



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFEECTO DE LA ADICIÓN EN JUGOS DE
TORONJA DE UNA MEZCLA DE POLÍMEROS
DE QUITINA Y QUITOSANA OBTENIDA A PARTIR
DE RESIDUOS DE CAMARÓN**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

VIVIANA JOSÉ GONZÁLEZ



México, D.F.

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente	María del Carmen Durán Domínguez de Bazúa
Vocal	Lucía Cornejo Barrera
Secretario	Landy Irene Ramírez Burgos
1er. Suplente	Marisela Bernal González
2do. Suplente	Rolando Salvador García Gómez

Sitio donde se desarrolló el tema:

LABORATORIOS 301, 302 Y 303 DE INGENIERÍA QUÍMICA AMBIENTAL Y DE QUÍMICA AMBIENTAL (LIQAYQA). DEL CONJUNTO E DE LA FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

Asesor del tema:

Dra.-Ing. María del Carmen Durán Domínguez de Bazúa

Supervisor Técnico:

M. en C. Rolando Salvador García Gómez

Sustentante:

Viviana José González

ÍNDICE

	Página
Listado de tablas	i
Listado de figuras	iii
Listado de gráficos	iv
Abreviaturas	v
Glosario	vii
Resumen	x
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Problemática	1
1.2. Justificación del tema	3
1.3. Objetivos	4
1.3.1. Objetivo general	4
1.3.2. Objetivos específicos	4
CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO	5
2.1. Quitina	5
2.2. Quitosana	6
2.2.1. Actividad bactericida de la quitosana	7
2.2.2. Aplicaciones de la quitosana en alimentos	8
2.2.3. Regulaciones en México y en otros países de la respecto a su aprobación en alimentos	10
2.2.5. Toxicología de la quitosana	12
2.2.6. Efectos adversos en consumo humano	12
2.2.7. Reacciones adversas en consumo humano	13

	Página
2.3. Principales características del jugo de toronja	13
2.3.1. Factores que intervienen en el deterioro de jugos de fruta	15
2.3.2. Vida útil del jugo de toronja	17
2.4. Métodos de conservación en general del jugo de fruta en general	17
2.4.1. Tratamientos térmicos empleados para la conservación de bebidas	17
2.4.1.1. Proceso de pasteurización aplicado en bebidas	18
2.4.2. Tratamientos no térmicos empleados como métodos de conservación en alimentos	19
2.4.2.1. Campos eléctricos pulsantes de alta intensidad (CEPAI)	19
2.4.2.2. Irradiación de luz ultravioleta (UV)	20
2.4.2.3. Alta presión hidrostática (HHP)	22
2.4.3. Adición de aditivos naturales y químicos empleados para la conservación de alimentos	23
2.4.3.1. Conservadores químicos	23
2.4.3.2. Conservadores naturales	24
CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	26
3.1. Extracción de la mezcla de polímeros naturales quitina-quitosana (Q-Qn) (Ortega-Granados, 2011)	26
3.2. Elaboración de polímeros de quitosana Sigma Aldrich (85% desacetilación) empleados como controles (Q-SA1 Y Q-SA2)	29
3.3. Medición de parámetros fisicoquímicos en el jugo de toronja	30
3.3.1. Determinación de pH	30

	Página
3.3.2. Determinación de acidez titulable	30
3.3.3. Determinación de grados Brix	31
3.3.4. Determinación de vitamina C	31
3.4. Parámetros microbiológicos empleados para evaluar la calidad del jugo de toronja	32
3.4.1. Determinación de mesófilos aerobios	32
3.5. Evaluación sensorial aplicada en los jugo de toronja	33
3.6. Análisis estadísticos realizados durante el experimento	35
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
4.1. Parámetros fisicoquímicos	36
4.1.1. Acidez	36
4.1.2. Valor de pH	39
4.1.3. Valores de °Bx	41
4.1.4. Vitamina C	42
4.2. Pruebas microbiológicas	46
4.2.1. Mesófilos aerobios	46
4.3. Pruebas sensoriales	47
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	50
5.1. Conclusiones	50
5.2. Recomendaciones	51
ANEXO I. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS	52
ANEXO II. PRUEBAS TRIANGULARES	53
ANEXO III. RESULTADOS DE PRUEBAS ESTADÍSTICAS	59

	Página
ANEXO V. TRATAMIENTO DE RESIDUOS	65
Bibliografía	67

Nota:

Esta tesis usa el punto decimal, de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana respectiva (DOF, 2009)

LISTADO DE TABLAS

	Página
Tabla 2.1. Composición química representativa de diversos tipos de residuos de la industria pesquera (Vásquez y Vidal, 2011)	5
Tabla 2.2. Aplicaciones de la quitosana en la industria alimentaria	9
Tabla 2.3. Regulaciones aprobatorias de quitina y quitosana (Castañeda y col., 1997)	11
Tabla 2.4. Especificaciones fisicoquímicas del jugo de toronja (DOF, 1968)	14
Tabla 2.5. Especificaciones sensoriales del jugo de toronja (DOF, 1968)	14
Tabla 2.6. Factores intrínsecos y extrínsecos en los alimentos (Torres, 2011)	15
Tabla 2.7. Ventajas y desventajas del tratamiento por alta presión hidrostática en alimentos (Téllez-Luis y col., 2001)	22
Tabla 3.1. Descripción de los tratamientos dados a los diferentes lotes de jugos de toronja	27
Tabla 4.1. Valores iniciales y finales de acidez en jugos de toronja	37
Tabla 4.2. Valores iniciales y finales de pH en jugos de toronja	40
Tabla 4.3. Valores iniciales y finales de vitamina C en jugos de toronja	44
Tabla 4.4. Resultados de pruebas triangulares entre diferentes lotes de jugo de toronja	48
Tabla AI. Ejemplo para el cálculo de resultados de cuenta en placa, utilizado ensayos por duplicado (Rango de sensibilidad: 25 a 250 colonias) (Camacho y col., 2009)	52
Tabla AII. Valores mínimos de juicios correctos para establecer diferencias significativas en diferentes niveles de probabilidad para pruebas triangulares ($p=1/2$) (Stone y Sidel, 2004)	53

	Página
Tabla BII. Valores mínimos de juicios correctos para establecer diferencias significativas en diferentes niveles de probabilidad para pruebas triangulares ($p=1/2$) (Stone y Sidel, 2004)	54
Tabla CII. Diseño experimental de la prueba triangular Blanco vs Q-Qn para 1g/L	56
Tabla DII. Diseño experimental de la pruebas triangular Blanco vs Q-Qn para 2g/L	57
Tabla EII. Diseño experimental de la prueba triangular Q-Qn para 2g/L vs Q-SA para 2g/L	58
Tabla AIII. Análisis de varianza (ANOVA) del parámetro de acidez en jugos de toronja	59
Tabla BIII. Pruebas de rangos múltiples para el parámetro de acidez por tratamiento	59
Tabla CIII. Pruebas de rangos múltiples para el parámetro de acidez por tratamiento	60
Tabla DIII. Análisis de varianza (ANOVA) del parámetro de pH en jugos de toronja	61
Tabla EIII. Pruebas de rangos múltiples para pH por Tratamiento	61
Tabla FIII. Pruebas de rangos múltiple para pH por Tratamiento	62
Tabla GIII. Análisis de varianza (ANOVA) del parámetro de vitamina C en jugos de toronja	63
Tabla HIII. Pruebas de rangos múltiples para vitamina C por Tratamiento	63
Tabla JIII. Pruebas de rangos múltiples para vitamina C por Tratamiento	64

LISTADO DE FIGURAS

	Página
Figura 2.1. Molécula de quitina (Flores, 2008)	6
Figura 2.2. Molécula de celulosa (Flores 2008)	6
Figura 2.3. Estructuras de quitina y su producto de desacetilación, la quitosana (Monarul y col., 2011)	6
Figura 2.4. Esquema de una planta de tratamiento de pulsos eléctricos de alta intensidad de campo (Raventós, 2006)	20
Figura 2.5. Espectro de la luz (adaptada de Uvtechnics, 2013)	21
Figura 2.6. Estructura química del benzoato de sodio	24
Figura 3.1. Filtración en equipo Millipore	27
Figura 3.2. Homogenización de jugo de toronja con quitina- quitosana en diferentes concentraciones	27
Figura 3.3. Quitosana marca Sigma Aldrich (SA) empleada en la elaboración de lotes control de jugos de toronja	29
Figura 3.4a. Polímero de quitosana marca Sigma Aldrich (SA) antes de la completa disolución	30
Figura 3.4b. Polímero de quitosana marca Sigma Aldrich (SA) completamente homogeneizado	30
Figura 3.4c. Crecimiento de mesófilos aerobios en cajas de Petri	33
Figura 3.5. Lugar destinado para la evaluación sensorial de jugos de toronja	35
ANEXOS	
Figura All. Cuestionario empleado por los panelistas para las pruebas triangulares	55
Figura AIV. Tratamiento de residuos de Vitamina C	65

LISTADO DE GRÁFICOS

	Página
Gráfico 4.1. Comparación en el cambio de porcentaje de acidez total (g de ácido cítrico por cada 100g de jugo) en los diferentes lotes de jugo de toronja durante 14 días	36
Gráfico 4.2. Comparación de los tratamientos aplicados a jugos de toronja mediante una determinación de diferencia significativa entre los valores de acidez	38
Gráfico 4.3. Comparación en el cambio de pH en los diferentes lotes de jugo de toronja durante 14 días	39
Gráfico 4.4. Prueba de rangos múltiples para el parámetro de pH	41
Gráfico 4.5. Comparación en el cambio de vitamina C (mg ácido ascórbico/100mL de jugo) en los diferentes lotes de jugo de toronja durante 14 días	43
Gráfico 4.6. Prueba de rangos múltiples para el parámetro de vitamina C	45
Gráfico 4.7. Resultados de prueba microbiológica de mesófilos aerobios en jugos de toronja	46

ABREVIATURAS

°Bx	Grados Brix
°C	Grados Celsius
2,6-DI	2, 6 Diclorofenol indofenol
A	Volumen de la alícuota tomada para titular (10 mL) (Ec. 3.1b)
AA	Ácido ascórbico 2.0%
AAFCO	<i>Association of American Feed Control Officials</i>
AIJN	<i>Association of the Industry of Juices and Nectars and Vegetables of the European Union</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
B	Blanco
B	Promedio de volumen (mL) de 2,6-DI empleado en la titulación del blanco (Ec. 3.1b)
BP	Blanco pasteurizado
BS	Benzoato de sodio
CC	Cefalotórax y exoesqueleto de camarón
CEPAI	Campos eléctricos pulsantes de alta intensidad
DL ₅₀	Dosis letal media
E	Promedio del volumen (mL) de 2,6-DI empleados en la titulación del estándar (Ec. 3.1b)
EPA-US	<i>Environmental Protection Agency of the United States</i> (EEUU)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (EEUU)
FIFRA	<i>Federal Insecticide Fungicide and Rodenticide Act</i>
g	Gramo
GRAS	<i>Generally recognized as safe</i>
HHP	<i>High hydrostatic pressure</i>
kg	Kilogramo
L	Litro
MAC-141	Mezcla de disolventes con metanol-agua-calcio (relación molar 1:4:1)
meq _{ácido cítrico}	Miliequivalentes del ácido cítrico= 0.0064 g de ácido cítrico/mEq (Ec. 3.1 ^a)
M	Alícuota de muestra (10 mL) (Ec. 3.1b)
mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
mL	Volumen de la muestra (mililitros) (Ec. 3.1a)

MPa	Megapascal
nm	Nanómetro
NMX	Norma Mexicana (no obligatoria)
N_{NaOH}	Normalidad del NaOH (mEq/mL) (Ec. 3.1a)
NOM	Norma Oficial Mexicana (obligatoria)
P	Promedio de volumen (mL) de 2,6-DI empleados en la titulación de la muestra (Ec. 3.1b)
<i>PME</i>	<i>Pectin methyl stearase</i>
Q-Qn1	Mezclas de quitina-quitosana obtenidas experimentalmente en concentración de 1g/L
Q-Qn2	Mezclas de quitina-quitosana obtenidas experimentalmente en concentración de 2g/L
Q-SA1	Quitosana de la marca Sigma Aldrich en concentración de 1g/L
Q-SA2	Quitosana de la marca Sigma Aldrich en concentración de 2g/L
®	Marca registrada
SA	Sigma Aldrich
<i>TSCA</i>	<i>Toxic Substances Control Act</i>
UV	Luz Ultravioleta
V	Volumen final (mL) del aforo de la muestra (100mL) (Ec. 3.1b)
VC	mg ácido ascórbico/ 100mL de muestra (Ec. 3.1b)
V_{NaOH}	Volumen (mL) de NaOH gastado en la titulación de la muestra (Ec. 3.1 ^a)

GLOSARIO

Acetamida	La acetamida es la amida derivada del ácido acético. Su fórmula molecular o empírica es C_2H_5NO
Aditivo	Sustancia que sin constituir por sí misma un alimento ni poseer valor nutritivo se agrega intencionadamente a los alimentos con el objeto de facilitar o mejorar su proceso de elaboración, conservación, características organolépticas o uso
Antifúngica	Sustancia que tiene la capacidad de evitar el desarrollo de algunos tipos de hongos o incluso de provocar su muerte
Antimicrobiana	Sustancias químicas que en bajas concentraciones son capaces de inhibir e incluso de destruir microorganismos sin producir efectos tóxicos en el huésped
Biocida	Sustancias sintéticas o de origen natural o microorganismos que destruyen, neutralizan o impiden la acción de un organismo considerado nocivo para el hombre
Biocompatibilidad	Cualidad de un material de ser compatible con el entorno biológico, es decir, la capacidad del material para interactuar con los tejidos vivos, sin causar daño o muy pocas reacciones biológicas
Biodegradable	Compuesto o sustancia que puede ser degradado por acción biológica, como plantas, animales, microorganismos y hongos
Biopolímeros	Compuestos con alta masa molecular que pueden extraerse de una materia prima natural y pueden degradarse en el ambiente
°Bx	Los grados Brix miden la cantidad de sólidos solubles (glúcidos, ácidos, sales y demás compuestos solubles en agua) presentes en una sustancia expresados en porcentaje de sacarosa
Cefalotórax	Parte del cuerpo de los crustáceos y arácnidos que está formada por la unión de la cabeza y el tórax
Celulosa	La celulosa es un biopolímero compuesto únicamente de moléculas β -glucosa desde cientos hasta miles debido a que es un homopolisacárido. Estas moléculas se encuentran unidas mediante enlaces β -1,4-O-

	glucosídico. Su fórmula empírica es $(C_6H_{10}O_5)_n$.
Coadyuvante	Sustancia que no se consume como ingrediente alimentario, que se utiliza intencionadamente en la transformación de materias primas o de productos alimenticios para cumplir un objetivo tecnológico. Ejemplo: enzimas, agentes clarificantes y filtrantes, etc.
Condiciones extrínsecas	Se relacionan con el ambiente en donde se esté conservando el alimento (empaquete, temperatura de almacenamiento, porcentaje de humedad, etc.)
Condiciones intrínsecas	Son los relacionados propiamente con el alimento (composición, pH, presencia y disponibilidad de agua, etc.)
Desacetilación	Proceso de eliminación de grupos acetilo en la molécula de quitina con hidróxido de sodio y altas temperaturas ($>100^\circ C$)
Desmineralización	Por proceso de desmineralización o desionización se entiende la eliminación de las sales disueltas (iones catiónicos y aniónicos)
Desproteínización	Proceso de eliminación de proteínas que se realiza normalmente con disolventes orgánicos
DL ₅₀	Cantidad de material tóxico que como mínimo debe administrarse a un organismo para que produzca la muerte de al menos el 50% de ellos. Se expresa en mg de sustancia/kg de masa corporal del organismo
Electropermeabilización	Consiste en provocar un aumento significativo de la conductividad eléctrica y la permeabilidad de la membrana
Enzimas	Moléculas de naturaleza proteínica (generalmente proteínas globulares) que catalizan reacciones químicas. Ejemplos: amilasas, proteasas, glucanasas, lactasas, lipasas, pectinasas, etc.
Exoesqueleto	Tejido orgánico duro y rígido que recubre exteriormente el cuerpo de los artrópodos y otros invertebrados
Flavonoides	Son pigmentos naturales presentes en los vegetales, frutas plantas y protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes
Floculante	Es una sustancia química que aglutina sólidos en suspensión, provocando su precipitación
Glucosamina	La glucosamina ($C_6H_{13}NO_5$) es un amino monosacárido que se encuentra principalmente en el exoesqueleto de los artrópodos y en la pared celular de los hongos

<i>in vivo</i>	Latín: dentro de lo vivo. Se refiere a experimentación hecha dentro o en el tejido vivo de un organismo vivo
Lactoperoxidasa	Pertenece al grupo de enzimas de las peroxidasa, que junto con la catalasa y la peróxido dismutasa reducen el peróxido de hidrógeno gracias a una variedad de donantes de electrones
Lisosoma	Los lisosomas son orgánulos esféricos u ovalados que se localizan en el citoplasma celular
Nematodo	Se dice de los gusanos nematelmintos que tienen aparato digestivo, el cual consiste en un tubo recto que se extiende a lo largo del cuerpo, entre la boca y el ano
Pectinasas	Las enzimas pectinasas son un conjunto de enzimas que hidrolizan la pectina. Éstas presentan una extensa aplicación en la industria alimentaria, principalmente en la obtención y clarificación de jugos, vinos y cervezas
Pectinmetilesterasa	La pectinmetilesterasa (PME) es una enzima que produce la desmetilación de la pectina propia de la fruta, la cual se combina con calcio para formar una matriz calcio-pectina que refuerza la pared celular de la fruta
pH	Es el logaritmo negativo de la concentración de ion hidrógeno. Puede representarse simbólicamente como: $\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$
Poligalacturonasa	Es una de las enzimas más importantes asociadas a la degradación de la pared celular que cataliza la ruptura hidrolítica de enlaces glicosídicos α -D-(1,4) de residuos D-galactopiranosidurónicos no esterificados
Quelante	Se denominan quelantes a las sustancias que tienen la propiedad de fijar los iones metálicos de un determinado complejo molecular
Suplemento dietario	Es un producto alimenticio añadido a la dieta total que contiene al menos uno de los siguientes ingredientes: una vitamina, un mineral, un aminoácido o una combinación de cualquiera de estos ingredientes. Un suplemento dietario no puede ser presentado como alimento convencional ni dieta alternativa
Vida de anaquel	Periodo entre la manufactura y venta al menudeo de un producto alimenticio durante el cual el producto tiene una calidad satisfactoria

RESUMEN

Según la literatura, la quitosana ha mostrado eficacia como agente antimicrobiano empleándola como recubrimiento en frutas y vegetales. Existen estudios limitados donde se compruebe su efectividad en alimentos líquidos, como los jugos de frutas. El objetivo de este trabajo fue estudiar su efectividad como agente antimicrobiano y su efecto sobre algunos parámetros fisicoquímicos para jugos de toronja de una mezcla de polímeros (quitina-quitosana) extraída de residuos de crustáceos (exoesqueleto y cefalotórax de camarón) mediante una metodología amigable con el ambiente. La mezcla de quitina-quitosana fue adicionada en concentraciones de 1 y 2 g/L a jugos de toronja, empleando como control lotes de jugo adicionados de una solución al 2.0% de quitosana de la marca Sigma-Aldrich, SA, en las mismas concentraciones que las mezclas de quitina-quitosana. También se usaron como lotes control uno al que se le adicionó benzoato de sodio en una concentración de 0.05 g/L, otro lote que fue pasteurizado y un lote “blanco” sin ningún aditivo ni tratamiento térmico. La calidad de los diferentes lotes de jugo de toronja fue evaluada a lo largo del tiempo por 15 días mediante pruebas fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales. Los resultados demostraron que los jugos de toronja adicionados con la mezcla de quitina-quitosana (1 y 2 g/L) mostraron una disminución en la carga microbiana (mesófilos aerobios) comparados con el blanco. Como era esperado, el jugo pasteurizado fue el que mostró los mejores resultados microbiológicos con una menor carga microbiana comparada con todos los otros lotes, seguido del que tenía benzoato de sodio y después los de quitina-quitosana y la quitosana SA. Por último, se realizaron evaluaciones de parámetros fisicoquímicos donde se apreciaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en los parámetros de vitamina C y pH en los diferentes lotes de jugos. Los contenidos de grados Brix fueron los mismos para todos los jugos y se mantuvieron constantes durante el periodo de análisis. Así mismo, como resultado de una evaluación sensorial se pudo concluir que el uso de la mezcla de quitina-quitosana y la quitosana SA en concentraciones mayores a 1 g/L afecta al perfil sensorial del jugo de toronja aportando un sabor amargo en el producto.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1. Problemática

El principal objetivo de la industria de alimentos consiste en extender el período durante el cual los alimentos siguen siendo aptos para el consumo (Cavalcante y col., 2008). La calidad es un componente clave de los alimentos; sin embargo, mantener la calidad de diversos productos alimenticios durante su vida útil es sólo posible gracias a los conservadores químicos (P. ej., benzoatos, sorbatos, eritorbatos, etc.) y a los tratamientos térmicos aplicados a ellos.

Los métodos tradicionales de conservación causan ciertos efectos indeseables en los alimentos. El método más habitual para inactivar microorganismos indeseables en la industria de alimentos es la pasteurización; sin embargo, los tratamientos térmicos pueden alterar las propiedades organolépticas y provocar pérdidas de los componentes nutrimentales sensibles al calor como las vitaminas (Chacón, 2011) y pigmentos naturales como los carotenoides (Baduí y col., 2006).

Además, para inhibir, retardar o prevenir el desarrollo y/o proliferación de bacterias, levaduras y mohos se emplean sustancias antimicrobianas o antifúngicas como el ácido benzoico y sus sales de calcio, sodio y potasio en productos como jugos de frutas, mermeladas, dulces de frutas, entre otros (Eufic, 2004).

Debido a esto, la producción de alimentos se ha vuelto bastante compleja ya que los consumidores exigen cada vez más alimentos procesados naturales (sin adición de aditivos químicos como acidulantes, colorantes y saborizantes artificiales, conservadores, espumantes, etc.) con mejor calidad, mayor vida de anaquel, con alto valor nutritivo (vitaminas y minerales) y con propiedades

organolépticas similares a las del producto fresco, lo cual ha llevado a la investigación de nuevos ingredientes naturales y nuevas tecnologías emergentes sin el empleo de tratamientos térmicos (Cavalcante y col., 2008).

En los últimos años se han desarrollado nuevos métodos complementarios de conservación de alimentos a los que actualmente se dispone como la adición de agentes antimicrobianos provenientes de animales, plantas y microorganismos como lactoperoxidasas (leche), lisosomas (huevos), saponinas y flavonoides (hierbas y especias), quitosana¹ (caparazones de camarón), entre otros (Devlieghere y col., 2004a,b).

Dentro de las propuestas que se están realizando en cuanto al desarrollo de métodos complementarios de conservación se tiene a la quitosana, la cual es un biopolímero natural con importantes propiedades funcionales y a este hecho se suma el valor añadido de obtenerse a partir de la quitina, que se extrae principalmente de los exoesqueletos de crustáceos y que constituye un subproducto importante procedente de la industria pesquera (López, 2012), por lo que el empleo de los residuos de la industria camaronícola es una propuesta para minimizar el problema ambiental debido a que en el proceso de limpieza de los crustáceos como el camarón se genera una merma de aproximadamente 30 al 35% de la masa del producto, produciendo aproximadamente hasta 60 mil toneladas de desechos que generalmente son descargadas en aguas costeras, terrenos abandonados o en rellenos sanitarios, afectando la capacidad de autopurificación del agua y del ambiente (García, 1998).

Así mismo, esos polímeros presentan propiedades como biodegradabilidad, biocompatibilidad y no toxicidad y tienen aplicaciones importantes en los

¹ Las gomas tienen el sufijo -ana. En este caso, si esta goma se deriva de la quitina debería llamarse quitana pero, por seguir los términos anglófonos *chitin* y *chitosan*, en español se encuentra en la literatura como quitosán, quitosano y quitosan sin acento. En esta investigación se prefirió usar la palabra quitosana, más cercana a la nomenclatura de las gomas

alimentos, por ejemplo, en la formación de películas biodegradables, en la inmovilización de enzimas, en la preservación de alimentos frente al deterioro microbiano, en la clarificación y desacidificación de jugos de frutas y bebidas, en la elaboración de agentes espesantes y estabilizantes del color, entre otros (Giraud y col., 2010). Por ello, ante una gran demanda de productos que no contengan conservadores químicos y que en su formulación posean componentes como minerales y vitaminas, la actividad antimicrobiana de la quitosana frente a diversos grupos de organismos como bacterias, hongos y levaduras ha recibido una considerable atención en los últimos años (Caprile, 2005).

1.2. Justificación del tema

Para controlar el desarrollo microbiano, prevenir reacciones químicas y enzimáticas de degradación y sustituir el uso de conservadores químicos y tratamientos térmicos en jugos de frutas, se propuso el uso de la quitosana como aditivo natural extraído de residuos de la industria camaronícola (cefalotórax de camarón) mediante un procedimiento de química verde.

Existen algunos trabajos donde se han demostrado las propiedades antimicrobianas de la quitosana aplicada como aditivo en jugos de frutas, ya que está comprobado que los compuestos antimicrobianos naturales son efectivos para la inactivación de microorganismos, al mismo tiempo que no afectan la calidad sensorial y nutricional de los jugos de frutas en bajas concentraciones (Rupasinghe y Yu, 2012). Por otra parte, la quitosana ha demostrado tener un efecto clarificante (Rungsardthong y col., 2006), por lo cual el empleo en jugos frescos podría tener una ventaja al poder adicionarse como aditivo natural al no sólo presentar un efecto antimicrobiano.

Barry-Ryan y colaboradores (2009) probaron en una investigación el posible uso de la quitosana como conservador natural para extender la vida de anaquel de jugos frescos sugiriendo emplear concentraciones de quitosana por debajo de 1g/L para alargar la vida útil del producto y conservar el contenido de vitamina C y carotenoides por un mayor tiempo evitando el uso de un tratamiento térmico

(pasteurización) el cual reduce significativamente el contenido de ácido ascórbico. Así mismo los autores sugieren que se realice una mayor investigación en la parte microbiológica para probar la eficacia de la quitosana como un conservador natural en los jugos frescos, debido a que estos presentan una vida útil limitada.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la adición de una mezcla de biopolímeros de quitina-quitosana obtenida del cefalotórax del camarón en jugos de toronja, corroborando su comportamiento a través del tiempo mediante parámetros fisicoquímicos (pH, acidez, °Bx y vitamina C), microbiológicos (mesófilos aerobios) y sensoriales.

1.3.2. Objetivos específicos

- Evaluar el comportamiento de los diferentes lotes de jugos de toronja (fresco y pasteurizado, jugo fresco con adición de quitina-quitosana (1 y 2 g/L), lote control: jugo fresco con adición de quitosana Sigma Aldrich 2.0% (1 y 2 g/L), analizando parámetros fisicoquímicos como: acidez, pH, grados Brix y vitamina C.
- Valorar el efecto antimicrobiano de la adición de mezclas de quitina-quitosana extraídas del cefalotórax de camarón y quitosana comercial Sigma-Aldrich como lote control con el efecto producido por el conservador químico, benzoato de sodio, y el efecto de la pasteurización teniendo como comparación un blanco sin ningún tratamiento mediante la cuantificación de organismos mesófilos aerobios en jugos de toronja.
- Determinar si la adición de las mezclas de quitina-quitosana extraídas del cefalotórax de camarón y de la quitosana comercial Sigma-Aldrich afectan organolépticamente a los jugos de toronja.

CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO

2.1. Quitina

La quitina es el segundo biopolímero más abundante en la naturaleza después de la celulosa, y se encuentra en el exoesqueleto de crustáceos insectos y paredes celulares de hongos y de algunas algas (Vásquez y Vidal, 2011).

El exoesqueleto y cefalotórax de crustáceos es actualmente la principal fuente industrial de extracción de quitina, la cual se encuentra presente en diferentes porcentajes de acuerdo con el tipo de crustáceos (P. ej., calamares, langostas, camarones y cangrejos), variando con la especie biológica y la época del año en rangos muy amplios para los distintos constituyentes (Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Composición química representativa de diversos tipos de residuos de la industria pesquera (Vásquez y Vidal, 2011)

Fuente	Composición química			
	Proteína (%)	Ceniza (%)	Lípidos (%)	Quitina (%)
Langosta y langostinos	23.1	33.7	2.2	20.2
Camarón	58.0	24.2	1.4	16.4
Cangrejo	13.1	72.4	0.8	13.8
Calamar	55.3	0.9	0.6	43.2

La estructura química de la quitina poli-[β -(1-4)-2-acetamido-2-desoxi-D-glucopiranosas] (Figura 2.1), es estructuralmente similar a la celulosa (Flores, 2008). Solamente se diferencia químicamente de la celulosa (Figura 2.2) en que cada grupo OH-C-(2) se halla sustituido por un grupo de acetamida.

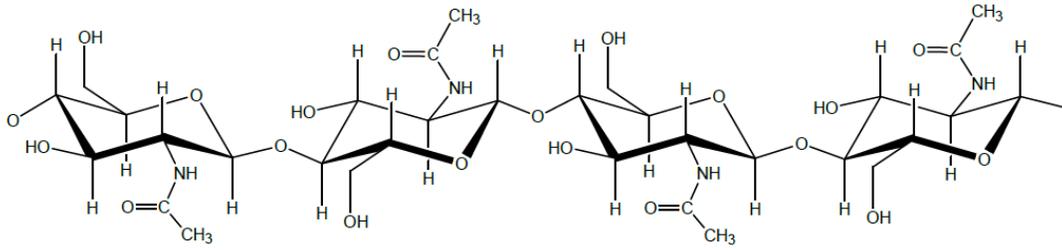


Figura 2.1. Molécula de quitina (Flores, 2008)

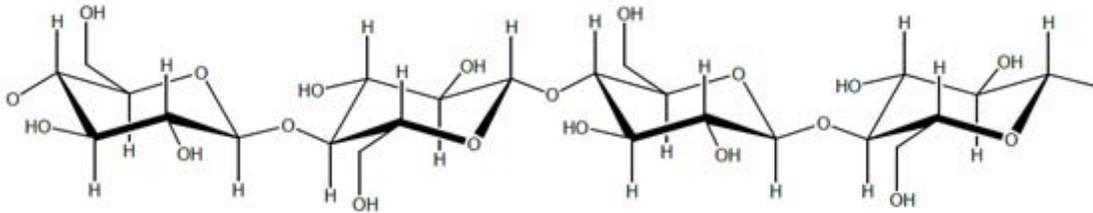


Figura 2.2. Molécula de celulosa (Flores 2008)

2.2. Quitosana

La quitosana es un biopolímero natural no tóxico producido mediante la desacetilación de la quitina (Figura 2.3).

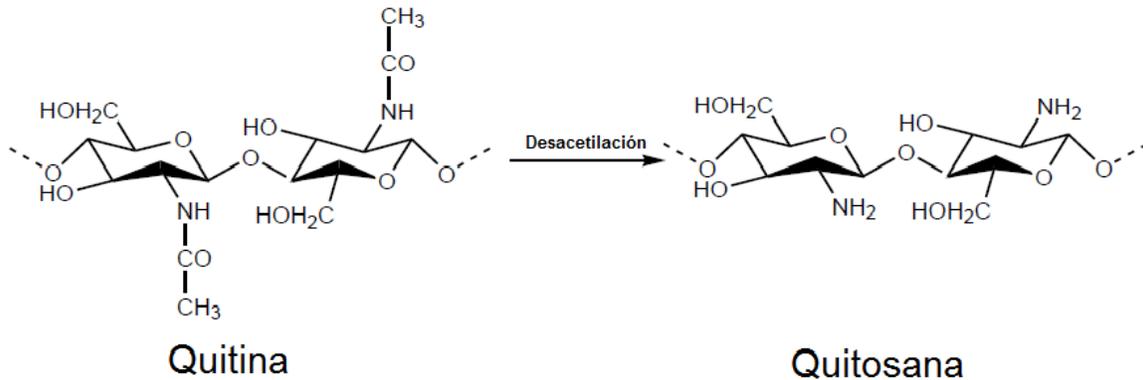


Figura 2.3. Estructuras de quitina y su producto de desacetilación, la quitosana (Monarul y col., 2011)

Esta reacción se produce en un medio alcalino muy concentrado y a temperaturas superiores a 60°C y consiste en la pérdida del resto del acetilo del grupo amido del carbono 2, mientras queda un grupo amino en esa posición. El producto de la

reacción se denomina quitosana, la cual posee una cadena más corta que la quitina (alrededor de 25 a 30 unidades menos de glucosamina). Su fórmula es beta (1-4)-2-amino-2-desoxi-D-glucosa (Vásquez y Vidal, 2011).

La quitosana, al igual que su compuesto predecesor (quitina), es insoluble en la mayoría de los solventes orgánicos y en agua, lo que presenta una gran desventaja para su aplicación como agente antimicrobiano.

Por otro lado presenta solubilidad en ácidos orgánicos tales como acético, fórmico, tartárico y cítrico, así como en algunos solventes inorgánicos como los ácidos clorhídrico y sulfúrico. Por otra parte, presenta una variedad de propiedades fisicoquímicas y biológicas y por lo tanto puede utilizarse en diversos campos como la industria de recubrimientos comestibles, como aditivo para mejorar la calidad nutricional de los alimentos, para la recuperación de materiales sólidos de desechos de procesamiento de alimentos y en la purificación del agua (Chhabra, 2004).

2.2.1. Actividad bactericida de la quitosana

La actividad antimicrobiana de la quitosana depende de numerosos factores como lo son: el grado de desacetilación, la masa molecular, el pH del medio, la temperatura y la presencia de componentes en los alimentos (Devlieghere y col., 2004b). El método de acción más aceptado es la interacción mediada por fuerzas electrostáticas que se da entre las moléculas de quitosana con cargas positivas (grupos protonados NH_3^+) y los residuos negativos que compiten con Ca^{2+} por los sitios electronegativos en la superficie de la membrana. Esta interacción produce dos cambios importantes:

- 1) Mediante la promoción de cambios en las propiedades de permeabilidad de la pared de la membrana, se provocan desequilibrios internos osmóticos y en consecuencia se inhibe el desarrollo de microorganismos.

- 2) Debido a la hidrólisis de los peptidoglucanos en la pared de los microorganismos se lleva a cabo la pérdida de electrolitos intracelulares tales como iones del potasio y otros constituyentes proteínicos de baja masa molecular (e.g. proteínas, ácidos nucleicos, glucosa y lactato deshidrogenasa) (Goy y col., 2009).

Una de las características más atractivas de la quitosana es su actividad antiviral, antibacteriana y antifúngica. Algunas investigaciones han demostrado que la quitosana ha mostrado eficacia como agente antimicrobiano frente a diversos microorganismos, tales como *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *S. faecalis*, *Salmonella enterica*, *Bacillus Cereus*, *S. cerevisiae*, entre otras (Cavalcante y col., 2008).

Chhabra (2004) reportó que concentraciones de 0.5 y 1.0% fueron efectivas para retardar el crecimiento de *S. aureus* en ostras crudas. Sin embargo, el mejor tratamiento se logró con una concentración del 2.0% con la inactivación de este microorganismo en el día 12. Devlieghere y col. (2004b) concluyeron en su estudio que el efecto antimicrobiano de la quitosana como conservador de los alimentos está limitado a aquellos con bajo contenido proteínico y de NaCl donde las frutas y verduras pertenecen a esta categoría.

2.2.2. Aplicaciones de la quitosana en alimentos

En numerosas industrias se ha empleado a la quitosana debido a las propiedades que presenta, entre las cuales están incluidas la industria farmacéutica y la cosmética, en donde se emplea en cremas y ungüentos por su capacidad de estimular el crecimiento de células de las pieles dañadas; también en la industria textil forman fibras que poseen un mejor comportamiento elástico que las fibras comerciales; en la industria de los jugos de fruta la emplean como agente clarificante y en la industria de limpieza es utilizada en aguas que contienen metales pesados debido a su capacidad de formar complejos con los iones de metales (Hernández, 2004; Shahidi y col., 1999).

Las aplicaciones de la quitosana en la industria alimentaria han atraído un especial interés debido a sus excelentes propiedades, incluyendo la biocompatibilidad, la biodegradabilidad, la baja toxicidad, la adsorción y la habilidad de formar películas, entre otras (Fernandez-Kim, 2004). Como suplemento alimenticio se ha demostrado el efecto benéfico de la quitina-quitosana en la reducción del colesterol y triglicéridos en la sangre, así como la habilidad para ligar lípidos reduciendo la absorción de estos en el intestino (Koide, 1998). Japón produce galletas, papas y tallarines enriquecidos con quitosana debido a su efecto hipocolesterolémico (Shahidi y col., 1999).

Por otro lado, las propiedades antimicrobianas de soluciones y películas de quitosana en alimentos han demostrado disminuir la multiplicación de una amplia variedad de bacterias Gram positivas y Gram negativas, así como algunas variedades de hongos (Dutta y col., 2009; Valenzuela y Arias, 2012). La Tabla 2.2 resume algunas de las aplicaciones que se le ha dado a la quitosana en la industria de los alimentos.

Tabla 2.2. Aplicaciones de la quitosana en la industria alimentaria

Aplicación	Fuente
Actividad antibacteriana contra una amplia variedad de patógenos y microorganismos de deterioro, incluyendo hongos y bacterias Gram positivas y Gram negativas	Fernandez-Kim, 2004; Morhsed y col., 2011; Nejati y Sadeghinia, 2011; Hernández, 2004;
Clarificación de jugo de frutas: Actúa como agente coagulante provocando la separación de partículas suspendidas de bebidas como algunos jugos de frutas	Giraud y col., 2010; Rungsardthong y col., 2006; Castro y col., 2012
Conservador en alimentos como: productos de origen animal y jugos de fruta	Gacén y Gacén, 1996; Caprile, 2005

Tabla 2.2. Aplicaciones de la quitosana en la industria alimentaria (cont.)

Aplicación	Fuente
Desacidificación de jugos de frutas: Controla la acidez de los jugos frutales, con o sin tratamiento de pectinasas	Giraudó y col., 2010; Shahidi y col., 1999
Películas para recubrimientos comestibles en frutas y vegetales para alargar la vida de anaquel y preservar propiedades organolépticas	Nakamatsu, 2012 Lárez, 2008; Vu y col., 2011; Dutta y col., 2009
Ingrediente funcional: fibra dietaria, efecto hipocolesterolémico, reducción de la absorción de lípidos, agente antigastroenteritis, etc.	Giraudó y col., 2010; Huerta, 1997; Shahidi y col., 1999; Yogeshkumar y col., 2013

2.2.2. Regulaciones en México y en otros países respecto a su aprobación como aditivo

A pesar de las importantes propiedades atribuibles a este polímero, en el ámbito de la industria alimentaria aún presenta algunas limitaciones ya que es necesario el desarrollo de más investigaciones de su uso *in vivo* y, por otro lado, existen limitaciones legales que hacen que este polímero no se use todavía en la industria alimentaria en todo el ámbito internacional (López, 2012). Países como Japón, Noruega, Corea e Italia han aprobado el uso de la quitosana en alimentos. En Japón fue aprobado desde hace por lo menos quince años, de tal manera que se ha incorporado a alimentos funcionales como promotor de la salud cardiovascular (Salas, 2011).

La quitosana no ha sido aprobada por la *FDA* ni por la *EFSA*. Por otra parte, la base de datos *EAFUS* (*Everything Added to Food in the United States* por sus siglas en inglés) no cita a la quitina ni a la quitosana (Salas, 2011). Sin embargo, la *FDA* ha aprobado un producto conocido como *ChitoClear®*, *Shrimp Derived Chitosan*, de la empresa Primex como aditivo *GRAS* (*General Recognised As Safe*

por sus siglas en inglés) en donde se aprueba que su uso en alimentos es inocuo y seguro. Las aplicaciones permitidas en alimentos, como carne y pollo, para este producto aprobado por la *FDA* son: agente antimicrobiano, emulsificante, suplemento de nutrientes, coadyuvantes de elaboración (agente clarificante, floculante, inhibidor de cristalización, agente para prevenir turbidez) estabilizante y espesante (FDA, 2012).

Otro ejemplo es el producto que tiene la marca registrada de “*KiOnutrimeCG®*”, el cual es un compuesto de quitina-glucano y que se emplea como suplemento dietético para aumentar la ingesta de fibra alimentaria, la cual ha sido evaluada como positiva por la *EFSA* (*European Food Safety Authority*, por sus siglas en inglés), así mismo, los resultados de estas evaluaciones evidencian su inocuidad y contribuyen al avance de los aspectos regulatorios de la quitosana (López, 2012). Un ejemplo de esto es la quitosana derivada de *Aspergillus niger*, la cual fue aprobada como *GRAS* para su uso como un ingrediente secundario en alimentos en el 2011 (FDA, 2012). La Tabla 2.3 resume las agencias que regulan a la quitosana y algunos de sus usos aprobados.

Tabla 2.3. Regulaciones aprobatorias de quitina y quitosana (Castañeda y col., 1997)

Usos aprobados	Agencias reguladoras
Plaguicida, tratamiento de semillas y regulador de crecimiento	<i>EPA- FIFRA</i>
Aditivo en alimentos	Ministerio Japonés de Salud y Bienestar
Aditivo en alimentos para animales	AAFCO
Clarificante, coadyuvantes de filtración y floculantes	Codex Alimentarius
Quelación de metales para uso de aguas	EPA-TSCA

2.2.3. Toxicología de la quitosana

La quitosana posee propiedades únicas que lo hacen un ingrediente ideal para el desarrollo de películas comestibles y su aplicación en sistemas alimentarios como agente antimicrobiano, ya que presenta una baja toxicidad, con una dosis letal (DL₅₀) en ratas de 16 g/kg de masa corporal, valor que sitúa a la quitosana en un nivel similar al azúcar (DL₅₀: 10 g/kg) y lo hace menos tóxico que la sal (DL₅₀: 1g/kg) (Nakamatsu, 2012).

2.2.4. Efectos adversos en consumo humano

No se conocen estudios a largo plazo de los efectos de la quitosana sobre la salud humana, pero se han realizado estudios en animales con dietas con suplemento de quitosana al 5% los cuales indican que este compuesto podría inhibir la absorción de minerales como el calcio, magnesio y selenio, así como a las vitaminas liposolubles (A, D, E y K) debido a que la quitosana actúa como formador de un gel en el tracto intestinal que además de atrapar grasas y colesterol, interfiere con la absorción de estos compuestos (Giraudó y col., 2010; Koide, 1998; Yogeshkumar y col., 2013). Por otro lado, la absorción de zinc no se ve afectada por una ingestión de quitina o quitosana en un periodo corto de ingestión (Koide, 1998).

A pesar que la quitosana se cree que altera beneficiosamente la flora intestinal no se ha descartado la posibilidad de que está presente algunos efectos negativos como trastornos gastrointestinales como flatulencias u otras molestias a largo plazo. Por este motivo, no es recomendable consumirlo en altas dosis o por periodos prolongados (Giraudó y col., 2010). Generalmente, es recomendable ingerir dosis de hasta un gramo por día (Koide, 1998) y en investigaciones donde se ha estudiado la quitosana como uso terapéutico lo han empleado de 3 a 6 gramos al día con el acompañamiento de comidas (Yogeshkumar y col., 2013).

Estudios en ratas con ingestión de quitosana en una dosis de 3 a 6 gramos al día por un periodo de 2 semanas mostraron resultados positivos sin el desarrollo de diarrea o constipación (Koide, 1998).

2.2.5. Reacciones adversas en consumo humano

Las personas alérgicas a los mariscos pueden presentar ciertas reacciones adversas. Ensayos clínicos han reportado algunos casos, generalmente limitado a flatulencias y a constipación (Yogeshkumar y col., 2013).

2.3. Principales características del jugo de toronja

La norma general del Codex para zumos (jugos) y néctares de frutas (CODEX STAN 247, 2005), define que “el zumo (jugo) de fruta es el líquido sin fermentar, pero fermentable, que se obtiene de la parte comestible de frutas en buen estado, debidamente maduras y frescas o frutas que se han mantenido en buen estado por procedimientos adecuados, inclusive por tratamientos de superficie aplicados después de la cosecha de conformidad con las disposiciones pertinentes de la Comisión del Codex Alimentarius”.

Los zumos (jugos) se extraen mediante algunas tecnologías que mantienen sus características fisicoquímicas y nutricionales como vitaminas de las frutas que proceden. Pueden presentar turbidez o ser cristalinos y emplear en su formulación algunas sustancias adicionadas procedentes del mismo tipo de la fruta (CODEX STAN 247, 2005).

Las Tablas 2.4, y 2.5 presentan las especificaciones fisicoquímicas y sensoriales que deberán de cumplir los jugos de toronja de acuerdo con la Norma NMX-F-018-1968 (DOF, 1968).

Tabla 2.4. Especificaciones fisicoquímicas del jugo de toronja (DOF, 1968)

Especificaciones	Calidad "A" o Suprema		Calidad "B" o Común		Calidad "C" o Corriente	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
Acidez titulable expresada como ácido cítrico	0.900	1.600	0.700	1.750	0.700	1.750
Sólidos solubles totales a 20°C	10	--	10	--	10	--
Contenido de ácido ascórbico	250.00	--	200.00	--	150.00	--

Tabla 2.5. Especificaciones sensoriales del jugo de toronja (DOF, 1968)

Especificaciones	Calidad "A" o Suprema	Calidad "B" o Común	Calidad "C" o Corriente
Color	Brillante, característico, semejante al del jugo recién extraído del fruto maduro y de la variedad de toronja empleada.		
Olor	Aromático, distintivo, semejante al del jugo de toronja recién extraído.		
Sabor	Característico semejante al jugo recién extraído de fruto maduro, no debe presentar sabores a cocido u oxidación ni de terpenos ni cualquier sabor extraño u objetable	Característico semejante al jugo recién extraído de fruto maduro, se tolera un ligero sabor a cocido, de oxidación o de terpenos	
Apariencia	Podrá tener ligera tendencia de separación en dos fases y deberá de estar exento de semillas y sedimento	Podrá tener una separación en dos fases y deberá de estar exento de semillas y sedimento	

2.3.1. Factores que intervienen en el deterioro del jugo de toronja

El jugo de toronja es considerado un alimento perecedero debido a su corta vida útil aproximadamente de 5 días, por lo que se requieren de algunas condiciones para su conservación como un adecuado almacenamiento, transporte y expendio. Debido a esto, si los factores intrínsecos y extrínsecos (Tabla 2.6) son apropiados, los microorganismos pueden crecer rápidamente produciendo algunos cambios sensoriales perceptibles por el consumidor como olores y sabores desagradables lo cual va relacionado con el proceso de fermentación del producto (Velázquez, 2013).

Tabla 2.6. Factores intrínsecos y extrínsecos en los alimentos (Torres, 2011)

Factores intrínsecos	Factores extrínsecos
Composición del alimento	Procesamiento
Actividad del agua (a_w)	Higiene, manipulación
pH y acidez total	Almacenamiento
Potencial redox	Sistema de empaque
Oxígeno disponible	Distribución y puntos de venta

Las principales fuentes de deterioro en los jugos de frutas cítricas son:

- a) Deterioro microbiano: Este deterioro se debe principalmente al desarrollo de microorganismos que pueden ser parte de la microbiota natural o debido a la contaminación en alguna etapa de la manipulación del alimento (contaminación cruzada) (Anónimo, 2012). La mayoría de los patógenos en los jugos cítricos son de carácter deteriorativo como: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Leunostoc*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilis* y *Zygosacharomyces baili* (Toledo, 2004).

- b) Deterioro enzimático: En cuanto a la alteración enzimática, uno de los principales defectos en la calidad de los jugos es la pérdida de turbidez a lo largo de su almacenamiento. Este fenómeno está causado por una enzima de origen vegetal llamada pectinmetilesterasa (PME) que degrada pectinas. Como consecuencia, el jugo pierde su turbidez característica dando lugar a un líquido claro con un precipitado en el fondo (González, 2008). La PME es más resistente al tratamiento térmico que los microorganismos patógenos que pueden estar en los jugos de toronja, por lo que su inactivación es normalmente un indicador de un proceso adecuado de pasteurización (Collet y col., 2005).
- c) Deterioro organoléptico: Un alimento se considera descompuesto cuando es considerado por los consumidores como inaceptable, debido a sus características sensoriales como la apariencia (color), el sabor, el olor y la textura del alimento (cuerpo, viscosidad). Estas características son subjetivas y dependen de consideraciones culturales o de cambios en la agudeza de cada consumidor para percibir cambios. El color y el sabor son las características que tienen mayor influencia sobre la aceptabilidad de un alimento. El principal cambio organoléptico que se da en los jugos es el aumento del sabor ácido y el olor característico a un producto que está fermentado debido a que en el almacenamiento del producto se genera ácido acético al igual que CO₂ por acción de los microorganismos (Anónimo, 2012).
- d) Deterioro nutritivo: Durante el almacenamiento, los jugos también pierden su calidad nutritiva. La vitamina C, de gran importancia para la salud humana, disminuye durante su almacenamiento por procesos oxidativos (González, 2008). La principal causa de la pérdida significativa de esta vitamina en los alimentos son los tratamientos térmicos que se les da a los productos como la pasteurización y la esterilización ya que esta vitamina es termolábil. Debido a esto la vitamina C se puede usar como un índice de la

retención de nutrientes durante el tratamiento térmico. La pérdida de vitamina C en los alimentos genera en muchas de las ocasiones oscurecimiento, debido a la oxidación que presenta este compuesto a la temperatura, luz, pH, la disponibilidad de oxígeno, presencia de metales y ciertas sales, la presencia de otras vitaminas como las riboflavinas, así como a ciertas enzimas específicas como la fenolasa, peroxidasa, ácido ascórbico oxidasa, además de otros compuestos que pueden inducir la oxidación de la vitamina (Gómez, 2004).

2.3.2. Vida útil del jugo de toronja

Regularmente la vida útil de un jugo de toronja sin pasteurizar es de 3 a 5 días. La vida útil de un producto depende de la concentración inicial de microorganismos de descomposición y de las condiciones de almacenamiento. Para evitar pérdidas del producto e incrementar su vida útil será necesario evitar la contaminación de la materia prima y del producto final y usar métodos convenientes de conservación, así como de almacenamiento (Anónimo, 2012).

2.4. Métodos de conservación en general del jugo de toronja

La conservación de alimentos puede definirse como el conjunto de tratamientos que prolonga la vida útil de estos, manteniendo, en el mayor grado posible, sus atributos de calidad, incluyendo color, textura, sabor y especialmente valor nutritivo (FAO, 1993). La tecnología de conservación de alimentos se ha basado, tradicionalmente, en el uso de procesos térmicos para el control microbiano. Dichos procesos son altamente eficientes en cuanto a inactivación de microorganismos pero causan, en mayor o menor grado, daños irreversibles en la calidad de los productos obtenidos (Ortega, 2010).

2.4.1. Tratamientos térmicos empleados en bebidas

Los tratamientos térmicos generalmente emplean temperaturas elevadas con el objetivo de eliminar los microorganismos causantes de enfermedades y para

reducir las poblaciones microbianas (Baduí y col., 2006). Los métodos más conocidos son la pasteurización y la esterilización, los dos procesos incluyen un envasado aséptico del alimentos en envases preesterilizados de diferentes materiales (Gómez, 2004).

2.4.1.1. Proceso de pasteurización aplicado a bebidas

Los alimentos pueden clasificarse de acuerdo con su pH en alimentos de alta acidez (pH menor a 4.5) y en alimentos de baja acidez (pH mayor a 4.5). La mayoría de las frutas presentan valores de pH menores a 4.5 por lo cual el objetivo principal de la pasteurización es la inactivación enzimática (pectinestearasa y poligalacturonasa). El objetivo secundario es la destrucción de microorganismos causantes de alteraciones (levaduras y hongos) en los alimentos. Las condiciones mínimas de tratamiento seguido de un enfriamiento rápido a 3-7°C son: 65°C durante 30 min, 77°C durante 1 min y 88°C durante 15 segundos (Anónimo, 2010).

En la pasteurización se eliminan bacterias como *Escherichia coli* y aquellas productoras de: Brucelosis, tuberculosis, fiebre, salmonelosis, fiebre escarlatina, estafilococos, *Coxiella burnettii* (Rickettsia causante de la fiebre Q), pero no destruye los microorganismos mastíticos tales como el *Staphilococcus aureus* o el *Streptococcus pyrogenes*, como tampoco destruye algunos microorganismos responsables de la acidez como los *Lacotobacillus* (Martínez y Rosenberger, 2013).

Al someter un producto a tratamiento térmico ocurren cambios a nivel sensorial y nutricional como reacciones de degradación de color, cambio en la textura, aroma, pérdida de vitaminas y desarrollo de sabores a cocido u olores a oxidado.

Estos cambios son ocasionados por reacciones químicas en los alimentos que tienen una dependencia con la temperatura como reacciones de Maillard, caramelización, oxidación y polimerización del ácido ascórbico y polimerización de

aldehídos, y pueden tener lugar a lo largo del tratamiento térmico o durante el almacenamiento, como consecuencia de la severidad del tratamiento recibido, del pH, cantidad de oxígeno disuelto, entre otros factores (Gómez, 2004).

2.4.2. Tratamientos no térmicos empleados como métodos de conservación en alimentos

Los procesos no térmicos se llevan a cabo a bajas temperaturas (<50°C) y se caracterizan por inactivar microorganismos patógenos y deteriorativos, así como enzimas, afectando ligeramente el color, sabor, textura y propiedades nutricias del alimento como el contenido de vitaminas. La investigación de nuevas tecnologías para alargar la vida útil de los alimentos ha sido llevada a cabo para cumplir con las necesidades de la población de producir alimentos más naturales y sin un tratamiento prolongado, debido a esto, el uso de altas presiones (*HHP*), de campo eléctrico pulsante de alta intensidad (CEPAI) y de radiaciones ultravioletas se proponen como tecnologías emergentes (Calderón-Miranda y col., 1998).

2.4.2.1. Campos eléctricos pulsantes de alta intensidad (CEPAI)

El tratamiento no térmico CEPAI utiliza pulsos eléctricos de alto voltaje en un rango de 10 a 80 kV/cm, con duración de milésimas de segundos y con un número total de pulsos de 1 a 100 en el alimento colocado entre dos electrodos. El tratamiento se lleva a cabo a temperaturas alrededor de los 25°C o por debajo de ésta. El equipo utilizado (Figura 2.1) es un sistema eléctrico simple que consiste en una fuente de alto voltaje, un banco de condensadores, un interruptor y una cámara de tratamiento (Pineda, 2011).

Esta tecnología es mejor que los tratamiento térmicos como la pasteurización debido no repercute en las características sensoriales (sabor, color), y físicas (textura, viscosidad) de los alimentos (Fernández-Molina y col., 2011).

El uso de este tratamiento puede ocasionar electropermeabilización, que es la permeabilización reversible de las membranas celulares y de los organelos. La

aplicación de los pulsos es una nueva tecnología que busca la inactivación de microorganismos y enzimas en alimentos frescos o preparados (Ortega, 2010).

Se han llevado a cabo numerosos estudios para comprobar el efecto que tiene este tratamiento sobre la inactivación de microorganismos. Rivas y colaboradores (2004) reportaron que con un tratamiento CEPAL en jugo de naranja con zanahoria se lograron niveles aceptables de inactivación microbiológica y enzimática, logrando una vida de anaquel de 4 semanas a una temperatura de almacenamiento de 2°C con características sensoriales y fisicoquímicas parecidas a un jugo sin tratamiento.

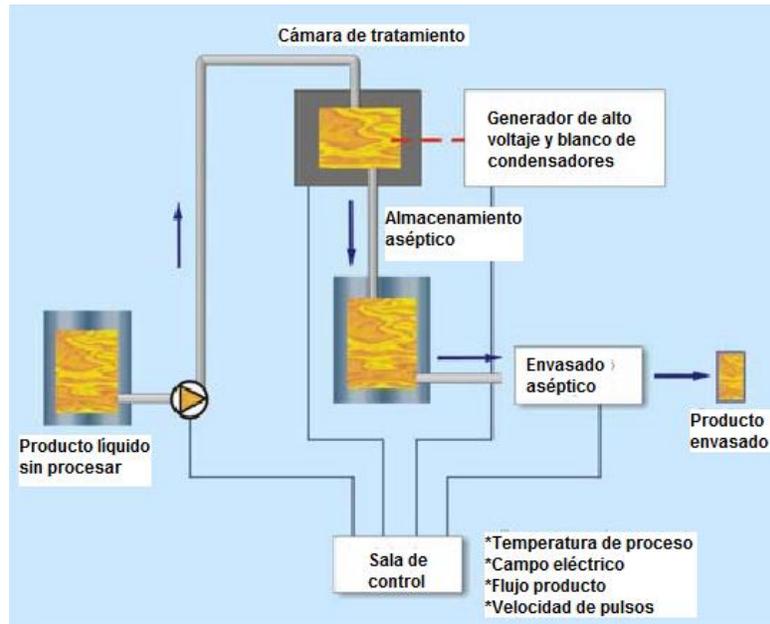


Figura 2.4. Esquema de una planta de tratamiento de pulsos eléctricos de alta intensidad de campo (Raventós, 2006)

2.4.2.2. Irradiación de luz ultravioleta (UV)

Las radiaciones ultravioletas (UV) se encuentran entre las bandas de rayos X y luz visible, con longitudes de onda que van desde 180 hasta 400 nm (Figura 2.2). Estas radiaciones se subdividen en tres regiones: UV de onda larga (UV-A: 320-400 nm), UV de onda media (UV-B: 280 a 320 nm) y UV de onda corta (UV-C:

200-280 nm) (Antonio-Gutiérrez y col., 2012). La irradiación UV-C es empleada por ser un tratamiento que inactiva microorganismos actuando directamente en las paredes celulares y ADN, por lo cual podría ser utilizada para la inactivación de microorganismos como bacterias, levaduras y hongos.

Este tratamiento no térmico es una de las más prometedoras tecnologías debido a su fácil uso, la letalidad del método frente a muchos microorganismos, la poca generación de residuos químicos y por ser un proceso en frío que es efectivo a bajos costos en comparación con otros métodos de conservación (Gayán y col., 2012). Así mismo, los alimentos conservan características organolépticas similares a aquellos en estado fresco (Borja y col., 2012). En zumos y néctares se ha aplicado con éxito este tratamiento para reducir la carga microbiana (Ochoa-Velasco, 2012, Guevara y col., 2012) y, bajo condiciones de tratamiento adecuado, se podrían lograr reducciones de más de 5-log de algunos microorganismos patógenos como *E. coli* (Rupasinghe y Yu, 2012).

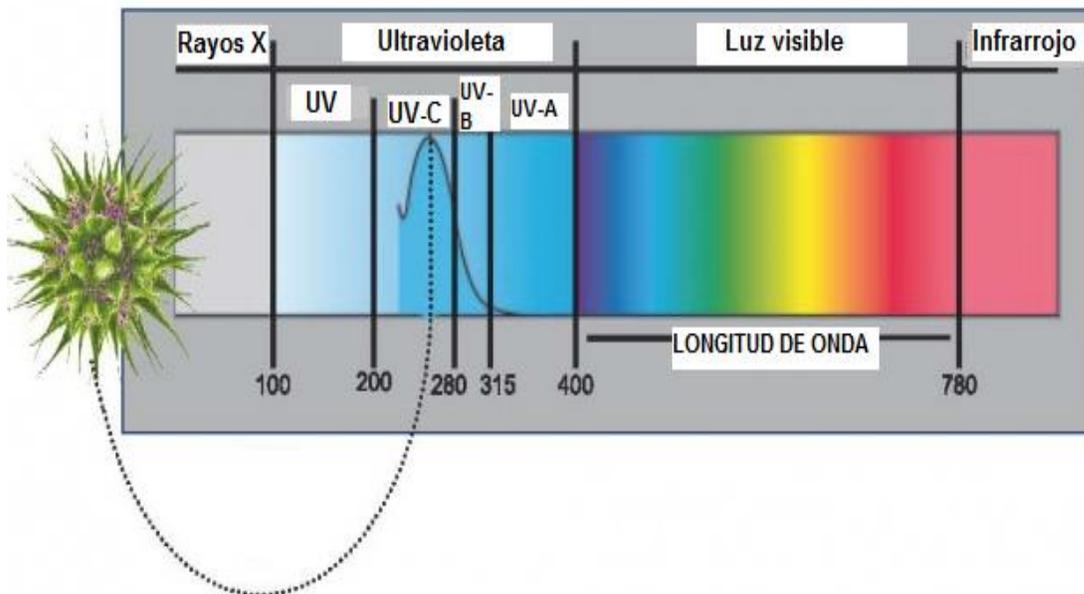


Figura 2.5. Espectro de la luz (adaptada de Uvtechnics, 2013)

2.4.2.3. Alta presión hidrostática (*HHP*)

En el procesamiento de alimentos por *HHP* se aplican altas presiones (100 a 1000 MPa) de manera isostática, es decir, se realiza una compresión uniforme en todas las direcciones regresando a su forma original al ser eliminada la presión (Calderón-Miranda y col., 1998).

De esta manera se logran inactivar microorganismos y modificar biopolímeros, incluyendo inactivación de enzimas, desnaturalización de proteínas y modificación de propiedades fisicoquímicas, manteniendo sin afectar características sensoriales, componentes de color y sabor de los alimentos tratados (Tuboly, 2009). En la Tabla 2.7 se resumen algunas de las ventajas y desventajas de esta tecnología.

Tabla 2.7. Ventajas y desventajas del tratamiento por alta presión hidrostática en alimentos (Téllez-Luis y col., 2001)

Ventajas	Desventajas
El tratamiento es independiente del volumen y de la forma de la muestra, por lo que se reduce el tiempo requerido para procesar grandes cantidades de alimento	Imposibilidad de aplicación en algunos alimentos como frutas y verduras porque perderían su forma y aspecto original
No deteriora nutrientes termolábiles como vitaminas	Desconfianza del consumidor al no conocer esta tecnología
No altera características organolépticas del producto debido a que no se favorecen reacciones de Maillard o pardeamiento no enzimático	No se pueden diseñar procesos continuos con los equipos actuales en el mercado
No genera residuos	Alto costo del equipo

Algunos de los alimentos que se han tratado con esta tecnología de altas presiones son: leche, zumos de frutas, jamón, guacamole, ostras, arroz precocido, margarina, carnes, entre otros (Nicolás, 2003).

La inactivación de enzimas y de organismos deterioradores en zumos ha sido ampliamente estudiada. Daoudi (2004) en su experimento con zumos de uva tratados con altas presiones, reportó una reducción inicial superior a 1 log UFC/mL en recuentos totales, así mismo, consiguió reducciones por debajo del límite de detección en bacterias lácticas, mohos y levaduras.

2.4.3. Adición de aditivos naturales y químicos empleados para la conservación de alimentos

Actualmente los compuestos antimicrobianos o conservantes se clasifican en tradicionales y naturales. Los conservadores tradicionales son aquellas sustancias químicas permitidas dentro de la normatividad vigente para cada producto alimenticio y los conservadores naturales son sustancias que se obtienen a partir de materiales o procesos biológicos y cuya inocuidad se atribuye a que son degradados por el organismo al ser ingeridos (Adarme y Rincones, 2008).

2.4.3.1. Conservadores químicos

La *FDA* (Por sus siglas en inglés: *Food & Drugs Administration*) define a un conservador químico como cualquier compuesto que al adicionarse a un alimento tiende a prevenir o retardar su deterioro. Estas sustancias no incluyen a la sal común, glúcidos, vinagre, especias y sustancias que se adicionan al alimento por exposición directa como humo de madera o agentes químicos aplicados por sus propiedades insecticidas y herbicidas (FDA, 1979).

Algunos de los conservadores químicos reconocidos como *GRAS* (Por sus siglas en inglés, *Generally Recognized As Safe*) son los siguientes:

- Ácido propiónico y propionatos (mohos)

- Ácido sórbico y sorbatos (mohos)
- Ácido benzoico y benzoatos (mohos y levaduras)
- Parabenos (mohos, levaduras y bacterias)
- Diacetato de sodio (mohos)
- Etil-formato (mohos y levaduras)
- Nicina (bacterias ácido lácticas y Clostridia)
- Nitrato de sodio (Clostridia) (FDA, 2014)

Los conservadores químicos más empleados son el sorbato de potasio y el benzoato de potasio (Figura 2.6). La acción antimicrobiana del ácido benzoico se basa en diversas intervenciones sobre el sistema enzimático de la célula de los microorganismos donde parece intervenir en diferentes sitios del ciclo del ácido cítrico, especialmente en el ácido β -cetoglutárico y la enzima ácido succínico deshidrogenasa; el ácido benzoico tiene acción sobre la tirosinasa. También actúa sobre la pared celular, donde el ácido benzoico tiene que penetrar a través de la pared celular. Cuando esto ocurre, la parte no disociada es la que tiene la mayor parte antimicrobiana y penetra con mayor facilidad en la célula (Adarme y Rincones, 2008).

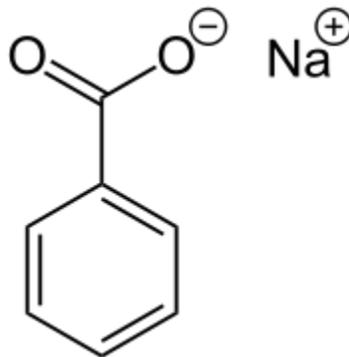


Figura 2.6. Estructura química del benzoato de sodio

2.4.3.2. Conservadores naturales

Los conservadores naturales que han tenido un gran auge en los últimos años son compuestos naturales capaces de inhibir el desarrollo de microorganismos. Se

pueden obtener de microorganismos, plantas y animales teniendo como ejemplo de estos: aceites, especias, ácidos orgánicos, hierbas y quitosana, que han demostrado viabilidad para su uso en algunos productos alimenticios (Adarme y Rincones, 2008; Rupasinghe y Yu, 2012).

Tanvir y col. (2014) en un estudio de quitosana aplicado como conservador en jugo de naranja y en pasta de jengibre encontraron que la pasta de jengibre fue aceptable al día 8 con un recuento bacteriano de 1.4×10^6 y recuento fúngico 7.5×10^5 . El jugo de naranja fue aceptable al día 8 con recuento bacteriano de 5.5×10^4 y recuento fúngico de 2.6×10^5 , concluyendo que la quitosana es factible para ser utilizada como conservador. En jugo de manzana, la quitosana inhibe el desarrollo de *Mucor racemosus*, *Byssochiamys* spp. y *Zygosaccharomyces bailii* (Guerrero, 2009).

Así mismo, en la industria cárnica se han encontrado resultados favorables debido al amplio espectro de acción de la quitosana como conservador, ya sea en forma de solución, película comestible, polvo agregado directamente en la preparación de alimentos procesados u otras formulaciones, en donde se aprecia que la quitosana es capaz de inhibir y/o disminuir el desarrollo de los principales microorganismos patógenos de alimentos de origen animal (Valenzuela y Arias, 2012).

En el Capítulo 3 se expondrá la metodología que se llevó a cabo para la realización de esta tesis experimental.

CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA

A continuación se presenta la metodología seguida en esta investigación.

3.1. Extracción de la mezcla de polímeros naturales quitina-quitosana (Q-Qn) (Ortega-Granados, 2011)

a) Recolección de cefalotórax y exoesqueletos de camarón fresco: Las cabezas de camarón (cefalotórax) se obtuvieron de la zona de pescados y mariscos de la central de abasto “La Nueva Viga”.

b) Limpieza: Los cefalotórax y exoesqueletos del camarón (CC) frescos se limpiaron de objetos extraños y se lavaron bajo chorro de agua de la llave.

c) Molienda: En una licuadora doméstica, se adicionaron los CC limpios y agua en una relación 1:2 en masa y se licuaron durante 1 minuto hasta observar un tamaño de partícula reducido. Durante la molienda la mayor parte de las proteínas, grasas, pigmentos y parte de los minerales se eliminan en la fase de licuefacción de los CC en agua para así obtener el sólido o cefalotórax y exoesqueleto parcialmente desproteinizados (CPD).

d) Filtración: Los CPD se filtraron con un tamiz y se enjuagaron con abundante agua.

e) Secado y tamizado de los cefalotórax y exoesqueletos parcialmente desproteinizados: Una vez eliminado el excedente de agua de los CPD se sometieron a un secado solar y se tamizaron para obtener un tamaño de partícula de 149 μm conservándose en refrigeración dentro de un envase hermético.

f) Extracción de la mezcla de polímeros naturales quitina-quitosana (Q-Qn): Se pesó 1 g de CPD y se adicionaron 10 g de MAC-141® (metanol-agua-cloruro de calcio), se dejó la mezcla en un recipiente de cristal con tapa por 78 horas y después se filtró en un equipo Millipore (Figura 3.1). El

polímero extraído es la mezcla de quitina-quitosano que fue adicionada a los jugos de toronja en concentraciones de 1 y 2 g/L con una homogeneización mediante agitación por 5 minutos (Figura 3.2).



Figura. 3.1. Filtración en equipo Millipore



Figura. 3.2. Homogeneización de jugo de toronja con quitina-quitosana en diferentes concentraciones

Para esta investigación se elaboraron 8 lotes de jugos de toronja con diferentes condiciones de procesamiento (tratamiento térmico y adición de aditivos químicos o naturales) conservados a temperatura de refrigeración. La Tabla 3.1 presenta la descripción de cada una de estas muestras.

Tabla 3.1. Descripción de los tratamientos dados a los diferentes lotes de jugos de toronja

Lote	Descripción	Referencia
Quitina-Quitosana (Q-Qn1 y Q-Qn2)	Jugo de toronja con adición de 1 y 2 g/L respectivamente de quitina-quitosana extraído del cefalotórax del camarón	Sección 3.1
<i>Controles</i> Quitosana S-A (QSA1 y QSA2)	Jugo de toronja con adición de 1 y 2 g/L respectivamente de quitosana Sigma Aldrich grado analítico disuelta en ácido ascórbico al 2.0%	Sección 3.2
Ácido ascórbico 2.0% (AA)	Jugo de toronja con adición de 1 g/L de ácido ascórbico al 2.0%	-----
Benzoato de sodio (BS)	Jugo de toronja con adición de 0.05 g/L de benzoato de sodio en polvo disuelto en el jugo	-----
Blanco (B)	Jugo de toronja sin tratamiento	-----
Blanco pasteurizado (BP)	Jugo de toronja con tratamiento térmico (pasteurización a 63±5°C por 30 min y envasado aséptico)	-----

El diagrama de bloques en la Figura 3.1 presenta los pasos de esta investigación para la elaboración y seguimiento de los diferentes parámetros de evaluación de la vida útil de los jugos de toronja.

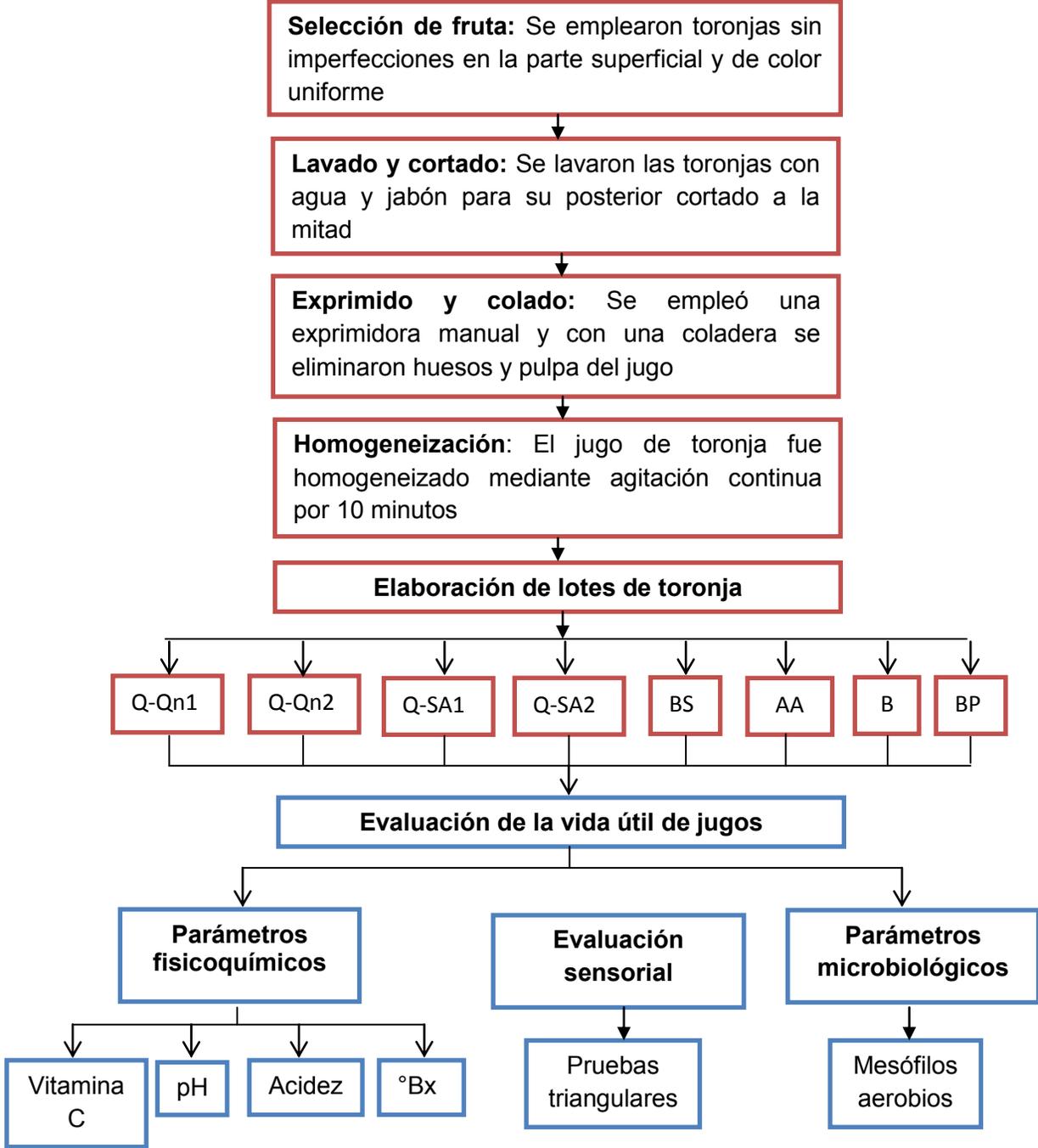


Figura 3.1. Diagrama de flujo para el proceso de elaboración de los diferentes lotes de jugo de toronja con diferentes tratamientos y su posterior evaluación de la vida útil

3.2. Elaboración de polímeros de quitosana Sigma Aldrich (SA) (85% desacetilación) empleados como controles (QSA1 Y QSA2)

Con el objetivo de evaluar el polímero (quitina-quitosano) extraído del cefalotórax del camarón obtenido experimentalmente se empleó como lote control un polímero de quitosana de la marca Sigma Aldrich, SA (Figura 3.3) con un porcentaje de desacetilación del 85% disuelta en una solución de ácido ascórbico.



Figura 3.3. Quitosana marca Sigma Aldrich (SA) empleada en la elaboración de lotes control de jugos de toronja

Para la preparación de este polímero se partió de la investigación de Flores (2008) empleando la máxima concentración de quitosana en su investigación (2.0%), la cual fue la que mostró buenos resultados aplicados a recubrimientos en frutas. Para esto se pesó 1 g de quitosana SA y se disolvieron con 50 mL de una solución previamente preparada de ácido ascórbico al 2.0% p/v. Esta mezcla se agitó manualmente hasta la disolución completa de la quitosana, el resultado fue un gel transparente con alta viscosidad (Figuras 3.4a y 3.4b). Posteriormente, esta mezcla se adicionó al jugo en concentraciones de 1 y 2 g/L las cuales son las concentraciones reportadas en la literatura donde la quitosana no interfiere en las características sensoriales ni fisicoquímicas del producto.



Figura 3.4a. Polímero de quitosana Sigma Aldrich (SA) antes de la completa disolución

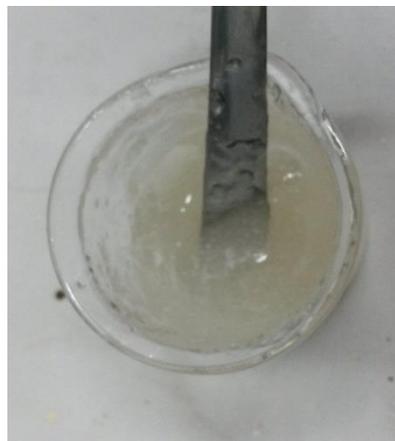


Figura 3.4b. Polímero de quitosana SA completamente homogeneizado

3.3. Parámetros fisicoquímicos empleados para evaluar la calidad del jugo de toronja

Cada uno de los parámetros fisicoquímicos fueron evaluados diariamente durante un periodo de 14 días. Los jugos fueron preservados durante este tiempo en refrigeración aproximadamente a una temperatura de $4\pm 2^{\circ}\text{C}$.

3.3.1 Determinación de pH

Para la determinación de pH se empleó un potenciómetro modelo Orion 720-A7. Para esto se calibró el potenciómetro con soluciones reguladoras de pH 4 y 7 y se sumergió el electrodo en una porción de la muestra previamente homogeneizada (DOF, 1978a). La medición del pH se realizó por triplicado.

3.3.2. Determinación de acidez titulable

Se tomaron 10 mL de la muestra homogeneizada y filtrada previamente y se diluyeron con agua destilada hasta un aforo de 50 mL (DOF, 1978b). Posteriormente, a esta muestra se le agregaron 0.5 mL de indicador fenolftaleína y se tituló la muestra con solución normalizada de NaOH (0.1N) hasta que se observó un viraje a rosa tenue persistente por 15 segundos (Ortega-Granados, 2011). Este procedimiento se realizó por triplicado anotando el volumen de NaOH

gastado en cada titulación. Los resultados se expresaron en g de ácido cítrico por cada 100 mL de jugo de naranja (Ecuación 3.1).

$$\% \text{ Acidez} = \frac{V_{\text{NaOH}} * N_{\text{NaOH}} * \text{Meq}_{\text{ácido cítrico}} * 100}{\text{mL}} \quad (3.1a)$$

donde:

V_{NaOH} = volumen (mL) de NaOH gastado en la titulación de la muestra

N_{NaOH} = normalidad del NaOH (mEq/mL)

$\text{meq}_{\text{ácido cítrico}}$ = miliequivalentes del ácido cítrico = 0.0064 g de ácido cítrico/mEq

mL = volumen de la muestra (mililitros)

La reacción de neutralización del ácido cítrico con el hidróxido de sodio se describe de la siguiente manera:



3.3.3. Determinación de grados Brix

Para esta determinación se empleó un refractómetro de glúcidos Marca Velab Modelo: CVQ-4013. El aparato se limpió con alcohol etílico y se colocaron unas gotas de la muestra previamente homogeneizada en el refractómetro y se midió la lectura ajustando el brazo giratorio del aparato hacia delante y hacia atrás hasta que el campo visual se dividió en dos partes, una luminosa y otra oscura (DOF, 1982). Esta determinación se realizó por triplicado.

3.3.4. Determinación de vitamina C

Se preparó una solución estándar de ácido ascórbico (1 mg/mL). Se tomó una alícuota de 2 mL y se tituló con 2,6-Diclorofenolindofenol (2,6-DI) hasta un vire color rosa tenue. Este procedimiento se realizó por triplicado. Para la titulación del blanco se tomó una alícuota de 2 mL de agua destilada y se tituló con 2,6-DI hasta el vire rosa tenue. Este procedimiento se realizó por triplicado. Al valor obtenido

del estándar se restó el valor del blanco y la concentración de indofenol se expresó como mg de ácido ascórbico equivalentes a 1 mL de indofenol.

Para la determinación del contenido de ácido ascórbico en la muestra se tomó una alícuota de 10 mL de la muestra y se llevó a un aforo de 100 mL con agua destilada. Posteriormente, se tomó una alícuota de 10 mL que fue titulada con el 2,6-DI hasta el vire rosa tenue. Este procedimiento se realizó por triplicado y el volumen gastado en cada titulación se le restó el volumen gastado del blanco (Ecuación 3.2).

$$VC = ((P-B)/E-B) * (2 \text{ mg } \acute{\text{a}}\text{c asc.} / M) * (V/A) \quad (3.2)$$

donde:

VC= mg ácido Ascórbico/ 100 mL de muestra

P= promedio de volumen (mL) de 2,6-DI empleados en la titulación de la muestra

B= promedio de volumen (mL) de 2,6-DI empleado en la titulación del blanco

E= promedio del volumen (mL) de 2,6-DI empleados en la titulación del estándar

M= alícuota de muestra (10 mL)

V= Volumen final (mL) del aforo de la muestra (100 mL)

A= Volumen de la alícuota tomada para titular (10 mL)

3.4. Parámetros microbiológicos empleados para evaluar la calidad del jugo de toronja

Los análisis de mesófilos aerobios realizados a los jugos fueron realizados al inicio del experimento, a los 5 y a los 10 días de producidos los diferentes lotes de jugos.

3.4.1. Determinación de mesófilos aerobios

Para la preparación y dilución de las muestras se empleó la Norma Mexicana NMX-F-286 Preparación y dilución de muestras de alimentos para análisis microbiológicos (DOF, 1992). Al ser una muestra líquida el único tratamiento que se le dio fue una homogeneización para su posterior dilución (se realizaron diluciones de 10^{-1} a 10^{-3} en una solución de NaCl 0.8%). Posteriormente, 1mL de solución de cada una de las diluciones se inocularon en cajas de Petri estériles por

duplicado y se agregaron de 12 a 15 mL de medio de cultivo de agar cuenta estándar a una temperatura de 45 a 48°C mezclando con la muestra (6 movimientos de derecha a izquierda, 6 en el sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás a delante) hasta la completa incorporación del inóculo en el medio. Se dejó solidificar el medio y se incubaron las cajas en posición invertida a una temperatura de $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 48 ± 2 horas. Transcurrido este tiempo se seleccionaron las cajas con crecimiento (25 a 250 colonias) y se contaron todas las colonias desarrolladas (excepto las de hongos), incluyendo las colonias puntiformes (DOF, 1977; 1994a).

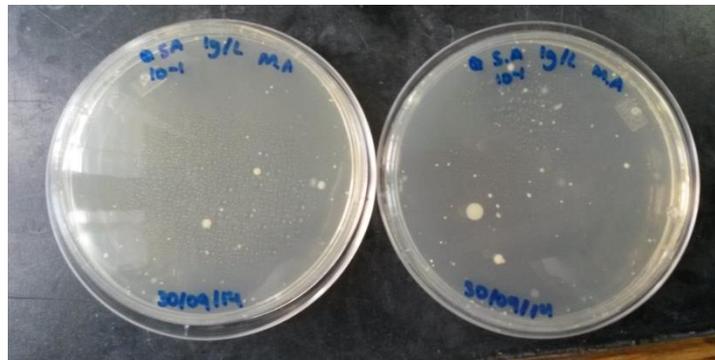


Figura 3.4c. Crecimiento de mesófilos aerobios en cajas de Petri

Para la expresión de resultados se multiplicó por la inversa de la dilución para obtener el número de colonias por mililitro o gramo de la muestra, siguiendo como ejemplo la Tabla A1 del Anexo I.

3.5. Evaluación sensorial aplicada en los jugos de toronja

En la evaluación sensorial de los jugos de toronja se realizó una prueba triangular, la cual es empleada para determinar si un cambio de ingredientes ocasiona diferencia significativa en un producto donde generalmente se usan de 30 a 50 réplicas (Pedrero y Pangborn, 1989). Esta prueba es una comparación direccionada y binomial de una cola, en donde la probabilidad de acierto al azar es de $1/3$.

Para este diseño sensorial se realizó una prueba triangular con tres juegos de muestras. Esta prueba se realizó un día después de haberse producidos los lotes de jugos con 36 jueces de los cuales 21 fueron del sexo femenino y 15 del sexo masculino con un rango de edades entre 20 y 36 años (Figura 3.5). Las muestras evaluadas fueron las siguientes:

- 1) Blanco vs Q-Qn 1 g/L
- 2) Blanco vs Q-Qn 2 g/L
- 3) Q-Qn 2g/L vs Q-SA 2 g/L

En este experimento se buscó comprobar si existía alguna diferencia significativa en la adición de la mezcla de polímeros extraídos de camarón (quitina-quitosano) y su posible efecto en el cambio de alguna característica sensorial en el producto terminado. El objetivo de sólo realizar pruebas triangulares con los lotes que tenían adicionada quitina-quitosana y quitosana marca sigma aldrich fue debido a que en la revisión bibliográfica se halló que estas soluciones producen un sabor amargo al adicionarse a jugos, por lo que únicamente se comparó el blanco contra los lotes que tenían quitina-quitosana en dos concentraciones (1 y 2 g/L). Por otro lado se quiso comprobar si existía un sabor similar producido entre los lotes adicionados con soluciones de quitina-quitosana y quitosana marca Sigma Aldrich por lo que se evaluaron dichos lotes con la concentración más altas que fue de 2g/L para saber si existían diferencias significativas.

En el cuestionario empleado en esta prueba (Figura AII, Anexo II), la pregunta realizada a los panelistas fue detectar cuál era la muestra diferente de 3 muestras presentadas con números aleatorios. El diseño experimental de esta prueba se aprecia en la Tablas CII, DII y EII del Anexo II.



Figura 3.5. Lugar destinado para la evaluación sensorial de jugos de toronja

Para el análisis de resultados de las pruebas triangulares se utilizó la Tabla AII y BII del Anexo II (Stone y Sidel, 1993) con un nivel de significancia del 5% arrojando un nivel de confiabilidad del 95% con la cual se pueden identificar si existen diferencias significativas entre las muestras a analizar.

3.6. Análisis estadísticos realizados durante el experimento

Los resultados experimentales fueron analizados estadísticamente mediante un análisis de varianza (*ANOVA*, por sus siglas en inglés, *analysis of variance*) y pruebas de diferencia mínima significativa (*LSD*) de Fisher empleando un programa de cómputo (Statgraphics Centurion XV1 Versión 16.2.04).

Las hipótesis planteadas en este diseño experimental fueron las siguientes:

- Ho:** Todos los tratamientos conservan de igual manera el producto basado en los parámetros fisicoquímicos (pH, °Bx, acidez y vitamina C) en los 14 días
- Hi:** Al menos un tratamiento es diferente en la conservación del producto basado en los parámetros fisicoquímicos (pH, °Bx, acidez y vitamina C) en los 14 días

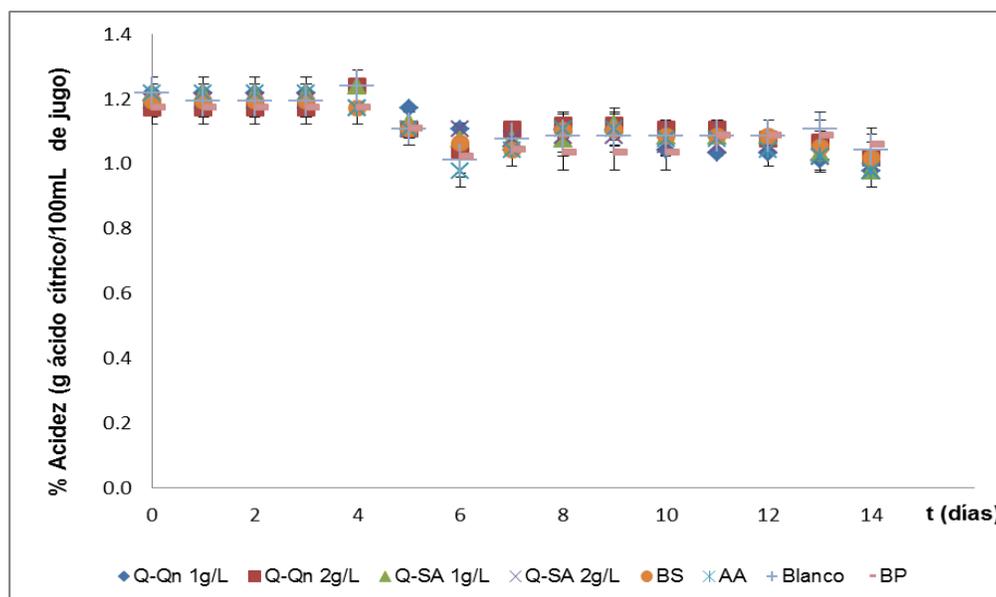
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presentan los resultados experimentales de esta investigación divididos de acuerdo con los siguientes parámetros: físicoquímicos, sensoriales y microbiológicos.

4.1. Parámetros físicoquímicos

4.1.1. Acidez

La acidez en los jugos se evaluó durante los primeros 14 días a la producción del jugo. En la Gráfica 4.1 se observa una tendencia relativamente constante en todos los lotes de jugos durante los primeros 4 días. Posterior a este tiempo se observa una tendencia decreciente en el día 5 y posteriormente un comportamiento constante en los siguientes días.



Significados: Q-Qn.- Mezcla de Quitina-Quitosana; Q-SA.- Quitosana Sigma Aldrich; BS.-Benzoato de sodio 0.05g/L; AA.- Ácido ascórbico; Blanco.- Muestra sin tratamiento; BP.- Blanco pasteurizado

Gráfico 4.1. Comparación en el cambio de porcentaje de acidez total (g de ácido cítrico por cada 100 mL de jugo) en los diferentes lotes de jugo de toronja durante 14 días

La acidez de los jugos de toronja se debe a la presencia del ácido cítrico que representa el 90% de los ácidos totales principalmente y, en menor proporción, a otros ácidos como el ácido málico, oxálico y ascórbico. La proporción de ácidos sobre el total del jugo suele ser aproximadamente del 1.0% (Perrilla, 2012).

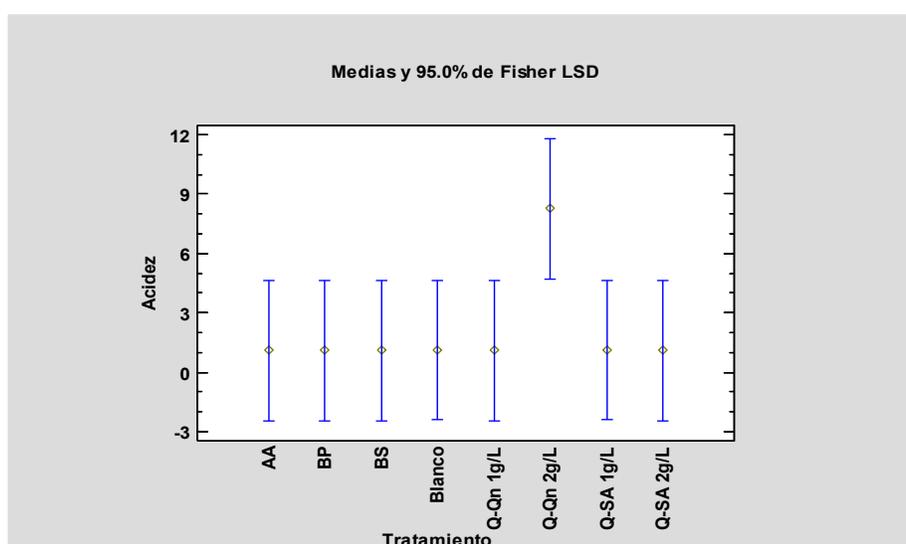
Los lotes de quitosana (Q-Qn y Q-SA 1 g/L) y de ácido ascórbico (AA) no tuvieron un cambio inicial de acidez con respecto al blanco. Por el contrario los adicionados con quitosana (Q-Qn y Q-SA 2 g/L) presentaron una menor acidez, al igual que el blanco pasteurizado y el lote adicionado con benzoato de sodio (Tabla 4.1). Con respecto a los valores finales de acidez, los lotes que presentaron una menor pérdida de acidez fueron el Q-Qn 2 g/L, benzoato de sodio y el blanco pasteurizado.

Tabla 4.1. Valores iniciales y finales de acidez en jugos de toronja

Lote	Acidez (%) Valor inicial Día 0	Acidez (%) Valor final Día 14	Diferencia (%)
Q-Qn 1 g/L	1.217 ± 0.031	0.978 ± 0.026	0.239
Q-Qn 2 g/L	1.173 ± 0.015	1.018 ± 0.031	0.155
Q-SA 1 g/L	1.127 ± 0.010	0.978 ± 0.031	0.149
Q-SA 2 g/L	1.195 ± 0.010	0.978 ± 0.010	0.217
Benzoato de sodio 0.05 g/L (BS)	1.195 ± 0.010	1.018 ± 0.026	0.177
Ácido ascórbico 1 g/L (AA)	1.217 ± 0.031	0.978 ± 0.010	0.239
Blanco	1.217 ± 0.026	1.043 ± 0.010	0.174
Blanco pasteurizado (BP)	1.173 ± 0.031	1.059 ± 0.026	0.114

Significados: Q-Qn.- Mezcla de Quitina-Quitosana; Q-SA.- Quitosana Sigma Aldrich; BS.- Benzoato de sodio 0.05 g/L; AA.- Ácido ascórbico; Blanco.- Muestra sin tratamiento; BP.- Blanco pasteurizado

De acuerdo con el análisis estadístico de varianza (Tabla AIII, Anexo III), las variables de tiempo (días) y tratamiento no tuvieron un efecto estadísticamente significativo sobre el parámetro de acidez con un nivel de significancia del 5.0% ($p < 0.05$). Así mismo, se realizaron pruebas de análisis de medias y de rangos múltiples para el tratamiento de acidez por tratamiento (Gráfico 4.2 y Tabla BIII y CIII, Anexo III) donde se puede observar que el único lote que presentó diferencias significativas fue el de quitina-quitosana en una concentración de 2 g/L (Q-Qn 2g/L).



Significados: Q-Qn.- Mezcla de Quitina-Quitosa; Q-SA.- Quitosana Sigma Aldrich; BS.-Benzoato de sodio 0.05 g/L; AA.- Ácido ascórbico; Blanco.- Muestra sin tratamiento; BP.- Blanco pasteurizado

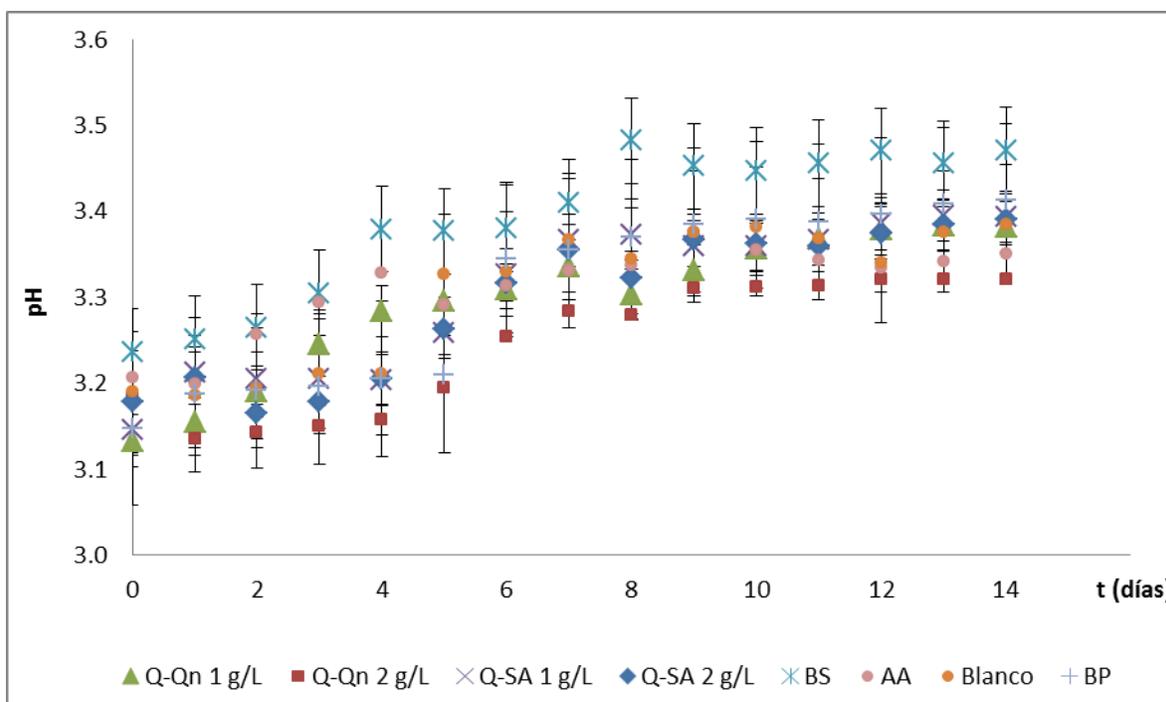
Gráfico 4.2. Comparación de los tratamientos aplicados a jugos de toronja mediante una determinación de diferencia significativa entre los valores de acidez

La quitosana ha mostrado reducir la acidez de jugos de frutas debido a su propiedad de ligar ácidos. En un estudio se encontró que al agregar quitosana en una concentración de 0.015 g/mL a un jugo de uva, el contenido total de acidez fue reducido en un 52.6% reflejado en la reducción de la cantidad de ácido cítrico, tartárico L-málico, ácido oxálico y ácido ascórbico en 56.6, 41.2, 38.8, 36.8 y 6.5% respectivamente (Shahidi y col., 1999). Sin embargo, en este estudio no se

observó ese efecto pudiéndose deber a la baja concentración de quitosana (1 y 2g/L) adicionada a los jugos de toronja.

4.1.2. Valor de pH

Los valores de acidez y de pH están relacionados debido a que al aumentar el pH se ve disminuido el valor de acidez de los alimentos. En el parámetro de pH en los diferentes lotes de toronja se observó una tendencia creciente al transcurrir los días de almacenamiento (Gráfico 4.3) la cual se relaciona con la disminución de la acidez en los diferentes lotes de jugo de toronja.



Significados: Q-Qn.- Mezcla de Quitina-Quitosana; Q-SA.- Quitosana Sigma Aldrich; BS.- Benzoato de sodio 0.05 g/L; AA.- Ácido ascórbico; Blanco.- Muestra sin tratamiento; BP.- Blanco pasteurizado

Gráfico 4.3. Comparación en el cambio de pH en los diferentes lotes de jugo de toronja durante 14 días

Los resultados de la Tabla 4.2 pueden compararse con los obtenidos por Barry-Ryan y col. (2009), quienes en su estudio con jugos de naranja enriquecidos con quitosana de la marca Sigma Aldrich en concentraciones de 0 a 2 g/L los rangos de pH abarcaron un intervalo de 4.1 a 5.7 los cuales fueron comparados con otros

estudios donde el rango de valores de pH en jugos de naranja fueron de 3.05 a 3.35. En este experimento los lotes adicionados de quitosana (Q-Qn y Q-SA 1 y 2g/L) no mostraron un aumento de pH inicial importante con respecto al blanco, lo cual pudo deberse a diferentes factores entre los que destacan 1) los disolventes empleados para disolver la quitosana comercial y experimental, 2) la concentración de dicho compuesto empleado en cada uno de los estudios. Sin embargo, una de las conclusiones a las que se llega en este experimento y en el estudio mencionado con anterioridad es que el aumento de pH se encuentra relacionado proporcionalmente con el deterioro microbiano debido al período de almacenamiento.

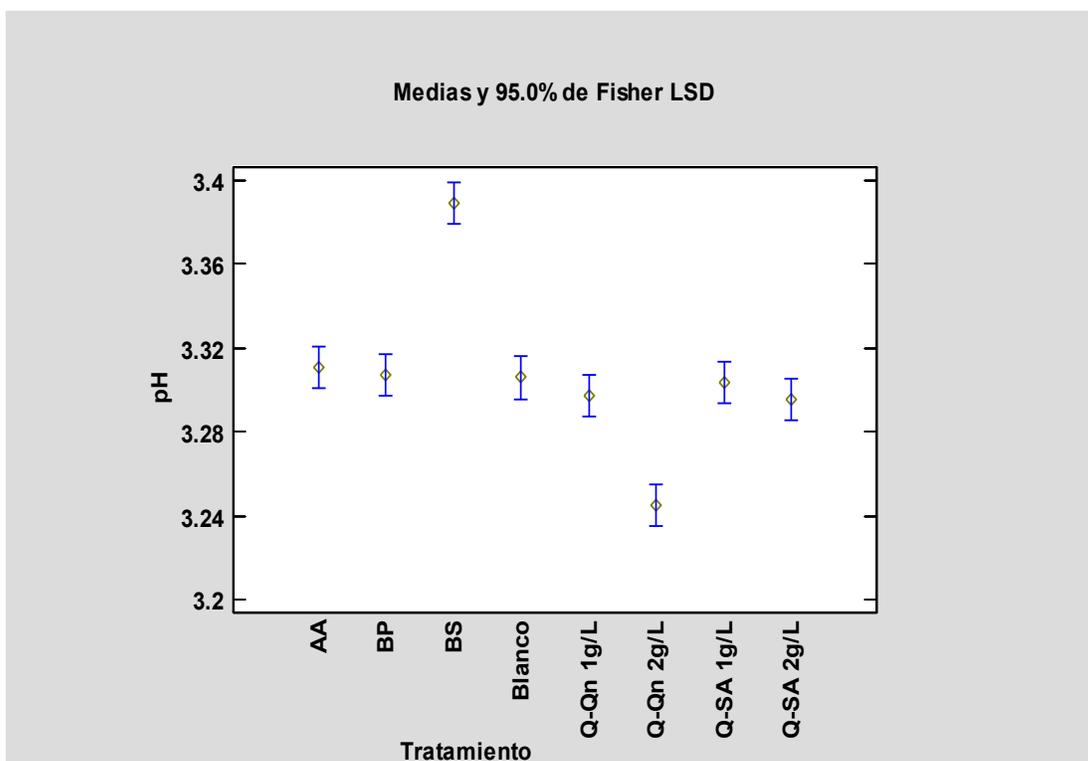
Tabla 4.2. Valores iniciales y finales de pH en jugos de toronja

Lote	pH Valor inicial Día 0	pH Valor final Día 14	Diferencia
Q-Qn 1 g/L	3.133± 0.10	3.382 ± 0.06	0.249
Q-Qn 2 g/L	3.184 ± 0.15	3.321 ± 0.03	0.137
Q-SA 1 g/L	3.146 ± 0.08	3.393 ± 0.22	0.247
Q-SA 2 g/L	3.179 ±0.15	3.391 ± 0.16	0.214
Benzoato de sodio 0.05 g/L (BS)	3.236 ± 0.19	3.471 ± 0.06	0.235
Ácido ascórbico 1 g/L (AA)	3.206 ± 0.05	3.351 ± 0.12	0.145
Blanco	3.190 ± 0.06	3.385 ± 0.05	0.195
Blanco pasteurizado (BP)	3.148 ± 0.09	3.412 ± 0.06	0.264

Significados Q-Qn.- Mezcla de Quitina-Quitosana; Q-SA.- Quitosana Sigma Aldrich; BS.- Benzoato de sodio 0.05 g/L; Blanco.- Muestra sin tratamiento; BP.- Blanco pasteurizado

Así mismo, en ese estudio Barry-Ryan y col. (2009) se demostró que el pH fue significativamente afectado por el tiempo de almacenamiento, así como por los tratamientos de quitosana con diferentes concentraciones ($p < 0.05$).

Esto querría decir que el pH aumentó conforme la concentración de quitosana se incrementó. En este experimento, de acuerdo con el análisis estadístico de varianza (Tabla DIII, Anexo III), las variables de tiempo de almacenamiento (días) y los diferentes tratamientos tuvieron un efecto estadísticamente significativo sobre el parámetro de pH con un nivel de significancia del 5.0% ($p < 0.05$). Las pruebas de análisis de medias y de rangos múltiples para este tratamiento (Gráfico 4.4 y Tabla EIII y FIII, Anexo III) mostraron que las principales diferencias se encontraron principalmente en los lotes de benzoato de sodio (BS) y Quitina-Quitosana 2 g/L que fueron significativamente diferentes a los demás lotes de jugo de toronja, el cual presentó la menor pérdida de pH de todos los lotes al final de los 14 días.



Significados: Q-Qn.- Mezcla de Quitina-Quitosana; Q-SA.- Quitosana Sigma Aldrich; BS.-Benzoato de sodio 0.05 g/L; AA.- Ácido ascórbico; Blanco.- Muestra sin tratamiento; BP.- Blanco pasteurizado

Gráfico 4.4. Prueba de rangos múltiples para el parámetro de pH

4.1.3. Valores de °Bx

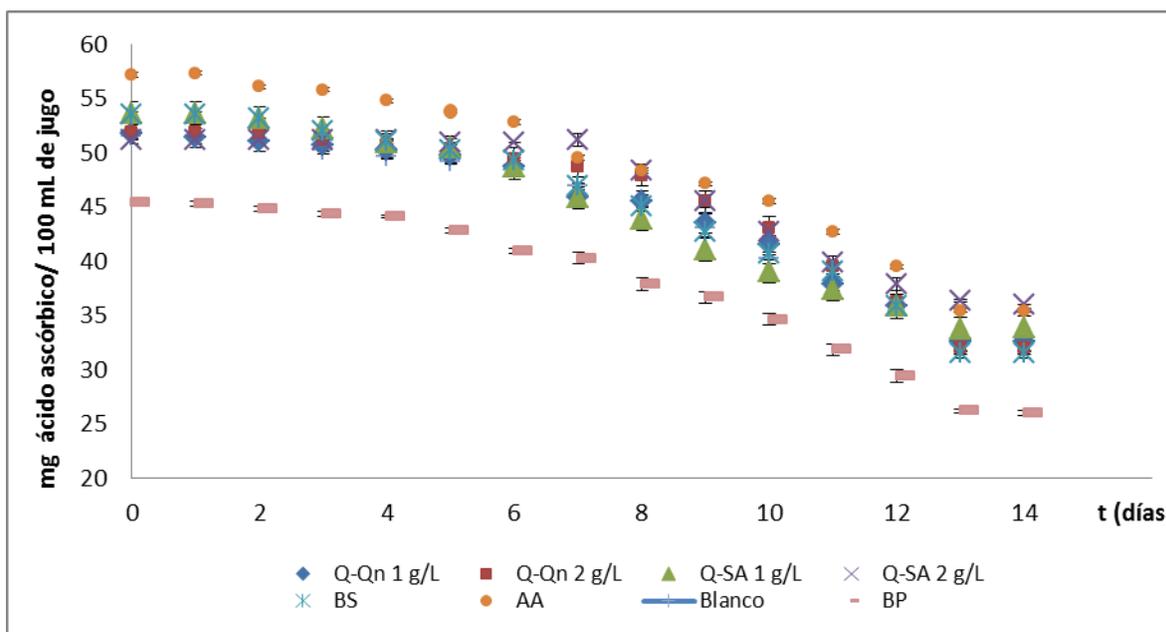
Se cree que la quitosana es capaz de reducir los sólidos solubles totales de jugos de frutas debido a su carga positiva cargada y su habilidad para coagular sólidos suspendidos, incrementando la capacidad de floculación que podría actuar ligando el azúcar (negativamente cargado) (Sapers, 1992). En este experimento se evaluaron los sólidos solubles totales expresados como grados Brix (°Bx) durante 14 días para todos los lotes de jugos, los cuales se mantuvieron constantes con un valor de 10 °Bx. Esto fue contrario a lo encontrado en el estudio de Jabbar y Kareem (2012) donde la quitosana redujo el valor de los grados Brix en un jugo de uva adicionada en concentraciones en un rango de 0.2 a 1 g/L. Por otro lado, Castro y col. (2012) en su estudio sobre jugos con fruta de la pasión observaron en su estudio que al adicionar quitosana el valor de los grados Brix aumentó del 3 al 5%. En ambos estudios se puede observar que el tiempo de almacenamiento no es un factor que influya directamente sobre los sólidos solubles totales en un periodo de 10 a 15 días.

4.1.4. Vitamina C

Como se puede observar en el Gráfico 4.5, la concentración de vitamina C (mg de ácido ascórbico/100 mL de jugo) siguió una tendencia decreciente en todos los lotes de jugos. Inicialmente existió una pérdida de aproximadamente el 25% de vitamina C en el caso de que exista un tratamiento térmico.

La vitamina C es sensible a las reacciones de oxidación, destruyéndose con gran facilidad durante el procesado de los alimentos siendo este parámetro un índice de la calidad de los alimentos procesados. Entre los numerosos factores que pueden influir en los mecanismos de degradación de este compuesto se pueden citar la temperatura, la concentración de azúcar, el pH, el oxígeno, las enzimas, los catalizadores metálicos, la concentración inicial de ácido y la relación ácido ascórbico – ácido dehidroascórbico (su forma oxidada) (Cedeño, 2011).

Otros factores que pueden contribuir a la degradación de las vitaminas durante la vida útil de los alimentos pueden ser el tipo de envase, el tiempo y las condiciones de almacenamiento como la exposición al oxígeno, la luz y el incremento de la temperatura (Cedeño, 2011; Konrad y Grimm, 2007).



Significados: Q-Qn.- Mezcla de Quitina-Quitosa; Q-SA.- Quitosa Sigma Aldrich; BS.- Benzoato de sodio 0.05 g/L; AA.- Ácido ascórbico; Blanco.- Muestra sin tratamiento; BP.- Blanco pasteurizado

Gráfico 4.5. Comparación en el cambio de vitamina C (mg de ácido ascórbico/100mL de jugo) en los diferentes lotes de jugo de toronja durante 14 días

En la Tabla 4.3 se puede observar que el lote con menor contenido de vitamina C al inicio del experimento fue el blanco pasteurizado debido al tratamiento térmico dado en el cual la pérdida inicial de vitamina C fue del 11.9%. Las reacciones de pardeamiento no-enzimático durante tratamientos térmicos producen cambios de color, glúcidos y pérdidas de vitamina C que afectan la calidad de los jugos de frutas (Avalo y col., 2009). Con respecto a los otros lotes comparados con el blanco la mayoría fueron semejantes exceptuando al lote de ácido ascórbico el cual mostró un aumento inicial de vitamina C porque en su formulación se agregó 1 g/L de una solución al 2.0% de este ácido.

Tabla 4.3 Valores iniciales y finales de vitamina C en jugos de toronja

Lote	Vitamina C Valor inicial (mg/100 mL) Día 0	Vitamina C Valor final (mg/100 mL) Día 14	Pérdida (mg/100 mL)
Q-Qn 1 g/L	51.729± 0.350	32.633 ± 0.35	19.096
Q-Qn 2 g/L	51.891 ± 0.228	32.029 ± 0.100	19.826
Q-SA 1 g/L (QSA1)	53.663 ± 0.30	33.842 ± 0.220	17.821
Q-SA 2 g/L (QSA2)	51.246 ±0.30	35.957 ± 0.142	15.289
Benzoato de sodio 0.05 g/L (BS)	53.502 ± 0.228	31.525 ± 0.142	21.977
Ácido ascórbico 1 g/L (AA)	57.209 ± 0.228	35.453 ± 0.570	21.756
Blanco (B)	51.568 ± 0.142	32.633 ± 0.100	18.935
Blanco pasteurizado (BP)	45.445 ± 0.395	25.986 ± 0.247	19.459

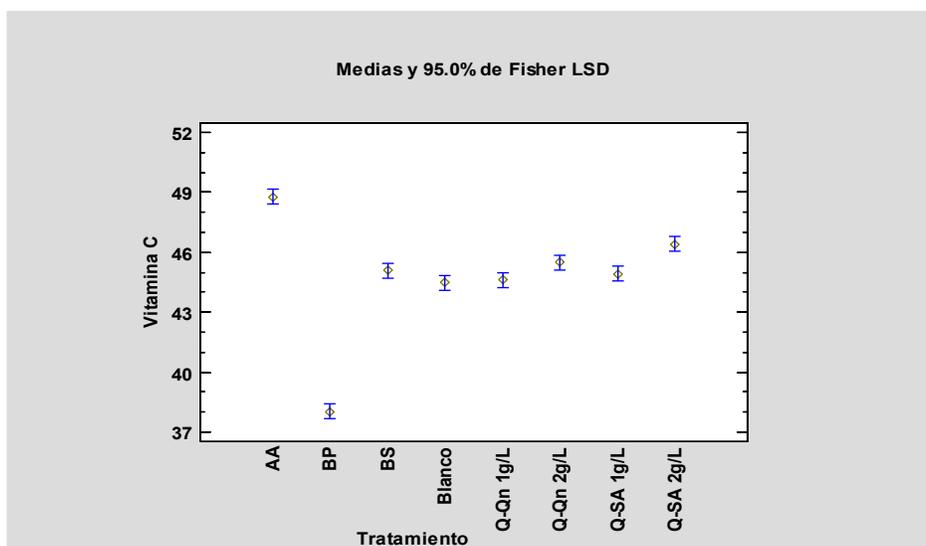
Significados: Q-Qn.- Mezcla de Quitina-Quitosa; Q-SA.- Quitosa Sigma Aldrich; BS.-Benzoato de sodio 0.05 g/L; AA.- Ácido ascórbico; Blanco.- Muestra sin tratamiento; BP.- Blanco pasteurizado

Al final del experimento se compararon las pérdidas de vitamina C al término de los 14 días donde se pudo observar que todos los lotes tuvieron una pérdida similar que va de 15 a 21 mg/100 mL de jugo. Sin embargo, el blanco pasteurizado fue de los lotes con menor contenido de vitamina C al final del periodo de evaluación.

De acuerdo con la *AIJN* (por sus siglas en inglés, *Association of the Industry of Juices and Nectars and Vegetables of the European Union*), el contenido de ácido ascórbico debe de ser mayor a 20 mg/100 mL en jugos cítricos en la fecha de expiración del producto. Este valor es usado para estimar el final de la vida útil de los jugos donde el 50% aproximadamente de ácido ascórbico se ha degradado (Polydera y col., 2003). Con referencia en este valor se puede concluir que todos

los lotes de jugos al final del periodo de evaluación registraron concentraciones de vitamina C mayores por lo que se puede estimar una vida útil de estos productos por un periodo de 14 días. Por otro lado, se deberán de considerar otros parámetros importantes como los resultados microbiológicos.

En el análisis estadístico de varianza (Tabla GIII, Anexo III), las variables de tiempo de almacenamiento (días) y los diferentes tratamientos presentaron un efecto estadísticamente significativo sobre el parámetro de vitamina C con un nivel de significancia del 5.0% ($p < 0.05$). Las pruebas de análisis de medias y de rangos múltiples para este tratamiento (Gráfico 4.6 y Tablas HIII y JIII, Anexo III) mostraron que las principales diferencias se deben principalmente a los lotes de ácido ascórbico (AA), blanco pasteurizado (BP) y Q-SA 2 g/L que fueron estadísticamente diferentes a todos los demás lotes ($p < 0.05$). Por otro lado, los lotes adicionados con quitosana (Q-Qn 1 y 2 g/L y Q-SA 1 g/L) y benzoato de sodio (BS) no mostraron diferencias significativas entre sí.



Significados: Q-Qn.- Mezcla de Quitina-Quitosa; Q-SA.- Quitosana Sigma Aldrich; BS.-Benzoato de sodio 0.05 g/L; AA.- Ácido ascórbico; Blanco.- Muestra sin tratamiento; BP.- Blanco pasteurizado

Gráfico 4.6. Prueba de rangos múltiples para el parámetro de vitamina C

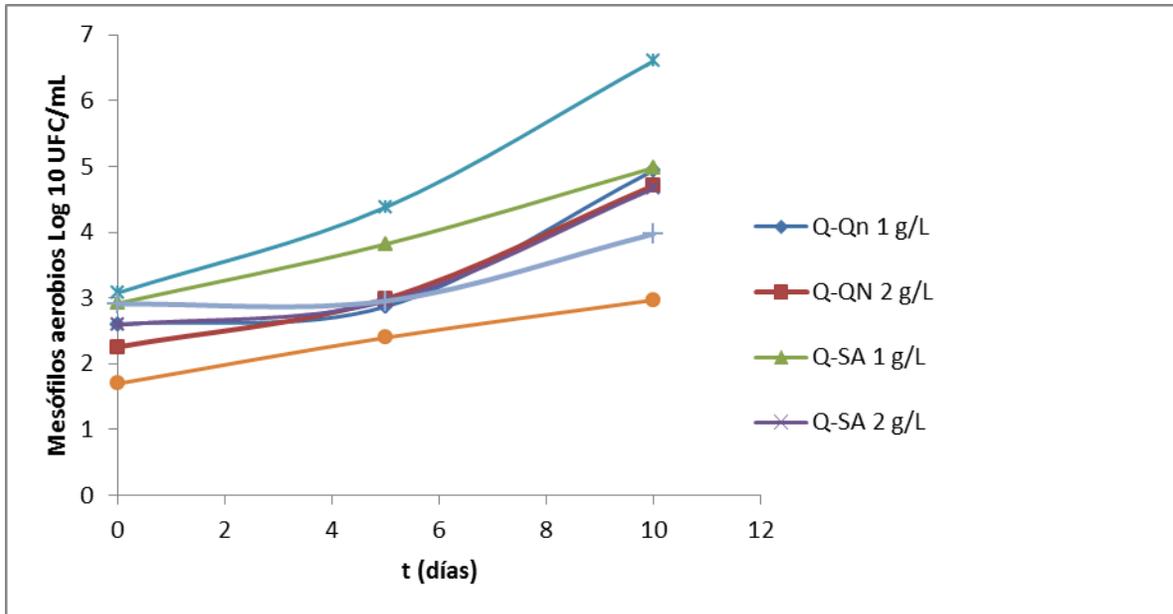
Barry-Ryan y col. (2009) mencionan en su estudio con jugos de naranja que a bajas concentraciones de quitosana (0 a 0.8 g/L) no se afectan los contenidos de ácido ascórbico debido a las propiedades que tiene la quitosana como secuestrante de ácidos.

4.2. Pruebas microbiológicas

4.2.1. Mesófilos aerobios

Para la parte microbiológica de esta investigación se realizaron tres pruebas de mesófilos aerobios a los 0, 5 y 10 días. Como se aprecia el Gráfico 4.7 en el día de inicio del experimento, el tratamiento con menor carga microbiana fue el blanco pasteurizado (BP). Así mismo, al final de este estudio después de los 10 días de almacenamiento del jugo de toronja se observó que el lote que mostró tener mejores resultados microbiológicos fue el blanco pasteurizado con cargas microbianas menores con respecto a los otros lotes. Sin embargo, los lotes adicionados de quitosana experimental y comercial (Q-Qn y Q-SA 1 y 2 g/L), así como el adicionado con benzoato de sodio (0.05 g/L) presentaron un decremento de carga microbiana cuando fueron comparados con el blanco al que no se le proporcionó ningún tratamiento.

En investigaciones anteriores se ha atribuido un efecto antimicrobiano a la quitosana cuando es adicionada en alimentos. Tanvir y col. (2014) realizaron un estudio con quitosana agregada a jugos de naranja como conservador. Los resultados de su experimento señalan que la quitosana actúa como un buen conservador en dosis de 0.5% y 1.0%. Además, concluyen que con la mayor dosis empleada de quitosana el efecto antimicrobiano donde se logra extender la vida de anaquel de un jugo es un promedio de 8 días. Resultados similares fueron obtenidos de esta investigación donde los tratamientos con mayor concentración de quitosana (Q-Qn y Q-SA 2 g/L) presentaron una menor carga microbiana que con los comparados que fueron adicionados en una concentración menor de quitosana (Q-Qn y Q-SA 1 g/L).



Significados: Q-Qn.- Mezcla de Quitina-Quitosa; Q-SA.- Quitosana Sigma Aldrich; BS.- Benzoato de sodio 0.05 g/L; AA.- Ácido ascórbico; Blanco.- Muestra sin tratamiento; BP.- Blanco pasteurizado

Gráfico 4.7. Resultados de prueba microbiológica de mesófilos aerobios en jugos de toronja

Así mismo, estudios en jugo de manzana por Roller y Covill (1999) demostraron que la quitosana en concentraciones de 0.5 a 1 g/L posee propiedades antifúngicas. Devlieghere y col. (2004b) concluyeron en su estudio que la actividad antimicrobiana de la quitosana únicamente se presentará en alimentos con bajo contenido proteínico y bajo contenido de NaCl.

4.3. Pruebas sensoriales

Para las pruebas sensoriales se realizó una prueba triangular con 3 juegos de muestras donde se compararon únicamente las muestras adicionadas con quitina-quitosa y quitosana marca Sigma Aldrich (SA). Las muestras seleccionadas para ser comparadas fueron las siguientes:

- 1) Blanco vs Q-Qn 1 g/L
- 2) Blanco vs Q-Qn 2 g/L

3) Q-Qn 2 g/L vs Q-SA 2 g/L

Los resultados de la Tabla 4.4 muestran el consolidado de respuestas por cada pareja de muestras analizadas y el resultado de respuestas mínimas correctas de las Tablas AII y BII del Anexo II que se emplearon para verificar si existían diferencias significativas entre las muestras con un nivel de significancia del 5%.

Con base en esto se puede observar que las únicas diferencias significativas ($p < 0.05$) sensoriales encontradas fueron entre los lotes del Blanco vs Q-Qn 2 g/L donde los principales comentarios arrojados en esta prueba fueron que se percibía un sabor amargo en las muestras con adición de quitina—quitosana (Q-Qn) en concentraciones de 2 g/L; sin embargo, a las concentraciones de 1 g/L no se percibieron diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al blanco.

Resultados similares se encontraron en otro estudio donde Devlieghere y col. (2004b), demostraron que al aplicar recubrimientos de quitosana en concentraciones al 0.5% en lechugas se desarrollaba un sabor amargo, aunque en fresas no se presentó este fenómeno, por lo que se puede decir que el sabor desarrollado por la quitosana puede depender del alimento al que se le aplica y de la concentración en la cual es adicionada.

Tabla 4.4. Resultados de pruebas triangulares entre diferentes lotes de jugo de toronja

Juego de muestras	Respuestas correctas	Número. de respuestas mínimas*
Blanco vs Q-Qn 1 g/L	16	24
Blanco vs Q-Qn 2 g/L	30	
Q-Qn 2 g/L vs QSA 2 g/L	13	

Significados Q-Qn.- Mezcla de Quitina-Quitosana; Q-SA.- Quitosana Sigma Aldrich; Blanco.- Muestra sin tratamiento

*Donde; Número mínimo de respuestas correctas con un nivel de significancia del 5% de acuerdo con las Tablas AII y BII del Anexo II

Barry-Ryan y col. (2009) encontraron que mientras mayor fuese la concentración adicionada de quitosana en jugos era menor el grado de aceptabilidad en los parámetros sensoriales debido al sabor amargo de la quitosana, encontrándose una calificación mayor en el sabor general del jugo cuando la concentración de quitosana resultó ser la más baja (0.4 g/L). Así mismo, concluyeron que los jugos enriquecidos con quitosana fueron considerados aceptables, caso contrario a los que tuvieron un proceso de pasteurización donde se afectaba negativamente el sabor de los jugos.

En este experimento se encontró que el lote de blanco pasteurizado (BP) fue el único lote que presentó un cambio en la coloración del jugo. Esto puede deberse a que las temperaturas elevadas favorecen reacciones de pardeamiento no enzimático dando lugar a compuestos altamente reactivos que pueden reaccionar con algunas vitaminas, oxidándolas y produciendo compuestos oscuros que modifican el color, aroma y sabor de la fruta. Por ejemplo, en la degradación anaerobia de la vitamina C, en medios muy ácidos y con aplicación de calor se produce el ácido 2-cetogulónico, a partir del cual se produce el furfural que es el intermediario de las reacciones de pardeamiento no enzimático (Osorio, 2008).

Por otro lado, durante el tratamiento con calor los glúcidos presentes como sacarosa pueden hidrolizarse en fructosa y glucosa, siendo estos monosacáridos glúcidos reductores que pueden participar en las reacciones de caramelización y de Maillard cuando hay aminoácidos presentes (Avalo y col., 2009).

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

De acuerdo con el objetivo planteado en esta investigación el cual era el de “Evaluar el efecto de la adición de una mezcla de biopolímeros de quitina-quitosana obtenida del cefalotórax del camarón en jugos de toronja, corroborando su comportamiento a través del tiempo mediante parámetros fisicoquímicos (pH, acidez, °Bx y vitamina C), microbiológicos (mesófilos aerobios) y sensoriales”, a continuación se presentan las conclusiones derivadas de la experimentación realizada.

- Las adiciones de quitina-quitosana a dos diferentes concentraciones (1 g/L y 2 g/L) no mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el parámetro de acidez, contrario a otros estudios que demostraron que la adición de quitosana disminuye la acidez de los alimentos. El tratamiento de quitina-quitosana en concentración de 2 g/L presentó diferencias significativas al ser el tratamiento con menor variación en el pH.
- En cuanto al parámetro de vitamina C, la adición de quitina-quitosana en diferentes concentraciones (1 g/L y 2 g/L) no mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) en el contenido de vitamina C contrario al blanco que tuvo un proceso térmico de pasteurización el cual tuvo una disminución significativa ($p < 0.05$) de este parámetro lo que afecta la calidad nutritiva de los jugos de toronja.
- Sensorialmente la adición de quitina-quitosana en concentraciones mayores a 1 g/L afectaron el perfil sensorial de los jugos de toronja con un aumento en el sabor amargo que no fue agradable por lo que su uso deberá de limitarse a concentraciones menores o iguales a 1 g/L.

- Puede concluirse que la adición de quitina-quitosana no impacta el comportamiento de ninguno de los parámetros fisicoquímicos pero muestra buenos resultados al disminuir la carga microbiana casi 3 ciclos logarítmicos lo que indica una buena oportunidad para sustituir un tratamiento térmico que produce cambios organolépticos y nutritivos (disminución de vitamina C).

5.2. Recomendaciones

Con base en esta experimentación se sugiere continuar la investigación hacia los siguientes rubros:

- Estudiar la combinación de la adición de mezclas de quitina-quitosana en concentraciones de 1 g/L con tratamientos no térmicos de procesamiento como altas presiones hidrostáticas, radiación UV y campos eléctricos pulsantes de alta Intensidad
- Realizar estudios microbiológicos de hongos y levaduras y de algunos otros microorganismos específicos de jugos para aumentar el conocimiento de la quitosana como compuesto antimicrobiano natural
- Estudiar cómo afecta la adición de mezclas de quitina-quitosana en la reología de los jugos
- Realizar estudios para evaluar la clarificación de jugos con estas mezclas de polímeros.

ANEXOS

ANEXO I. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS

Tabla A1. Ejemplo para el cálculo de resultados de cuenta en placa, utilizado ensayos por duplicado (Rango de sensibilidad: 25 a 250 colonias) (Camacho y col., 2009)

Serie	Diluciones			Resultado UFC/ mL	Observaciones
	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴		
A B	>250 >250	178 190	16 17	18 x 10 ⁴	Si están dentro del rango se promedian los datos de la dilución
A B	>250 >250	220 138	25 28	23 x 10 ⁴	Se promedian los datos de las diluciones que estén dentro del rango y se promedian ambos resultados
A B	18 14	2 0	0 0	16 x 10 ² Valor estimado	Se promedian datos de la dilución 10 ⁻² aunque están fuera de rango ya que son los más cercanos y se anota "valor estimado"
A B	>250 >250	>250 >250	512 495	50 x 10 ⁵ valor estimado	Se toma la más alta que se pueda contar y se anota "valor estimado"
A B	0 0	0 0	0 0	>100 Valor estimado	Se reporta como <1 en la dilución más baja que se utilizó, en este caso 10 ⁻² . Se registra como "sensibilidad del método"
A B	>250 >250	216 262	23 42	28 x 10 ⁴	Se consideran las placas que están dentro del rango y se promedian con sus duplicados aunque éstos salgan del rango. Finalmente, se promedian los resultados de ambas diluciones

*Las cifras sombreadas son las que se consideran adecuadas para realizar los cálculos

ANEXO II. PRUEBAS TRIANGULARES

Tabla AII. Valores mínimos de juicios correctos para establecer diferencias significativas en diferentes niveles de probabilidad para pruebas triangulares ($p=1/2$) (Stone y Sidel, 2004)

Número de pruebas (n)	Niveles de probabilidad						
	0.05	0.04	0.03	0.02	0.01	0.005	0.001
7	7	7	7	7	7	--	--
8	7	7	8	8	8	8	--
9	8	8	8	8	9	9	--
10	9	9	9	9	10	10	10
11	9	9	10	10	10	11	11
12	10	10	10	10	11	11	12
13	10	11	11	11	12	12	13
14	11	11	11	12	12	13	13
15	12	12	12	12	13	13	14
16	12	12	13	13	14	14	15
17	13	13	13	14	14	15	16
18	13	14	14	14	15	15	16
19	14	14	15	15	15	16	17
20	15	15	15	16	16	17	18
21	15	15	16	16	17	17	18
22	16	16	16	17	17	18	19
23	16	17	17	17	18	19	20
24	17	17	18	18	19	19	20
25	18	18	18	19	19	20	21
26	18	18	19	19	20	20	22
27	19	19	19	20	20	21	22
28	19	20	20	20	21	22	23
29	20	20	21	21	22	22	24
30	20	21	21	22	22	23	24
31	21	21	22	22	23	24	25
32	22	22	22	23	24	24	26
33	22	23	23	23	24	25	26
34	23	23	23	24	25	25	27
35	23	24	24	25	25	26	27
36	24	24	25	25	26	27	28
37	24	25	25	26	26	27	29

Tabla BII. Valores mínimos de juicios correctos para establecer diferencias significativas en diferentes niveles de probabilidad para pruebas triangulares ($p=1/2$) (Stone y Sidel, 2004)

Número de pruebas (n)	Niveles de probabilidad						
	0.05	0.04	0.03	0.02	0.01	0.005	0.001
38	25	25	26	26	27	28	29
39	26	26	26	27	28	28	30
40	26	27	27	27	28	29	30
41	27	27	27	28	29	30	31
42	27	28	28	29	29	30	32
43	28	28	29	29	30	31	32
44	28	29	29	30	31	31	33
45	29	29	30	30	31	32	34
46	30	30	30	31	32	33	34
47	30	30	31	31	32	33	35
48	31	31	31	32	33	34	36
49	31	32	32	33	34	34	36
50	32	32	33	33	34	35	37
60	37	38	38	39	40	41	43
70	43	43	44	45	46	47	49
80	48	49	49	50	51	52	55
90	54	54	55	56	57	58	61
100	59	60	60	61	63	64	66

Figura AII. Cuestionario empleado por los panelistas para las pruebas triangulares

Nombre: _____

Fecha: _____

Instrucciones: Frente a tí hay 3 juegos con muestras codificadas respectivamente, dos de ellas son iguales y una es diferente. Empezando por la izquierda, escribe el número de código de cada muestra, evalúalas sensorialmente y circula el código de la muestra que es diferente a las otras dos. Enjuágate bien la boca entre cada dos soluciones. Puedes reevaluar las muestras, si no encuentras diferencia aparente; adivina lo mejor que puedas para elegirla.

Si tienes alguna duda, por favor pregunta antes de empezar la prueba.

Juego 1

Juego 2

Juego 3

Comentarios:

Tabla CII. Diseño experimental de la prueba triangular Blanco vs Q-Qn 1g/L

# Panelista	Producto	Códigos por panelista				
1	B	544	A	618	A	610
2	A	124	B	336	A	941
3	B	569	B	357	A	803
4	A	881	A	439	B	946
5	A	612	B	177	B	106
6	B	586	A	691	B	100
7	A	842	B	847	A	640
8	B	448	B	811	A	874
9	B	479	A	519	B	756
10	A	936	B	858	B	563
11	A	975	A	505	B	745
12	B	700	A	224	A	556
13	A	507	B	228	A	148
14	B	438	A	525	A	676
15	B	729	B	186	A	961
16	A	989	A	789	B	410
17	A	973	B	992	B	237
18	B	526	A	167	B	206
19	A	642	A	576	B	806
20	A	416	B	564	B	903
21	B	721	A	805	A	562
22	B	629	B	911	A	693
23	B	168	A	927	B	145
24	A	641	B	709	A	766
25	B	247	B	681	A	712
26	A	214	B	338	A	809
27	A	590	A	252	B	853
28	B	455	A	405	A	653
29	A	663	B	980	B	218
30	B	828	A	934	B	454
31	B	553	B	216	A	714
32	A	256	A	428	B	761
33	A	300	B	287	B	763
34	B	152	A	591	A	683
35	A	294	B	364	A	476
36	B	829	A	754	B	296

A=Muestra sin tratamiento (Blanco)

B: Muestra Q-Qn 1g/L

*Color azul: Señala cual es la muestra que es diferente en cada tercia

Tabla DII. Diseño experimental de la pruebas triangular Blanco vs Q-Qn 2 g/L

# Panelista	Producto	Códigos por panelista				
1	B	892	A	360	B	604
2	A	440	A	767	B	107
3	A	621	B	713	A	620
4	B	498	A	912	A	722
5	A	839	B	758	B	483
6	B	244	B	752	A	968
7	A	790	B	947	A	695
8	A	634	A	518	B	333
9	A	101	B	402	B	271
10	B	895	B	504	A	344
11	B	863	A	857	A	443
12	B	568	A	202	B	137
13	A	129	A	597	B	649
14	A	617	B	978	A	595
15	A	856	B	515	B	527
16	B	318	A	723	A	747
17	B	246	B	692	A	827
18	B	625	A	650	B	466
19	B	678	A	261	B	797
20	A	111	B	361	B	684
21	B	977	A	158	A	297
22	A	368	A	922	B	859
23	B	409	B	420	A	770
24	A	241	B	351	A	972
25	B	706	A	633	A	894
26	B	203	B	319	A	666
27	B	149	A	908	B	329
28	A	808	B	464	B	248
29	A	451	A	984	B	492
30	A	441	B	995	A	931
31	A	698	A	549	B	546
32	B	910	A	817	A	861
33	B	234	A	169	B	543
34	A	732	B	914	B	759
35	A	970	B	127	A	878
36	B	746	B	341	A	779

A=Muestra sin tratamiento (Blanco)

B: Muestra Q-Qn 2 g/L

*Color azul: Señala cual es la muestra que es diferente en cada tercia

Tabla EII. Diseño experimental de la prueba triangular Q-Qn 2 g/L vs Q-SA 2 g/L

# Panelista	Producto	Códigos por panelista				
1	B	544	A	618	A	610
2	A	124	B	336	A	941
3	B	569	B	357	A	803
4	A	881	A	439	B	946
5	A	612	B	177	B	106
6	B	586	A	691	B	100
7	A	842	B	847	A	640
8	B	448	B	811	A	874
9	B	479	A	519	B	756
10	A	936	B	858	B	563
11	A	975	A	505	B	745
12	B	700	A	224	A	556
13	A	507	B	228	A	148
14	B	438	A	525	A	676
15	B	729	B	186	A	961
16	A	989	A	789	B	410
17	A	973	B	992	B	237
18	B	526	A	167	B	206
19	A	642	A	576	B	806
20	A	416	B	564	B	903
21	B	721	A	805	A	562
22	B	629	B	911	A	693
23	B	168	A	927	B	145
24	A	641	B	709	A	766
25	B	247	B	681	A	712
26	A	214	B	338	A	809
27	A	590	A	252	B	853
28	B	455	A	405	A	653
29	A	663	B	980	B	218
30	B	828	A	934	B	454
31	B	553	B	216	A	714
32	A	256	A	428	B	761
33	A	300	B	287	B	763
34	B	152	A	591	A	683
35	A	294	B	364	A	476
36	B	829	A	754	B	296

A=Muestra Q-Qn 2 g/L

B: Muestra Q-SA 2 g/L

*Color azul: Señala cual es la muestra que es diferente en cada tercia

ANEXO III. RESULTADOS DE PRUEBAS ESTADÍSTICAS

La Tabla AIII descompone la variabilidad de ACIDEZ en contribuciones debidas a varios factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que ningún valor-P es menor que 0.05, ninguno de los factores tiene un efecto estadísticamente significativo sobre ACIDEZ con un 95.0% de nivel de confianza.

Tabla AIII. ANOVA del parámetro de acidez en jugos de toronja

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Tratamiento	668.10	7	95.44	1.00	0.43
B: Tiempo	1325.96	14	94.71	0.99	0.47
RESIDUOS	9336.22	98	95.27		
TOTAL (CORREGIDO)	11330.30	119			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual (GI, grados de libertad)

En la Tabla BIII se identificaron 2 grupos homogéneos según la alineación de las X en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X. Por lo que la única muestra diferente se puede decir que es el lote de quitina-quitosana en una concentración de 2 g/L.

Tabla BIII. Pruebas de rangos múltiples para el parámetro de acidez por tratamiento

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tratamiento	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
BP	15	1.097	2.5201	X
AA	15	1.106	2.5201	X
Q-SA 2 g/L	15	1.106	2.5201	X
BS	15	1.114	2.5201	X
Q-Qn 1 g/L	15	1.116	2.5201	X
Blanco	15	1.121	2.5201	X
Q-SA 1 g/L	15	1.123	2.5201	X
Q-Qn 2 g/L	15	8.246	2.5201	X

Las Tabla CIII aplican un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. El asterisco que se encuentra al lado de los 7 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

Tabla CIII. Pruebas de rangos múltiples para el parámetro de acidez por tratamiento

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
AA – BP		0.0088	7.072
AA – BS		-0.0082	7.072
AA - Blanco		-0.0154667	7.072
AA - Q-Qn 1 g/L		-0.0100667	7.072
AA - Q-Qn 2 g/L	*	-7.1408	7.072
AA - Q-SA 2 g/L		-0.0007	7.072
BP – BS		-0.0170	7.072
BP - Blanco		-0.0243	7.072
BP - Q-Qn 1 g/L		-0.0189	7.072
BP - Q-Qn 2 g/L	*	-7.1496	7.072
BP - Q-SA 1 g/L		-0.0267	7.072
BP - Q-SA 2 g/L		-0.0095	7.0727
BS - Blanco		-0.0073	7.0727
BS - Q-Qn 1 g/L		-0.0019	7.0727
BS - Q-Qn 2 g/L	*	-7.1326	7.0727
BS - Q-SA 1 g/L		-0.0097	7.0727
BS - Q-SA 2 g/L		0.0075	7.0727
Blanco - Q-Qn 1 g/L		0.0054	7.0727
Blanco - Q-Qn 2 g/L	*	-7.12533	7.0727
Blanco - Q-SA 1 g/L		-0.0025	7.0727
Blanco - Q-SA 2 g/L		0.0148	7.0727
Q-Qn 1 g/L - Q-Qn 2 g/L	*	-7.13073	7.0727
Q-Qn 1 g/L - Q-SA 1 g/L		-0.0079	7.0727
Q-Qn 1 g/L - Q-SA 2 g/L		0.0094	7.0727
Q-Qn 2 g/L - Q-SA 1 g/L	*	7.12287	7.0727
Q-Qn 2 g/L - Q-SA 2 g/L	*	7.14013	7.0727
Q-SA 1 g/L - Q-SA 2 g/L		0.0173	7.0727

* indica una diferencia significativa

La Tabla DIII descompone la variabilidad de pH en contribuciones debidas a varios factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que dos valores-P son menores que 0.05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre pH con un 95.0% de nivel de confianza.

Tabla DIII. ANOVA del parámetro de pH en jugos de toronja

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tratamiento	0.162	7	0.023	30.85	0.00
B:Tiempo	0.687	14	0.049	65.46	0.00
RESIDUOS	0.073	98	0.0007		
TOTAL (CORREGIDO)	0.922	119			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual (GI, grados de libertad)

En la Tabla EIII se han identificado tres grupos homogéneos según la alineación de las X en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X.

Tabla EIII. Pruebas de Múltiple Rangos para pH por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tratamiento	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Q-Qn 2 g/L	15	3.2453	0.0071	X
Q-SA 2 g/L	15	3.2954	0.0071	X
Q-Qn 1 g/L	15	3.2973	0.0071	X
Q-SA 1 g/L	15	3.3039	0.0071	X
Blanco	15	3.3059	0.0071	X
BP	15	3.3068	0.0071	X
AA	15	3.3108	0.0071	X
BS	15	3.3891	0.0071	X

La Tabla FIII aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. El asterisco que se encuentra al lado de los trece pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. El método

empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

Tabla FIII. Pruebas de Múltiple Rangos para pH por Tratamiento

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
AA – BP		0.004	0.0198
AA – BS	*	-0.0782667	0.0198
AA – Blanco		0.00493333	0.0198
AA - Q-Qn 1 g/L		0.0134667	0.0198
AA - Q-Qn 2 g/L	*	0.0654667	0.0198
AA - Q-SA 1 g/L		0.00686667	0.0198
AA - Q-SA 2 g/L		0.0154	0.0198
BP – BS	*	-0.0822667	0.0198
BP – Blanco		0.000933333	0.0198
BP - Q-Qn 1 g/L		0.00946667	0.0198
BP - Q-Qn 2 g/L	*	0.0614667	0.0198
BP - Q-SA 1 g/L		0.00286667	0.0198
BP - Q-SA 2 g/L		0.0114	0.0198
BS – Blanco	*	0.0832	0.0198
BS - Q-Qn 1 g/L	*	0.0917	0.0198
BS - Q-Qn 2 g/L	*	0.1437	0.0198
BS - Q-SA 1 g/L	*	0.0851	0.0198
BS - Q-SA 2 g/L	*	0.0937	0.0198
Blanco - Q-Qn 1 g/L		0.0085	0.0198
Blanco - Q-Qn 2 g/L	*	0.0605	0.0198
Blanco - Q-SA 1 g/L		0.0019	0.0198
Blanco - Q-SA 2 g/L		0.0105	0.0198
Q-Qn 1 g/L - Q-Qn 2 g/L	*	0.0520	0.0198
Q-Qn 1 g/L - Q-SA 1 g/L		-0.0066	0.0198
Q-Qn 1 g/L - Q-SA 2 g/L		0.0019	0.0198
Q-Qn 2 g/L - Q-SA 1 g/L	*	-0.0586	0.0198
Q-Qn 2 g/L - Q-SA 2 g/L	*	-0.0501	0.0198
Q-SA 1 g/L - Q-SA 2 g/L		0.0085	0.0198

* indica una diferencia significativa

La Tabla GIII descompone la variabilidad de Vitamina C en contribuciones debidas a varios factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que dos valores-P son menores que 0.05, estos factores

tienen un efecto estadísticamente significativo sobre Vitamina C con un 95.0% de nivel de confianza.

Tabla GIII. Análisis de varianza (ANOVA) del parámetro de vitamina C en jugos de toronja

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tratamiento	970.657	7	138.665	133.19	0.0000
B:Tiempo	5646.500	14	403.322	387.40	0.0000
RESIDUOS	102.027	98	1.0411		
TOTAL (CORREGIDO)	6719.190	119			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual (Gl, grados de libertad)

En la Tabla HIII, se han identificado 5 grupos homogéneos según la alineación de las X en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X.

Tabla HIII. Pruebas de rangos múltiples para vitamina C por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tratamiento	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
BP	15	38.0397	0.2634	X
Blanco	15	44.4938	0.2634	X
Q-Qn 1 g/L	15	44.6120	0.2634	X
Q-SA 1 g/L	15	44.9115	0.2634	XX
BS	15	45.0900	0.2634	XX
Q-Qn 2 g/L	15	45.4875	0.2634	X
Q-SA 2 g/L	15	46.3980	0.2634	X
AA	15	48.7751	0.2634	X

La Tabla JIII un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. El asterisco que se encuentra al lado de los 20 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5.0% al

decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

Tabla JIII. Pruebas de Múltiple Rangos para vitamina C por Tratamiento

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
AA - BP	*	10.7353	0.7394
AA - BS	*	3.6851	0.7394
AA - Blanco	*	4.2813	0.7394
AA - Q-Qn 1 g/L	*	4.1631	0.7394
AA - Q-Qn 2 g/L	*	3.2875	0.7394
AA - Q-SA 1 g/L	*	3.8635	0.7394
AA - Q-SA 2 g/L	*	2.3771	0.7394
BP - BS	*	-7.0503	0.7394
BP - Blanco	*	-6.4541	0.7394
BP - Q-Qn 1 g/L	*	-6.5723	0.7394
BP - Q-Qn 2 g/L	*	-7.4478	0.7394
BP - Q-SA 1 g/L	*	-6.8718	0.7394
BP - Q-SA 2 g/L	*	-8.35827	0.7394
BS - Blanco		0.5962	0.7394
BS - Q-Qn 1 g/L		0.478	0.7394
BS - Q-Qn 2 g/L		-0.3975	0.7394
BS - Q-SA 1 g/L		0.1784	0.7394
BS - Q-SA 2 g/L	*	-1.308	0.7394
Blanco - Q-Qn 1 g/L		-0.1182	0.7394
Blanco - Q-Qn 2 g/L	*	-0.9937	0.7394
Blanco - Q-SA 1 g/L		-0.4177	0.7394
Blanco - Q-SA 2 g/L	*	-1.9042	0.7394
Q-Qn 1 g/L - Q-Qn 2 g/L	*	-0.8755	0.7394
Q-Qn 1 g/L - Q-SA 1 g/L		-0.2995	0.7394
Q-Qn 1 g/L - Q-SA 2 g/L	*	-1.7860	0.7394
Q-Qn 2 g/L - Q-SA 1 g/L		0.5760	0.7394
Q-Qn 2 g/L - Q-SA 2 g/L	*	-0.9105	0.7394
Q-SA 1 g/L - Q-SA 2 g/L	*	-1.48647	0.7394

* indica una diferencia significativa

ANEXO V. TRATAMIENTO DE RESIDUOS

Los residuos producidos en esta investigación se trataron de la manera como sigue.

a1) Residuos de materia orgánica

Los residuos orgánicos generados en esta investigación fueron principalmente cáscaras de toronja las cuales fueron desechadas en los contenedores de la Facultad de Química de la UNAM como residuos de tipo biodegradable.

a2) Tratamiento de residuos de Vitamina C

Para el residuo de vitamina C en dicha determinación se empleó como valorante 2,6 diclorofenolindofenol, por lo cual, los desechos se llevaron a la neutralidad midiendo su pH con un potenciómetro. Después de esto con ayuda de carbón activado se llevó a cabo una decoloración dejando la mezcla con agitación durante 30 minutos. El carbón activado gastado fue enviado a la Unidad de Gestión Ambiental de la Facultad de Química para su disposición controlada y el fluido residual se dispuso en el drenaje como no peligroso.



Figura AIV. Tratamiento de residuos de Vitamina C

a3) Tratamiento para residuos de acidez

Para la determinación de acidez de los lotes de jugo de toronja se empleó como reactivo hidróxido de sodio 0.1N, por lo cual para los residuos de esta prueba se determinó el pH con ayuda de un potenciómetro y se aseguró de que el pH fuera de 7.0 para su eliminación al drenaje. En caso de que no se tuviera este pH se empleó la cantidad necesaria de NaOH o HCl para llegar a la neutralidad.

BIBLIOGRAFÍA

- Adarme, C. T. y Rincones, M. P. 2008. Evaluación de cuatro antimicrobianos para el control de levaduras contaminantes de un proceso de fermentación de ácido cítrico. Tesis profesional. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá, Colombia.
- Anónimo. 2010. Pasteurización. Procesado de alimentos. Consultado el 5 de septiembre de 2014. Disponible en: [http://web.udl.es/usuaris/w3511782/Procesos e instalaciones/9.Pasteurizacion files/9%20-%20Pasteurizacion.pdf](http://web.udl.es/usuaris/w3511782/Procesos_e_instalaciones/9.Pasteurizacion_files/9%20-%20Pasteurizacion.pdf)
- Anónimo. 2012. Microorganismos de alteración o deterioro. Consultado el 4 de septiembre de 2014. Disponible en: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/4Alteracion_6541.pdf
- Antonio-Gutiérrez, O., Palou, E., López-Malo, A. 2012. Equipos para tratamiento de alimentos con radiación UV. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos 6 (2); 149-159.
- Avalo, B., Pérez, S., Tovar, M. 2009. Caracterización preliminar del proceso de concentración del jugo natural de naranja en un evaporador de tres efectos. Consultado el 27 de enero de 2015. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442009001100007
- Baduí, S., Valdés, S., Gálvez, A., Flores, I., González, A., Quirasco, M., López-Munguía, A., Guerrero, I., López, E., Armenta, R., Ponce, E., Montejano, J., Valle, P., Barrios, A., de la Barrera, A. 2006. Química de los alimentos. Editorial Pearson Educación, 4ta Ed. Pp. 622-623. México.
- Barry-Ryan, C. Martin-Diana, A., Rico, A., Barat, J. 2009. Orange juices enriched with chitosan: Optimisation for extending the shelf-life. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 10, 590-600.
- Borja, A., Alcívar, A., Santacruz, S. 2012. Desarrollo de una bebida de *Vaccinium floribundum* Kunth con aplicación de luz ultravioleta como método de pasteurización. Vitae, 19 (1), 165-167.
- Calderón-Miranda, M., González, M. F., Barbosa-Cánovas, G. V., Swanson, B. G. 1998. Métodos no térmicos para procesamiento de alimentos: variables e inactivación microbiana. Brazilian Journal of Food Technology, 1 (1,2), 3-11.
- Camacho, A., Giles, M., Ortegón, A., Palao, M., Serrano, B. y Velázquez, O. 2009. Técnicas para el análisis microbiológico de alimentos. 2ª ed. Facultad de Química, UNAM. México.

- Caprile, M. 2005. Obtención y utilización de quitina y quitosano a partir de desechos de crustáceos. En libro de resúmenes del Congreso Mundial ISWA 2005: "Hacia un sistema integral de residuos sólidos urbanos". Centro de exposiciones de la rural, Buenos Aires, República Argentina.
- Castañeda, S., Figueroa, A. A., García, E., González, S. L., Trejo, G. M. 1997. Elaboración de quitosano en cápsulas como fibra dietética a partir de los residuos del procesamiento del camarón. Trabajo terminal. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. México, D.F. México.
- Castro, R., Faria, S., Bernardes, R., Cardoso, L., Miranda, M. 2012. Clarification of passion fruit juice with chitosan: Effects of coagulation process. *Process Biochemistry*, 47, 467-471.
- Cavalcante, A., Montenegro, C., Montenegro, T. 2008. Potencial biotecnológico de quitosana em sistemas de conservação de alimentos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 9(5), 435-351.
- Cedeño, L. A. 2011. Degradación del ácido ascórbico en la pasteurización de bebidas tipo néctar de durazno. Tesis de Posgrado en Ciencia Alimentaria. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción. Guayaquil, Ecuador. Pp. 16-20.
- Chacón, L. 2011. Aplicación de tecnologías alternativas para el procesamiento de jugos de fruta. Facultad de Ciencias Químicas. Coahuila. *Ciencia Abierta*. Vol. 27.
- Chhabra, P. 2004. Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad de Georgia. Athens, Georgia, EE.UU.
- Codex Stan 247. 2005. Norma general del Codex para zumos (jugos) y néctares de frutas. Consultado el 27 de enero de 2015. Disponible en: http://www.google.com.mx/url?url=http://www.codexalimentarius.org/input/download/standards/10154/CXS_247s.pdf&rct=j&frm=1&q=&esrc=s&sa=U&ei=6i3ZVKayM5KYyATVuYGoDg&ved=0CBMQFjAA&usq=AFQjCNGhsyOZqBN9W1qR92J_kKzr1GHROw
- Collet, L., Shigeoka, D., Badolato, G., Tadini, C. 2005. A kinetic study on pectinesterase inactivation during continuous pasteurization of orange juice. *Journal of Food Engineering*, 69, 125-129.
- Daoudi, L. 2004. Efecto de las altas presiones hidrostáticas sobre el gazpacho y zumo de uva. Tesis de Doctorado en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Autónoma de Barcelona, Facultad de Veterinaria. Barcelona, España.
- Devlieghere, F., Vermeiren, L., Debevere. 2004a. New preservation technologies: Possibilities and limitations. *International Dairy Journal*, 14, 273-285.
- Devlieghere, F., Vermeiren, L., Debevere. 2004b. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology*, 21, 703-714.
- DOF. 1968. NMX-F-018-1968. Alimentos. Calidad para jugo de toronja. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas. Poder Ejecutivo Federal. México, D.F. México.

- DOF. 1978a. NMX-F-317-S-19778. Determinación de pH en alimentos. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas. Poder Ejecutivo Federal. México, D.F. México.
- DOF. 1978b. NMX-F-102-S-1978. Determinación de la acidez titulable en productos elaborados a partir de frutas y hortalizas. Norma Mexicana. Dirección General de Normas. Poder Ejecutivo Federal. México, D.F. México.
- DOF. 1977. NMX-F-253-1997. Cuenta de bacterias mesofílicas aerobias. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas. Poder Ejecutivo Federal. México, D.F. México.
- DOF. 1982. NMX-F-103-1982. Alimentos. frutas y derivados. Determinación de grados Brix. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas. Poder Ejecutivo Federal. México, D.F. México.
- DOF. 1992. NMX-F-286-1992. Alimentos. Preparación y dilución de muestras de alimentos para análisis microbiológicos. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas. Poder Ejecutivo Federal. México, D.F. México.
- DOF. 1994a. NOM-092-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. Dirección General de Normas. Poder Ejecutivo Federal. México, D.F. México.
- DOF. 2009. Modificación del inciso 0, en el encabezado de la Tabla 13, el último párrafo del Anexo B y el apartado Signo decimal de la Tabla 21 de la Norma Oficial Mexicana NOM-008-SCFI-2002, Sistema general de unidades de medida. Diario Oficial de la Federación. Poder Ejecutivo Federal. Jueves 24 de septiembre de 2009 (Primera Sección).
- Dutta, P. K., Tripathi, S., Mehrotra, G. K., Dutta, J. 2009. Review: Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. Food Chemistry, 114, 1173-1182.
- Eufic. 2004. Conservantes para aumentar la seguridad y la duración de los alimentos. Consultado el 3 de septiembre de 2014. Disponible en: <http://www.eufic.org/article/es/seguridad-alimentaria-calidad/aditivos-alimenticios/artid/conservantes-seguridad-duracion-alimentos/>
- FAO. 1993. Procesamiento de frutas y hortalizas mediante métodos artesanales y de pequeña escala. Consultado el 24 de septiembre de 2014. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/x5062s/x5062S00.htm#Contents>
- FDA. 1979. CPG Sec. 562.600 Preservatives; Use in Nonstandardized Foods; Label Declaration. Consultado el 27 de enero de 2015. Disponible en: <http://www.fda.gov/iceci/compliancemanuals/compliancepolicyguidancemanual/ucm074583.htm>
- FDA. 2012. GRAS Notice (GRN) No. 443. Consultado el 5 de septiembre de 2014. Disponible en: <http://www.fda.gov/ucm/groups/fdagov-public/@fdagov-foods-gen/documents/document/ucm337459.pdf>
- FDA. 2014. SCOGS (Select Committee on GRAS Substances). Consultado el 27 de enero de 2015. Disponible en: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/?set=SCOGS>

- Fernandez-Kim, S. O. 2004. *Physicochemical and functional properties of crawfish chitosan as affected by different processing protocols*. Doctoral dissertation, in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science in The Department of Food Science. Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College, EEUU.
- Fernández-Molina, J., Barbosa-Cánovas, G. y Swanson, B. 2011. Tecnologías emergentes para la conservación de alimentos sin calor. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. España. *Arbor*, 168 (661), 156-157.
- Flores, R. 2008. Obtención y caracterización de esponja de quitina a partir de cefalotórax de camarón. Tesis de Doctorado en Ciencias. Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas, UNAM, Facultad de Química. México, D.F. México.
- Gacén, J. y Gacén, I. 1996 Quitina y quitosano. Nuevos materiales textiles. *Boletín Intexter*. 110, 67-71.
- García, L. 1998. Composición proximal y mineral en desechos de conchas de cangrejo. Trabajo Especial de Grado. Universidad del Zulia-Facultad de Ingeniería. Maracaibo, Venezuela. P 89.
- Gayán, E., Serrano, M., Monfort, S., Álvarez, I., Condón, S. 2012. Combining ultraviolet light and mild temperatures for the inactivation of *Escherichia coli* in orange juice. *Journal of Food Engineering*, 113, 598-605.
- Giraudó, M., Ugarte, M., Scollo, D., Nonzioli, A., Sánchez, H. 2010. Carbohidratos en los alimentos funcionales. Quitosano como suplemento dietario, aditivo y nutracéutico. *Actualización en Nutrición*, 11 (4), 315-320.
- Gómez, O. 2004. Dependencia en la temperatura de los cambios en atributos sensoriales, degradación de ácido ascórbico e inactivación enzimática durante el tratamiento de pasteurización en puré y néctar de tamarindo. Tesis de Maestría en Ciencia de Alimentos. Universidad de las Américas Puebla. Cholula, Puebla. México.
- González, E. 2008. Pasteurización de zumos con luz ultravioleta (parte I). Consultado el 3 de septiembre de 2014. Disponible en: http://www.catedu.es/ctamagazine/index.php?option=com_content&view=article&id=669&catid=94:artlos-del-mes-archivo
- Goy, R., De Britto, D., Assis, O. 2009. A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros: Ciencia e Tecnologia*, 19 (3). Consultado el 26 de octubre de 2014. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010414282009000300013.
- Guerrero, I. 2009. Tecnología de productos de origen acuático. Editorial Limusa. P. 509. México DF, México.
- Guevara, M., Tapia, M. S., Gómez-López, V. 2012. Microbial inactivation and quality of guava and passion fruit nectars treated by UV-C light. *Food Bioprocess Technology*. Consultado el 26 de octubre de 2014. Disponible en: <http://link.springer.com/article/10.1007/s11947-011-0537-3#page-2>
- Hernández, I. 2004. La quitosana: un producto bioactivo de diversas aplicaciones. *Cultivos Tropicales*, 25(3), 97-110.

- Huerta, S. 1997. Elaboración de quitosano en cápsulas como fibra dietética a partir de los residuos del procesamiento de camarón Trabajo terminal. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. México, D.F. México.
- Jabbar, A. y Kareem, A. 2012. Effect of chitosan on apple juice quality. Consultado el 8 de febrero de 2015. Disponible en: http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:UUirUjUXxcJ:urpjournals.com/tocjnls/7_12v2i4_9.pdf+&cd=5&hl=es&ct=clnk&gl=mx
- Kiskó, G., Sharp, R., Roller, S. 2005. Chitosan inactivates spoilage yeasts but enhances survival of *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 872-880.
- Koide, S. 1998. Chitin-chitosan: properties, benefits, and risks. *Nutrition Research*, 18 (6), 1091-1101.
- Konrad, H. y Grimm, P. 2007. Nutrición: texto y atlas. Consultado el 10 de febrero 2015. Disponible en: <https://books.google.com.mx/books?id=9XqTwTkBh4QC&pg=PA164&lpg=PA164&dq=Konrad+y+Grimm+vitamina+c&source=bl&ots=tblFnhvupX&sig=dhJkyg7oaeORw9vMr4bskw4Y8&hl=es&sa=X&ei=fenaVlrgNoWigwSurYSABg&ved=0CBwQ6AEwAA#v=onepage&q=Konrad%20y%20Grimm%20vitamina%20c&f=false>
- Lárez, C. 2008. Algunas potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura en Latinoamérica. *Revista UDO Agrícola*, 8 (1), 1-22.
- López, M. 2012. Obtención y caracterización de quitosanos modificados: Ingredientes funcionales con aplicaciones tecnológicas y biológicas en la industria alimentaria. Tesis de Doctorado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Universidad Complutense de Madrid. España, Madrid.
- Martínez, A. y Rosenberger, M. 2013. Modelado numérico de pasteurización artesanal de leche y jugos naturales. *Mecánica Computacional*, 32, 2486-2493.
- Monarul, I., Masum, S., Rayhan, K., Haque, Z. 2011. Antibacterial activity of crab-chitosan against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Journal of Advanced Scientific Research*, 2 (4), 63-66.
- Morhsed, M., Bashir, A., Khan, M., Alam, M. 2011. Antibacterial activity of shrimp chitosan against some local food spoilage bacteria and food borne pathogens. *Bangladesh Journal of Microbiology*, 28 (1), 45-47.
- Nakamatsu, J. 2012. Molécula destacada: La quitosana. *Revista de Química PUCP*, 26 (2), 10-12.
- Nejati, F. y Sadeghinia, N. 2011. A review on application of chitosan as a natural antimicrobial. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 5, 2-23.
- Nicolás, M. 2003. Aplicación de altas presiones en la elaboración de queso de cabra. Tesis de Doctorado en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Autónoma de Barcelona, Facultad de Veterinaria. Barcelona, España.

- Ochoa-Velasco, C. 2012. Ultraviolet-C light effect on Pitaya (*Senocereus griseus*) juice. Journal of Food Research, 1 (2), 60-70.
- Ortega-Granados, J. A. 2011. Efecto del recubrimiento de fresas usando quitina-quitosana obtenida de cefalotórax y exoesqueleto de camarón en su vida de anaquel a temperatura ambiente ($20\pm 2^{\circ}\text{C}$) y refrigeración (4°C).
- Ortega, R. 2010. La eficiencia de la tecnología de campos eléctricos pulsantes de alta intensidad en el control microbiano de jugos de frutas procesados. Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua, Chih., México.
- Osorio, O. 2008. Influencia de tratamientos térmicos en la calidad y estabilidad del puré de fresa (*Fragaria x ananassa* cv Camarosa). Tesis de Doctorado. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España.
- Pedrero, F. D. y Pangborn, R. 1989. Evaluación sensorial de los alimentos. Métodos de análisis estadístico. Alhambra Mexicana, S. A de C.V. México DF, México. Pp. 76-86.
- Perrilla, J. 2012. Determinar la acidez de un zumo de limón volumetrías ácido-base. Consultado el 26 de enero de 2015. Disponible en: https://conceptosquimicosupn.files.wordpress.com/2012/10/laboratorio_5_determinacion_acidez_limon_basefuerte_acidodebil.pdf
- Pineda, D. 2011. Campos eléctricos pulsados en la preservación de alimentos. Consultado el 23 de noviembre de 2014. Disponible en: <http://www.innovacion.gob.sv/inventa/attachments/article/2400/Campos%20electricos%20pulsados%20en%20la%20preservacion%20de%20alimentos.pdf>
- Polydera, A., Stoforos, N. y Taoukis, P. 2003. Comparative shelf life study and vitamin C loss kinetics in pasteurised and high pressure processed reconstituted orange juice. Journal of Food Engineering, 60, 21-29.
- Raventós, M. 2006. Tecnologías para la criogenización y criomaceración. Consultado el 23 de noviembre de 2014. Disponible en: http://www.acenologia.com/ciencia102_2.htm
- Rivas, A., Rodrigo, D., Martínez, A., Barbosa-Cávanovas, G.V., Rodrigo, M. 2004. Effect of PEF and heat pasteurization on the physical-chemical characteristics of blended orange and carrot juice. LWT, 39, 1163-1170.
- Roller, S. y Covill, N. 1999. The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. International Journal of Food Microbiology, 47, 67-77.
- Rungsardthong, V., Wongvuttanakul, N., Kongpien, N., Chotiwaranon, P. 2006. Application of fungal chitosan for clarification of apple juice. Process Biochemistry, 41, 589–593.
- Rupasinghe, H.P.V. y Yu, L.J. 2012. Emerging preservation methods for fruit juices and beverages. En Food Additive. Yehia El-Samragy, editor. Pub. Agricultural and Biological Sciences. DOI: 10.5772/32148. Pp. 65-82. Consultado el 12 de septiembre de 2014. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/food-additive/emerging-preservation-methods-3-for-fruit-juices-and-beverages>

- Salas, D. 2011. Estudio de prefactibilidad para la puesta en marcha de una planta procesadora de quitina, ubicada en el cantón Eloy Alfaro de la provincia del Guayas. Tesis Profesional. Universidad Tecnológica Equinoccial. Ecuador, Quito.
- Sapers, G. 1992. Chitosan enhances control of enzymatic browning in apple and pear juice by filtration. *Journal of Food Science*, 57 (5), 1192-1193.
- Shahidi, F., Arachchi, J.K.V., Jeon, Y.-J. 1999. Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science & Technology*, 10, 37-51.
- Stone, H. y Sidel, J. 2004. Sensory evaluation practices. *Food Science and Technology International Series*. 3era edición. San Diego, California, EE.UU. Pp. 174-175.
- Tanvir, M., Rahman, S., Hossain, Z., Alam, M. 2014. Preparation of chitosan and its application on ginger paste and fruit juice as food preservative. *Journal of Food and Nutrition Sciences*, 2 (6), 243-249.
- Téllez-Luis, S.J., Ramírez, J.A., Pérez-Lamela, C., Vázquez, M., Simal-Gandara, J. 2001. Aplicación de la alta presión hidrostática en la conservación de los alimentos. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 3 (2), 66-80.
- Toledo, V. 2004. Desarrollo de gajos estabilizados por tratamiento térmico. Tesis Profesional. Universidad de las Américas de Puebla. Cholula, Puebla, México.
- Torres, M. 2011. Vida útil apoyando el etiquetado de alimentos. Consultado el 12 de septiembre de 2014. Disponible en: [http://www.inofood.cl/neo_2011/pdf/PRE_PDF/MARTES_TARDE_2/Microsoft%20PowerPoint%20-%203%20MARCELA%20TORRES%20-%20GCL%20\[Modo%20de%20compatibilidad\].pdf](http://www.inofood.cl/neo_2011/pdf/PRE_PDF/MARTES_TARDE_2/Microsoft%20PowerPoint%20-%203%20MARCELA%20TORRES%20-%20GCL%20[Modo%20de%20compatibilidad].pdf)
- Tuboly, K. 2009. Effects of the use of high hydrostatic pressure technology on the microbiology and other quality parameters of some selected foodstuffs. PhD School of Food Science. Corvinus University of Budapest. Faculty of Food Science. Hungary, Budapest.
- Uvtechnics. 2013. Use of UVC. Consultado el 26 de octubre de 2014. Disponible en: <http://www.uvtechnics.com/en/use-of-uvc/>
- Valenzuela, C. y Arias, J. 2012. Potenciales aplicaciones de películas de quitosano en alimentos de origen animal: Una revisión. *Avances en Ciencias Veterinarias*, 27 (1), 33-47.
- Vásquez, L. y Vidal, M. 2011. Caracterización y alternativa de uso de una película biodegradable de quitosano a partir de la extracción de quitina de langostino (*Pleuroncodes planipes*) para la industria de alimentos. Tesis profesional. Universidad de El Salvador. Facultad de Ingeniería y Arquitectura. El Salvador, San Salvador.
- Velázquez, J. 2013. Efectos en uvas de mesa (*Vitis vinifera* L.) del recubrimiento con películas de quitina-quitosana obtenidas por medio de química verde en su apariencia, pH, porcentaje de acidez, contenido de

humedad y vitamina C. Tesis profesional. UNAM. Facultad de Química. México, D.F. México.

- Vu, K., Hollingsworth, R., Leroux, E., Salmieri, S., Lacroix, M. 2011. Development of edible bioactive coating based on modified chitosan for increasing the shelf life of strawberries. *Food Research International*, 44, 198-203.
- Yogeshkumar, G., Atul, G., y Adhikrao, Y. 2013. Chitosan and its applications: A review of literature. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 4 (1), 312-331.