pasteurizada y tecnología un tanto más moderna (Villegas, 1993).

La transformación de la leche en queso reviste en el país una importancia económica y social múltiple al permitir “guardar” la leche en forma natural con el objetivo de transportarla a los centros de consumo para su fácil comercialización, o bien para conservar los sólidos de la leche en aquellas zonas de condiciones ambientales hostiles a la preservación, tales como los trópicos y las zonas calurosas y secas; constituye entonces una forma de comercializar la leche en regiones donde no existe el hábito de consumo de leche fluida (Cervantes *et al.*, 2008). Además el queso, es un alimento muy valioso, pues proporciona los elementos esenciales para una adecuada nutrición con la ventaja de poseer gran diversidad composicional y organoléptica que satisface las necesidades gustativas de todo tipo de consumidores (Villegas, 1993).

4.7 Producción de leche y queso en México

Según la SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y pesquera), la producción de leche en México durante el 2012 fue de 10,946,015 miles de litros (cifras preliminares), con un crecimiento anual con respecto al 2011 de 2.1%.

En cuanto a la distribución geográfica de la producción, en el 2012 no se determinaron cambios de relevancia, manteniéndose una alta concentración de la producción en 9 entidades federativas, que aportaron en conjunto el 74.0 por ciento del total nacional (fig. 7).



Se consolidaron como principales estados productores de leche, Jalisco con 18.5 por ciento del total de la producción, la Región Lagunera (Coahuila y Durango) con 21.2 por ciento, Chihuahua con 8.9 por ciento, seguido por Veracruz, Guanajuato, México, Hidalgo y Puebla.

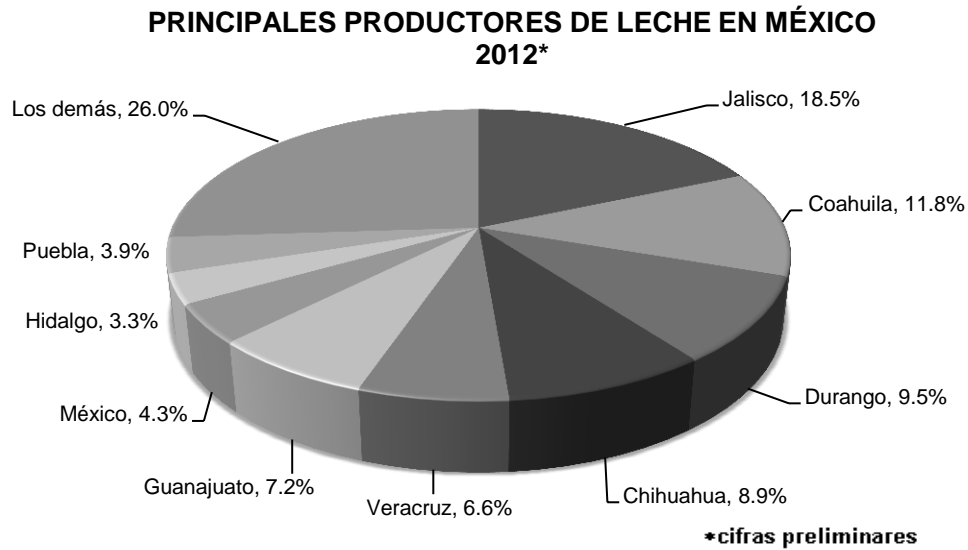


Fig. 7 Principales productores de Leche en México durante el 2012 (SIAP, 2012)

Por su parte, el destino de la leche fluida en México se distribuye de la siguiente forma: 30.9 por ciento para la elaboración de leche leche pasteurizada, homogeneizada y ultra pasteurizada; 17.6 por ciento para leche entera y leche para lactantes; 15.7 por ciento para quesos industriales; 9 por ciento para yogurt, yogurt natural o con frutas; 6 por ciento para la rehidratación de leche; 4 por ciento para crema, mantequilla, margarinas y grasas butíricas; y se destina cerca de un 17 por ciento para otros productos entre los que destacan quesos artesanales, dulces, y otros productos lácteos de carácter regional.



La producción de queso durante el 2012 fue de 263,929 toneladas (cifras preliminares), de las cuales el 16% de la producción corresponde a la elaboración de queso fresco. El la fig. 8 puede observarse la producción en porcentaje de los principales quesos elaborados en México durante el 2012.

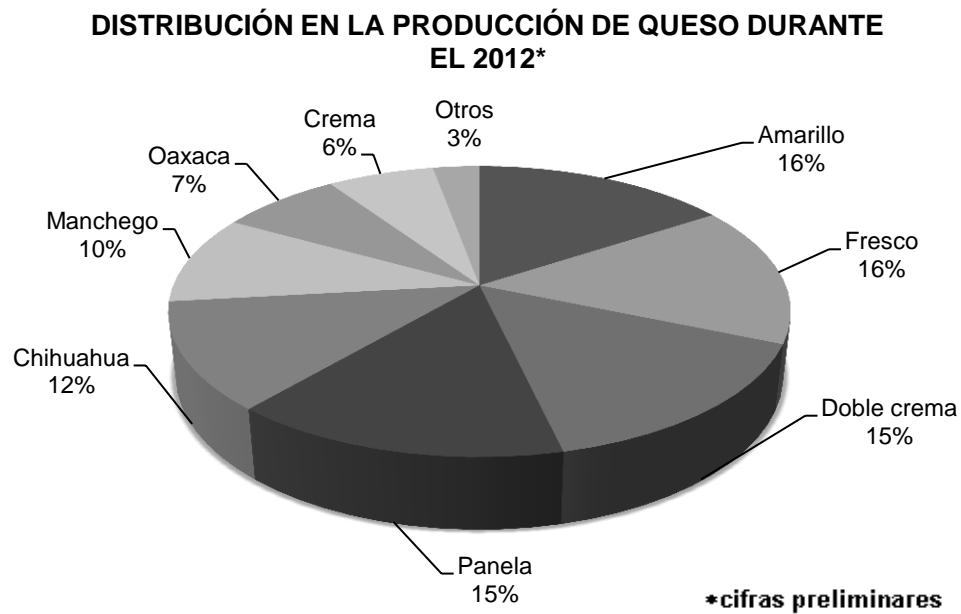


Fig. 8 Distribución en la producción de queso durante el 2012 en México (SIAP, 2012)



JUSTIFICACIÓN

El presente trabajo busca obtener un envase activo eficaz a partir de quitosano, para alargar la vida de anaquel de Queso Ranchero, queso que posee una corta vida de anaquel y limitada distribución.



HIPÓTESIS

El empleo de películas con base en quitosano para recubrir queso Ranchero, permitirá alargar su vida de anaquel mediante la inhibición de microorganismos, entre ellos *Listeria monocytogenes*, debido a su acción como envase activo.



OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto de películas con base en quitosano, como envase activo de queso “Ranchero”, para alargar su vida de anaquel e inhibir el desarrollo de *Listeria monocytogenes*.

Objetivos particulares

- I. Extraer y caracterizar quitina a partir de desechos de camarón mediante un método biológico-químico.
- II. Obtener y caracterizar quitosano mediante desacetilación de la quitina extraída.
- III. Preparar películas de quitosano, quitosano co-cítrico, quitosano ácido láctico y quitosano-ácido cítrico-hidroxi-propil-metil celulosa.
- IV. Determinar el peso, espesor, permeabilidad al vapor de agua y propiedades mecánicas de las películas.
- V. Evaluar las películas como envase activo de queso “Ranchero”.
- VI. Modificar la permeabilidad al vapor de agua del material con mejores propiedades para envasar el queso.
- VII. Evaluar la inhibición de *L. monocytogenes* en queso “Ranchero”, envasado empleando una película de quitosano modificada.



METODOLOGÍA

1. Materiales

Para la extracción de quitina y quitosano: Cabezas y exoesqueletos de camarón (La Nueva Viga, México); acetona grado técnico (Meyer, México); ácido clorhídrico A.C.S. (Reactivos Química Meyer, México); hidróxido de sodio grado industrial (Casa Miyako, México). **Los materiales empleados para preparar las películas fueron:** quitosano obtenido mediante desacetilación heterogénea de quitina extraída biológicamente; ácido acético glacial (Merck, Alemania); ácido láctico 85% (J.T. Baker, México); ácido cítrico (J.T.Baker, México); hidroxipropil-metil-celulosa 2208 HK, 100 BV (Derivados Macroquímicos, México); etanol (Hycel, México); polietilenglicol (Fluka, E.E.U.U.); fosfato de potasio dibásico (J.T. Baker, México); sorbitol (J.T. Baker, E.E.U.U.); fosfato de sodio monobásico (J.T.Baker, México); harina de arroz (Tres estrellas, México); proteína aislada de soya 90% (Pronat-ProWiner, México). **Se empleó queso “Ranchero” comercial** (Celaya Guanajuato, México), fabricado 24h antes de su uso, preparados en forma de disco con un diámetro de aproximadamente 3cm y altura de 1cm, almacenado a 4°C. **Para los análisis microbiológico se utilizó:** agar para métodos estándar (Bioxon, México); agar papa dextrosa (Bioxon, México); agar base Oxford (Dibico, México) y (Difco, Francia); suplemento para *Listeria monocytogenes* (BD BBL, USA). **Los microorganismos empleados fueron:** *Lactobacillus sp.* (B2) (Lab. Biopolímeros-UAMI, México); *Listeria monocytogenes* de la colección LNSP 031212 (Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN, México).

2. Metodología

La metodología empleada en este trabajo, se dividió en tres etapas: la etapa I contempla la extracción y caracterización de quitina y quitosano; la etapa II corresponde a la obtención, caracterización y evaluación como envase activo en queso ranchero de las películas Q,QAL,QC,QH; la etapa III consistió en el



mejoramiento de la PVA del material que presentó los mejores resultados en la etapa II, su caracterización, evaluación como envase activo y su efecto inhibitorio contra *L. monocytogenes* en queso ranchero inoculado. En la fig. 9 se presenta en esquema de la metodología general y a continuación se describen a detalle las metodologías seguidas en cada etapa.

2.1 ETAPA I. Extracción y caracterización de quitina y quitosano

2.1.1 Extracción de quitina a partir de desechos de camarón

El desecho empleado consistió en cabezas y exoesqueletos de camarón provenientes de la Central de Abasto de Pescados y Mariscos “La Nueva Viga”, fue molido y congelado. Se realizó una fermentación ácido láctica con 50kg del desperdicio en un reactor tipo columna, se utilizó 5% (v/p) de un inóculo de *Lactobacillus* sp. y 10% (p/p) de sacarosa. El tiempo de fermentación fue de 96 h a 35°C (Cira *et al.*, 2002). Se monitoreó la fermentación mediante la determinación de pH y acidez total titulable en el sólido y el licor con un potenciómetro digital (Hanna Instruments, Italia). La fase sólida “quitina cruda”, se secó a 60°C durante 24h para su posterior purificación.

2.1.2 Purificación de quitina cruda

Consistió en una despigmentación con acetona, seguido de una desmineralización con HCl 0.4N y finalmente una desproteización con NaOH 0.4N; cada una de estas etapas en relación 1:15 (p/v) con respecto a la quitina cruda, bajo agitación constante durante una hora (Juárez-Castelán, 2010). La quitina pura fue secada a 60°C durante 24 h para su posterior tratamiento.

2.1.3 Obtención de quitosano

El quitosano se obtuvo mediante desacetilación heterogénea de la quitina pura, empleando NaOH 50% (p/v) en relación 1:15 (p/v) con respecto a la quitina, en un reactor tipo columna a una temperatura de 110°C durante 3h (Juárez-Castelán, 2010). Posterior a la reacción de desacetilación, el quitosano fue enjuagado con agua corriente hasta su neutralidad y secado a 60°C durante 24h.

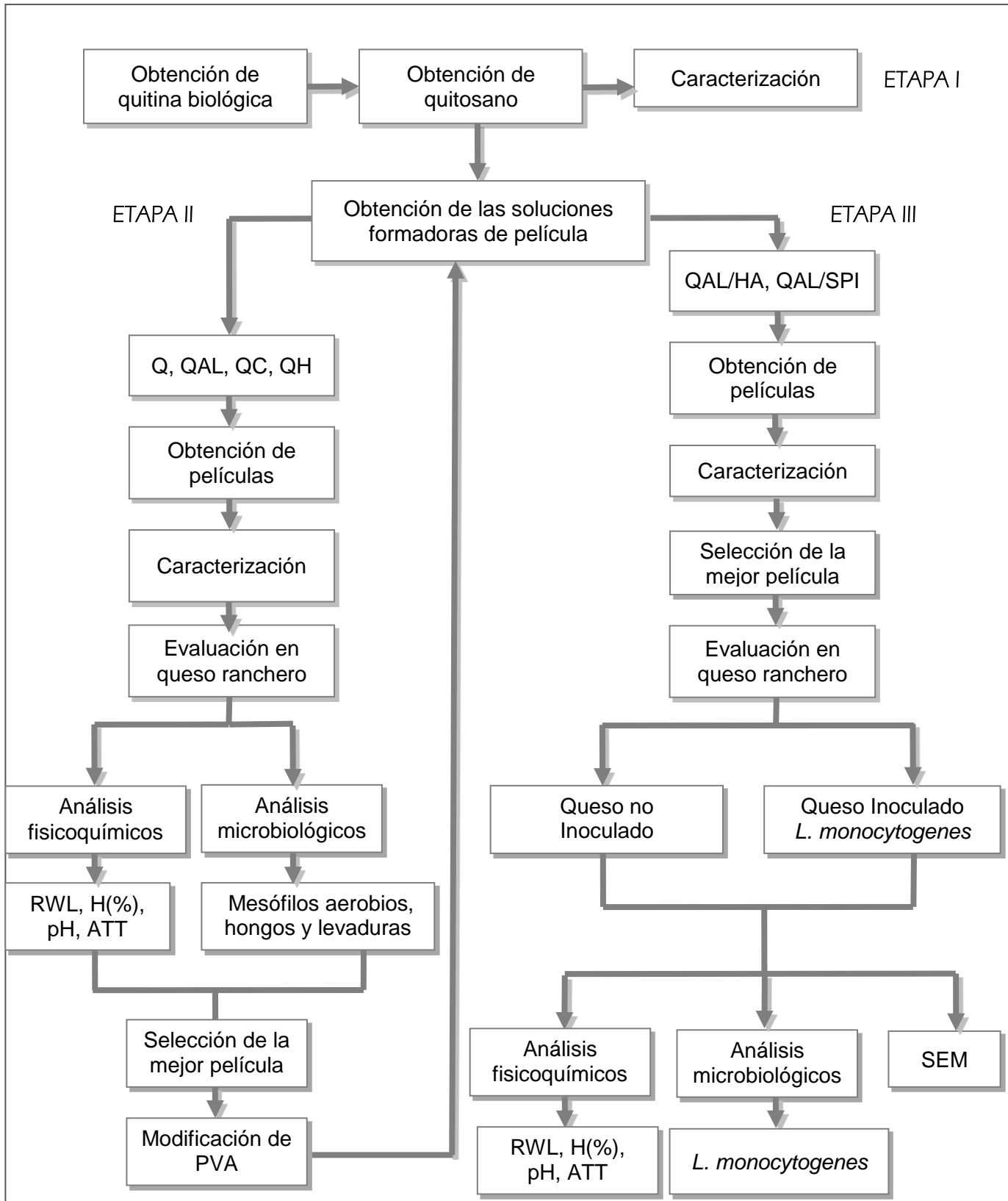


Fig. 9 Metodología general.



2.1.4 Caracterización de quitina.

2.1.4.1 Determinación del porcentaje de humedad, cenizas y proteína residual

El contenido de humedad fue determinado al secar 1g de muestra por 12h a 100°C en estufa convencional (Lab-line, U.S.A). Después las muestras fueron calcinadas y colocadas en una mufla (ISB-Linderberg, México) a 550°C durante 12h para cuantificar las cenizas. El porcentaje de humedad y cenizas fue calculado por diferencia de peso de la muestra al inicio y al final de cada proceso, de acuerdo al método de la A.O.A.C., 1990.

La proteína residual se calculó determinando el nitrógeno total por el método de Kjeldahl en un equipo (Buchi, Switzerland), al cual se resta el valor de nitrógeno de quitina pura y se multiplica por 6.25 (Cira *et al.*, 2002).

2.1.5 Caracterización de quitosano.

2.1.5.1 Determinación del porcentaje de humedad y cenizas

Fueron obtenidos siguiendo la metodología de la A.O.A.C. (A.O.A.C., 1990), descrita en la determinación de quitina.

2.1.5.2 Determinación del porcentaje de solubles en solución de ácido acético.

Se determinó disolviendo 0.1g de quitosano en 25 mL de solución de ácido acético (0.1M), bajo agitación constante durante 24h a temperatura ambiente (Juárez-Castelán, 2010). Transcurrido este tiempo, se filtró la disolución empleando papel filtro Whatman No. 30 a peso constante. El papel filtro con material insoluble se secó en una estufa (Lab-line, U.S.A) a 100°C durante 3h, posteriormente se pesó y se determinó la cantidad de quitosano insoluble por diferencia de peso. El porcentaje de solubles se calculó restando el valor de quitosano insoluble (*qins*) a



la cantidad de quitosano pesado inicialmente en base seca (q_i), se dividió entre la cantidad de quitosano inicial y se multiplicó por 100 (1).

$$\text{Solubles (\%)} = \frac{q_i - q_{ins}}{q_i} \times 100 \quad (1)$$

2.1.5.3 Grado de acetilación

El grado de acetilación (DA), se determinó mediante resonancia magnética nuclear de protón (RMNH) en un espectrómetro (Bruker Advance III 500, Alemania) a 500Mhz para ^1H . De los espectros de RMN, se obtuvieron las áreas correspondientes al grupo metilo y los masivos A y B, integrando las curvas con el programa "Spinworks" (V2.5.5). Posteriormente los valores de las áreas obtenidos se sustituyeron en la ec. 2(Pacheco, 2010).

$$DA(\%) = \left[\frac{\frac{1}{3} A_{CH_3}}{\frac{1}{6} \sum_{i=2}^6 A_{H_i}} \right] \times 100 \quad (2)$$

2.1.5.4 Peso molecular

El peso molecular del quitosano se obtuvo determinando la viscosidad intrínseca con un viscosímetro de Ostwald, de soluciones de quitosano con concentraciones de 0.5, 1, 1.5, 2 y 4 g/L en una solución de ácido acético glacial (2%) y acetato de sodio (0.2M). El peso molecular (M_w), se calculó con la ecuación Mark – Houwink-Sakurada (3), en donde los valores empleados de las constantes k y a fueron 1.38×10^{-5} g/L y 0.85 respectivamente.

$$[\eta] = kPw^a \quad (3)$$



2.1.5.5 Espectrometría de infrarrojo (ATR-FTIR)

Se utilizó un espectrómetro de infrarrojo (FTIR) con detector de reflectancia total atenuada (Perkin Elmer ATR-FTIR 100, Inglaterra) para corroborar la estructura química del quitosano obtenido. Se identificaron las señales características de este compuesto empleando el programa computacional analítico SPECTRUM (V 6.3.5, Inglaterra).

2.2 ETAPA II. Obtención, caracterización y evaluación como envase activo en queso rancho de las películas Q,QAL,QC,QH.

2.2.1 Obtención de las soluciones formadoras de película

2.2.1.1 Películas de quitosano (Q)

Se solubilizó quitosano al 1.15% (p/v) en solución de ácido acético 0.1 M, en agitación magnética constante durante 24 h. La solución fue filtrada en un tamiz No. 100 para eliminar el quitosano insoluble. Una vez listas las soluciones formadoras de película, se agregó como plastificante sorbitol en una proporción de 17% con respecto al quitosano (Corona-Suárez, 2011).

2.2.1.2 Películas de quitosano-ácido láctico (QAL)

El quitosano se solubilizó en una concentración de 1.15% (p/v) en una solución de ácido láctico 0.3M, en agitación magnética constante durante 3 días, posteriormente la solución se filtró, con el fin de eliminar el quitosano insoluble. La disolución de quitosano con ácido láctico se tapó herméticamente y se puso a reaccionar durante 2h a 80°C (Albertsson *et al.*, 1999; Espadín, 2012). La solución se dejó enfriar y se añadió sorbitol en una proporción de 17% con respecto al quitosano.



2.2.1.3 Películas de quitosano co-cítrico (QC)

Se disolvió quitosano al 1.15% (p/v) en solución de ácido cítrico 0.2 M en agitación magnética durante 3 días, se filtró. Posteriormente, se calentó hasta 70°C, se agregó fosfato de potasio al 2.3% (p/p) en relación al ácido cítrico y se mantuvo con agitación magnética durante 30 minutos. La solución se dejó enfriar y se añadió sorbitol en una proporción de 17% con respecto al quitosano (Corona-Suárez, 2011).

2.2.1.4 Películas de quitosano co-cítrico-HPMC (QH)

Se disolvió quitosano al 1.15% (p/v) en solución de ácido acético 0.1 M, en agitación magnética constante durante 24 h, la solución obtenida se filtró. A continuación se agregó ácido cítrico al 5% (p/v) y fosfato de sodio monobásico al 1,9% (p/v). La solución se dejó enfriar y se añadió sorbitol en una proporción de 17% con respecto al quitosano. Esta solución se mezcla en proporción 1:1 (v/v), con una solución de HPMC, obtenida disolviendo HPMC al 3% (p/v) en agua destilada, a la cual una vez disuelto se agrega 33% (v/v) de etanol y 0.3% (v/v) de polietilenglicol (Nicio, 2012).

2.2.2 Preparación de películas

Las películas se obtuvieron por “casting” de la solución formadora de película correspondiente, vaciando 30g de la solución en cajas Petri de poliestireno y a continuación fueron secadas en estufa a 60°C durante 24h.

2.2.3 Caracterización de las películas

2.2.3.1 Acondicionamiento

Las películas fueron acondicionadas en una cámara ambiental con una HR de 40 ±2% alcanzada con una solución saturada de $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$, a temperatura ambiente durante tres días.



2.2.3.2 Peso de las películas

Una vez formadas las películas, las cajas Petri fueron pesadas en una balanza analítica (OHAUS, U.S.A), obteniéndose el peso de las películas por diferencia de peso considerando el peso de la caja Petri vacía.

2.2.3.3 Espesor

El espesor de las películas se obtuvo empleando un micrómetro digital (Mitutoyo 1D-C112E, Japón), realizándose cinco mediciones en distintas áreas de la película. Los valores determinados fueron promediados para obtener el espesor de cada película.

2.2.3.4 Permeabilidad al vapor de agua (PVA)

La PVA fue medida según una modificación de la técnica gravimétrica ASTM E96-80 (Miranda *et al.*, 2003). Se utilizó una celda de prueba de vidrio con una altura de 5cm y un diámetro de 2cm, en la cual se generó una HR de 22% empleando una solución saturada de KCH_3CO_2 . Las películas previamente cortadas, se colocaron en la parte superior de la celda de prueba, se sujetaron con una banda de goma y sellaron con parafilm. Se registró el peso inicial de las celdas de prueba y fueron transferidas a una cámara ambiental, correspondiente a un desecador de tapa esmerilada que contenía una solución saturada de NaCl para generar una HR de 75% previamente acondicionada. De esta forma se obtuvo el gradiente de humedad 22/75. Se empleó la misma metodología para generar un gradiente 75/22, en donde la celda de prueba contenía una solución saturada de NaCl y la cámara ambiental una solución saturada de KCH_3CO_2 . Las cámaras ambientales se mantuvieron a $5^{\circ}C \pm 2$. La pérdida o incremento de peso de las celdas de prueba fueron monitoreadas a través del tiempo cada 24h y se registraron un mínimo de siete valores a partir del estado de equilibrio. La prueba se realizó por triplicado para cada película.

Se graficaron la pérdida o ganancia de peso contra el tiempo, obteniéndose la pendiente (J). A partir de este valor, se determinó la velocidad de transmisión de



vapor de agua (VTVA) , así como la permeabilidad al vapor de agua (PVA) con las siguientes ecuaciones:

$$VTVA = \frac{J}{t \cdot A} \quad (4)$$

En donde:

VTVA= velocidad de transmisión de vapor de agua

t= tiempo

A= área expuesta de la película

$$PVA = \frac{VTVA}{Pw_1 - Pw_2} \cdot L \quad (5)$$

En donde:

PVA= permeabilidad al vapor de agua

L= espesor de la película

Pw₁= presión parcial de vapor en la celda de prueba

Pw₂= presión parcial vapor en la cámara ambiental

2.2.3.5 Propiedades mecánicas

Se evaluaron la fuerza de fractura en la punción y la fuerza de fractura en la extensión, para ello se utilizó la máquina de pruebas mecánicas SINTECH 1/S (MTS, USA) con una celda de carga de 100N, variando entre las dos pruebas (punción y extensión) las mordazas utilizadas.

2.2.3.5.1 Fuerza de fractura en la extensión.

Determinada con base en el método estándar de la ASTM D882-97 (ASTMD882-97, 2003), a temperatura ambiente (25°C). Las películas previamente acondicionadas se cortaron en tiras de 1cm de ancho por 7cm de largo. Estas tiras se sujetaron a las mordazas de la máquina, con una separación inicial de 5cm,



generando posteriormente en ellas una extensión mediante estiramiento a una velocidad constante de 100mm/min. La resistencia generada a la ruptura de la película, fue registrada. Se realizaron 5 mediciones para cada material.

2.2.3.5.2 Fuerza de fractura en la punción.

Las películas previamente acondicionadas fueron cortadas en círculos de 8cm de diámetro y fijada una a una entre un anillo metálico a temperatura ambiente. Posteriormente la película se sometió a una compresión por medio de una superficie punzante (punta cilíndrica de 1.3 cm de diámetro), la cual fue puesta en movimiento dirigida en forma perpendicular hacia la superficie de la película a una velocidad constante de 100 mm/min. La resistencia generada hasta llegar a 2cm de longitud es registrada (Gontard *et al.*, 1993). Se realizaron 5 mediciones para cada material.

Los datos primarios obtenidos de este equipo fueron fuerza (lbf) y tiempo (min). Con los datos de fuerza (lbf) se calculó la fuerza en N y se prosiguió a calcular el esfuerzo nominal mediante la ec. 5:

$$\sigma = \frac{F}{A} \quad (6)$$

Donde:

F = Fuerza aplicada a la película

A= Área de la película sobre la que se aplicó la fuerza. Para las pruebas de fractura en la extensión corresponde al producto del espesor por el ancho de las tiras. Para las pruebas de punción corresponde al área de la punta cilíndrica.

Se calculó la longitud final y la deformación relativa nominal de la película para un tiempo *t* de la prueba con las ecuaciones:

$$v = \frac{L}{t} \rightarrow L = v \cdot t \quad (7)$$



$$\Delta L = L - L_0 \quad (8)$$

$$t = \frac{\Delta L}{L_0} \quad (9)$$

donde:

L= Longitud de la película al tiempo (t)

L₀= Longitud inicial de la película

t= Tiempo

v= 100 mm/min para la fuerza de fractura en la punción y en la extensión.

Se determinó la deformación de Cauchy (ϵ_C) mediante las ecuaciones:

$$\epsilon_C = \frac{\Delta L}{L} = \frac{L_0 - L}{L_0} \quad \text{En la compresión} \quad (10)$$

$$\epsilon_C = \frac{\Delta L}{L} = \frac{L - L_0}{L} \quad \text{En la extensión} \quad (11)$$

Se obtiene la deformación de Hencky (ϵ_H):

$$\epsilon_H = -Ln(1 - \epsilon_C) \quad \text{En la compresión} \quad (12)$$

$$\epsilon_H = Ln(1 + \epsilon_C) \quad \text{En la extensión} \quad (13)$$

Se calcula el esfuerzo normal verdadero (σ_v) en pascales con los valores obtenidos del esfuerzo nominal (σ):

$$\sigma_v = \sigma(1 - \epsilon_H) \quad \text{En la compresión} \quad (14)$$

$$\sigma_v = \sigma(1 + \epsilon_H) \quad \text{En la extensión} \quad (15)$$



Para el cálculo del módulo de Young se grafica el esfuerzo normal verdadero en función de la deformación de Hencky y se obtiene solamente la parte lineal, se calcula regresión lineal y se obtiene la pendiente de la recta.

2.2.4 Evaluación de los recubrimientos en queso ranchero

Se fabricaron bolsas empleando dos películas unidas mediante termosellado y una solución de grenetina. Los quesos se colocaron dentro de las bolsas en condiciones asépticas, empleando una campana de flujo laminar, fueron sellados y almacenados en refrigeración a una temperatura de $4 \pm 1^\circ\text{C}$ y una HR de $20 \pm 1\%$ durante 15 días. Se realizaron análisis a los quesos al tiempo cero, a los siete días de almacenamiento y finalmente a los quince días.

2.2.5 Análisis de los quesos

2.2.5.1 Pérdida relativa de peso (RWL)

Los quesos fueron pesados al inicio del estudio (IW), a los siete y quince días de almacenamiento considerándose este valor como el peso final (FW) (Cerqueira *et al.*, 2007), obteniéndose la RWL con la siguiente ecuación:

$$RWL = \frac{IW - FW}{IW} \times 100 \quad (16)$$

2.2.5.2 Humedad

El contenido de humedad fue determinado al secar 1g de muestra hasta peso constante a 100°C en estufa convencional (Lab-line, E.E.U.U.). El porcentaje de humedad fue calculado por diferencia de peso de la muestra al inicio y al final de cada proceso, de acuerdo al método de la A.O.A.C. (A.O.A.C., 1990).



2.2.5.3 pH y acidez total titulable

Se homogenizaron 10g de muestra durante 5 min con un procesador de alimentos, con 100mL de agua destilada. Se determinó el pH con un potenciómetro digital (Hanna Instruments, Italia) por triplicado para cada muestra. Se titularon 25mL de la solución obtenida por triplicado con NaOH valorada (0.1N), añadiendo 5 gotas de fenoftaleína (1% p/v) como indicador ácido-base, hasta el vire del indicador.

2.2.5.4 Análisis microbiológico

Fueron homogenizados 10g de muestra durante 1min con solución salina estéril (0.9% p/v). La suspensión obtenida correspondió a la dilución primaria, para obtener las diluciones decimales se transfirieron 0.1mL a tubos eppendorf con 0.9mL de solución salina estéril. Se inocularon por duplicado para cada dilución cajas Petri con agar para métodos estándar para la cuenta total en placa de mesófilos aerobios y agar papa dextrosa acidificado con ácido tartárico estéril (10% p/v) para realizar la cuenta en placa de hongos y levaduras, por extensión superficial. Las cajas Petri se invirtieron e incubaron a $35^{\circ}\text{C}\pm 2$ durante 48 h para realizar la cuenta de mesófilos y a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 5 días en el caso de hongos y levaduras. Después de la incubación se contaron las colonias características desarrolladas.

2.3 ETAPA III. Modificación de la PVA, caracterización, evaluación como envase activo y efecto inhibidor contra *L. monocytogenes* en queso ranchero inoculado.

2.3.1 Modificación de la PVA

Para la modificación de la PVA, de la película seleccionada en la etapa II, se siguieron tres estrategias: eliminar la utilización de sorbitol como plastificante, evaluar mezclas con distintas concentraciones de harina de arroz (HA) y evaluar mezclas con distintas concentraciones de proteína aislada de soya (SPI).



2.3.1.1 Obtención de las soluciones formadoras de película

2.3.1.1.1 Películas de quitosano-ácido láctico y harina de arroz (QAL/RS)

Se preparó una solución de QAL siguiendo la metodología del punto (No.). Por otro lado, se obtuvieron soluciones de RS al 2% y 4% (p/v), disolviendo la harina de arroz en agua destilada; esta mezcla se calentó hasta alcanzar 85°C y se mantuvo a esta temperatura en agitación constante hasta su gelatinización (Bourtoom y Chinnan, 2008), a continuación la solución fue filtrada. La solución de QAL se mezcló en proporción 1:1 (v/v) con la solución de RS.

2.3.1.1.2 Películas de quitosano-ácido láctico y proteína aislada de soya (QAL/SPI)

La solución formadora de película fue obtenida al mezclar en proporción 1:1 (v/v), una solución de QAL obtenida siguiendo la metodología del punto (No.) y una solución de SPI al 0.14, 0.25, 0.38, 0.50 y 0.75% (w/v), la cual se obtuvo disolviendo la SPI en agua destilada, calentando hasta 85°C durante 30min, posteriormente la solución se coloca en un baño maría a 45°C durante 2h y finalmente la disolución obtenida es filtrada (Dongying *et al.*, 2009).

2.3.1.2 Preparación de películas

Las películas se obtuvieron por “casting” de la solución formadora de película correspondiente, vaciando 50g de la solución en cajas Petri de poliestireno y a continuación fueron secadas en estufa a 60°C durante 24h.

2.3.1.3 Caracterización de las películas

Las películas fueron caracterizadas de acuerdo a la metodología expuesta en el punto No. Se seleccionó la película con menor PVA.



2.3.2 Evaluación de la película en queso ranchero y queso ranchero inoculado con *L. monocytogenes*.

La película seleccionada, se empleó para evaluar su efectividad como envase activo y posible inhibidor de *L. monocytogenes* en queso ranchero. Se utilizaron quesos no inoculados e inoculados. De ambos tratamientos se evaluó un control correspondiente a quesos sin recubrir, empacados en bolsa de polietileno de baja densidad (LDPE) y en la película de quitosano.

2.3.2.1 Preparación del inóculo de *L. monocytogenes*

Se preparó el inóculo, tomando una asada del microorganismo en cultivo sólido, colocándola en 25mL de caldo soya tripticaseína, el cual se incubó a 37°C durante 24h. Transcurrido este tiempo se determinó la densidad óptica a 560nm en un espectrómetro de UV-visible (Thermospectronic, E.E.U.U.), utilizando como blanco el medio de cultivo estéril. Se realizó el conteo en placa, realizando diluciones decimales empleando solución salina estéril (0.9% p/v) e inoculando por duplicado para cada dilución 0.1 mL en cajas Petri con agar soya tripticaseína por extensión superficial. Las cajas invertidas se incubaron a 37°C por 24h. La cantidad de microorganismos fue establecida en 1×10^4 UFC/mL (Mariani *et al.*, 2011), diluyendo en solución salina estéril 0.9% (w/v) cuando fue necesario de acuerdo a la densidad óptica.

2.3.2.2 Inoculación de *L. monocytogenes* al queso ranchero

Se depositaron 780 μ L de la suspensión (1×10^4 UFC/mL) de *L. monocytogenes*, en un área de 25cm² (5x5cm), delimitada en una tabla de madera de dimensiones (42x25cm), previamente esterilizada en autoclave a 121°C por 15min. A continuación se colocaron en las áreas delimitadas los quesos, dejándose en contacto con la suspensión durante 30min una de las caras del queso, una vez transcurrido el tiempo, se depositaron 780 μ L de la suspensión y se dio vuelta a la cara. Este procedimiento se realizó en condiciones asépticas, en una campana de flujo laminar.



2.3.2.3 Envasado de los quesos

Se empaclaron por triplicado los quesos inoculados y no inoculados en bolsa de plástico de (LDPE), colocando el queso dentro de la bolsa cerrándola mediante termosellado.

Para empaclar los quesos en las películas de quitosano, se emplearon bolsas fabricadas con dos películas unidas mediante termosellado y una solución de grenetina. Los quesos se colocaron dentro de las bolsas en condiciones asépticas y se sellaron con la misma técnica.

2.3.2.4 Diseño experimental

Se envasaron quesos no inoculados e inoculados en bolsas de LDPE y de quitosano qAL/SPI y control sin empaque. Se colocaron en charolas de PET, por triplicado, se tomaron muestras a los 0, 7 y 14 días de almacenamientos a 4 °C y una HR de 20±1%. En la fig. 10 se muestra un esquema de las unidades experimentales.

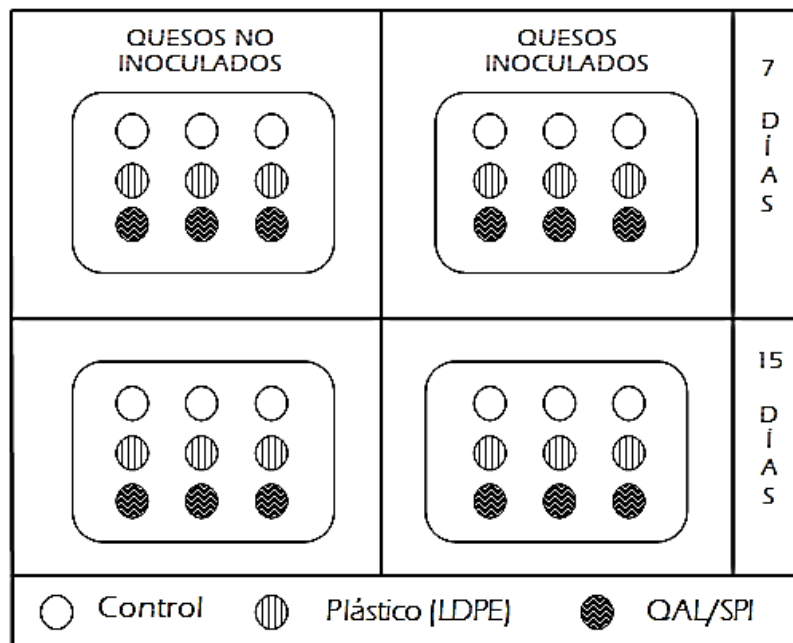


Fig. 10 Unidades experimentales de quesos inoculados con *L. monocytogenes* y sin inocular almacenados a 4±1°C y 20%HR.



2.3.3 Análisis de los quesos

2.3.3.1 Pérdida relativa de peso

Se determinó siguiendo la metodología descrita en el apartado 2.2.5.1

2.3.3.2 Humedad

El contenido de humedad fue determinado en una termobalanza (Wiggen Hauser, Alemania), a 80°C, colocando 0.5-1g de muestra. Las determinaciones se realizaron por triplicado para cada muestra.

2.3.3.3 pH y acidez total titulable

Se determinó siguiendo la metodología descrita en la sección 2.2.5.3

2.3.3.4 Análisis microbiológico: Cuenta en placa de *L. monocytogenes*

Se homogenizaron 10g de muestra durante 1min con solución salina estéril (0.9% p/v). La suspensión obtenida correspondió a la dilución primaria, para obtener las diluciones decimales se transfirieron 0.1mL a tubos eppendorf con 0.9mL de solución salina estéril. Se inocularon por duplicado para cada dilución 50µL en cajas Petri (60x15mm) con agar Oxford, por extensión superficial. Las cajas Petri se invirtieron e incubaron a 35 ±2°C durante 24-48 h. Se observaron las cajas a las 24 y 48 h en busca de colonias características de *L. monocytogenes* (las colonias características aparecen de color verde-grisáceo con halos negros alrededor de las colonias).

2.3.3.5 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se realizaron SEM, de los quesos en el último tiempo de almacenamiento (14días), tanto de los inoculados como los no inoculados. Se tomó una muestra de aproximadamente 0.5x0.5cm, realizando un corte delgado con bisturí, de la superficie del queso. Las muestras se colocaron en tubos eppendorf de 2mL, fueron fijadas, añadiendo como fijador primario gluteraldehído 5%(v/v) hasta cubrir las totalmente, dejando actuar el fijador durante 24h a una temperatura de 4°C. Posteriormente se realizaron lavados hasta eliminación del gluteraldehído con un buffer de fosfatos 0.1M con pH 7.3-7.4. Se agregó tetraóxido de osmio hasta cubrir la muestra y se dejó actuar durante 2h. Prosiguieron lavados de



etanol con un gradiente de 30,40,50,70,80,90,100% (v/v), realizando dos lavados con cada concentración en periodos de 30min. Se realizó una desecación por punto crítico. Finalmente las muestras fueron fijadas al portamuestras, empleando carbono en estado coloidal y se recubrieron con oro. Las observaciones se realizaron en un Microscopio Electrónico de Barrido (JEOL JSM-5900LV, Japón).



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. ETAPA I. Extracción y caracterización de quitina y quitosano

Durante la fermentación se observó un descenso de pH en la fracción sólida de 7.5 a 5.2 y un ascenso de la ATT de 0.01 a 0.30 mmol/g, debido a la producción de ácido láctico, por acción de las bacterias ácido lácticas después de 96h (fig. 11), Cira *et al.* (2002) obtuvieron un pH final en la fracción sólida de 4.6 y una ATT de 0.52 mmol/g producidos después de 96h de fermentación empleando la misma cantidad de inóculo y de sacarosa, en este trabajo la acidificación fue menor y puede atribuirse a la viabilidad del inóculo. Debido a la baja acidificación se obtuvo un bajo grado de desmineralización de 61%, mientras el porcentaje de desproteínización obtenido fue de 91%, atribuido a una mayor actividad proteolítica por parte de peptidasas y proteinasas presentes en el desperdicio de camarón (Pacheco *et al.*, 2009). Cira *et al.* (2002) reportaron valores de 85% de desmineralización y 87.6% de desproteínización, se ha observado que entre mayor es el grado de desproteínización menor es el grado de desmineralización, lo cual concuerda con lo observado en este trabajo.

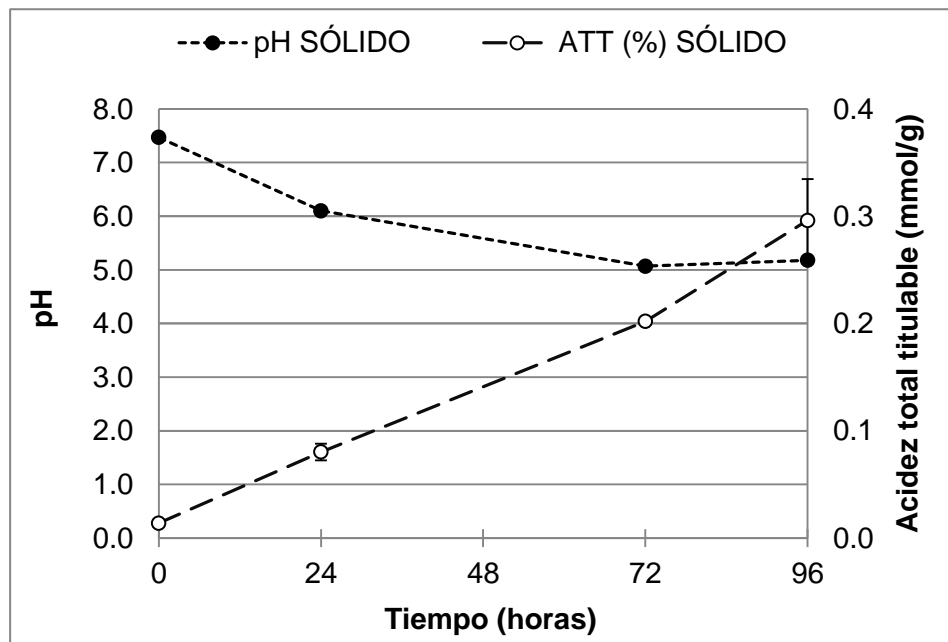


Fig. 11 Variación del pH y la acidez total titulable en la fracción sólida con respecto al tiempo de fermentación



El contenido de humedad, cenizas y proteína residual determinados en el desperdicio de camarón, quitina cruda y quitina pura (Tabla 6), permite observar el efecto de cada proceso hasta obtener una quitina con las características deseadas. Gacén (1996) señala que el contenido de humedad en quitinas va de 2-10%, la quitina obtenida presenta 3.32% de humedad. Cira *et al.* (2002) obtuvieron una quitina con 2% de proteína residual después del proceso de desproteínización química y alrededor de 1% de cenizas después del tratamiento de desmineralización químico, mientras que la quitina obtenida en este trabajo presentó valores similares de contenido de proteína residual y valores mayores en el contenido de cenizas.

Tabla 6 Análisis químico proximal del desperdicio de camarón, quitina cruda y quitina pura.

Muestra	Camarón	Quitina cruda	Quitina pura
Humedad (%)	76.38±0.24	62.17±0.86	3.32±0.40
Cenizas (%)	17.07±0.73	10.68±0.53	1.90±0.13
Proteína residual (%)	40.29±0.08	6.29±0.03	1.68±0.05

Datos promedio de tres determinaciones y su desviación estándar.

Se obtuvieron tres lotes de quitosano, los cuales fueron caracterizados (Tabla 7), de acuerdo a Pillai *et al.* (2009) los quitosanos obtenidos cumplen con las características esperadas, sus grados de desacetilación son altos y pueden ser clasificados como quitosanos de peso molecular medio. El grado de acetilación es uno de los factores más importantes que influyen en las propiedades de este biopolímero debido al rol que juega en la solubilidad (Pacheco, 2010); se ha observado que los quitosanos disponibles comercialmente poseen un DA del 10-20% (Gacén y Gacén, 1996), Chou *et al.* (1998) reportaron el DA de algunos quitosanos comerciales como por ejemplo: Sigma-aldrich (10.1±1.1), Pronova Biopolymer (17.0±0.0), DuPont (27.5±0.0). Los quitosanos obtenidos en este trabajo presentan menores valores de acetilación, es decir, se encuentran más desacetilados, lo cual favorece su solubilidad y una mayor disponibilidad de grupos amino.



Tabla 7 Caracterización de los quitosanos obtenidos.

Lote	Humedad (%)	Cenizas (%)	Solubles* (%)	DA (%)	M_w (kDa)
1	7.7 ± 0.13	1.7 ± 0.05	69 ± 4.0	4.71 ± 0.16	189.8
2	5.6 ± 0.85	2.1 ± 0.07	72 ± 2.2	13.57 ± 0.76	177.9
3	9.9 ± 0.07	2.1 ± 0.08	80 ± 4.7	6.43 ± 0.19	274.8

Datos promedio de tres determinaciones y su desviación estándar
*en ácido acético 0.1M por 24h

El espectro de ATR-FTIR realizado para corroborar la estructura química del quitosano obtenido (fig. 12), muestra las señales características las cuales aparecen en: 3356.9 cm^{-1} propias de los grupos OH del polímero, a 3281 cm^{-1} aparece el grupo -NH, las bandas en 2916.4 y 2850.6 cm^{-1} corresponden al grupo -CH, en 1648.5 cm^{-1} aparece la banda característica del grupo -NH de una

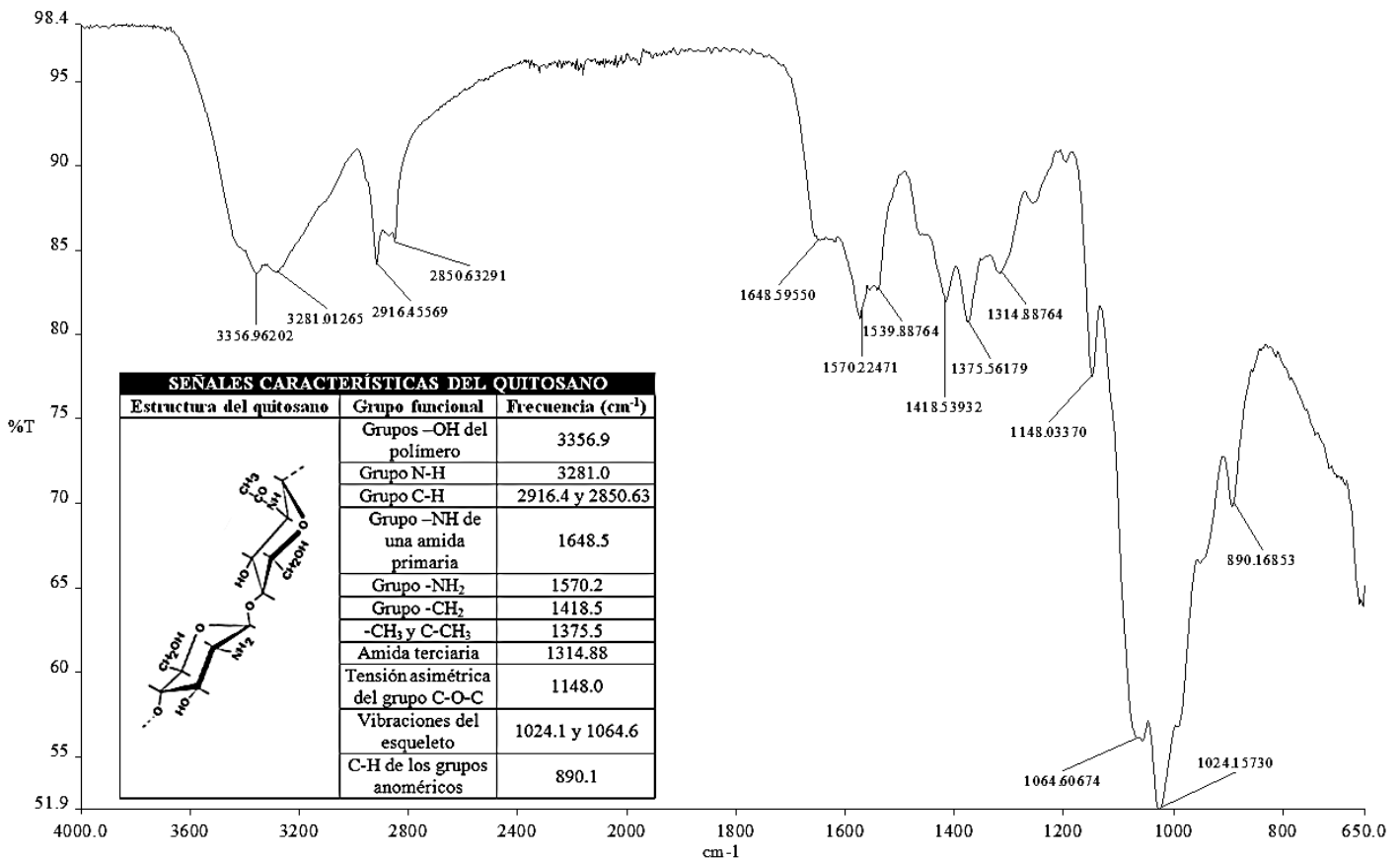


Fig. 12 Espectro ATR-FTIR de quitosano, obtenido mediante desacetilación de quitina extraída por un método biológico-químico.



amida primaria asociada con los restos del grupo acetamida después de la desacetilación, en 1570.2 cm^{-1} aparece el grupo amino $-\text{NH}_2$, 1418.5 cm^{-1} corresponde al grupo $-\text{CH}_2$, en 1375.5 cm^{-1} aparecen el grupo $-\text{CH}$ y deformación del $\text{C}-\text{CH}_3$, la banda en 1148 cm^{-1} es característica de la tensión asimétrica del grupo $\text{C}-\text{O}-\text{C}$, las vibraciones del esqueleto propias de la estructura de quitosano aparecen en 1024.1 y 1064.6 cm^{-1} y por último en 890.1 cm^{-1} aparece la tensión $-\text{CH}$ de los grupos anoméricos (Maza *et al.*, 2007).

2. ETAPA II. Obtención, caracterización y evaluación como envase activo en queso rancho de las películas Q,QAL,QC,QH.

2.1 Caracterización de las películas

Se realizó la espectrometría de infrarrojo ATR-FTIR de las películas obtenidas de QAL, QC y QH (fig. 13), con el fin de verificar la modificación del quitosano debida a la síntesis de los materiales. En el espectro 13a, correspondiente al espectro de las películas de quitosano se observan las bandas principales en 1648.5 cm^{-1} debidas al grupo $-\text{NH}$ de una amida primaria asociada con los restos del grupo acetamida después de la desacetilación, en 1570.2 cm^{-1} aparece el grupo amino $-\text{NH}_2$, la banda en 1148 cm^{-1} es característica de la tensión asimétrica del grupo $\text{C}-\text{O}-\text{C}$, las vibraciones del esqueleto propias de la estructura de quitosano aparecen en 1024.1 y 1064.6 cm^{-1} (Maza *et al.*, 2007). En los espectros de las películas QAL, QC y QH (15b,15c y 15d), se observan las señales características debidas al quitosano, descritas anteriormente, sin embargo, aparece como banda confirmativa para las películas QAL, una señal en 1717.28 cm^{-1} típica del estiramiento del grupo carbonilo proveniente de la incorporación de la molécula de ácido láctico (Albertsson *et al.*, 1999; Espadín, 2012). Para el caso de QC y QH aparece, como señal confirmativa una banda en 1707.52 y 1713.52 cm^{-1} , que indica la formación de un enlace éster entre el quitosano y el ácido cítrico (Corona-Suárez, 2011; Nicio, 2012).

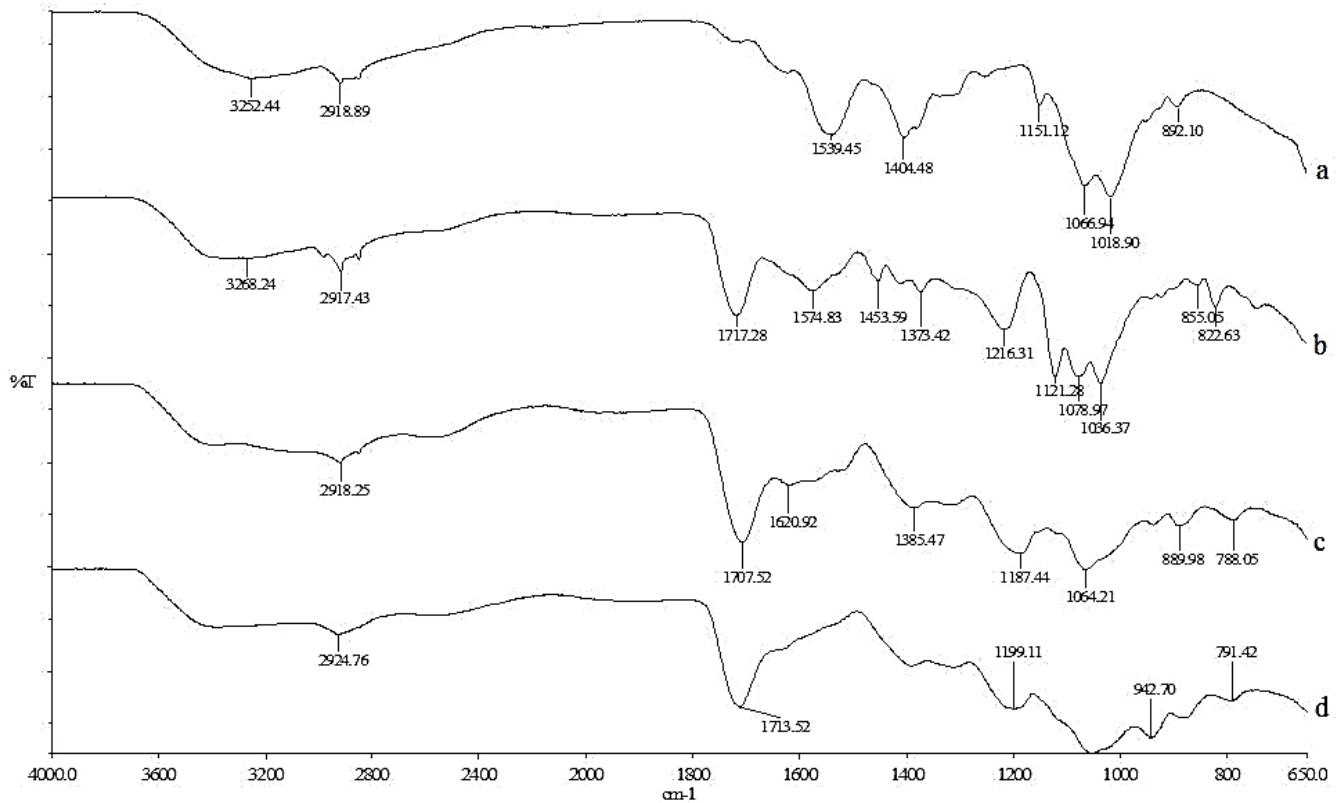


Fig. 13 Espectro ATR-FTIR de las películas: a) Q, b) QAL, c) QC, d)QH

El peso de las películas varió en relación con su composición y/o la adición de otros compuestos como catalizadores y plastificantes. Se observó una relación directa entre el peso de las películas y su espesor. Los factores que determinan el espesor de las películas, son la composición de la solución formadora de película, la cantidad de solución añadida a las placas y el área superficial de las mismas, en este trabajo se utilizó la misma cantidad de solución formadora de película para cada tratamiento, así como fueron empleadas las mismas placas, por lo que las variaciones en el espesor de las películas son atribuidas a su composición. Las películas que presentaron mayor espesor fueron QH con un valor de 0.1841 ± 0.0074 mm, las más delgadas correspondieron a Q (0.0608 ± 0.0044 mm), QAL y QC presentaron espesores similares de 0.0947 ± 0.0068 y 0.0988 ± 0.0079 mm respectivamente. Se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, excepto entre QAL y QC quienes se situaron en el mismo grupo (fig. 14).

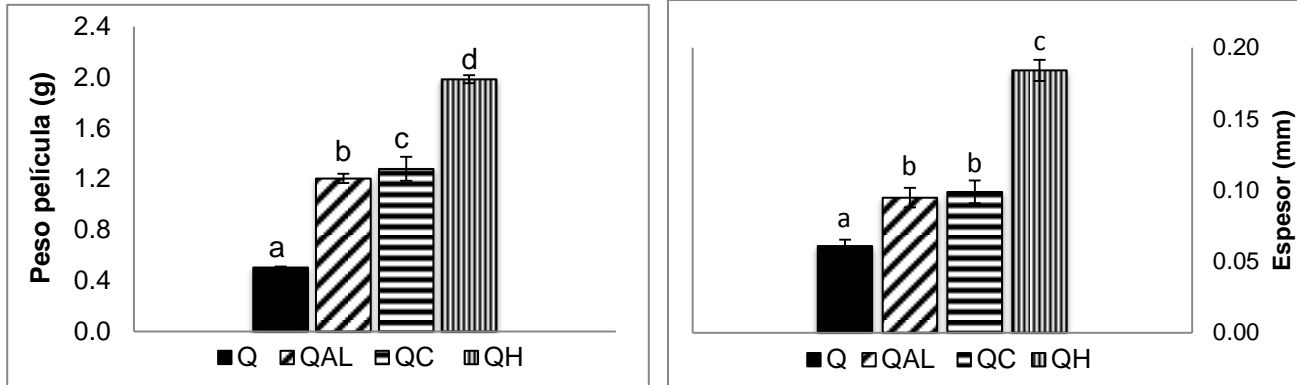


Fig. 14 Peso y espesor de las películas. Datos promedio de diez determinaciones. Histogramas con la misma letra no presentan diferencias significativas ($\alpha \leq 0.05$).

Plascencia (2004) reportó un espesor de 0.091 ± 0.005 mm en películas de quitosano al 1% (w/v) con 17% de sorbitol, pese a que en este trabajo la concentración de quitosano empleada fue de 1.15% (w/v), se observaron valores de espesor menores, sin embargo Plascencia (2004) no reporta la cantidad de solución formadora de película empleada. Di Pierro *et al.* en el 2011, obtuvieron películas de quitosano al 0.8% (w/v) empleando 32.5 mL de solución formadora de película, obteniendo películas con un espesor de 0.0553 ± 0.0004 mm. Las películas de QH fueron preparadas siguiendo la metodología reportada por Nicio (2012), quien reporta espesores de 0.23 mm. Los valores de espesor son importantes ya que se observa un efecto debido a éste en la PVA; se ha observado que a medida que el espesor de la película aumenta, se incrementa la resistencia a la transferencia de masa a través de ella, en consecuencia, la presión parcial de vapor de agua de equilibrio en la superficie inferior de la película se incrementa (Bertuzzi *et al.*, 2002).

La PVA se midió a 4°C , simulando las condiciones de almacenamiento del queso ranchero dentro de los recubrimientos en forma de bolsa, en donde la HR de la celda de prueba es de 75% correspondiente a la humedad del queso dentro de la bolsa, mientras la humedad de la cámara ambiental corresponde a la humedad externa en el refrigerador de 20%, también se llevó a cabo la prueba invirtiendo el gradiente de humedad para observar el comportamiento de los recubrimientos. Se observó que las películas QAL y QH mostraron los valores más altos de PVA,

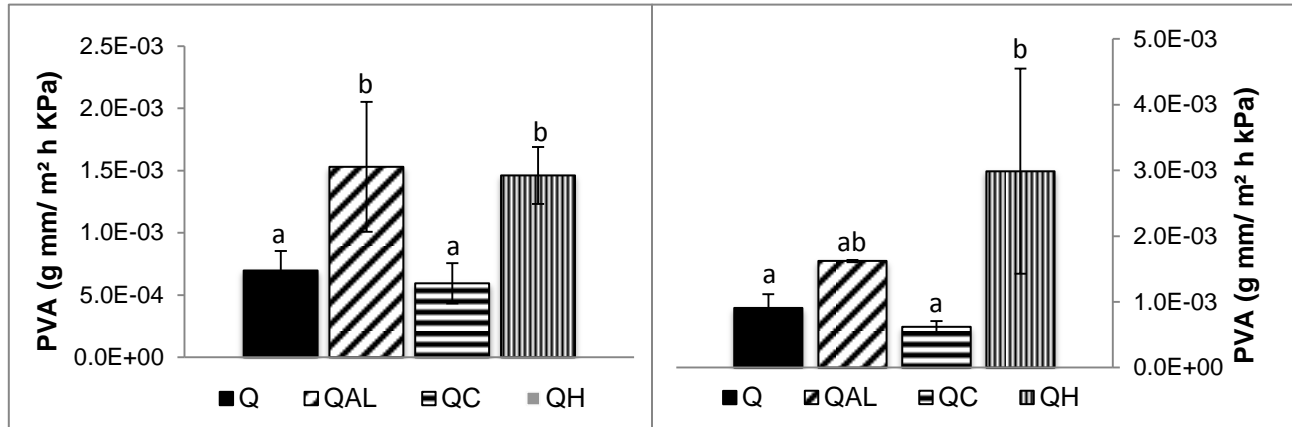


Fig. 15 PVA de las películas, a dos gradientes de HR 22/75 (A) y 75/22 (B) a $4^{\circ}\text{C}\pm 2$. Datos promedio de tres determinaciones. Histogramas con la misma letra no presentan diferencias significativas ($\alpha\leq 0.05$)

1.53×10^{-3} y 1.46×10^{-3} gmm/m²hkPa respectivamente en el gradiente 22/75, mientras que las películas de Q y QC presentaron los valores más pequeños de PVA a ese mismo gradiente, con valores de 6.96×10^{-4} y 5.94×10^{-4} gmm/m²hkPa respectivamente (fig. 15). La PVA de las películas de Q se encuentran por debajo de las reportadas por Di Pierro *et al.* en el 2011 con valores de 0.0167gmm/m²hkPa para un gradiente 0-100% y por debajo de los valores que reporta Miranda *et al.*, en el 2003 de 0.2613gmm/m²hkPa para un gradiente 97-85%. Sin embargo, a pesar de que existen en la literatura valores de PVA reportados para películas de quitosano, no son comparables ya que se ha demostrado que la permeabilidad de las películas hidrofílicas está relacionado directamente con el gradiente de HR (Miranda *et al.*, 2003), por lo tanto es necesario que los valores reportados concuerden con las condiciones probadas en este trabajo para poder llevar a cabo una comparación. Otro factor que influye en la PVA es la adición de plastificantes, en este trabajo se empleó sorbitol, Trejo *et al.* (2001) observaron un incremento en la PVA en películas de quitosano al 1 y 2% al aumentar la cantidad de sorbitol, esto lo atribuyen a la capacidad del sorbitol para reducir los enlaces hidrógeno internos, reduciéndose las fuerzas intermoleculares entre las cadenas del polímero, lo que permite que exista mayor espacio para que las moléculas de agua migren.

**Tabla 8 Propiedades mecánicas de las películas Q, QAL, QC y QH.**

	Fuerza de fractura en la extensión			Fuerza de fractura en la punción		
	Módulo de Young (MPa)	Elongación hasta fractura (%)	Esfuerzo Máximo (MPa)	Módulo de Young (MPa)	Elongación hasta fractura (%)	Esfuerzo Máximo (MPa)
Q	2226±561.8	57.2±27.0	610.6±204.1	990.61±116.11	6.74±1.98	46.50±9.63
QAL	151.2±34.0	275.4±5.9	323.3±22.3	63.88±4.87	43.20±0.55	20.51±1.02
QC	327.2±97.2	238.4±14.4	474.0±80.5	316.79±134.06	35.88±0.78	53.06±6.28
QH	222.3±25.1	122.7±4.1	283.4±38.9	202.35±32.32	27.59±1.47	32.67±4.26

Los resultados de las propiedades mecánicas de las películas se muestran en la tabla 8. Estas describen el modo en que el material responde a la aplicación de una fuerza o carga y son tres: el módulo de Young o módulo elástico es una medida de la rigidez de la película, cuanto mayor es el módulo menor es su cambio de longitud (deformación) con respecto a la fuerza aplicada, es decir, menor es su elongación por lo tanto el material es más rígido. El esfuerzo máximo, indica la máxima fuerza que la película puede resistir al ser alargada hasta el momento de su fractura. Finalmente la elongación (E%), corresponde al cambio máximo de longitud que sufre la película antes de ser fracturada (Khoshgozaran-Abras *et al.*, 2012; Groover, 1997).

Los resultados obtenidos muestran que la modificación del quitosano con ácido láctico, ácido cítrico e HPMC genera cambios considerables en las propiedades mecánicas de los materiales. Las películas de Q presentan valores mayores en el módulo de Young tanto en la extensión como en la punción, siendo éste el material más rígido y frágil. Las películas de QAL presentan el menor módulo de Young lo que sugiere que la película es menos rígida, con una capacidad de elongación mayor, mostrándose como la película con mayor elasticidad comparada con Q, QC y QH.



Se ha observado que las propiedades mecánicas en películas de quitosano, se ven afectadas por la fuente de obtención de quitina, el grado de acetilación y peso molecular del quitosano, el uso de plastificantes, así como, por el tipo de solución ácida empleada para disolverlo (Khoshgozaran-Abras *et al.*, 2012). El arreglo intermolecular del quitosano en solución está influenciado por las peculiaridades de la solución ácida empleada, tal como, su fuerza iónica y su grado de disociación. Distintos trabajos, sugieren que las películas preparadas con ácido acético son más rígidas que las preparadas con otros tipos de ácidos, hecho que se observó en el presente trabajo, esto puede deberse, a que el quitosano disuelto en ácido acético forma dímeros, lo que indica interacciones intermoleculares relativamente fuertes (Park *et al.*, 2002).

Park *et al.* (2002), realizaron un estudio empleando distintos ácidos orgánicos como disolventes, obtuvieron valores de elongación en orden ascendente para las películas obtenidas con ácido acético, ácido láctico, ácido málico y ácido cítrico; es decir, las películas obtenidas al disolver el quitosano en ácido cítrico, presentaron valores mayores de elongación, la película fue más flexible, mientras las obtenidas con ácido acético mostraron menores valores de elongación, es decir las películas resultaron más rígidas. En este trabajo los valores de elongación en orden ascendente son para las películas de Q, QH, QC y QAL que corresponden al empleo de ácido acético, ácido acético, ácido cítrico y ácido láctico para disolver el quitosano respectivamente; las películas obtenidas con ácido láctico resultaron más elásticas; si bien Park *et al.* (2002) señala que las películas obtenidas al disolver quitosano con ácido cítrico son más elásticas que las obtenidas al emplear ácido láctico, en este trabajo se observó lo contrario, obteniéndose películas con mayor rigidez al emplear ácido cítrico para disolver al quitosano. Sin embargo, se debe considerar que en éste trabajo no sólo se emplearon los ácidos como disolventes ya que se realizaron reacciones de entrecruzamiento entre quitosano-ácido láctico y quitosano-ácido cítrico, lo que como se mencionó con anterioridad también influye en las propiedades mecánicas de las películas.



Por otro lado, el LDPE posee un módulo de Young de 150 MPa, el HDPE de 700 MPa, el polipropileno de 1400 MPa (Groover, 1997), comparando estos valores con los obtenidos en el presente trabajo, podemos destacar su potencial aplicación como envase de alimentos. Las películas de QAL obtenidas, poseen el mismo módulo de Young que el LDPE, material frecuentemente empleado para empacar queso fresco.

2.2 Evaluación de los recubrimientos en queso ranchero

La humedad inicial de los quesos, fue de $53.6 \pm 0.92\%$. Después de quince días de almacenamiento, dada las condiciones desecantes del refrigerador y la alta PVA de los materiales, los quesos presentaron una RWL alrededor de 40%, se observaron diferencias significativas entre el control y QAL (fig. 16A). Distintos trabajos señalan una menor RWL en quesos recubiertos con diferentes materiales (p.ej., alginato, gelano, k-carragenina, galactomananos), comparado con los quesos sin recubrir (Cerqueira *et al.*, 2007; Fajardo *et al.*, 2010), sin embargo en este trabajo se observó lo contrario, los quesos recubiertos mostraron mayor RWL, sugiriendo un efecto desecante de los recubrimientos en los quesos.

La humedad final de los quesos presentó diferencias significativas entre tratamientos, observándose la menor humedad con un valor de $26.6 \pm 0.39\%$, en los quesos recubiertos con QAL (fig. 16B), lo cual concuerda con los resultados de PVA en los cuales las películas de QAL presentaron los mayores valores de PVA. La humedad de los quesos es un parámetro importante como criterio de control de calidad, relacionado con la vida de anaquel y sus propiedades de textura; los quesos frescos son de textura suave y desmoronable, conforme pierden humedad su textura se vuelve más dura.

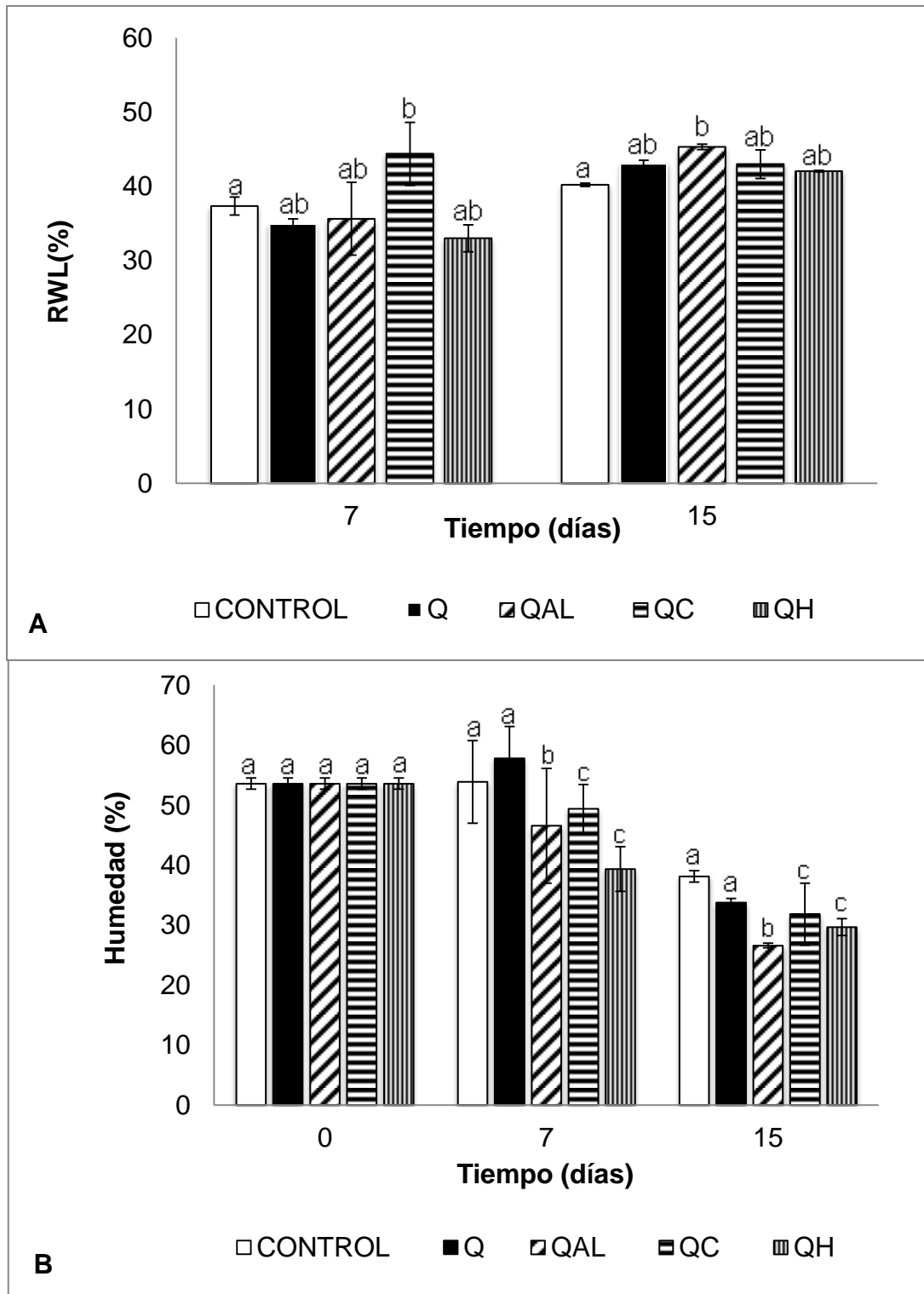


Fig. 16 Pérdida relativa de peso (RWL)(A) y humedad (B) con respecto al tiempo de almacenamiento a 4°C y 20%HR en los quesos recubiertos. Datos promedio de tres determinaciones. Histogramas con la misma letra no presentan diferencias significativas ($\alpha \leq 0.05$).



El pH inicial en los quesos fue de 5.71 ± 0.33 , el pH en el control y el queso recubierto con Q aumentó durante el tiempo de almacenamiento hasta un pH final de 6.46 ± 0.0094 y 6.53 ± 0.0212 respectivamente, este efecto puede explicarse como consecuencia de la alcalinización del medio por compuestos generados por degradación proteica, Martins *et al.* (2010), observaron este mismo efecto en queso Ricotta recubierto con galactomananos. Di Pierro *et al.*, en el 2011 evaluaron películas de quitosano y proteína del lactosuero para almacenar queso fresco Ricotta en una atmósfera modificada y observaron una disminución del pH en los quesos recubiertos y sin recubrir después de 7 días de almacenamiento, hecho que atribuyen a la síntesis de ácido láctico por *Lactobacillus* spp. En este trabajo se encontró, que los quesos recubiertos con QAL, QC y QH mostraron un descenso de pH a los siete días de almacenamiento, sin embargo, este es atribuido a la acidificación de los quesos debido a la migración de los componentes ácidos de los recubrimientos y no a la acidificación por la acción de microorganismos. Después de quince días de almacenamiento se registró un ascenso de pH con respecto al tiempo de siete días, siendo el pH final en los quesos recubiertos con QAL de 5.73 ± 0.08 muy similar al pH inicial, el pH final para los quesos recubiertos con QC fue de 5.22 ± 0.19 y 5.05 ± 0.07 para los recubiertos con QH, valores ligeramente menores del pH inicial (fig. 17A).

La ATT aumentó con respecto al tiempo de almacenamiento, en los distintos tratamientos. Se obtuvo la mayor ATT en los quesos recubiertos con QC y QH con valores de $3.04 \pm 0.87\%$ y $3.12 \pm 0.13\%$ respectivamente. El control y Q presentaron la menor ATT. Aunque la ATT aumentó de siete a quince días, no podemos atribuirlo completamente a la acidificación por la composición de las películas, ni tampoco a la acción microbiana, podría ser un efecto de la concentración de solutos por la pérdida de humedad (fig. 17B).

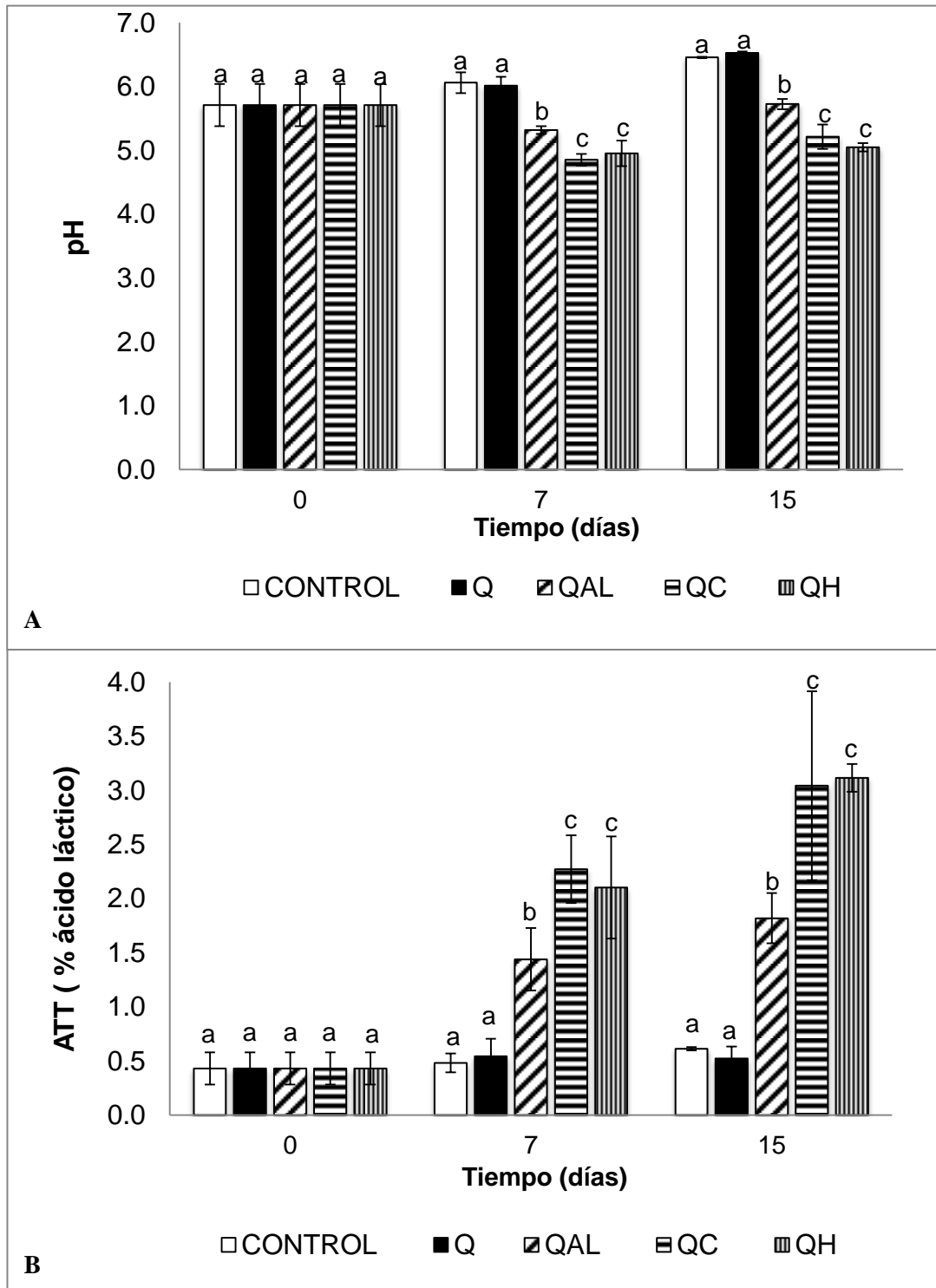


Fig. 17 pH (A) y Acidez total titulable (ATT) (B) con respecto al tiempo de almacenamiento a 4°C y 20%HR en los quesos recubiertos. Datos promedio de tres determinaciones. Histogramas con la misma letra no presentan diferencias significativas ($\alpha \leq 0.05$).



De acuerdo al análisis microbiológico, se observó que solo los quesos recubiertos con QAL y QH presentaron diferencias significativas en la inhibición de mesófilos aerobios comparados con el control (fig. 18I). El material que presentó mayor inhibición tanto para mesófilos aerobios, como para hongos y levaduras, fueron los quesos recubiertos con QAL (fig. 18II). Cabe resaltar que los valores obtenidos para QAL son incluso menores que la cantidad de microorganismos al tiempo cero, indicándonos no solo una inhibición sino también un efecto bactericida y fungicida; hecho principalmente atribuido a la acción del quitosano y el ácido láctico. El mecanismo de acción del quitosano, se explica por la interacción electrostática entre el quitosano cargado positivamente y las membranas celulares cargadas negativamente, alterando las propiedades de barrera de la membrana externa del microorganismo, cambiando la permeabilidad de la membrana plasmática, con la consecuente alteración de sus principales funciones (Lárez, 2008). Por otro lado, se ha observado que el efecto antimicrobiano de los ácidos orgánicos ocurre tanto por la forma disociada y no disociada del ácido, siendo, la forma no disociada la que posee mayor actividad (Hsiao *et al.*, 1999). Existen dos mecanismos de acción propuestos para explicar el efecto antimicrobiano de los ácidos orgánicos, ambos relacionados con su capacidad de atravesar la membrana plásmática microbiana y disociarse en su interior: el primero es debido a la acidificación del citoplasma, modificando el pH intracelular microbiano con consecuencias en la producción y regulación de energía; el segundo, por la acumulación de aniones debidos al ácido disociado, hasta niveles tóxicos para el microorganismo (Mani-López *et al.*, 2012). Además de estos hechos, deben considerarse ciertos factores extrínsecos, es decir las características en donde se almacenó el alimento, como lo son la temperatura de almacenamiento y la humedad relativa; así como factores intrínsecos como el pH y su a_w (actividad de agua), que pudieron influir en la inhibición microbiana. La a_w representa un factor determinante en la estabilidad de un alimento ya que se refiere a la cantidad de agua libre en el alimento, es decir, el agua disponible para que se lleven a cabo reacciones enzimáticas y la cual permite que los microorganismos puedan crecer y desarrollarse. Se define como la relación entre el vapor de agua del alimento y la



presión de vapor del agua pura a la misma temperatura; es un valor adimensional que va de 0 a 1. Se ha encontrado que los límites máximo y mínimo de la actividad acuosa para el crecimiento microbiano son de 0.99 y 0.62. Sin embargo el límite mínimo de actividad acuosa depende completamente del tipo de microorganismo; se sabe que los hongos son mas resistentes que las bacterias a bajos valores de a_w . Por lo tanto los valores de a_w de los quesos durante su almacenamiento, son un factor que determina que tipo de microorganismos se desarrollan. Cabe señalar que no es lo mismo hablar de contenido de humedad y a_w , el contenido de humedad hace referencia a la cantidad total de agua que contiene el alimento. Por lo tanto aunque los valores de humedad en los quesos al final de su almacenamiento son bajos, no existe una relación lineal con la a_w . A pesar de que no determinamos la a_w de los quesos al final del experimento, es posible suponer que los valores de a_w permitieron el desarrollo microbiano, esto en base a la cuenta microbiana tanto de mesófilos aerobios como de hongos y levaduras de los quesos sin recubrir (control) mostrados en la fig. 18, en donde se observa un incremento en la cuenta al final del experimento.

Di Pierro (2011), obtuvieron una cuenta de microorganismos mesófilos significativamente menor ($p < 0.05$) en muestras de queso Ricotta recubiertos con películas de quitosano/proteínas del lactosuero que los controles sin recubrir, obteniendo 1.5 log UFC/g por debajo del control, en este trabajo el tratamiento que mostró mayor reducción en las cuentas microbianas (QAL) esta 5 log UFC/g por debajo del control para la cuenta de mesófilos aerobios en el último tiempo de almacenamiento y 4 log UFC/g por debajo del control en la cuenta de hongos y levaduras. El límite de aceptabilidad microbiológica según ICMSF (1986), es de 7 log UFC/g, la cuenta de mesófilos aerobios inicial en los quesos fue de 9.6 ± 0.5 log UFC/g que rebasa el límite establecido, revelando una baja calidad microbiológica en los quesos, sin embargo, al emplear QAL como recubrimiento la cuenta de mesófilos después de 15 días de almacenamiento es de 6.9 ± 0.4 UFC/g, que se encuentra en el límite de aceptabilidad.

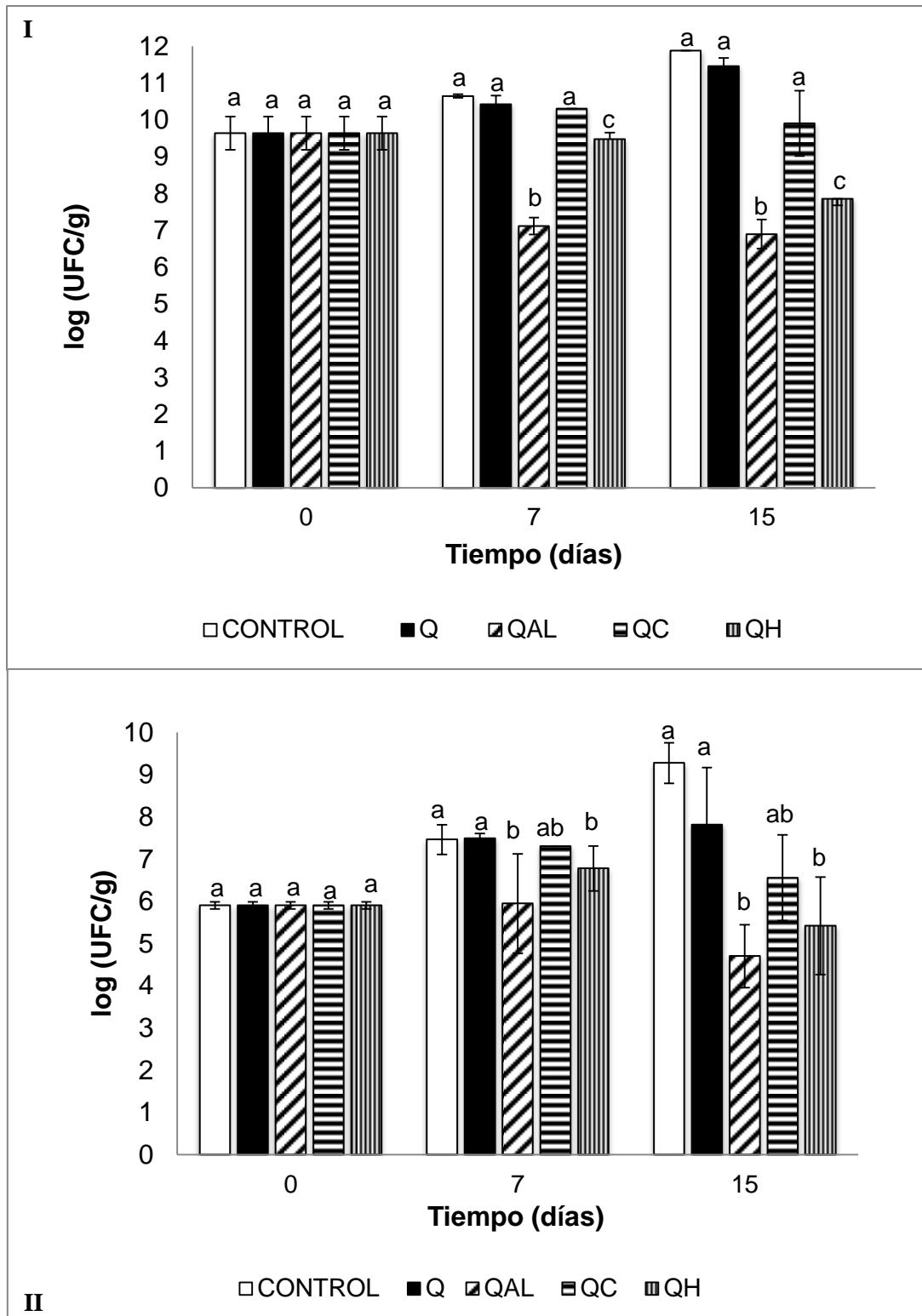


Fig. 18 Cuenta total en placa de mesófilos aerobios (I) y hongos y levaduras (II) con respecto al tiempo de almacenamiento a 4°C y 20%HR en los quesos recubiertos. Datos promedio de tres determinaciones. Histogramas con la misma letra no presentan diferencias significativas ($\alpha \leq 0.05$)



Con los resultados obtenidos en esta etapa, tomando como uno de los criterios más importantes la actividad antimicrobiana de los recubrimientos, se seleccionó QAL, a pesar de ser la película con mayor PVA, fue la que presentó mayor inhibición microbiana y mejores propiedades mecánicas, por lo que se decidió modificar su PVA y continuar su estudio como envase activo de queso ranchero.

3. ETAPA III. Modificación de la PVA, caracterización, evaluación como envase activo y efecto inhibitor contra *L. monocytogenes* en queso ranchero inoculado.

Para la modificación de la PVA, como primer estrategia se decidió eliminar el empleo de sorbitol como plastificante, debido a que diversos autores han observado un incremento de la PVA con la adición de los mismos, hecho atribuido a su capacidad de reducir los enlaces hidrógeno internos, con lo que reducen las fuerzas intermoleculares incrementando el espacio intermolecular y la movilidad dentro de las cadenas del quitosano, lo que permite el libre paso de agua (Srinivasa *et al.*, 2007; Miranda *et al.*, 2003; Trejo *et al.*, 2001; Bertuzzi *et al.*, 2002). Se determinó la PVA en películas de QAL sin añadir sorbitol (QALss) y los resultados se compararon con la PVA de las películas de QAL con sorbitol (QALCs), obteniéndose valores de PVA menores en las películas de QALss (fig. 19), estos resultados permitieron justificar la eliminación del sorbitol de la formulación.

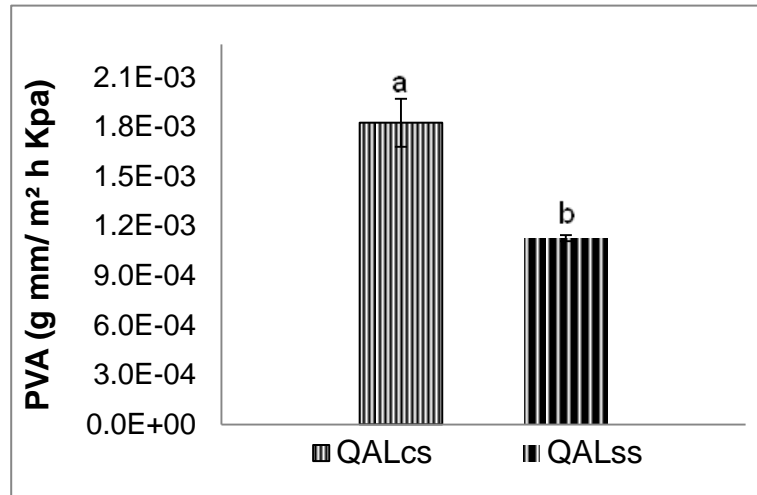


Fig. 19 PVA de las películas de QAL con sorbitol (QALCs) y las películas de QAL sin adición de sorbitol (QALss). Datos promedio de tres determinaciones. Histogramas con la misma letra no presentan diferencias significativas ($\alpha \leq 0.05$).

Como siguiente estrategia se probaron distintas concentraciones de harina de arroz (RS) y proteína aislada de soya (SPI) mezcladas con QAL, para obtener las películas y evaluar su efecto en la PVA. Se determinó el peso y espesor de las películas obtenidas comparándolas con las películas de QAL (fig. 20), se observa una disminución en peso y espesor de las películas de QAL mezcladas con SPI, lo cual era de esperarse ya que al realizar la mezcla de la solución de SPI con la solución de QAL existe una disminución de la concentración de quitosano. En cuanto a las películas obtenidas de QAL y RS, las obtenidas con 4%RS presentaron mayores valores de peso y espesor, debido a la elevada concentración de RS. Se observan diferencias significativas tanto para el peso y espesor de las películas obtenidas con RS y SPI comparadas con QAL.

Se determinó la PVA de las películas obtenidas empleando el gradiente de humedad 22/75 a una temperatura de 4°C, los resultados se muestran en la Tabla 9. Bourtoom *et al.* (2008), obtuvieron películas de harina de arroz con quitosano y observaron que cuando la proporción de quitosano era mayor la PVA se incrementaba, debido a la alta hidrofiliidad del quitosano por los grupos NH_3^+ .

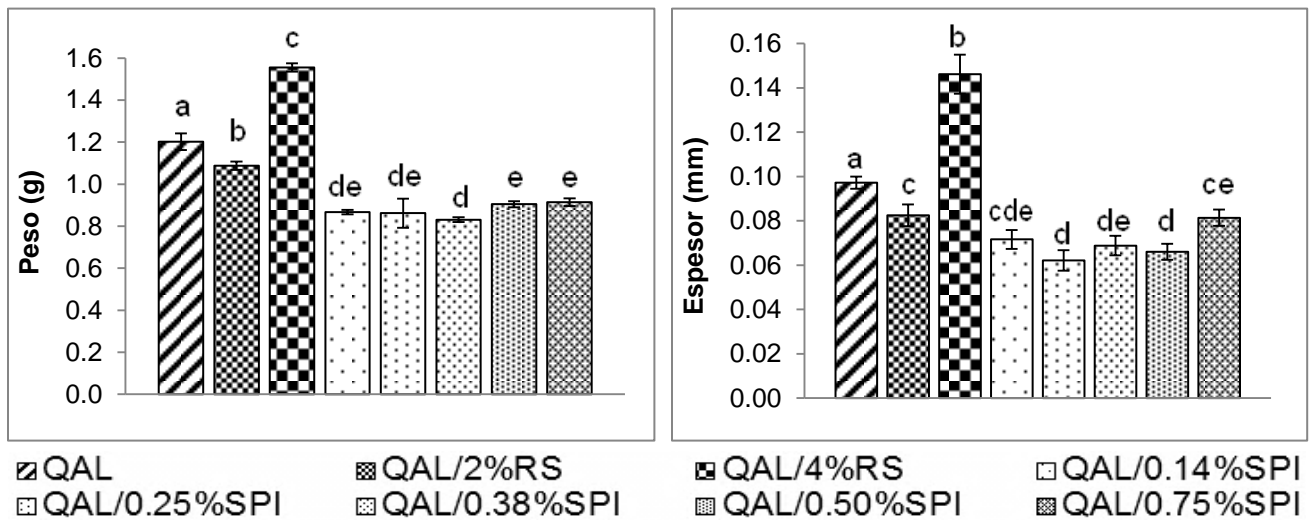


Fig. 20 Peso y espesor de las películas de QAL modificadas. Datos promedio de seis determinaciones. Histogramas con la misma letra no presentan diferencias significativas ($\alpha \leq 0.05$).

Bourtoom *et al.* (2008), obtuvo que las películas con 4% de RS y 2% de quitosano (proporción 2:1), presentaron valores de permeabilidad menores, correspondientes a 0.1713 gmm/ m²hkPa, mientras que películas con 2% de RS y 2% quitosano (proporción 1:1) presentaron un valor de PVA mayor (0.2917 gmm/ m²hkPa). En este trabajo se probaron dos concentraciones de RS al 2% y 4% con 1.15% de quitosano, correspondientes a una proporción 1:0.5 y 2:0.5 (gRS:quitosano), sin embargo, se observó que la PVA fue mayor cuando la concentración de RS fue mayor, los valores de PVA de las películas de QAL/4%RS fueron incluso mayores que la PVA de las películas de QAL sin modificación.

Tabla 9 PVA de las películas de QAL modificadas.

QAL/	PVA (g mm/ m ² hkPa)	QAL/	PVA (g mm/ m ² hkPa)
QAL	1.83x10 ⁻³ ± 1.45x10 ⁻⁴ b	0.25%SPI	8.43x10 ⁻⁴ ± 1.07x10 ⁻⁴ a*
2%RS	1.32x10 ⁻³ ± 3.28x10 ⁻⁵ b	0.38%SPI	8.75x10 ⁻⁴ ± 4.81x10 ⁻⁵ a
4%RS	2.33x10 ⁻³ ± 1.76x10 ⁻⁴ c	0.50%SPI	9.26x10 ⁻⁴ ± 1.94x10 ⁻⁴ a
0.14%SPI	1.13x10 ⁻³ ± 4.29x10 ⁻⁵ b	0.75%SPI	1.18x10 ⁻³ ± 6.93x10 ⁻⁵ b

PVA de las películas en el gradiente de humedad 22/75.*Película elegida por poseer la menor PVA. Datos promedio de tres determinaciones. Valores con la misma letra no presentan diferencias significativas ($\alpha \leq 0.05$).



La menor PVA se obtuvo al emplear 0.25%SPI y se observan diferencias significativas con respecto a QAL. Dongying *et al.* (2009) obtuvieron películas empelando Konjac (Glucomanano)-quitosano y proteína aislada de soya y observan una disminución en la PVA al emplear 0.25% de SPI; ellos señalan que comparados con SPI el Konjac y el quitosano son más hidrofílicos, por lo que la incorporación de SPI a la matriz polimérica a bajas concentraciones puede reducir la PVA de las películas, sin embargo cuando la concentración de SPI aumenta, disminuyen las interacciones intermoleculares como los puentes de hidrógeno, incrementando la repulsión electrostática entre el quitosano y la SPI, que se encuentran cargados positivamente cuando el pH de la solución es ácido (alrededor de 3.0), lo que provoca un incremento de la PVA. En el trabajo señalado la PVA de las películas disminuye conforme aumenta la concentración de SPI de 0% a 0.25% y posteriormente se incrementa conforme se aumenta la concentración de SPI de 0.25% a 0.45% (w/v). En el presente trabajo se observó un efecto muy similar, ya que la PVA de las películas de QAL mezcladas con SPI disminuyó al modificar la concentración de SPI de 0.14% a 0.25%, pero al aumentarla de 0.25% hasta 0.75% se observó un aumento de la PVA (Tabla 9). Con los resultados de PVA obtenidos se decidió continuar la investigación empleando las películas de QAL/0.25%SPI.

Se realizó un espectro de ATR- FTIR de la SPI, de las películas de QAL sin modificar y de las películas modificadas QAL/0.25%SPI, con el fin de comparar las señales características de QAL/SPI y corroborar posibles cambios o deformaciones en las bandas de QAL al mezclar con SPI (fig. 21). En la fig. 21a se muestra el espectro de SPI en donde se observan como principales señales la banda que aparece en 3281cm^{-1} correspondiente a puentes de hidrógeno entre las cadenas proteicas y la humedad en la proteína, en 1633 y 1515cm^{-1} aparecen las bandas correspondientes al grupo $-\text{NH}$, las bandas entre 1235 y 1446cm^{-1} corresponden a las vibraciones del enlace C-N y N-H (amida III), y por último alrededor de 1060cm^{-1} aparecen las vibraciones de C-H debidas a la estructura aromática (Su *et al.*, 2010).

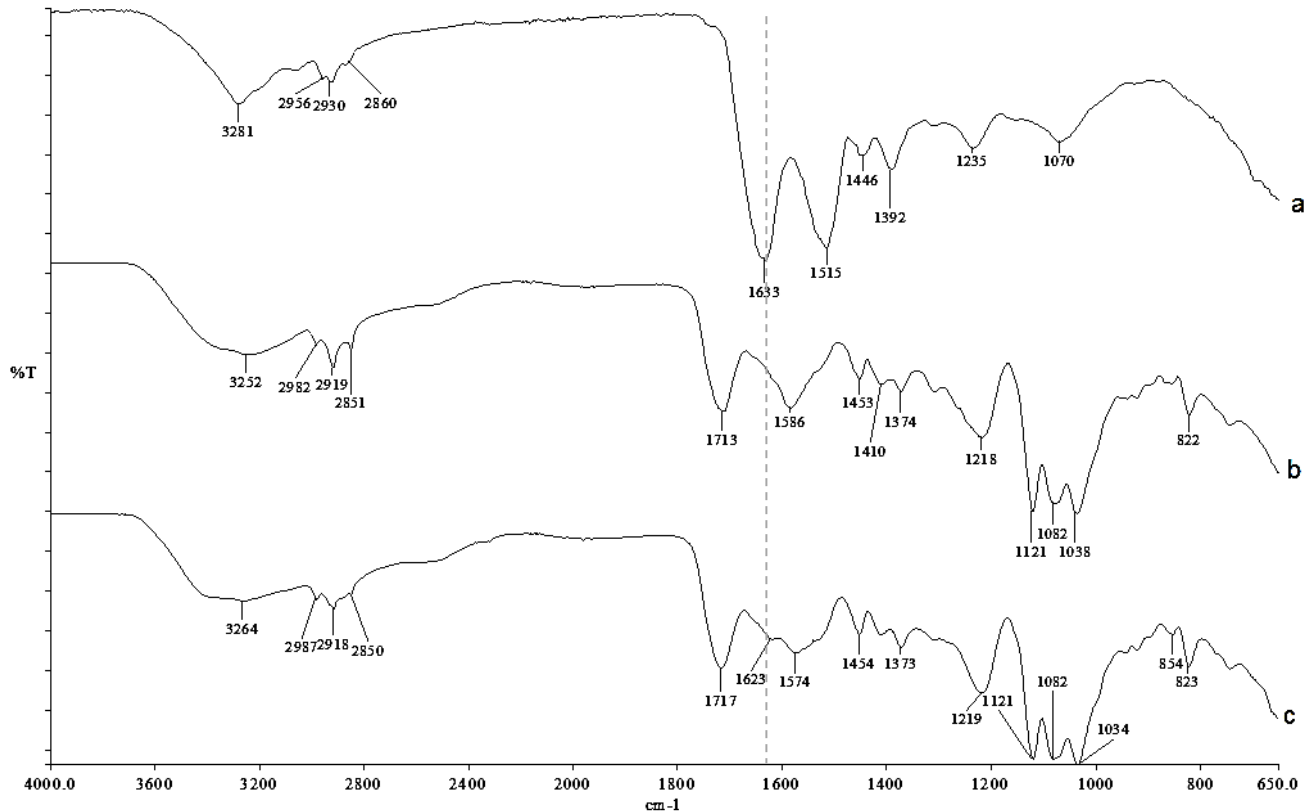


Fig. 21 Espectro ATR-FTIR de a) SPI, b) QAL, c) QAL/0.25%SPI

En la fig. 21c se muestra el espectro de las películas de QAL/SPI, al compararlo con el espectro 21b correspondiente a QAL y 21a correspondiente a SPI, es posible notar la presencia de SPI con la aparición de una banda en 1623cm^{-1} y la deformación de la banda en 1574cm^{-1} debidas a los grupos $-\text{NH}$, en 1717cm^{-1} aparece la señal correspondiente al estiramiento del grupo carbonilo proveniente de la incorporación de la molécula de ácido láctico y el resto de las bandas son características del quitosano.

Los recubrimientos QAL/0.21%SPI obtenidos, se emplearon como empaque activo de queso ranchero y se evaluó su capacidad de inhibir a *L. monocytogenes*.



3.1 Evaluación de los recubrimientos en queso ranchero

Se determinó la humedad inicial de los quesos no inoculados y de los quesos después de inocularse con *L. monocytogenes*, los valores fueron $41.5 \pm 1.6\%$ y $37.5 \pm 1.7\%$ respectivamente, se observó diferencia significativa en la humedad de los quesos no inoculados y los inoculados. Los quesos inoculados presentaron menor humedad y esto puede atribuirse al proceso de inoculación, en el cual al agregar el inóculo de *L. monocytogenes*, los quesos permanecieron durante una hora en reposo en campana de flujo laminar en condiciones ambientales (asépticas), favoreciendo el desuerado de los mismos. Después de 14 días de almacenamiento los controles no recubiertos y los quesos recubiertos con QAL/SPI, tanto inoculados como no inoculados, no muestran diferencias significativas en cuanto al porcentaje de humedad, pero sí para los recubiertos con LDPE, quienes presentan los mayores porcentajes de humedad al término del estudio (fig. 22). Sin embargo, al obtener RWL se observan diferencias significativas entre los tres tratamientos, presentando la menor RWL los quesos recubiertos con LDPE, con valores de $1.1 \pm 0.3\%$ en los quesos no inoculados y $0.5 \pm 0.8\%$ en los quesos inoculados; mientras los quesos recubiertos con QAL/SPI mostraron la mayor RWL $23.0 \pm 2.1\%$ y $24.7 \pm 1.8\%$ en los quesos no inoculados e inoculados respectivamente. Estos resultados eran de esperarse, considerando que el LDPE posee una muy baja PVA, 2.6 a 3.5×10^{-15} g mm/m²hkPa (Han, 2005), mientras la PVA de QAL/SPI obtenida en este trabajo fue de $8.43 \times 10^{-4} \pm 1.07 \times 10^{-4}$ g mm/m²hkPa.

La RWL en la etapa II a los 15 días de almacenamiento con todos los tratamientos fue alrededor de 40% (fig. 16), en esta etapa los quesos presentaron una RWL alrededor de 25%, lográndose reducir la RWL en un 15%. Sin embargo, los resultados de humedad y RWL de los quesos recubiertos con QAL/SPI presentan valores muy similares a los controles sin recubrir.

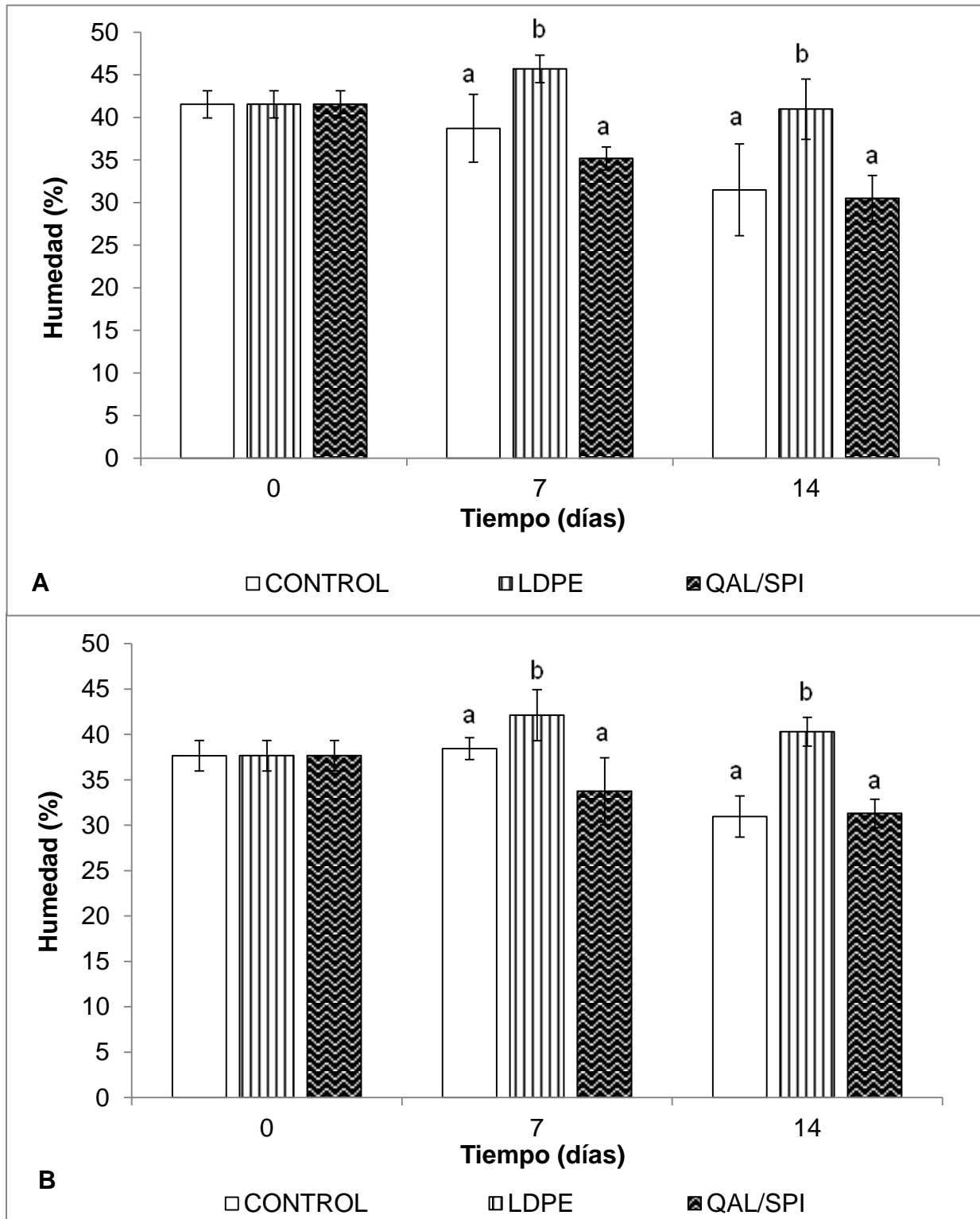


Fig. 22 Humedad (%) de los quesos no inculados (A) y los quesos inoculados con *L. monocytogenes* (B) a 4°C y 20%HR Datos promedio de tres determinaciones. Histogramas con la misma letra no presentan diferencias significativas ($\alpha \leq 0.05$).

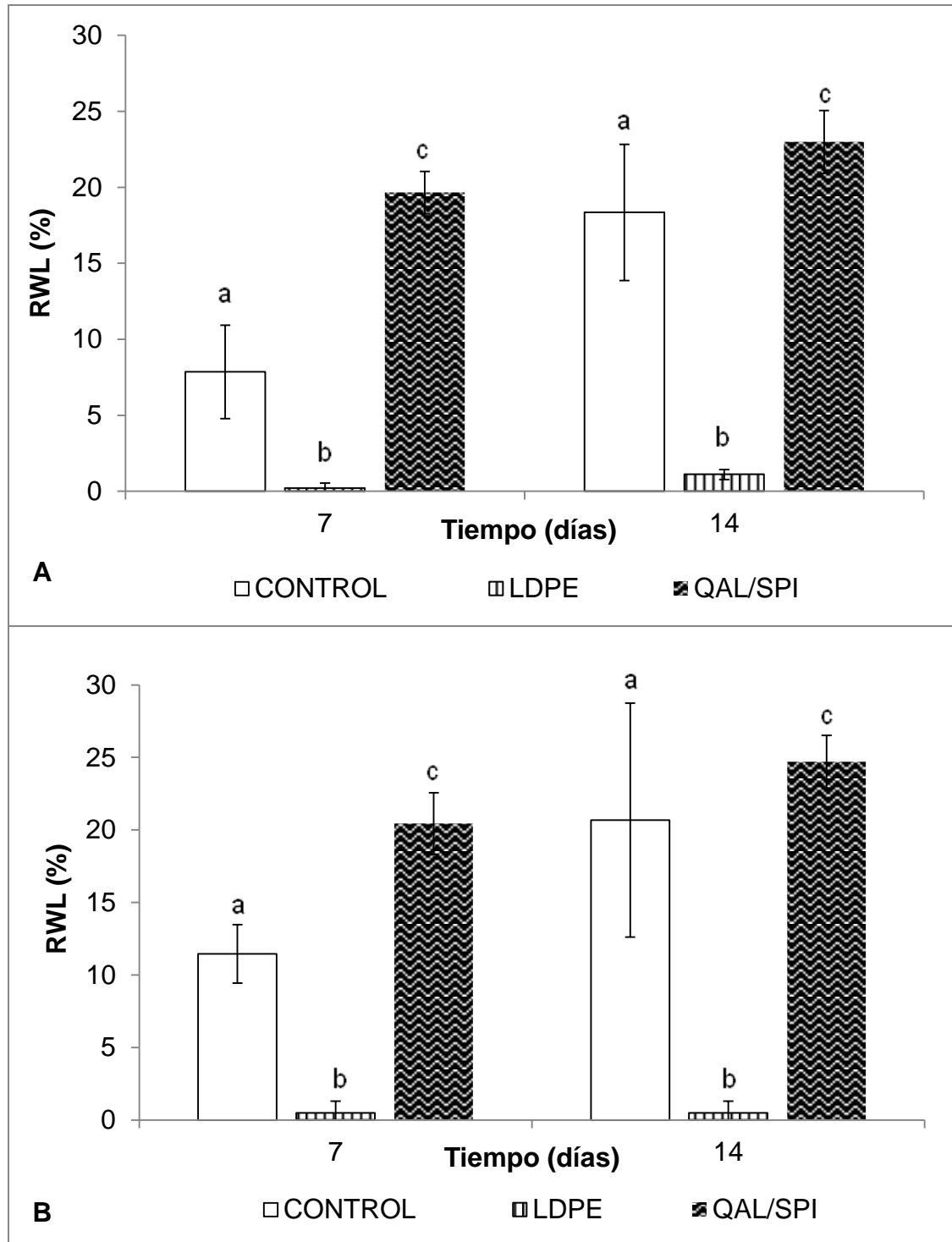


Fig. 23 Pérdida relativa de peso (RWL) en los quesos no inculados (A) y los quesos inculados con *L. monocytogenes* (B) a 4°C y 20%HR. Datos promedio de tres determinaciones. Histogramas con la misma letra no presentan diferencias significativas ($\alpha \leq 0.05$).



El pH en los quesos inoculados y no inoculados tendió a descender durante el tiempo de almacenamiento (fig. 24), en los quesos inoculados no se observan diferencias significativas entre tratamientos (fig. 24b), mientras en los no inoculados los recubiertos con LDPE mostraron diferencia significativa con respecto al control y QAL/SPI (fig. 24a). Los quesos recubiertos con QAL/SPI inoculados y no inoculados, presentaron los valores más bajos de pH; los quesos no inoculados a los siete días de almacenamiento presentan un descenso de pH mientras que a los catorce días de almacenamiento se observó un ligero ascenso, sin embargo la ATT se incrementa durante el almacenamiento.

Martins *et al.* (2010), compararon el pH de queso Ricotta sin recubrir, recubierto con galactomananos y con galactomanano más nisina y obtuvieron que los quesos recubiertos mostraron valores de pH menores al final del almacenamiento comparados con el control. El pH en el control aumentó conforme aumentó el tiempo de almacenamiento y el pH de los quesos recubiertos descendió a los dos días de almacenamiento y a partir de los siete días comenzó a ascender. En este trabajo las películas no poseen ningún componente ácido en su formulación. Ellos atribuyen el aumento de pH a la liberación de componentes alcalinos generados durante la degradación proteica, debido a la presencia de microorganismos en la superficie. En este trabajo, no se observó un ascenso de pH con ninguno de los tratamientos, por lo que podríamos descartar acción proteolítica de importancia.

A los catorce días de almacenamiento la ATT de los quesos recubiertos con QAL/SPI presento un incremento considerable de 0.4 ± 0.1 a 1.6 ± 0.2 y de 0.7 ± 0.2 a 1.7 ± 0.3 en los quesos no inoculados e inoculados respectivamente (fig. 25), estos valores de ATT tan elevados son atribuidos a la migración del ácido láctico a los quesos, pero también un pequeño porcentaje debido a la fermentación de lactosa por parte de la microbiota. El análisis estadístico muestra que existen diferencias significativas en la ATT de los quesos recubiertos con QAL/SPI con respecto al control y los recubiertos con LDPE.

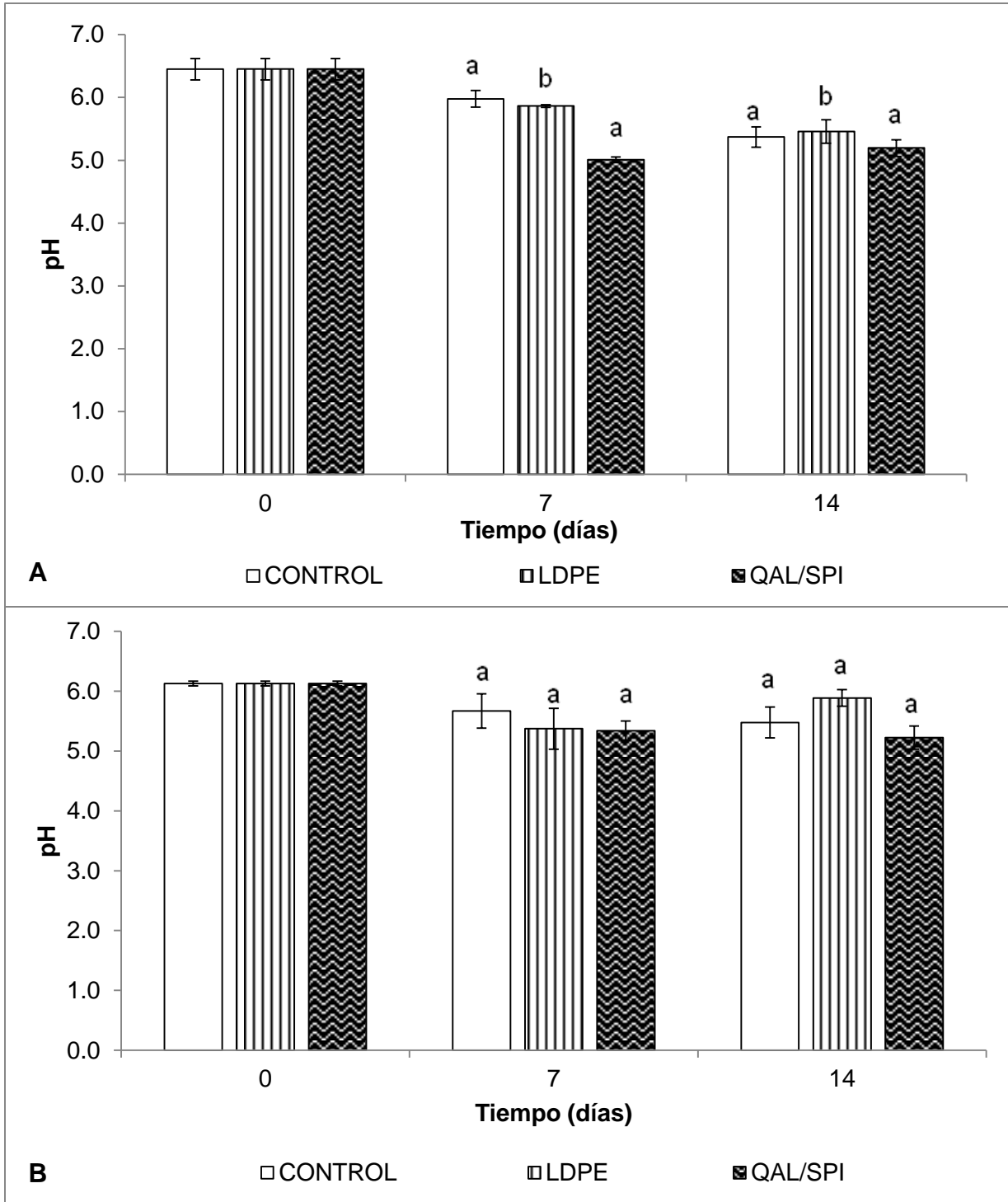


Fig. 24 pH de los quesos no inculados (A) y los quesos inoculados con *L. monocytogenes* (B) a 4°C y 20%HR. Datos promedio de tres determinaciones. Histogramas con la misma letra no presentan diferencias significativas ($\alpha \leq 0.05$).

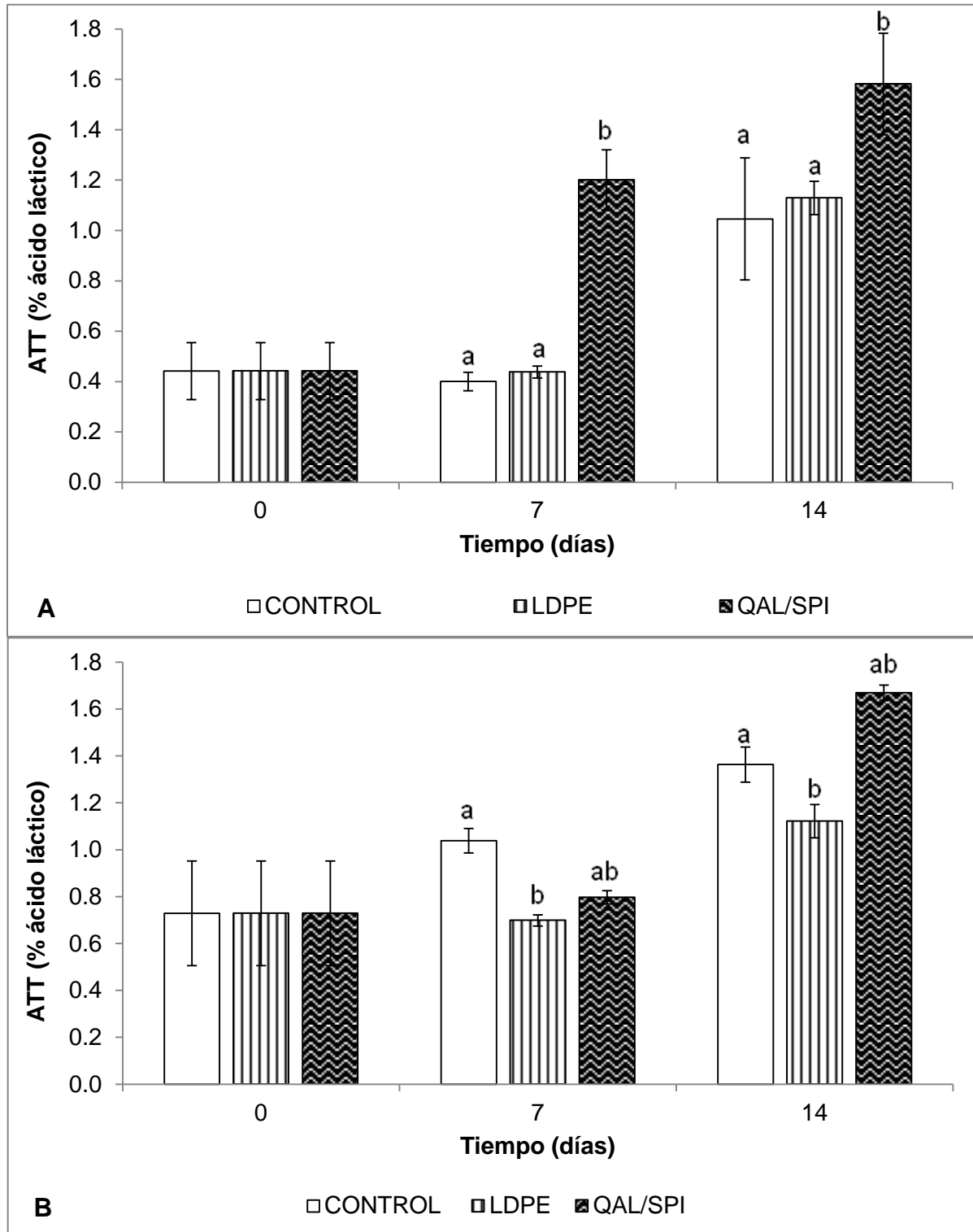


Fig. 25 Acidez total titulable (ATT) de los quesos no inculados (A) y los quesos inculados con *L. monocytogenes* (B) a 4°C y 20%HR. Datos promedio de tres determinaciones. Histogramas con la misma letra no presentan diferencias significativas ($\alpha \leq 0.05$).



Los controles y los quesos con LDPE mantienen la ATT durante los primeros siete días de almacenamiento, pero se incrementa considerablemente a los catorce días de almacenamiento, indicándonos la formación de ácido láctico debido a la fermentación de la lactosa por parte de bacterias ácido-lácticas.

Se llevó a cabo el análisis microbiológico para identificar y cuantificar *L. monocytogenes*, se realizó la cuenta al tiempo cero, a los siete días de almacenamiento y finalmente a los catorce días tanto en los quesos no inoculados como en los quesos inoculados. En los quesos no inoculados no se encontraron colonias características en Agar Oxford de *L. monocytogenes* en ninguno de los tiempos analizados por esta razón no se muestran los gráficos correspondientes, lo que nos sugiere buenas prácticas de manufactura por parte de los productores, este resultado también asegura que no existió ninguna contaminación con el microorganismo durante su manipulación en este trabajo. En los quesos inoculados se realizó la cuenta después de llevar a cabo la inoculación, correspondiente al tiempo cero, posteriormente se realizó el conteo a los siete y catorce días de almacenamiento en refrigeración a 4°C. Sin embargo no se observaron colonias características en el tiempo cero ni a los siete días de almacenamiento, esto podría deberse a que no se realizó un pre-enriquecimiento ni un enriquecimiento selectivo durante el análisis microbiológico de *L. monocytogenes*, que tienen como objetivo favorecer el crecimiento del microorganismo en estudio hasta valores cercanos a 1×10^6 UFC/mL para que pueda ser detectado por el método tradicional. La concentración de *L. monocytogenes* inoculada en los quesos fue de 1×10^4 UFC/mL, por lo cual se puede justificar que en el tiempo cero no se observarán colonias características, debido a la sensibilidad del método. Para el día siete de almacenamiento, se hubiera esperado que *L. monocytogenes* fuera capaz de desarrollarse hasta alcanzar una concentración mayor a 1×10^6 UFC/mL, sin embargo, no fue así ya que nuevamente no se observaron colonias características en el conteo, sin bien *L. monocytogenes* es capaz de sobrevivir y desarrollarse a temperaturas de refrigeración su crecimiento es más lento, además se ha observado que algunas

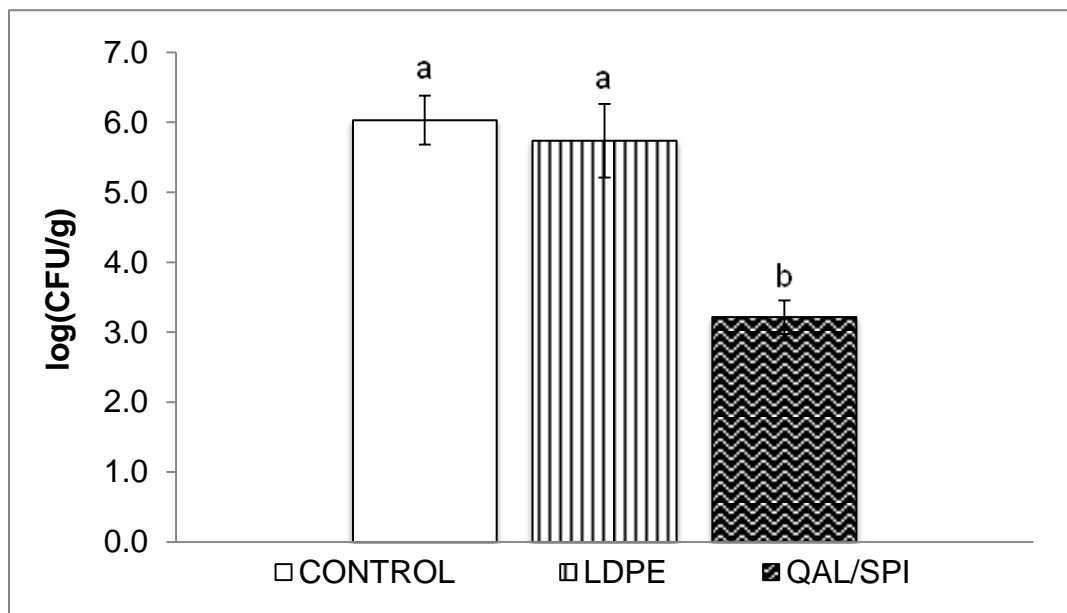


Fig. 26 Cuenta en placa de *L. monocytogenes* en queso ranchero inoculado después de 14 días de almacenamiento a 4°C y 20%HR. Datos promedio de tres determinaciones. Histogramas con la misma letra no presentan diferencias significativas ($\alpha \leq 0.05$).

bacterias lácticas poseen la capacidad de inhibir este microorganismo, debido a la disminución del pH, resultado de la producción de ácido láctico, o bien, debido a una competencia por la utilización de los carbohidratos en el sustrato, produciendo una disminución de nutrientes comunes y específicos de *L. monocytogenes*, lo que produce una acción antagonista sobre el patógeno (Bredholt *et al.*, 2001). A los catorce días de almacenamiento si se encontraron colonias características de *L. monocytogenes* en los tres tratamientos, en la fig. 27 se muestran los resultados de la cuenta en placa. Los resultados muestran que los quesos recubiertos con QAL/SPI presentan la menor cuenta, 3.2 ± 0.2 log UFC/g y se observan diferencias significativas con respecto al control y LDPE que presentan valores de 6.0 ± 0.3 log UFC/g y 5.7 ± 0.5 log UFC/g respectivamente. La reducción en la cuenta de los quesos con QAL/SPI es considerable, lográndose una reducción en la cuenta de *L. monocytogenes* de prácticamente la mitad. Podría ponerse en duda la efectividad de QAL/SPI, debido a la pérdida de humedad y por tanto disminución de la a_w , lo que limitaría el crecimiento de *L. monocytogenes* considerando que el mínimo de a_w para que pueda desarrollarse es de 0.92, sin embargo los resultados



de humedad muestran que los controles sin recubrir y los quesos recubiertos con QAL/SPI no muestran diferencia significativa entre ellos, es decir, ambos poseen valores de humedad similares (fig. 22b), pero la cuenta en placa de *L. monocytogenes* en el control es significativamente mayor que la cuenta en los quesos recubiertos con QAL/SPI.

Mariani *et al.* (2011), logró inhibir el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en queso Ricotta, empleando un recubrimiento de galactomanano al que añadió nisina y obtuvo una cuenta de 4.5 log UFC/g a los catorce días de almacenamiento, los resultados de este trabajo muestran mayor inhibición de *Listeria monocytogenes* en el queso Ranchero empleando las películas de QAL/SPI.

3.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido es una herramienta útil que ha permitido examinar los elementos estructurales en los quesos a pequeña escala, como lo son microorganismos y la matriz de caseína, así como los cambios que ocurren durante su manufactura y el proceso de maduración (Everett *et. al*, 2008).

En las fig. 27 y Fig. 28 se muestran las microscopías electrónicas de barrido de la superficie de los quesos no inoculados e inoculados respectivamente, después de 14 días de almacenamiento. La figura 27a corresponde a la SEM con un aumento x500 del control sin recubrir, en la cual podemos observar un segmento de hifa debido al crecimiento de hongos, lo cual no es de extrañarse considerándose que en la etapa 2 del presente trabajo la cuenta de hongos y levaduras en los quesos sin recubrir a los 15 días de almacenamiento fue alta (log 9.3 UFC/g), además en la figura 27b y 27c, también correspondientes al control se observa la presencia de levaduras y esporas. Se ha identificado la presencia de diversos hongos y levaduras en diversos quesos frescos Mexicanos destacan los géneros de hongos *Penicillium sp.*, *Cladosporium sp.* y *Geotrichum candidum*, mientras que de



levaduras se ha identificado la presencia de *Candida guilliermondii*, *Candida lipolytica*, *Candida tropicalis*, principalmente (Saxer *et al.*, 2013).

También se observa en la fig. 26b y 26c la presencia de cristales, que podría atribuirse a cristales de lactosa, de acuerdo a la comparación de éstos con los cristales de lactosa obtenidos por Kougoulos *et al.* (2010) mediante ultrasonido y anti-disolvente, así como los obtenidos por Kaialy *et al.* (2012) empleando cristalización anti-disolvente.

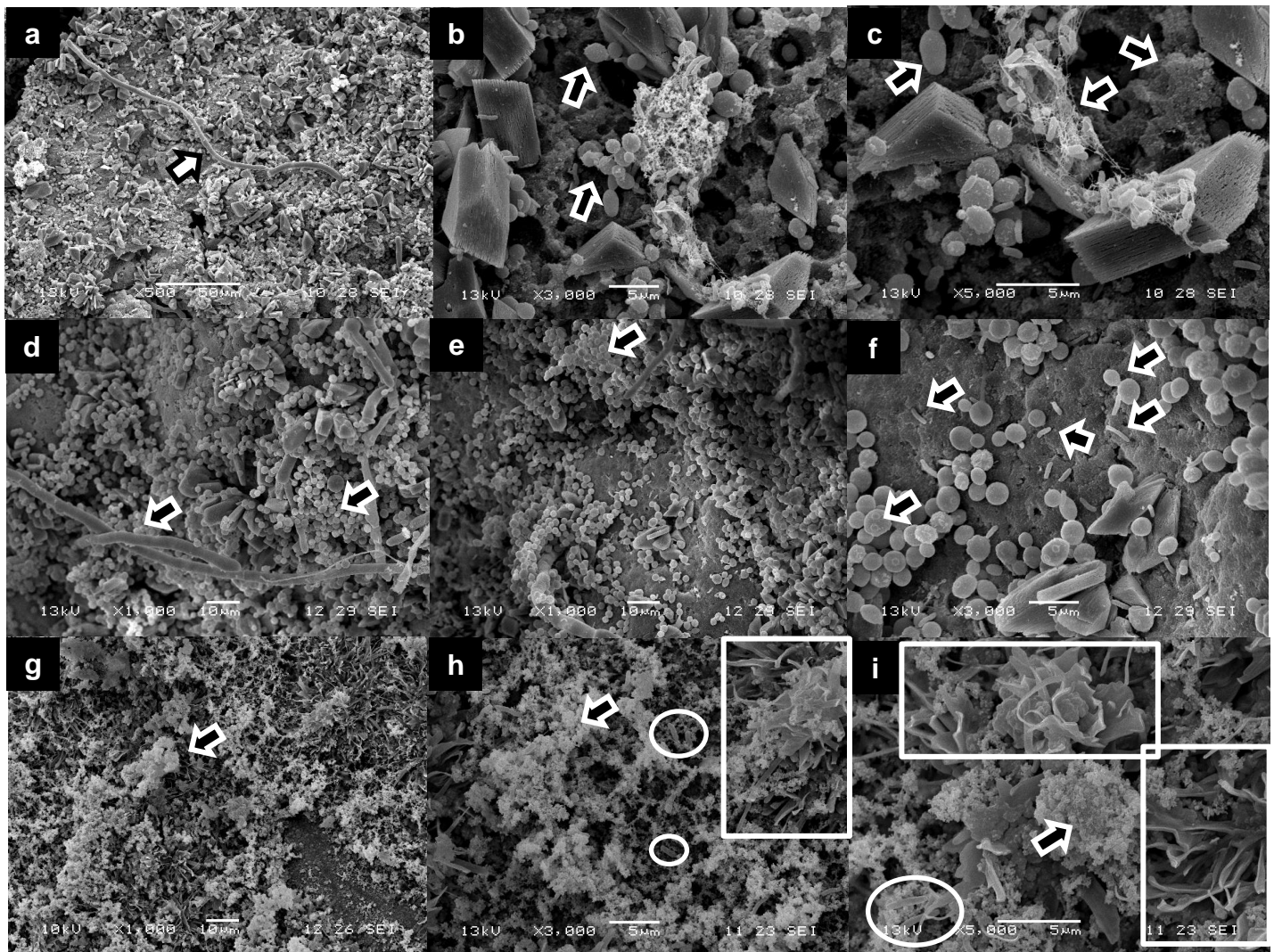


Fig. 27 SEM superficie de queso Rancho no inoculado a los 14 días de almacenamiento: a(x500),b(x3000),c(x5000) correspondiente al control sin recubrir; d(x1000),e(x1000),f(x3000) quesos empacados en LDPE; g(x1000),h(x3000),i(x5000) quesos empacados en QAL/SPI.



En la figura 27b y 27c se observa la presencia de una aglomeración de bacterias capaces de formar exopolisacárido; se logra ver la presencia de exopolisacárido que se encuentra como una red en donde se localizan inmersas las bacterias (con forma de bacilos cortos), mejor apreciable en la Fig. 27c a x5000. Se conoce que algunas bacterias ácido lácticas tienen la capacidad de producir diferentes tipos de exopolisacáridos (EPS), dependiendo de las condiciones de crecimiento como temperatura y pH (Canquil *et al.*, 2007).

Los quesos no inoculados empacados en LDPE se muestran en la fig. 27 d, e y f, en donde podemos observar que este material no es efectivo para inhibir el desarrollo de hongos y levaduras, ya que las SEM permiten distinguir la presencia de hifas (fig.27d), una gran proliferación de esporas (fig. 27e) y levaduras (fig. 27f). Además podemos ver bacterias con forma de bacilos aisladas sin exopolisacárido en la fig. 27f.

En las SEM de los quesos empacados en QAL/SPI (fig. 27g,h,i) notamos menor presencia de microorganismos, no se observa presencia de hifas, esporas ni levaduras. En la fig. 27g,h,i señalado con flechas, se observa un complejo esponjoso conformado por aglomeración de partículas esféricas, el cual puede corresponder a micelas de caseína; la imagen observada presenta similitudes con la SEM obtenida por Lobato-Calleros *et al.* (2007) de un queso fresco (control) con un aumento x3000 en donde se muestra una red proteica, correspondiente a caseína. Está reportado que las micelas de caseína se presentan como estructuras porosas, esponjosas con gran voluminosidad y poseen un diámetro aproximado que va de 30-300nm (Fennema, 1995); conformadas por una agrupación de submicelas esféricas con un diámetro medio que va de 10-20nm, que varía entre cien y más de mil (Eck, 1990). En la misma figura, encerrado con una elipse, se puede observar la presencia de bacilos cortos en la figura 27h y bacilos de mayor longitud en la figura 27i, ambos menores a 5µm. Delimitado por rectángulos, se muestran unas estructuras laminares conformadas peculiarmente;



Dumelié *et al.* (2005) muestra la micrografía SEM de un recubrimiento de fosfato de calcio obtenido mediante electrodeposición ($j=2 \text{ mA/cm}^2$), en la que observa dos diferentes morfologías de la superficie, la primera compuesta por cristales en forma de agujas afiladas con una longitud menor a $10\mu\text{m}$ y alrededor de $2 \mu\text{m}$ de ancho, estos cristales, presentan mucha similitud con los observados en la figura 27h,i. El fosfato de calcio es el mineral más abundante en la leche y el queso, interactúa con la caseína, permitiendo formar las micelas de caseína (Fennema, 1995). Se ha reportado e identificado la presencia de cristales de fosfato de calcio en la superficie de quesos mediante microscopía electrónica y microanálisis de rayos-X. Empleando microscopía de fluorescencia se ha observado la presencia de cristales con una longitud entre $10\text{-}30\mu\text{m}$, en quesos procesados (Everett *et al.*, 2008).

La fig. 28 corresponde a las SEM de los quesos inoculados; 28a,b corresponden a las micrografías del inóculo de *Listeria monocytogenes*, con el fin de observar su morfología y tenerla como referencia, para distinguir su presencia en los quesos inoculados de la microflora acompañante. *L. monocytogenes* es un bacilo corto que puede tener una longitud de $0.5\text{-}2\mu\text{m}$ y un diámetro de $0.4\text{-}0.5\mu\text{m}$, en la figura 28b a $\times 16,000$ podemos observar que la longitud de los bacilos en general es de aproximadamente $1\mu\text{m}$.

En la figura 28c, correspondiente al control con amplificación $\times 1000$, señalado con una flecha se distingue un segmento de hifa y señalado dentro de un cuadrado se observan dos esferas, que podrían corresponder a glóbulos de grasa. En 28d a $\times 3000$, se muestra con una flecha una estructura porosa y esponjosa correspondiente a la red proteica de micelas de caseína y nuevamente se observan dos estructuras esféricas que creemos son glóbulos de grasa. Está reportado que los glóbulos grasos en la leche tienen un diámetro que va de $2\text{-}6\mu\text{m}$ y es 25 veces más grande que el diámetro medio de las micelas de caseína (Fennema, 1995), hecho que concuerda con lo observado en estas imágenes.

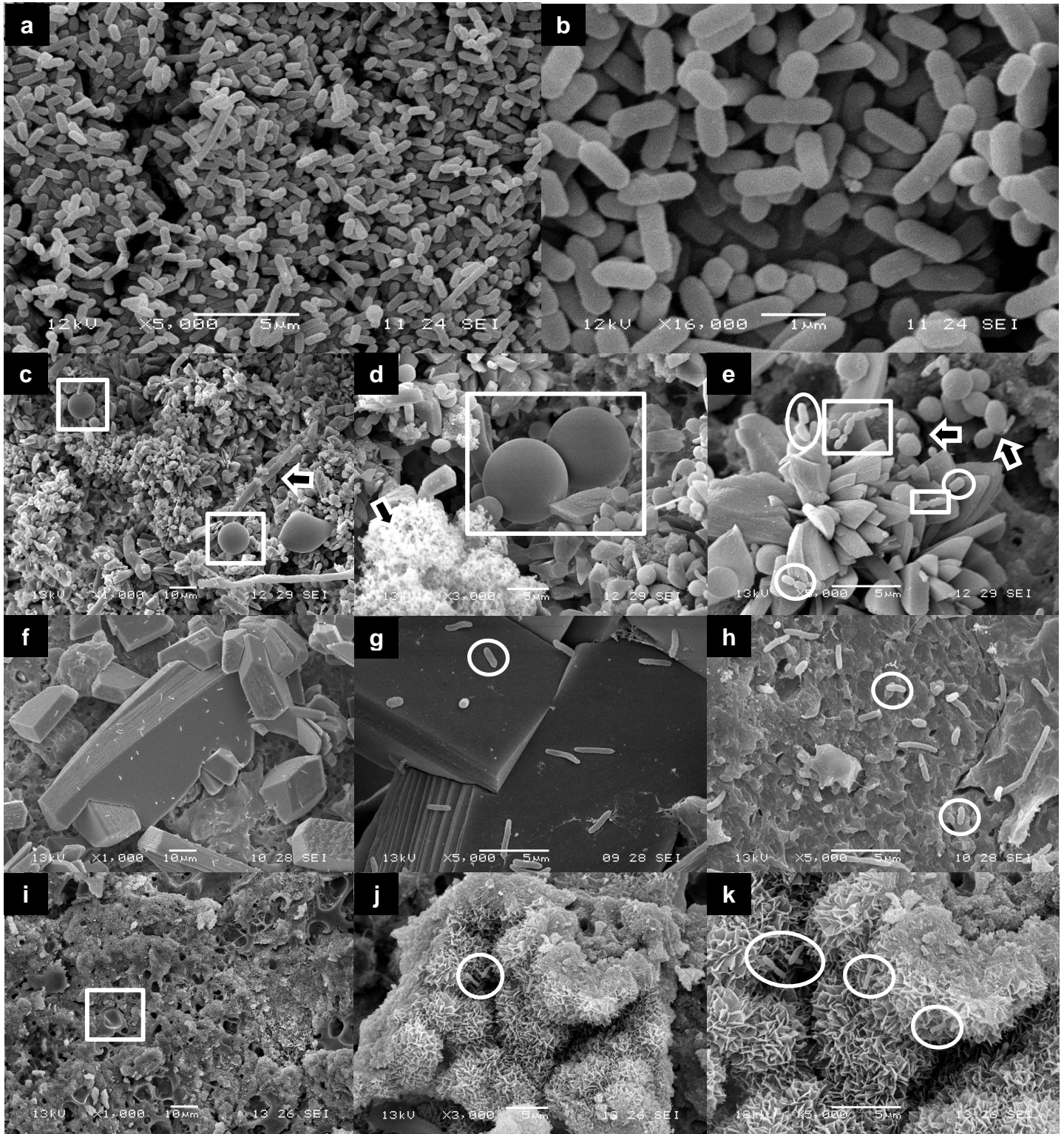


Fig. 28 SEM superficie de queso Rancho inoculado con *L.monocytogenes* a los 14 días de almacenamiento: a(x5000),b(x16000) inóculo *L.monocytogenes*; c(x1000),d(x3000),e(x5000) correspondiente al control sin recubrir; f(x1000),g(x5000),h(x5000) quesos empacados en LDPE; i(x1000),j(x3000),k(x5000) quesos empacados en QAL/SPI.



A mayor amplificación (x5000) logramos distinguir bacterias en 28e. Señaladas dentro de una elipse se observan bacilos cortos, con morfología similar a *L. monocytogenes*. Por otro lado, se observa la presencia de bacterias con forma de cocos unidas formando una cadena, que pueden corresponder al género *Streptococcus sp.* En esta misma imagen se observan algunas levaduras y esporas.

La figura 28f,g y h corresponde a los quesos empacados en LDPE, se observa en general la presencia de bacterias; a comparación de los quesos no inoculados, en estos no se observa la proliferación de hongos ni levaduras. En 28f con un aumento x1000, podemos apreciar una vista panorámica en la cual se observan cristales de distintos tamaños y formas, sobre los cuales están algunas bacterias. Con mayor aumento en 28g,h a x5000, se distinguen bacilos largos, algunos cocos y encerrados en círculo bacilos cortos que tienen semejanza con *L.monocytogenes*.

Las SEM de los quesos empacados con QAL/SPI se muestran en la figura 28 i,j,k. En general podemos observar menor presencia de microorganismos, observamos bacilos cortos similares a *L.monocytogenes* en 28j y k señalados con círculos, en estas mismas figuras destaca la presencia de cristales con una conformación parecida a corales. En 28i denotamos una estructura señalada con un cuadrado que puede ser SPI que migró a la superficie del queso, esto en base al trabajo de Huan *et al.* (2012) en el cual muestra una SEM de SPI cuya estructura muestra características semejantes con la señalada.



CONCLUSIONES

El empleo de películas de quitosano-ácido láctico (QAL) resultó una buena alternativa para proteger el queso fresco Ranchero de la proliferación de microorganismos, reduciendo las cuentas de mesófilos aerobios, hongos y levaduras, actuando como un envase activo mediante la liberación de componentes antimicrobianos como lo es el ácido láctico así como por la propia acción antimicrobiana de la matriz empleada, el quitosano.

El empleo de SPI permitió reducir la PVA de las películas de QAL, sin embargo esta reducción no es suficiente para mantener la humedad en los quesos durante el tiempo de almacenamiento. Las películas de QAL/SPI mostraron actividad contra *Listeria monocytogenes*, siendo una excelente opción para inhibir el desarrollo de este patógeno, comúnmente presente en este tipo de quesos.

El presente trabajo permitió esclarecer las ventajas y limitaciones del empleo de biopelículas sobre el uso de plásticos como el LDPE en el envasado de queso fresco Ranchero.



REFERENCIAS

Albertsson A., Wirsén A. and Qu X. Synthesis and Characterization of pH-sensitive Hydrogels based on Chitosan and D,L-Lactic acid. *Journal of Applied Polymer Science*, 1999. - Vol. 74.

Alonso, D., Gimeno, M., Olayo, R., Vázquez-Torres, H., Sepúlveda-Sánchez, J., Shirai, K., Cross-linking chitosan into UV-irradiated cellulose fibers for the preparation of antimicrobial-finished textiles. *Polymers*, 2009. - Vol. 77.

Álvarez Varela E. Rotación de antibióticos: una estrategia para paliar la resistencia. *CENIC Ciencias Biológicas*, 2006. - 1 : Vol. 37.

ASTMD882-97 Standar practice for conditioning plastics for testin, 2003.

Bertuzzi, M.A., Armanda, M., Gottifredi, J.C., Aparicio, A.R., Jimenez, P. Estudio de la permeabilidad al vapor de agua de films comestibles para recubrir alimentos. Congreso Regional de Ciencia y Tecnología NOA, Secretaría de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Catamarca, 2002. - Vols. Producciones Científicas. Sección:Ciencias de la Ingeniería, Agronomía y Tecnología.

Bourtoom T. and Chinnan M.S., Preparation and properties of rice starch-chitosan blend biodegradable films, *LWT-Food Science and Technology*, 2008. - Vol. 41.

Bredholt Sesbakken, T. and Holck A. Industrial application of an antilisterial strain of *Lactobacillus sakei* as a protective culture and its effect on the sensory acceptability of cooked, sliced, vacuum-packaged meats, *Journal of Food Microbiology*, 2001. - Vol. 66.

Brody, Aaron L., Bugusu, B., Han, Jung H., Koelsch, Sand C., McHugh, Tara H., Innovative Food Packaging Solutions, Institute of Food Technologists : *Journal of Food Science*, 2008. - 8 : Vol. 73.

Canquil, N., Villarroel, M., Bravo, S., Rubilar, M., Shene, C., Behavior of the rheological parameters of exopolysaccharides synthesized by three lactic acid bacteria, *Carbohydrate Polymers*, 2007. - Vol. 68.



Castillo Valle E. Recubrimiento de envases de poliestireno expandido con nanopartículas lipídicas sólidas para generar envases activos, Tesis de Licenciatura Ingeniería en Alimentos, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, 2010.

Catala R. and Gavara R. Nuevos envases. De la protección pasiva a la defensa activa de los alimentos envasados, *Arbor*, 2001. - 661 : Vol. CLXVIII.

Cerqueira, M.A., Lima, A.M.P., Vicente, A.A., Teixeira, J.A., Moreira, R.A., Novel Functional Polysaccharides as Edible Coatings for Cheese, Proceedings of the 3rd CIGR Section VI International Symposium on FOOD AND AGRICULTURAL PRODUCTS: PROCESSING AND INNOVATIONS. - Naples, Italia : CIGR Section VI International Symposium on FOOD AND AGRICULTURAL PRODUCTS: PROCESSING AND INNOVATIONS, 2007.

Cervantes, Escoto F., Gante, Villegas de, Vargas, Cesín A., Espinoza, Ortega A., Los quesos mexicanos genuinos: patrimonio cultural que debe rescatarse, Mundi-Prensa México, Universidad Autónoma Chapingo y Universidad Autónoma del Estado de México, 2008.

Cervera Fantoni A.L., Envase y Embalaje, La venta silenciosa, España : ESIC, 2003. - Vol. 2a ed..

Chou Y., Kyoon H. and Meyers Physicochemical Characteristics and Functional Properties of Various Commercial Chitin and Chitosan Products, *Journal Agriculture Food Chemistry*, 1998. - Vol. 46.

Cira, L., Huerta, S., Hall, G., Shirai, K. Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery, *Process Biochemistry*, 2002. - Vol. 37.

Corona-Suárez I.J. Síntesis y caracterización de las propiedades mecánicas y antifúngicas de las películas de quitosano-co-cítrico, Tesis de Licenciatura Químico en Alimentos. Universidad Nacional Autónoma de México, 2011.

Dainelli D., Gontard N., Spyropoulos, D., Zondervan-van den Beuken, E. and Tobback P. Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns, *Trends in Food Science & Technology*, 2008. - Vol. 19.

De Eugenio M. L.I. Estudio bioquímico, genético y fisiológico de la degradación intracelular de polihidroxialcanoatos en *Pseudomonas putida*: Aplicaciones



biotecnológicas, Madrid : Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid, , 2009.

Di Pierro, P; Sorrentino, A.; Mariniello, L.; Valeria, C.L.; Porta, G.R, Chitosan/whey protein films as active coating to extend Ricotta cheese shelf-life, *LWT-Food Science and Technology*, 2011. - Vol. 44.

Dongying Jia, Yu Fang and Kai Yao Water vapor barrier and mechanical properties of konjac glucomannan-chitosan-soy protein isolate edible films, *Food and Bioproducts processing*, 2009. - Vol. 87.

Dumelié, N.; Benhayoune, H.; Rouse-Bertrand, C.; Bouthors, S.; Perchet, A.; Wortham, L.; Douglade, J.; Laurent-Maquin, D.; Balossier, G., Characterization of electrodeposited calcium phosphate coatings by complementary scanning electron microscopy and scanning-transmission electron microscopy associated to X-ray microanalysis, *Thin Solid Films*, 2005. - Vol. 492.

Dumitriu S. Polysaccharides. Structural, diversity and functional versatility, USA : Marcel Dekker, 2005. - Vol. 2a ed..

Dutta, P.K.; Shipra, Tripathi; Mehrotra, G.K.; Dutta, Joydeep, Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food application, *Food Chemistry*, 2009. - Vol. 114.

Eck A. El queso, España : Omega, 1990.

Espadín Dávila A.U. Preparación y caracterización de materiales a base de quitosano biológico-químico y derivados del ácido láctico, Tesis de Maestría en Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, 2012.

Everett D. and Auty M.A.E. Cheese structure and current methods of analysis, *International Dairy Journal*, 2008. - Vol. 18.

Fajardo, P.; Martins, J.T.; Fuciños, C.; Pastrana, L.; Teixeira, J.A.; Vicente, A.A., Evaluation of a chitosan-based edible film as carrier of natamycin to improve the storability of Saloio cheese, *Journal of Food Engineering*, 2010. - Vol. 101.

Farkye Nana Y. Dairy Microbiology Handbook, editado por Richard K. Robinson, USA : Wiley-Interscience, Inc., 2002. - Vol. 3a ed..

Fennema Owen R. Química de los alimentos, Zaragoza : Acribia, 1995. - 3ra ed. : p. 1258.



- Fernández Álvarez M.** Revisión: Envasado activo de los alimentos, Food Science and Technology International, 2000. - 97 : Vol. 6. - DOI: 10.1177/108201320000600203.
- Gacén J. and Gacén E.I.** Quitina y quitosano. Nuevos materiales textiles, Boletín Intexter (U.P.C.), 1996. - Vol. 110.
- Gammariello, D.; Conte, A.; Attanasio, M.; Del Nobile, M.A.,** A study on the synergy of modified atmosphere packaging and chitosan on straciatella shelf life, Journal of Food Process Engineering, 2011. - Vol. 34.
- García M.** Inhibición de *aspergillus parasiticus* y *penicillium digitatum* con mezclas sinérgicas de antimicrobianos naturales y sintéticos en sistemas modelo de puré de manzana mínimamente procesado, México : Tesis profesional Ingeniería de Alimentos, Universidad de las Américas Puebla, 2004.
- Gontard N., Guilbert S. and Cuq J.** Water and glicerol as plasticizers affect mechanical and water vapor barrier. Properties of an edible wheat gluten film, Journal of Science, 1993. - 1 : Vol. 58.
- Groover M.P.** Fundamentos de Manufactura moderna. Materiales, procesos y sistemas, Pearson-Prentice Hall Hispanoamericana, 1997. - 1.
- Guldas, M.; Akpinar-Bayizit, A.; Ozcan, T.; Yilmaz-Ersan, L.,** Effects of edible film coatings on shelf-life of mustafakemalpassa sweet, a cheese based dessert, Journal of Food Science and Technology, 2010. - 5 : Vol. 47.
- Han H. Jung** Innovations in Food Packaging, Londres : Elsevier Academic Press, 2005.
- Hegde, V.; Leon-Velarde, C.G.; Stam, C.M.; Jaykus, Lee-Ann; Odumeru, J.A.,** Evaluation of BBL CHROMagar Listeria agar for the isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from food and environmental samples, Journal of Microbiological Methods, 2007. - Vol. 68.
- Hotchkiss J.H.** Current and future trends in active packaging, Food Packaging International Congress RISEA-2000:43. - 2000.
- Hsiao Chang-Ping and Siebert K.J.** Modeling the inhibitory effects of organic acids on bacteria, International Journal of Food Microbiology, 1999. - Vol. 47.



- Huang, G.Q.; Sun, Y.T.; Xiao, J.X; Yang, J.**, Complex coacervation of soybean protein isolate and chitosan, *Food Chemistry*, 2012. - Vol. 135.
- Juárez-Castelán C.** Tratamiento enzimático de desperdicios de crustáceos para la obtención de quitina, Tesis de Especialidad en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana, 2010.
- Kaialy W. and Nokhodchi A.** Antisolvent crystallisation is a potential technique to prepare engineered lactose with promising aerosolisation properties: Effect of saturation degree, *International Journal of Pharmaceutics*, 2012. - Vol. 437.
- Kamlesh, A. Soni; Monil, D.; Ademola, O.; Frederick, S.; Ramakrishna, N.** Reduction of *Listeria monocytogenes* in queso fresco cheese by a combination listericidal and listeristatic GRAS antimicrobials, *International Journal of Food Microbiology*, 2012. - Vol. 155.
- Kanatt S. R., Chander R. and Sharma A.** Chitosan glucose complex-A novel food preservative, *Food Chemistry*, 2008. - Vol. 106.
- Khoshgozaran-Abras, S.; Hossein, A. M.; Hamidy, Z.; Bagheripoor-Fallah, N.** Mechanical, physicochemical and color properties of chitosan based-films as a function of Aloe vera gel incorporation, *Carbohydrate Polymers*, 2012. - Vol. 87.
- Kougoulos E., Marziano I. and Miller P.R** Lactose particle engineering: Influence of ultrasound and anti-solvent on crystal habit and particle size, *Journal of Crystal Growth*, 2010. - Vol. 312.
- Lárez C.**, Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y futuro, *Avances en química*, 2006. - 2 : Vol. 1.
- Lárez Velásquez C.** Algunas potencialidades de la quitina y el quitosano par ausos relacionados con la agricultura en Latinoamérica, *UDO Agrícola*, 2008. - 1 : Vol. 8.
- Li, Q.; Dunn, E.T.; Grandmaison, E.W.; Goosen, M.F.A.**, Applications and properties of chitosan. Applications of chitin and chitosan, USA , Technomic Publishing Company Inc., 1997.
- Linnan, M.J.; Mascola, L.; Lou, XD.**, Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese, *The New England Journal of Medicine*, 1988. - Vol. 319.



- Lloyd, L.; Kennedy, J.; Methacanon, P.; Paterson, M.; Knill, C.**, Carbohydrate polymers as wound management aids, *Carbohydrate Polymers*, 1998. - 3 : Vol. 37.
- Lobato-Calleros, C.; Reyes-Hernández, J.; Beristain, C.I.; Hornelas-Urbe, Y.; Sánchez-García, J.E.; Vernon-Carter, E.J.**, Microstructure and texture of white fresh cheese made with canola oil and whey protein concentrate in partial or total replacement of milk fat, *Food Research International*, 2007. - Vol. 40.
- López Orozco M.** Mejoramiento de vida de anaquel en queso tradicional ranchero y queso de pasta hilada (Oaxaca), Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Universidad Iberoamericana, 2004.
- López-Rubio, A.; Almenar, E.; Hernández-Muñoz, P.; Lagarón, M. J.; Catalá, R.; Gavara, R.**, Overview of Active Polymer-Based Packaging Technologies for Food Application , *Food Reviews International*. - 4 : Vol. 20.
- MacDonald, Pia D.M.; Whitwam, Robert E.; Boggs, Jackie D.; MacCormack, Newton J.; Anderson, Kevin L.; Reardon, Joe W.; Saah, Royden J.; Graves, Lewis M.; Hunter, Susan B.; Sobel, J.**, Outbreak of Listeriosis among Mexican Immigrants as a Result of Consumption of Illicitly Produced Mexican-Style Cheese, *Clinical Infectious Diseases*, 2005. - (1 March) : Vol. 40.
- Madrid Vicente A.** Tecnología quesera, Madrid : Mundi-Prensa, 1999. - Vol. 2a ed.
- Mani-López E., García H.S. and López-Malo A.** Organic acids as antimicrobials to control Salmonella in meat and poultry products, *Food Research International*, 2012. - Vol. 45.
- Mariani, C.; Oulahal, N.; Chamba, J.F.; Dubois-Brissonnet, F.; Notz, E.; Briandet, R.**, Inhibition of *Listeria monocytogenes* by resident biofilms present on wooden shelves used for cheese ripening , *Food Control*, 2011. - Vol. 22.
- Martins, J.T.; Cerqueira, M.A.; Souza, B.W.S.; Do Carmo Avides, M.; Vicente, A.A.**, Shelf Life Extension of Ricotta Cheese Using Coatings of Galactomannans from Nonconventional Sources Incorporating Nisin against *Listeria monocytogenes*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010. - Vol. 58.



- Maza Mejía I. and Jacinto Hernández C.** Caracterización Físicoquímica de Quitosano para su Aplicación como Biosorbente de Metales, Revista de la Facultad de Ciencias de la UNI, REVCUNI, 2007. - 1 : Vol. 11.
- Miranda, P.S; Cárdenas, G.; López, D.; Sagahon, Lara A.V.,** Comportamiento de películas de quitosán compuesto en un modelo de almacenamiento de aguacate , Revista de la Sociedad Química de México, 2003. - 4 : Vol. 47.
- Nicio Cruz A.A.** Síntesis y caracterización de películas de quitosano-cítrico-HPMC, Tesis de Licenciatura Química de Alimentos, Universidad Nacional Autónoma de México, 2012.
- OTA-BP-E-102** Biopolymers: Making Materials Nature's Way-Background Paper, Washington, DC : U.S. Congress, Office of Technology Assessment, Government Printing Office, 1993. - Vols. OTA-BP-E-102.
- Pacheco L. N.A.** Extracción biotecnológica de quitina para la producción de quitosanos: caracterización y aplicación, Tesis de Doctorado en Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana., 2010.
- Pacheco, N.; Garnica-González, M.; Ramírez-Hernández, J.Y.; Flores-Albino, B.; Gimeno, M.; Bárzana, E.; Shirai, K.,** Effect of temperature on chitin and astaxanthin recoveries from shrimp waste using lactic acid bacteria, Bioresource Technology, 2009. - Vol. 100.
- Park S.Y. and Marsh K.S., Rhim, J.W.** Characteristics of Different Molecular Weight Chitosan Films Affected by the Type of Organic Solvents, Journal of food Science. Food Engineering and Physical Properties, 2002. - 1 : Vol. 67.
- Pillai C. K. S., Paul W. and Sharma C. P.** Chitin and chitosan polymers : chemistry, solubility and fiber formation, Progress in polymer science, 2009. - Vol. 34.
- Plascencia Jatomea M.** Estudio de la actividad antifúngica del quitosano en solución y en películas, Tesis de Doctorado en Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, 2004.
- Ritthidej G., T. Phaechamud. and Koizumi T.** Moist heat treatment on physicochemical change of chitosan salt films, International Journal of Pharm, 2002. - 1-2 : Vol. 232.



- Robinson R.K** Encyclopedia of Food Microbiology [*L. monocytogenes*]. -U.S.A. : Elsevier, 1999.
- Rooney M.L.** Active food packaging, London : Blackie Academic & Professional, 1995. - Vols. 1 ed. 74-107pp.
- Saxer S., Miescher S. and Lacroix C.** Characterization of the microflora of industrial Mexican cheeses produced without added chemical preservatives, LWT-Food Science and Technology, 2013. - Vol. 53.
- Shirai K. and Guerrero I., Hall, G.M.** Quitina: ocurrencia, propiedades y aplicaciones , Ciencia, 1996. - 4 : Vol. 47.
- Sperling L.H.** Introduction to Physical Polymer Science, Canadá : Jhon Wiley & Sons, 2006. - Vol. 3ra ed.
- Srinivasa P.C., Ramesh M.N. and Tharanathan R.N.** Effect of plasticizers and fatty acids on mechanical and permeability characteristics of chitosan films, Food Hydrocolloids, 2007. - Vol. 21.
- Steinbüchel A.** Polysaccharides and Polyamides in the Food Industry, Alemania : Wiley-VCH, 2005.
- Su, J.F.; Huang, Z.; Yuan, X.Y.; Wang, X.Y.; Li, M.,** Structure and properties of carboxymethyl cellulose/soy protein isolate blend edible films crosslinked by Maillard reactions, Carbohydrate Polymers, 2010. - Vol. 79.
- Trejo V., Aragón N. and Miranda P.** Estimación de la permeabilidad al vapor de agua en películas a base de quitosán, Journal of the Mexican Chemical Society, 2001. - 001 : Vol. 45.
- Villanueva Valencia M.** Frecuencia de *Brucella* spp, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157 en quesos frescos sin pasteurizar colectados en la zona conurbada Veracruz-Boca del Río, Tesis de Maestría en Ciencia animal, Universidad Veracruzana, 2010.
- Villegas A.** Los quesos Mexicanos, México : CIESTAAM, 1993.



ANEXOS

1. Caracterización de quitosano.

1.1 Espectro de RMN de los quitosanos obtenidos.

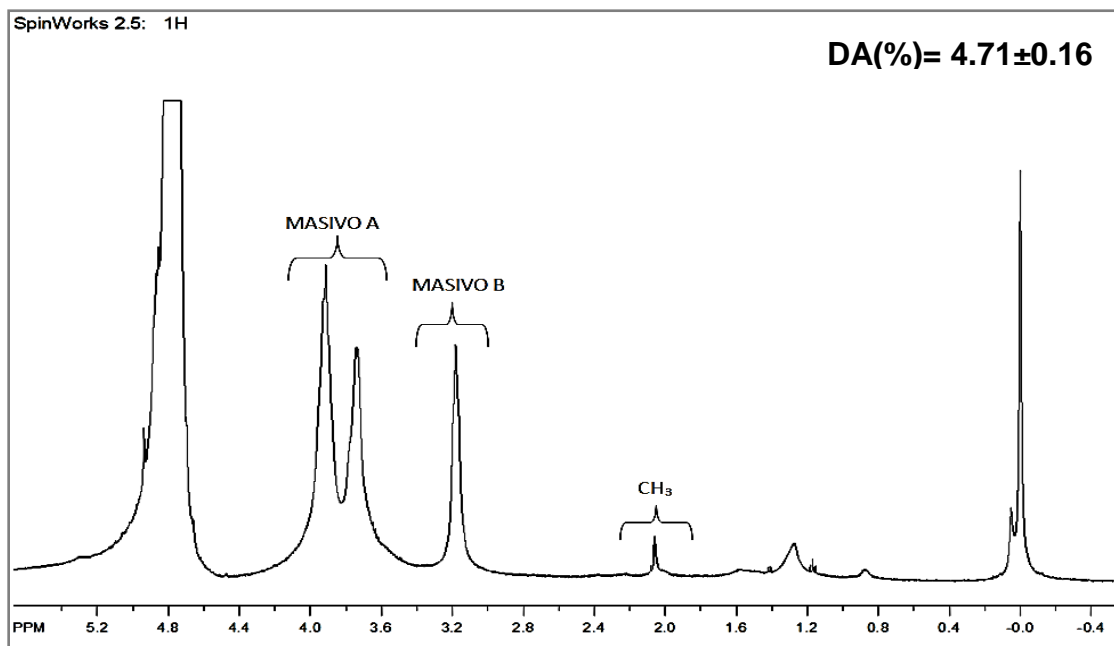


Fig. 29 Espectro de H-RMN de quitosano (lote 1) a partir de quitina extraída biológicamente de desperdicio de camarón.

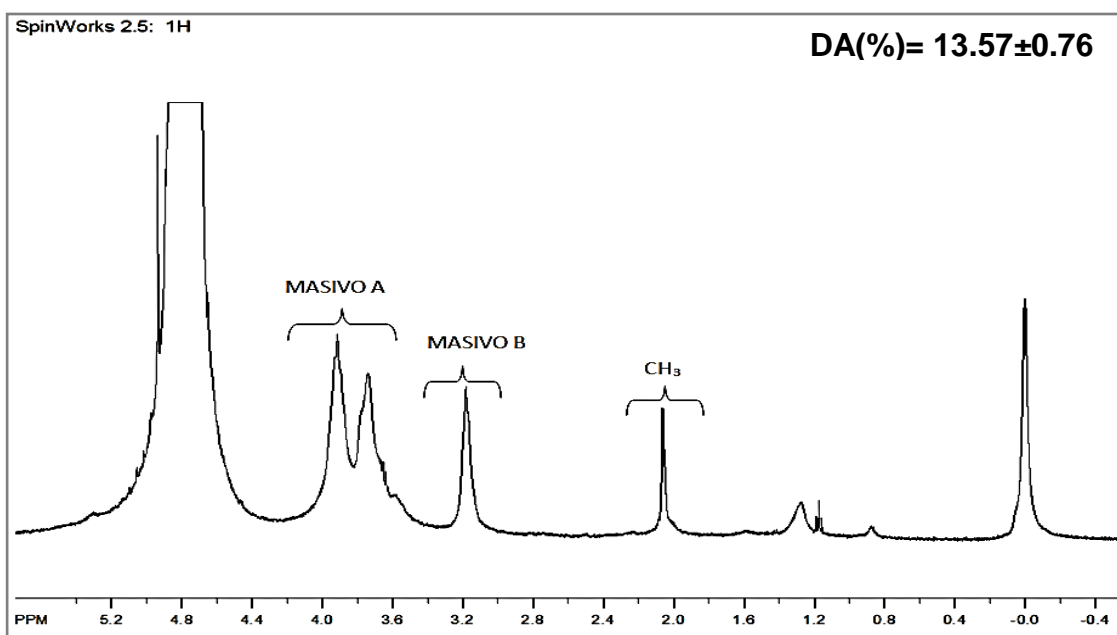


Fig. 30 Espectro de H-RMN de quitosano (lote 2) a partir de quitina extraída biológicamente de desperdicio de camarón.

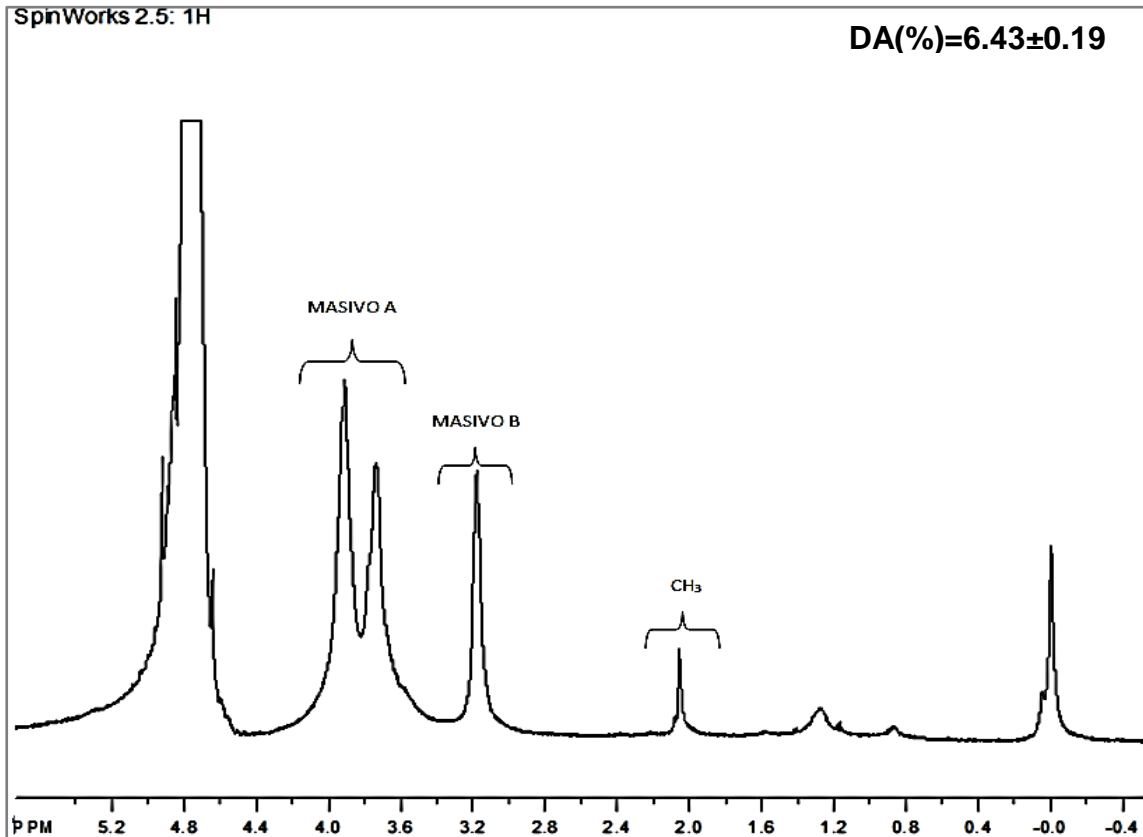


Fig. 31 Espectro de H-RMN de quitosano (lote 3) a partir de quitina extraída biológicamente de desperdicio de camarón.

2. Análisis estadístico de varianza (ANOVA) y prueba de comparación de medias.

ETAPA II. Obtención, caracterización y evaluación como envase activo en queso ranchero de las películas Q,QAL,QC,QH.

2.1 Peso de las películas

2.1.1 ANOVA

Variable	G.L	S.C	C.M	F(calculada)	Nivel Probabilidad	Power ($\alpha=0.05$)
A: TRATAMIENTO	3	10.94576	3.648587	6373.21	0.000000*	1.000000
Error	36	2.060959E-02	5.724885E-04			
Total (Adjusted)	39	10.96637				
Total	40					

* Term significant at alpha \leq 0.05

**2.1.2 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer.**

Tratamiento	Repeticiones	Media	Diferencia entre grupos
1: Q	10	0.50374	2, 3, 4
2: QAL	10	1.20780	1, 3, 4
3: QC	10	1.30856	1, 2, 4
4: QH	10	1.97970	1, 2, 3

2.2 Espesor de las películas**2.2.1 ANOVA**

Variables	G.L	S.C	C.M	F (calculada)	Nivel Probabilidad	Power ($\alpha=0.05$)
A: TRATAMIENTO	3	8.323129E-02	2.774376E -02	697.27	0.000000*	1.000000
Error	36	1.432413E-03	3.978925E-05			
Total (Adjusted)	39	0.0846637				
Total	40					

* Term significant at alpha = 0.05

2.2.2 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer.

Tratamientos	Repeticiones	Media	Diferencia entre Grupos
1:Q	10	0.06094	2, 3, 4
2:QAL	10	0.09574	1, 4
3:QC	10	0.10041	1, 4
4:QH	10	0.18498	1, 2, 3

2.3 PVA de las películas**2.3.1 ANOVA gradiente 22/75**

Variable	G.L	S.C	C.M	F (calculada)	Nivel probabilidad	Power ($\alpha=0.05$)
A: TRATAMIENTO	3	2.195329E-06	7.317765E-07	7.78	0.009320*	0.896536
Error	8	7.525147E-07	9.406434E-08			
Total (Adjusted)	11	2.947844E-06				
Total	12					

* Term significant at alpha = 0.05

**2.3.2 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer.**

Tratamiento	Repeticiones	Media	Diferencia entre grupos
3: QC	3	5.9387E-04	4,2
1:Q	3	6.955433E-04	2
4:QH	3	1.46115E-03	3
2:QAL	3	1.530283E-03	3,1

2.3.3 ANOVA gradiente 75/22

Variable	G.L	S.C	C.M	F (calculada)	Nivel Prob	Power ($\alpha=0.05$)
A: TRATAMIENTO	3	1.006278E-05	3.354261E-06	5.39	0.025301*	0.754420
Error	8	4.97788E-06	6.222349E-07			
Total (Adjusted)	11	1.504066E-05				
Total	12					

* Term significant at alpha = 0.05

2.3.4 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer.

Tratamiento	Repeticiones	Media	Diferencia entre Grupos
3: QC	3	6.187867E-04	4
1: Q	3	9.049233E-04	4
2: QAL	3	1.620843E-03	
4: QH	3	2.987743E-03	3, 1

Pérdida de peso de los quesos**2.4.1 ANOVA**

Variable	G.L	S.C	C.M	F (calculada)	Nivel Prob	Power ($\alpha=0.05$)
A: TIEMPO	2	160.2742	80.13712	16.00	0.000191*	0.997174
B: TRATAMIENTOS	4	77.67377	19.41844	3.88	0.023455*	0.777173
AB	8	190.2917	23.78646	4.75	0.004648*	0.956706
Error	15	75.14393	5.009595			
Total (Adjusted)	29	503.3836				
Total	30					

* Term significant at alpha = 0.05

**2.4.2 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer**

Tratamiento	Repeticiones	Media	Diferencia entre Grupos
1: Control	6	37.49637	5
3: QAL	6	38.55007	
2: Q	6	38.66787	
6: QH	6	41.25191	
5: QC	6	41.56573	1

2.4 Humedad de los quesos**2.5.1 ANOVA**

Variable	G.L	S.C	C.M	F (calc)	Nivel Prob	Power ($\alpha=0.05$)
A: TRATAMIENTO	4	5783.455	1445.864	108.33	0.000000*	1.000000
B: TIEMPO	2	26557.13	13278.56	994.85	0.000000*	1.000000
AB	8	7688.913	961.1141	72.01	0.000000*	1.000000
Error	75	1001.049	13.34731			
Total (Adjusted)	89	41030.54				
Total	90					

* Term significant at alpha = 0.05

2.5.1 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer

Tratamiento	Repeticiones	Media	Diferencia entre Grupos
3: QAL	18	32.85347	6, 5, 1, 2
6: QH	18	47.37928	3, 1, 2
5: QC	18	50.68776	3, 1, 2
1: Control	18	54.27232	3, 6, 5
2: Q	18	54.70347	3, 6, 5

2.5 pH de los quesos**2.6.1 ANOVA**

Variable	G.L	S.C	C.M	F (calc)	Nivel Prob	Power ($\alpha=0.05$)
A: TRATAMIENTO	4	12.57243	3.143107	127.36	0.000000*	1.000000
B: TIEMPO	2	1.903127	0.9515634	38.56	0.000000*	1.000000
AB	8	7.089773	0.8862216	35.91	0.000000*	1.000000
S	75	1.850883	2.467844E-02			
Total (Adjusted)	89	23.41621				
Total	90					

* Term significant at alpha = 0.05

**2.6.2 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer**

Tratamiento	Repeticiones	Media	Diferencia entre grupos
5: QC	18	5.162222	3, 1, 2
6: QH	18	5.235556	3, 1, 2
3: QAL	18	5.581666	5, 6, 1, 2
1: Control	18	5.978889	5, 6, 3
2: Q	18	6.08	5, 6, 3

2.6 Acidez total titulable (ATT) de los quesos**2.7.1 ANOVA**

Variable	G.L	S.C	C.M	F (calc)	Nivel Prob	Power ($\alpha=0.05$)
A: TRATAMIENTO	4	34.88463	8.721158	70.26	0.000000*	1.000000
B: TIEMPO	2	29.98057	14.99028	120.77	0.000000*	1.000000
AB	8	20.09238	2.511548	20.23	0.000000*	1.000000
Error	75	9.308927	0.124119			
Total (Adjusted)	89	94.26651				
Total	90					

* Term significant at alpha = 0.05

2.7.2 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer

Tratamientos	Repeticiones	Media	Diferencia entre Grupos
2: Q	18	0.4871	3, 6, 5
1: Control	18	0.5361944	3, 6, 5
3: QAL	18	1.212094	2, 1, 6, 5
6: QH	18	1.861567	2, 1, 3
5: QC	18	1.942744	2, 1, 3



2.7 Cuenta en placa de mesófilos aerobios en queso

2.8.1 ANOVA

Variable	G.L	S.C	C.M	F (calc)	Nivel Prob	Power ($\alpha=0.05$)
A: TRATAMIENTO	4	32.99985	8.249962	59.46	0.000000*	1.000000
B: TIEMPO	2	3.115801E-02	0.015579	0.11	0.894543	0.064166
AB	8	22.51786	2.814733	20.29	0.000001*	1.000000
Error	15	2.081364	0.1387576			
Total (Adjusted)	29	57.63023				
Total	30					

* Term significant at alpha = 0.05

2.8.2 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer

Tratamientos	Repeticiones	Medias	Diferencia entre Grupos
3: QAL	6	7.8353	6, 5, 2, 1
6: QH	6	9.07545	3, 5, 2, 1
5: QC	6	10.03513	3, 6
2: Q	6	10.46717	3, 6
1: Control	6	10.6822	3, 6

2.8 Cuenta en placa de hongos y levaduras en queso

2.9.1 ANOVA

Variable	G.L	S.C	C.M	F calc	Nivel Prob	Power ($\alpha=0.05$)
A: TRATAMIENTO	4	15.52165	3.880414	8.52	0.000854*	0.988225
B: TIEMPO	2	6.286572	3.143286	6.90	0.007494*	0.859612
AB	8	14.98033	1.872541	4.11	0.008912*	0.921912
Error	15	6.830801	0.4553867			
Total (Adjusted)	29	43.61936				
Total	30					

* Term significant at alpha = 0.05

**2.9.2 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer**

Tratamientos	Repeticiones	Media	Diferencia entre Grupos
3: QAL	6	5.530917	2, 1
6: QH	6	5.9544	1
5: QC	6	6.574433	
2: Q	6	7.058967	3
1: Control	6	7.517783	3, 6

ETAPA III. Modificación de la PVA, caracterización, evaluación como envase activo y efecto inhibidor contra *L. monocytogenes* en queso ranchero inoculado.

2.10 PVA de las películas de QAL sin sorbitol(QALss) y QAL con sorbitol (QALcs)**2.10.1 ANOVA**

Variable	G.L	S.C	C.M	F (calc)	Nivel prob	Power ($\alpha=0.05$)
A: TRATAMIENTO	1	4.88E-07	4.88E-07	45.61	0.021228*	0.897197
Error	2	2.14E-08	1.07E-08			
Total (Adjusted)	3	5.09E-07				
Total	4					

* Term significant at alpha = 0.05

2.10.2 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer

Tratamientos	Repeticiones	Media	Diferencia entre Grupos
1: QALss	2	1.13E-03	2
2: QALcs	2	1.83E-03	1



2.11 Peso de las películas de QAL modificadas

2.11.1 ANOVA

Variables	G.L	S.C	C.M	F (calc)	Nivel Prob	Power ($\alpha=0.05$)
A: TRATAMIENTO	7	2.598675	0.3712394	343.14	0.000000*	1.000000
Error	40	4.327597E-02	1.081899E-03			
Total (Adjusted)	47	2.641952				
Total	48					

* Term significant at alpha = 0.05

2.11.2 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer

Tratamientos	Repeticiones	Media	Diferencia entre grupos
6: QAL/0.38%SPI	6	0.8311	7, 8, 2, 1, 3
5: QAL/0.25%SPI	6	0.8618833	2, 1, 3
4: QAL/0.14%SPI	6	0.8674167	2, 1, 3
7: QAL/0.50%SPI	6	0.90455	6, 2, 1, 3
8: QAL/0.75%SPI	6	0.9139667	6, 2, 1, 3
2: QAL/2%RS	6	1.087667	6, 5, 4, 7, 8, 1, 3
1: QAL	6	1.202583	6, 5, 4, 7, 8, 2, 3
3: QAL/4%RS	6	1.5559	6, 5, 4, 7, 8, 2, 1

2.12 Espesor de las películas de QAL modificadas

2.12.1 ANOVA

Variable	G.L	S.C	C.M	F (calc)	Nivel Prob	Power ($\alpha=0.05$)
A: TRATAMIENTO	7	2.456325E-02	3.509036E-03	78.21	0.000000*	1.000000
Error	40	1.794667E-03	4.486667E-05			
Total (Adjusted)	47	2.635792E-02				
Total	48					

* Term significant at alpha = 0.05

2.12.2 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer

Variable	Repeticiones	Media	Diferencia entre grupos
5: QAL/0.25%SPI	6	0.0635	8, 2, 1, 3
7: QAL/0.50%SPI	6	6.533334E-02	8, 2, 1, 3
6: QAL/0.38%SPI	6	0.071	2, 1, 3
4: QAL/0.14%SPI	6	7.166667E-02	1, 3
8: QAL/0.75%SPI	6	0.082	5, 7, 1, 3
2: QAL/2%RS	6	8.383334E-02	5, 7, 6, 1, 3
1: QAL	6	9.716666E-02	5, 7, 6, 4, 8, 2, 3
3: QAL/4%RS	6	0.1371667	5, 7, 6, 4, 8, 2, 1



2.13 PVA de las películas de QAL modificadas

2.13.1 ANOVA

Variable	G.L	S.C	C.M	F (calc)	Nivel Prob	Power ($\alpha=0.05$)
A: TRATAMIENTOS	7	5.057296E-06	7.224708E-07	15.94	0.000004*	1.000000
Error	16	7.250186E-07	4.531366E-08			
Total (Adjusted)	23	5.782314E-06				
Total	24					

* Term significant at alpha = 0.05

2.13.2 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer

Tratamientos	Repeticiones	Media	Diferencia entre grupos
4: QAL/0.14%SPI	3	8.42878E-04	8, 2
5: QAL/0.25%SPI	3	8.712834E-04	8, 2
6: QAL/0.38%SPI	3	9.256834E-04	8, 2
3: QAL/4%RS	3	1.133098E-03	2
7: QAL/0.50%SPI	3	1.183157E-03	2
1: QAL	3	1.324839E-03	2
8: QAL/0.75%SPI	3	1.530281E-03	4, 5, 6, 2
2: QAL/2%RS	3	2.33245E-03	4, 5, 6, 3, 7, 1, 8

2.14 Humedad en los quesos no inoculados

2.14.1 ANOVA

Variable	G.L	S.C	C.M	F (calc)	Nivel Prob	Power ($\alpha=0.05$)
A: TIEMPO	2	257.0262	128.5131	15.23	0.000135*	0.996942
B: TRATAMIENTOS	2	194.1475	97.07375	11.50	0.000605*	0.982038
AB	4	192.8375	48.20937	5.71	0.003775*	0.936765
Error	18	151.8769	8.437604			
Total (Adjusted)	26	795.888				
Total	27					

* Term significant at alpha = 0.05

2.14.2 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer

Tratamiento	Repeticiones	Media	Diferencia entre grupos
3: QAL/SPI	9	35.77555	2
1: Control	9	37.76333	2
2: LDPE	9	42.19111	3, 1



2.15 Humedad en los quesos inoculados

2.15.1 ANOVA

Variable	G.L	S.C	C.M	F (calc)	Nivel Prob	Power ($\alpha=0.05$)
A: TIEMPO	2	82.33968	41.16984	6.36	0.008159*	0.842349
B: TRATAMIENTOS	2	199.3697	99.68483	15.39	0.000127*	0.997173
AB	4	91.95203	22.98801	3.55	0.026509*	0.760023
Error	18	116.5883	6.477129			
Total (Adjusted)	26	490.2497				
Total	27					

* Term significant at alpha = 0.05

2.15.2 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer

Tratamiento	Repeticiones	Media	Diferencia entre grupos
3: QAL/SPI	9	34.41444	2
1: Control	9	35.06	2
2: LDPE	9	40.47445	3, 1

2.16 Pérdida de peso en los quesos no inoculados

2.16.1 ANOVA

Variable	G.L	S.C	C.M	F (calc)	Nivel Prob	Power ($\alpha=0.05$)
A: TIEMPO	2	929.8755	464.9378	117.57	0.000000*	1.000000
B: TRATAMIENTO	2	867.6422	433.8211	109.70	0.000000*	1.000000
AB	4	508.5422	127.1356	32.15	0.000000*	1.000000
Error	18	71.18	3.954444			
Total (Adjusted)	26	2377.24				
Total	27					

* Term significant at alpha = 0.05

2.16.2 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer

Tratamientos	Repeticiones	Media	Diferencia entre grupos
2: LDPE	9	0.4333333	1, 3
1: Control	9	8.744445	2, 3
3: QAL/SPI	9	14.22222	2, 1



2.17 Pérdida de peso en los quesos inoculados

2.17.1 ANOVA

Variable	G.L	S.C	C.M	F (calc)	Nivel Prob	Power ($\alpha=0.05$)
A: TIEMPO	2	1109.882	554.9411	64.09	0.000000*	1.000000
B: TRATAMIENTO	2	1031.162	515.5811	59.55	0.000000*	1.000000
AB	4	579.6689	144.9172	16.74	0.000007*	0.999993
Error	18	155.8533	8.658519			
Total (Adjusted)	26	2876.567				
Total	27					

* Term significant at alpha = 0.05

2.17.2 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer

Tratamientos	Repeticiones	Media	Diferencia entre grupos
2: LDPE	9	0.3111111	1, 3
1:Control	9	10.72222	2, 3
3: QAL/SPI	9	15.03333	2, 1

2.18 pH de los quesos no inoculados

2.18.1 ANOVA

Variables	G.L	S.C	C.M	F (calc)	Nivel Prob	Power ($\alpha=0.05$)
A: TIEMPO	2	5.990808	2.995404	267.89	0.000000*	1.000000
B: TRATAMIENTOS	2	0.8328297	0.4164148	37.24	0.000000*	1.000000
AB	4	1.144859	0.2862148	25.60	0.000000*	1.000000
Error	18	0.2012667	1.118148E-02			
Total (Adjusted)	26	8.169763				
Total	27					

* Term significant at alpha = 0.05

2.18.2 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer

Tratamientos	Repeticiones	Media	Diferencia entre grupos
3: QAL/SPI	9	5.564445	2, 1
2: LDPE	9	5.862222	3
1: Control	9	5.982222	3



2.19 Acidez total titulable de los quesos no inoculados

2.19.1 ANOVA

Variable	G.L	S.C	C.M	F (calc)	Nivel Prob	Power ($\alpha=0.05$)
A: TIEMPO	2	3.124718	1.562359	81.15	0.000000*	1.000000
B: TRATAMIENTOS	2	1.146674	0.573337	29.78	0.000002*	0.999999
AB	4	0.6548815	0.1637204	8.50	0.000490*	0.991608
Error	18	0.3465333	1.925185E-02			
Total (Adjusted)	26	5.272808				
Total	27					

* Term significant at alpha = 0.05

2.19.2 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer

Variable	Repeticiones	Media	Diferencia entre grupos
1:Control	9	0.5922222	3
2: LDPE	9	0.7077778	3
3: QAL/SPI	9	1.075556	1, 2

2.20 Acidez total titulable en los quesos inoculados

2.20.1 ANOVA

Variable	G.L	S.C	C.M	F (calc)	Nivel Prob	Power ($\alpha=0.05$)
A: TRATAMIENTO	2	0.266163	0.1330815	4.15	0.033011*	0.655484
B: TIEMPO	2	2.453785	1.226893	38.23	0.000000*	1.000000
AB	4	0.410837	0.1027093	3.20	0.037666*	0.710287
Error	18	0.5776	3.208889E-02			
Total (Adjusted)	26	3.708385				
Total	27					

* Term significant at alpha = 0.05

2.20.2 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer

Tratamientos	Repeticiones	Media	Diferencia entre grupos
2: LDPE	9	0.83	1
3: QAL/SPI	9	1.023333	
1: Control	9	1.054444	2



2.21 Cuenta en placa de *L.monocytogenes*

2.21.1 ANOVA

Variable	G.L	S.C	C.M	F (calc)	Nivel Prob	Power ($\alpha=0.05$)
A: TRATAMIENTO	2	14.37202	7.186011	47.26	0.000213*	0.999999
Error	6	0.9123333	0.1520556			
Total (Adjusted)	8	15.28436				
Total	9					

* Term significant at alpha = 0.05

2.21.2 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer

Tratamientos	Repeticiones	Media	Diferencia entre los grupos
3: QAL/SPI	3	3.213333	2, 1
2: LDPE	3	5.733333	3
1: Control	3	6.03	3