



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
Facultad de Ingeniería Química



*“Funcionalidad del quitosano en la
conservación de carne vacuna”*

TESIS DE MAESTRÍA

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN INGENIERÍA QUÍMICA**

PRESENTA:

I.Q. Diana Vallejo Dominguez

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Efraín Rubio Rosas

ASESOR DE TESIS:

Dr. Heriberto Hernández Cocoletzi

ÍNDICE

CAPITULO I MARCO TEÓRICO	8
1.1. Quitina	8
1.1.1. Estructura química	8
1.1.2. Fuentes y procesos de obtención	9
1.2. Quitosano	11
1.2.1. Estructura química	12
1.2.2. Estructura cristalina	12
1.2.3. Propiedades químicas	12
1.2.4. Propiedades fisicoquímicas	13
1.2.5. Actividad antimicrobiana	14
1.2.6. Caracterización del quitosano	16
1.2.7. Aplicaciones en alimentos	16
1.3. Conservación de carne de vacuno	18
1.3.1. Vida útil	18
1.3.2. Microorganismos patógenos	18
1.3.3. Alternativas de empaques	19
1.4. Estado del arte	20
CAPITULO II METODOLOGÍA	23
2.1. Preparación de las muestras	24
2.2. Aislamiento de la quitina	24
2.3. Desacetilación parcial de la quitina	25
2.4. Preparación de membranas	26
2.5. Caracterización de quitina y quitosano	26
2.5.1. Espectroscopia de infrarrojo por transformada (FTIR)	26
2.5.2. Difracción de rayos X (DRX)	27
2.5.3. Contenido de proteínas	27
2.5.4. Grado de desacetilación	27
2.5.5. Peso molecular	28
2.5.6. Microscopia electrónica de barrido	28

2.6.	Aplicación de membranas y polvo de quitosano en bistec y carne molida de res	29
2.6.1.	Evaluación de color.....	29
	CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
3.1.	Características de las muestras	30
3.2.	Quitina	31
3.2.1.	Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR).....	31
3.2.2.	Difracción de Rayos X (DRX).....	35
3.2.3.	Contenido de proteínas.....	37
3.2.4.	Microscopia electrónica de barrido.....	38
3.3.	Quitosano	40
3.3.1.	Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR).....	40
3.3.2.	Difracción de Rayos X (DRX).....	44
3.3.3.	Grado de Desacetilación.....	47
3.3.4.	Peso molecular.....	48
3.3.5.	Microscopia electrónica de barrido.....	49
3.4.	Rendimiento	50
3.5.	Conservación de la carne de res.....	51
3.5.1.	Parámetro a*.....	53
3.5.2.	Croma (Cab*).....	55
	CONCLUSIONES.....	58
	RECOMENDACIONES.....	59
	REFERENCIAS	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de la quitina [3].	8
Figura 2. Estructura química de la celulosa. Copyright Kim et al.,2011 [3].	9
Figura 3. Orientación de las cadenas poliméricas dentro de las diferentes formas poli fórmicas de la quitina [4].	9
Figura 4. Estructura química del quitosano. Copyright Kim et al., 2011 [3].	12
Figura 5. Diagrama general de la metodología.	23
Figura 6. Exoesqueletos de camarón en polvo.	24
Figura 7. Desproteínización química.	25
Figura 8. Desmineralización.	25
Figura 9. Baño de ultrasonido.	25
Figura 10. Desacetilación de la quitina.	26
Figura 11. Medición de viscosidad específica.	28
Figura 12. Muestras de bistec y carne molida de res recubiertas con a) membranas de quitosano y b) polvo de quitosano.	29
Figura 13. Espectros IR de muestras de quitina obtenida a partir desproteínización asistida por ultrasonido en frecuencia alta y diferente tiempo de sonicación.	33
Figura 14. Zona de huella dactilar para los espectros IR de las muestras de quitina.	34
Figura 15. Difractogramas de las muestras de quitinas obtenidas con proceso de desproteínización asistido por ultrasonido en frecuencia alta variando el tiempo de sonicación.	36
Figura 16. Efecto del tiempo de sonicación en el porcentaje de nitrógeno contenido en las muestras de quitina.	38
Figura 17. Imágenes SEM de muestras de quitina de (a) 10, (b) 15, (c) 20, (d) 25, (e) 30, (f) 35, (g) 40 minutos de sonicación; (h) forma de partículas de quitina.	39
Figura 18. Tamaño de partícula como función del tiempo de sonicación de las muestras de quitina.	40
Figura 19. Espectros IR de las muestras de quitosano obtenidas.	42
Figura 20. Región huella dactilar de los espectros de quitosano.	43
Figura 21. Difractogramas de las muestras de quitosano obtenido.	46
Figura 22. Grado de desacetilación de las muestras de quitosano obtenidas.	48
Figura 23. . Imágenes SEM de muestras de quitosano de 10 (a), 15 (b), 20 (c), 25 (d), 30 (e), 35 (f), 40 (g) minutos de sonicación.	49
Figura 24. Tamaño de partícula como función del tiempo de sonicación de las muestras de quitosano.	50
Figura 25. Muestras de bistec y carne molida de res cubiertas con polvo de quitosano.	52

Figura 26. Muestras de bistec de res. (a) control al día 1, (b) control al día 10, (c) 15 minutos al día 10, (d) 25 minutos al día 10.....	52
Figura 27. Muestras de carne molida, (a) control al día 1, (b) control al día 4, (c) control al día 10, (d) 40 minutos al día 4, (e) 25 minutos al día 10.	53
Figura 28. Parámetro a* para las muestras de bistec almacenadas en refrigeración durante 10 días.	54
Figura 29. Parámetro a* para las muestras de carne molida almacenadas en refrigeración durante 10 días.	55
Figura 30. Parámetro Cab* para las muestras de bistec almacenadas en refrigeración durante 10 días....	56
Figura 31. Parámetro Cab* para las muestras de carne molida almacenadas en refrigeración durante 10 días.....	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Contenido de quitina en especies marinas.....	10
Tabla 2. Empaques activos.....	19
Tabla 3. Muestras de quitinas y quitosanos obtenidos.....	30
Tabla 4. Índice de blancura (WI) de las muestras de quitosano.....	31
Tabla 5. Asignación de las bandas de absorción representativas de los espectros IR de las muestras de quitina.....	35
Tabla 6. Contenido de Nitrógeno total en las muestras de quitina tratadas con ultrasonido y quitina obtenida por el método químico.....	37
Tabla 7. Asignación de las bandas de absorción representativas de los espectros IR de las muestras de quitosano.....	44
Tabla 8. Grado de Desacetilación de las muestras de quitosano obtenidas a partir de la quitina extraída con ultrasonido.....	47
Tabla 9. Peso molecular de las muestras de quitosano obtenidas a partir de la quitina extraída con ultrasonido.....	49
Tabla 10. Rendimientos totales de quitina y quitosano.....	¡Error! Marcador no definido.

Resumen

En los últimos años varios estudios han demostrado los beneficios del quitosano aplicado individualmente o en combinación con antimicrobianos naturales en los sistemas alimentarios. Se han desarrollado diversos métodos para su obtención, entre los que se encuentran el método químico y los métodos biológicos. En este trabajo se reporta la obtención de quitina a partir de exoesqueletos de camarón, en la que se utiliza ultrasonido en la etapa de desproteización. Se utiliza frecuencia alta y tiempo de sonicación de 10, 15, 20, 25, 30, 35 y 40 minutos. La quitina obtenida se desacetiló con NaOH para obtener quitosano. La presencia de quitina y quitosano se confirmó mediante espectroscopía de infrarrojo; el contenido de proteína se cuantificó utilizando el método Kjeldahl. La determinación del grado de desacetilación y el peso molecular del quitosano obtenido se realizó a partir del espectro de infrarrojo y viscosimetría capilar, respectivamente. La caracterización se complementó con microscopía electrónica de barrido, difracción de rayos X y cuantificación de color. La funcionalidad del quitosano se evaluó mediante su aplicación en la conservación de carne molida y bistec de vacuno. A mayor tiempo de sonicación el contenido de proteína residual es menor; consecuentemente, se obtiene quitina con mayor pureza. El quitosano y la quitina presentan las señales de difracción características, y partícula en forma de hojuela. El quitosano obtenido es de alto grado de desacetilación y de peso molecular predominantemente medio; conforme el tiempo de sonicación aumenta se torna más oscuro. En referencia a la conservación de la carne, las muestras de quitosano con tiempo de sonicación de 15, 25 y 40 minutos presentaron la mejor actividad antioxidante que fue capaz de prevenir el deterioro oxidativo del color de la carne de res.

Planteamiento del problema: Hoy en día, el desafío principal para la industria de carne procesada es su conservación por el mayor tiempo posible. De acuerdo con un informe del Servicio de investigación Económica del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), se desperdician más de 2 mil millones de libras de carne y aves de corral a nivel minorista [1]. Según cálculos del Grupo Técnico de Pérdidas y Merma de Alimentos de la Cruzada contra el hambre, en México se desperdicia un 35% de la producción total de carne de res [2].

Justificación: Este trabajo se enfocará en evaluar efecto del peso molecular, grado de desacetilación y tamaño de partícula del quitosano aplicado en la conservación del bistec y carne molida de res. Con la finalidad de desarrollar un recubrimiento comestible que logre reducir en buena medida el crecimiento microbiano, obteniendo un incremento significativo de la vida útil del bistec y la carne molida de res. Lo que permitirá incrementar la posibilidad de venta del producto y la disminución de desechos en tiendas. Esto incidirá en ahorros considerables para minoristas y procesadoras.

Hipótesis: Por medio de la aplicación de quitosano es posible disminuir el crecimiento microbiano en la carne de res y así prolongar su vida de anaquel.

Objetivo general: Utilizar quitosano para prolongar la vida de anaquel de carne de res.

Objetivos específicos:

- Obtener quitosano con diferentes grados de desacetilación a partir de exoesqueletos de camarón.
- Aplicar el quitosano en forma de película y polvo en bistec y carne molida de res.
- Evaluación de recubrimiento de quitosano en carne de res, de acuerdo con la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-093-SSA1-1994

CAPITULO I MARCO TEÓRICO

1.1. Quitina

La quitina es un amino polisacárido catiónico compuesto de N-acetil-D-glucosamina, 2-amino-2-deoxi-D-glucopiranososa con enlaces glicosídicos de β (1-4) entre cada monómero (Figura 1) [3]. En forma natural se encuentra en la estructura esquelética de invertebrados, por ejemplo, los artrópodos, los anélidos, los moluscos y los celentéreos. Es posible hallarla también en las paredes celulares de algunos hongos como los ascomicetos, los zigomicetos, los basidiomicetos y los deuteromicetos, además de en algas como las diatomeas [4].

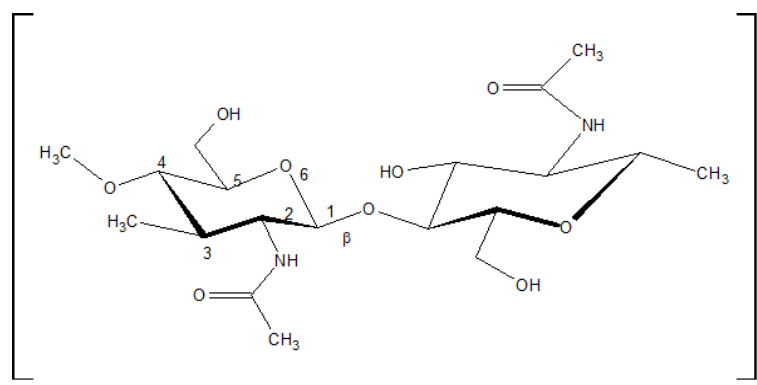


Figura 1. Estructura química de la quitina [3].

1.1.1. Estructura química

La estructura química de la quitina presenta mucha similitud con la de la celulosa (Figura 2). Su diferencia radica en que el carbono 2 contiene un grupo hidroxilo en la celulosa y el grupo acetamida en la quitina. Ambos biopolímeros cumplen funciones semejantes: actuar como material de soporte y defensa en los organismos que los contienen. Al ser la quitina de origen natural, no presenta una composición uniforme [3].

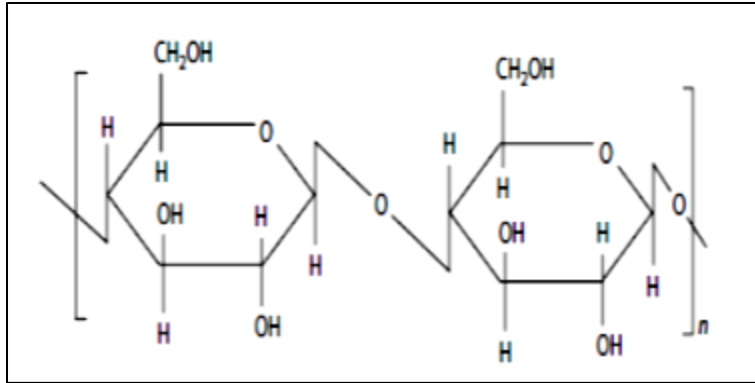


Figura 2. Estructura química de la celulosa. Copyright Kim et al., 2011 [3].

Se han detectado tres formas poli fórmicas, α , β , y γ . La diferencia entre ellas es el arreglo de los monómeros en la cadena polimérica. En la α -quitina, los monómeros que forman la cadena están en disposición antiparalela; en la β -quitina, disposición paralela; y, en la γ -quitina, se encuentran dos monómeros en un sentido y el siguiente en sentido contrario, Figura 3 [4].

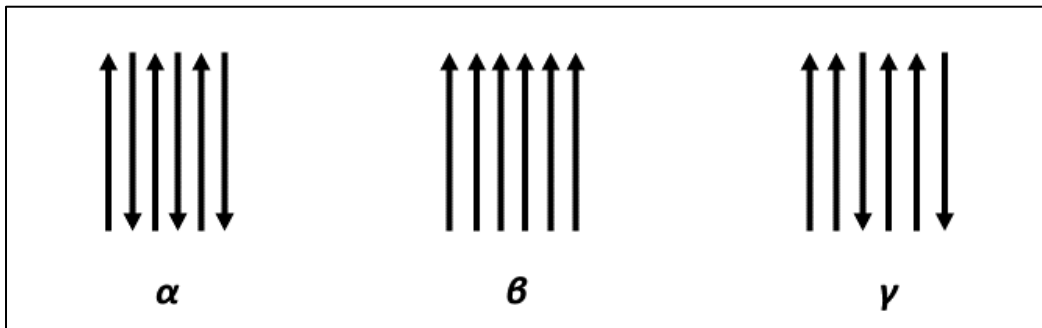


Figura 3. Orientación de las cadenas poliméricas dentro de las diferentes formas poli fórmicas de la quitina [4].

1.1.2. Fuentes y procesos de obtención

Fuentes

Aun cuando la celulosa es el biopolímero más abundante en la naturaleza, la tasa de regeneración de la quitina en la biosfera es de 2.3×10^9 toneladas/año solamente en crustáceos, casi el doble de la tasa de celulosa que es de 1.3×10^9 toneladas/año. A nivel mundial se estima una producción global de desechos quitinosos de 1,440,000 toneladas/año, el 12% de esta cifra proviene de la producción de Iberoamérica. Con un rendimiento promedio de la producción de quitina del 15%, se estima que la cantidad potencial de quitina es de 25 mil toneladas; sobrepasando notablemente la demanda actual de quitosano a nivel global que es de 10 mil toneladas/año.

La exportación de camarones y langostinos de América Latina al mundo asciende a 210 mil toneladas/año. En México existe una importante contribución a la producción acuícola, se estima una producción de 40 mil toneladas/año en lo que se refiere a la captura y producción de camarón. Se estima que esta actividad pesquera contribuye con aproximadamente el 30 % de la producción total de camarón en México. Cabe destacar que este grupo de especies es el más importante en términos de disponibilidad de materia prima para la producción industrial de quitina [4]. Sin embargo, los desechos de mariscos son considerados un problema ambiental, debido a su alta perecibilidad y alta contaminación. Las carnosidades que aún se encuentran adheridas se descomponen, dando como resultado generación de mal olor y desarrollo de agentes patógenos que causan un deterioro en la salud pública y en el ambiente. Dado que los crustáceos y moluscos son una fuente rica de productos de valor agregado como quitina, proteínas, pigmentos y compuestos de sabor, ha generado gran interés la explotación y bioconversión de este recurso de fácil acceso [3]. En la Tabla 1 se muestra una lista del contenido de quitina en las principales especies marinas.

Tabla 1. Contenido de quitina en especies marinas.

TIPO	QUITINA %	CaCO3 %	UBICACIÓN
Crustáceo Phylum			
Euphausia sp. y Meganyctiphanes sp. (Krill)	20-30	20-25	Cutícula/exoesqueleto
Chionoecetes sp., Cancer sp. y Carcinus sp., (Cangrejo)	15-30	40-50	Cutícula/exoesqueleto
Paralithodes sp. (Cangrejo rey)	35	40-50	Cutícula/exoesqueleto
Callinectes sp. (Cangrejo azul)	14	40-50	Cutícula/exoesqueleto
Crangon sp. y Pandalus sp. (Camarón)	17-40	20-30	Cutícula/exoesqueleto
Penaeus sp. (Gamba)	40	20-30	Cutícula/exoesqueleto
Nephrops sp. Y Homarus sp. (Langosta)	60-75	20-30	Cutícula/exoesqueleto
Lepas sp. (Barnacla de ganso)	59	20-30	Cascara
Molusco Phylum			
Mytilus sp. y Pecten sp., etc. (Mejillones, almejas, etc.)	3	85-90	Cascara
Crassostrea sp. (Ostra)	6	85-90	Cascara
Loliginidae sp. y Ommasrephidae sp. (Calamar)	20-40	Despreciable	Pluma

Obtención

Método Químico. Consiste en la extracción de quitina a partir de procesos de desmineralización y desproteización en medios alcalinos y básicos a altas temperaturas. La desmineralización consiste en la eliminación de carbonatos de calcio, fosfato de calcio y otras sales minerales. El tratamiento se realiza por hidrolisis con ácidos diluidos, el ácido clorhídrico es el más utilizado. Es importante que la cantidad de ácido clorhídrico sea igual o mayor estequiométricamente que todos los minerales presentes en la fuente de extracción, para asegurar una completa desmineralización [3].

La Desproteización se realiza mediante un tratamiento con soluciones alcalinas, como el hidróxido de sodio o hidróxido de potasio a temperaturas que pueden variar de 30 a 100 °C; generalmente se utilizan soluciones alcalinas con concentraciones entre el 1 y el 10%.

Métodos Biológicos. Una alternativa al método químico es el uso de métodos biológicos para la extracción de quitina. Diversas enzimas se han utilizado para la extracción de proteína y quitina a partir de crustáceos, como la quimotripsina, la bromelina y la papaína. La bromelina ha mostrado una mayor eficiencia en la extracción de proteínas comparada con la papaína [5]. Se han investigado las fermentaciones con bacterias que producen enzimas proteolíticas y quitinolíticas, obteniendo excelentes resultados [3]. Las desventajas de estos métodos consisten en que es alta la cantidad de proteína residual presente en la quitina y los tiempos de reacción son más largos en comparación con el método químico.

1.2. Quitosano

El quitosano es un polisacárido que se obtiene por medio de la desacetilación parcial de la quitina, cuando el grado de desacetilación de la quitina es igual o mayor al 50% se denomina quitosano y cuando alcanza el 100% se nombra quitano. La desacetilación consiste en dar tratamiento a la quitina por medio de una reacción termo alcalina con soluciones concentradas de hidróxido de sodio o potasio (30-50% p/p) a temperaturas arriba de 100 °C. Por hidrolisis alcalina se elimina el grupo N-acetilo del grupo N-acetil-amina del carbono 2, mientras queda una amina primaria en esa posición.

1.2.1. Estructura química

Al igual que la quitina, la molécula del quitosano muestra una variabilidad en el tamaño de sus cadenas, así también en el grado de desacetilación de las mismas. En la Figura 4 se muestra la estructura química del quitosano, está constituido por unidades de 2-acetamido-2-deoxi- β -D-glucopiranososa y 2-amino-2-deoxi-D-glucopiranososa [6]. El quitosano es el único polisacárido natural con carga positiva, lo que le confiere características especiales que lo hacen útil en numerosas aplicaciones. En su estructura, el nitrógeno se encuentra en forma de amina alifática primaria y da origen a reacciones tales como N-acilación y la formación de bases de Schiff, entre otras [4].

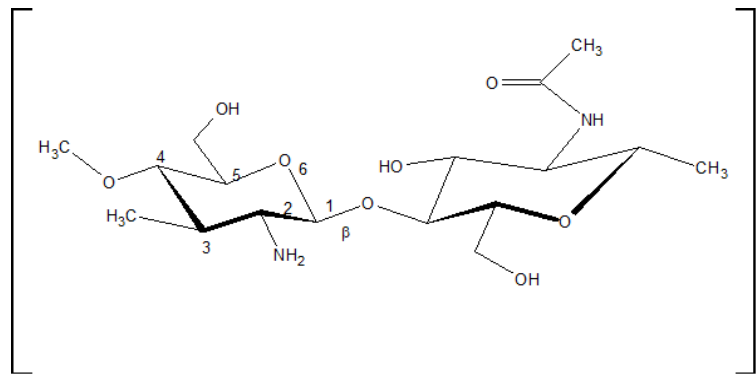


Figura 4. Estructura química del quitosano. Copyright Kim et al., 2011 [3].

1.2.2. Estructura cristalina

En estado sólido el quitosano es un polímero semicristalino, aunque también se han reportado estructuras amorfas. Se ha observado que la estructura cristalina obtenida depende del método usado en la preparación de la muestra.

1.2.3. Propiedades químicas

Algunas de las propiedades químicas del quitosano incluyen [7]:

- ❖ Amino-polisacáridos lineales con alto contenido de hidrogeno.
- ❖ Estructura rígida de D-glucosamina; alta hidrofiliidad, cristalinidad.
- ❖ El grupo amino desprotonado actúa como un poderoso nucleófilo (pK_a 6.3).
- ❖ Permite la formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares; en solución presenta alta viscosidad.

- ❖ Está constituido por grandes grupos reactivos para la reticulación y activación química
- ❖ Insoluble en agua y disolventes orgánicos; soluble en soluciones acuosas de ácidos diluidos.
- ❖ Forma sales con ácidos orgánicos e inorgánicos.
- ❖ Tiene propiedades quelantes y complejantes.
- ❖ Presenta conductividad iónica.
- ❖ Capacidad para formar polielectrolitos (a pH ácido).
- ❖ Agente floculante; Interactúa con moléculas cargadas negativamente.
- ❖ Tiene propiedades de captura y adsorción; filtración y separación; con elementos afines a su grupo amino.
- ❖ Capacidad de formación de películas; propiedad de adhesión para el aislamiento de biomoléculas.
- ❖ Biocompatibilidad.
- ❖ Bioactividad.
- ❖ No tóxico.
- ❖ Biodegradable.
- ❖ Actividad antimicrobiana (hongos, bacterias, virus).
- ❖ Propiedades antiácidas, antiulcerosas y antitumorales.
- ❖ Actividad hipodérmica.

1.2.4. Propiedades fisicoquímicas

El quitosano es una amina primaria, derivado de la quitina, su monómero principal es el 2-amino-2-desoxi- β -D-Glucopiranososa. El grupo amino libre en la estructura del quitosano le confiere un comportamiento básico, además de ciertas características fisicoquímicas de interés para un gran número de aplicaciones.

Solubilidad

Experimentos sobre la protonación del quitosano disuelto en ácido acético y ácido clorhídrico, muestran que su grado de ionización depende del pH y pK del ácido. Así la solubilidad del quitosano también depende de la concentración iónica del ácido, con un bajo grado de desacetilación la solubilidad ocurre para un grado de ionización aproximadamente de 0.5 en HCl,

$\alpha=0.5$ corresponde a un pH de 4.5-5. La solubilidad del quitosano generalmente se prueba disolviéndolo en ácido acético al 1% o 0.1 M. A su vez se ha demostrado que la concentración de protones necesarios en el ácido es al menos igual a la concentración de unidades de $-NH_2$ presentes en el quitosano [8].

Grado de desacetilación

El grado de desacetilación es un parámetro que permite diferenciar el quitosano de la quitina y fija sus propiedades físicas, químicas y biológicas. Determina la relación entre las unidades repetitivas de 2-Acetilamina-2-desoxi- β -D-(+)-Glucopiranososa y el 2-amino-2-desoxi- β -D-Glucopiranososa.

Peso molecular

En cualquier polímero, la solubilidad y la viscosidad están intrínsecamente ligadas a su peso molecular. En el caso del quitosano, su efecto abarca a sus propiedades biológicas. Por lo que sí se logra determinar el peso molecular y el arreglo de las moléculas del biopolímero, se pueden estimar una gran cantidad de propiedades reológicas y mecánicas.

1.2.5. Actividad antimicrobiana

El mecanismo de acción antimicrobiana del quitosano depende del microorganismo. En el caso de los hongos, ejerce un efecto antifúngico inhibiendo la formación de esporas e hifas. Por el contrario, la actividad antibacteriana del quitosano es más compleja y difiere entre bacterias Grampositivas y Gramnegativas debido a diferencias de composición en la superficie celular de estas bacterias. El mecanismo de acción antimicrobiana del quitosano aún no está totalmente esclarecido, dentro de los mecanismos propuestos, investigadores coinciden que posee tres posibles acciones.

Carácter catiónico

El carácter catiónico del quitosano se basa en las cargas positivas que posee el grupo (NH_3^+) esto se debe a la presencia de un cambio sobre el carbono 2 del monómero de la glucosamina, cuando el quitosano se solubiliza en soluciones acidas que tienen un pH menor a su pKa, es decir, con un pH aproximado entre 6 -7. Para el caso de soluciones de quitosano llevadas a un pH 5.5 se estima que los grupos aminos se encuentran parcialmente protonados. Por el contrario, a pH's menores de 5.5 estos grupos se encuentran completamente protonados, reaccionando con los grupos

hidrofílicos aniónicos como lipopolisacáridos, ácido teicoico de las bacterias Gram-negativas y proteínas celulares específicas; que influyen en la actividad bacteriana de las membranas celulares de los microorganismos [9]. Por ejemplo estudios que se realizaron en algunas levaduras, reportaron que la parte externa de la membrana plasmática está enriquecida por esfingolípidos, que tienen carga negativa, los cuales interactúan con los grupos amino del quitosano, generando una desestabilización de la membrana y lisis celular [10].

Agente quelante

Este mecanismo propone que el quitosano puede comportarse como agente quelante, formando compuestos con trazas de metales como Ni^{+2} , Zn^{+2} , Co^{+2} , Fe^{+2} , Mg^{+2} y Cu^{+2} , en condiciones ácidas. Tal comportamiento hace que inhiba el desarrollo microbiano, la producción de toxinas, y la disponibilidad de micronutrientes necesarios para las actividades celulares que son vitales para los microorganismos. También se ha observado que el quitosano es capaz de actuar como quelante de cationes divalentes, estableciendo interacciones electrostáticas con moléculas aniónicas, por ejemplo, el fosfato y carboxilato, que componen los lipopolisacáridos, desestabilizando la membrana celular de las bacterias [9].

Penetración al interior de la célula

Como tercer mecanismo se ha propuesto que oligómeros de bajo peso molecular ingresan en el interior de las células de los microorganismos e impiden el desarrollo de estas, ya que inhiben la acción de varias enzimas e interfiere en la síntesis de proteínas por inhibición de la transformación de ADN en ARNm [9].

En conclusión, se puede establecer que la actividad antimicrobiana del quitosano se resume en la siguiente secuencia de acciones. (1) absorción del quitosano y/o oligómeros de este sobre la superficie de la célula bacteriana, (2) difusión del quitosano al interior de la pared celular e interrupción de la función adecuada de esta, (3) provocando la interrupción de nutrientes a la membrana citoplasmática, (4) resultando en fugas de los constituyentes citoplasmáticos, y (5) la muerte de la célula [9].

1.2.6. Caracterización del quitosano

La caracterización del quitosano queda establecida básicamente en dos parámetros fundamentales, el grado de desacetilación y el peso molecular. Pero también existen otros que se derivan de estos dos, como el grado de ionización y la solubilidad [11].

Determinación del grado de desacetilación por titulación potenciométrica

El uso de esta técnica para determinar el grado de desacetilación, se debe a que el quitosano es un polielectrolito, es decir, un polímero con grupos potencialmente ionizables. Este polisacárido se encuentra compuesto básicamente por unidades de 2-amino-2-desoxi-β-D-Glucopiranosas que contiene al grupo amino (-NH₂), que es fácilmente protonable por los iones H₃O⁺ [11].

Determinación del peso molecular por viscosimetría capilar

La viscosimetría capilar se relaciona con la habilidad intrínseca de un polímero para aumentar la viscosidad de un disolvente, a una temperatura determinada. A su vez, esta información se relaciona con el tamaño y la forma de las moléculas del polímero en solución y las interacciones polímero disolvente. En cualquier polímero, su peso molecular está relacionado con la viscosidad intrínseca (η) o índice de viscosidad límite, esta se define como la medida de la habilidad de una molécula de polímero para aumentar la viscosidad de un disolvente en ausencia de interacciones intermoleculares, relacionándose con el peso molecular del polímero [11].

1.2.7. Aplicaciones en alimentos

El quitosano concentra una serie de características físicas, químicas y biológicas que lo convierten en un elemento con potencial para ser utilizado en la fabricación de alimentos, ya que puede mejorar sus características nutricionales, higiénicas y/o sensoriales. Además, posee propiedades emulsionantes, antimicrobianas, antioxidantes y gelificantes. Destaca la inocuidad del quitosano, su dosis letal (DL50), en ratas es de 16 g/kg de peso corporal. Lo que lo sitúa casi al mismo nivel que el azúcar y por debajo de la sal. Por este motivo, el quitosano es aceptado como suplemento dietario o como aditivo alimentario por varios países, entre ellos, Italia, Francia, Noruega, Polonia, Estados Unidos y Japón [4].

Quitosano como suplemento dietario

En la actualidad, la salud y la belleza se han asociado con mantener una figura delgada. Si se toma en cuenta que el tejido adiposo del cuerpo se relaciona con el balance energético, una

forma de lucir delgado es modificar el aporte lípido al organismo. Es por ello, que el quitosano se ha adicionado a la dieta alimentaria como suplemento, puesto que posee la capacidad de modificar, fuertemente, la absorción de lípidos, ya que se solubiliza con el ácido clorhídrico del estómago y gelifica al pH intestinal, lo que crea un coagulo que atrapa la grasa y , en menor proporción, a los otros nutrientes [4].

Quitosano como aditivo alimentario

Los aditivos alimentarios son sustancias o mezclas de sustancias que directa o indirectamente modifican las características, físicas, químicas o biológicas de un alimento. Estos deben ser inocuos por si mismos o por medio de su acción como aditivos en las condiciones de uso. Además de responder a las exigencias de designación y de pureza que establezca la legislación [4]. La versatilidad del quitosano permite cumplir con todas estas exigencias mencionadas, por lo que permite ser usado como aditivo alimentario.

Emulsionante

Se ha demostrado la capacidad del quitosano, en solución acética, de estabilizar emulsiones múltiples del tipo agua/aceite/agua sin la adición de otros surfactantes y en un solo paso. El quitosano muestra la ventaja de formar emulsiones múltiples debido a la forma heterogénea de su polielectrolito, mientras que la mayoría de las demás moléculas son hidrofílicas. Permite la estabilización de gotas de aceite en agua. Algunas moléculas con bajos grados de desacetilación, son más hidrofóbicas y estabilizan gotas de agua dentro de las de aceite [4].

Conservador

Se define como conservador al aditivo que se agrega con el objetivo de disminuir o retardar el desarrollo de microorganismos, para evitar la contaminación del alimento y la alteración en sus características. El quitosano tiene una actividad antimicrobiana que actúa sobre ciertas bacterias, levaduras y hongos, con excepción de los Zigomicetos que se encuentran como mayor componente de sus paredes celulares [4].

Películas comestibles

Debido a la capacidad del quitosano para formar filmes o películas semipermeables, se ha empleado como recubrimiento en alimentos y prolongado su vida de anaquel. A diferencia de otros materiales utilizados para recubrir frutas, se ha demostrado que el quitosano tiene la capacidad de inhibir el desarrollo fúngico, además de ser inocuo, biodegradable y renovable.

Esto lo convierte en un excelente medio para el control de los cambios fisiológicos, morfológicos y fisicoquímicos de los alimentos [4].

1.3. Conservación de carne de vacuno

La carne de vacuno tiene proteínas, lípidos, bajo contenido de carbohidratos y sustancias de menor peso molecular y un contenido de humedad adecuado, que la convierten en un medio de cultivo excelente de microorganismos. En los animales transitan grandes cantidades de microorganismos, mohos, bacterias, incluso levaduras, están presentes en el cuero, pelos y pezuñas de los vacunos, los cuales son transmitidos a la carcasa después del sacrificio. Los residuos de estiércol en la piel suelen acceder al músculo, incluso al contenido intestinal si la evisceración no se realiza cuidadosamente. Las bacterias también pueden provenir del ambiente donde se realiza el faenado, como en pisos, paredes, mesadas, cuchillos y manos de los operadores [12].

1.3.1. Vida útil

La vida útil de los productos cárnicos es el tiempo de su almacenamiento hasta el deterioro. El punto de deterioro se puede determinar de acuerdo con un nivel bacteriano máximo aceptable, un mal olor o una apariencia inaceptable. La vida útil depende de la cantidad y tipo de microorganismos. Principalmente bacterias presentes al inicio y su posterior crecimiento. El recuento bacteriano mesófilo inicial en la carne y los productos cárnicos cocidos es de 10²-10³ cfu/cm² por gramo, para una gran variedad de especies. Solo el 10% de las bacterias presentes al inicio son capaces de crecer a temperaturas de refrigeración. El porcentaje que causa el deterioro es más bajo. Es decir, durante su almacenamiento, ciertos factores determinarán su potencial de vida útil, como la temperatura, la atmosfera, el pH y el NaCl que intervendrán en ciertas bacterias y afectarán su crecimiento y su actividad [13].

1.3.2. Microorganismos patógenos

En la carne vacuna se puede encontrar el origen de la diseminación de ciertos tipos de virulentos de *E. coli*. Las bacterias *Staphylococcus aureus*, *C. perfringes*, *Campylobacter spp*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella app*, se encuentran en bajo número sobre la superficie de la carne cruda; sin embargo, el número puede aumentar debido a una manipulación inadecuada. Los

patógenos más comunes transmitidos por la carne vacuna son *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus* y *C. perfringens*. Además, la *Listeria* puede sobrevivir a bajas temperaturas en la carne procesada, debido a que es osmóticamente tolerante y acumula solutos compatibles con el citosol [12].

1.3.3. Alternativas de empaques

El principal reto para la industria procesadora de carne es lograr su conservación por el mayor tiempo posible por lo que en los últimos años se han producido muchos avances en el campo de envasado inteligente en carnes. A continuación, se presentan algunas de estas aplicaciones.

Empaque activo

El empaque activo es un sistema en el que el producto, paquete y paquete de entorno interactúan entre sí para proporcionar un valor agregado a la comida. Regularmente esto se logra incorporando compuestos activos en los materiales del embalaje que absorben sustancias de los alimentos o medio ambiente; o liberan agentes del embalaje al medio ambiente o al alimento. El envase activo puede tener componentes quimi activos y/o bioactivos [14], tal como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Empaques activos.

Aplicación del empaque	Descripción del componente activo
Tipo: Componente activo antimicrobiano	Bolsa, lamina, recubrimiento, película, bandeja, cartón etiqueta, envoltura. Plata, zeolita de plata, glucosa oxidasa, vapor de etanol, triclosán, dióxido de cloro, natamicina, extracto de wasabi en ciclodextrina, isotiocianato de alilo
Paquete eliminador de O₂ Tipo: Paquete de eliminación de O₂.	Bolsa, resina de barrera, película, etiqueta, tapa, cierre.

Empaque antioxidante

Los antioxidantes son compuestos que pueden ser sintéticos o derivados de la naturaleza, que previenen la oxidación de lípidos, retrasa el desarrollo de sabor desagradable y mejora la estabilidad del color. Existen dos métodos de acción de los antioxidantes, la liberación de agentes a la comida y la eliminación de componentes indeseables como oxígeno, radicales oxidativos o iones metálicos de los alimentos. Por otro lado, las dos metodologías para la producción de envases antioxidantes son, dispositivos independientes como, sobres, almohadillas o etiquetas que contienen el antioxidante separado del alimento; y la incorporación del antioxidante al alimento [14].

Empaque antimicrobiano

La tecnología de envasado activo también puede proporcionar efectos antimicrobianos mediante sistemas de eliminación de oxígeno, sistemas de control y absorción de humedad; sustancias migratorias y no migratorias hacia el alimento. En general, se puede obtener un aumento del 50% en la vida útil del alimento. Algunos agentes antimicrobianos que tienen gran potencial de uso en empaques de alimentos son, ácidos orgánicos, sales de ácidos, anhídridos de ácidos, ácidos para benzoicos, alcohol, bacteriocinas, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, agentes quelantes, enzimas, metales, antioxidantes, antibióticos, fungicidas, gases esterilizantes, polisacáridos, fenólicos, plantas volátiles, extractos de plantas y probióticos [14].

1.4.Estado del arte

El quitosano se ha utilizado en cárnicos debido a su alta actividad antimicrobiana. Es capaz de controlar los principales patógenos involucrados en la transmisión de enfermedades a los seres humanos. También se han utilizado películas y soluciones de quitosano debido a su eficacia sobre la estabilidad de almacenamiento de la carne y mejoramiento de sus propiedades orgánicas [9]. En los últimos años varios estudios han demostrado los efectos beneficiosos del quitosano, aplicado individualmente o en combinación con antimicrobianos naturales en los sistemas alimentarios.

G. Pereira et al. [15]. Elaboraron recubrimientos de quitosano con base de gelatina y evaluaron sus efectos en la conservación del color y oxidación de lípidos en filetes de res durante su tiempo en vitrina de exhibición a nivel minorista. Se observó que hubo una disminución en la oxidación

de lípidos después de 5 días de almacenamiento, con una efectividad mayor de los recubrimientos que contenían mayor concentración de gelatina. También se presentó una mayor estabilidad del color durante su tiempo en vitrina, los filetes exhibieron un color más rojo intenso cuando se recubrieron con mezclas que contenían entre el 3 y 6% de gelatina y entre el 0.5 y 0.1% de quitosano.

J. Quesada et al. [16]. Diseñaron un empaque activo para aplicarlo en carne refrigerada lista para comer, el empaque incluía su superficie interna recubierta con una película de quitosano adicionada con aceite esencial de tomillo (EO) al 0, 0.5, 1 y 2%, sin estar en contacto directo con la carne. Después de evaluarlo en almacenamiento refrigerado de la carne, la presencia de la película de quitosano con EO redujo la población de levaduras, mientras que las bacterias mesófilas aerobias, bacterias del ácido láctico y las enterobacterias no se vieron afectadas por la presencia de EO en las películas. Se mejoró la preservación del color rojo de la carne en presencia de EO, dando un mejor aspecto a la carne envasada.

M. Chatli et al. [17]. Crearon películas biodegradables, bioactivas y preformadas para el almacenamiento de carne de cabra. Las películas se basaron en compuestos de quitosano a partir de almidón y se impregnaron con nisina 60,000 UI/g (T1) y cinamaldehído 0.5% (T-2). Se evaluó en relación con el producto de control desempacado, en un ambiente de refrigeración aeróbica (4 °C +/- 1 °C) durante un periodo de 10 días. Durante el periodo de prueba, la actividad de pH y de agua de las muestras siguió una tendencia decreciente. La tasa de disminución de actividad de agua fue mayor que en la muestra de control. Los valores de las sustancias que reaccionaron con el ácido tiobarbitúrico fueron los más bajos en la T-2 y los más altos en la muestra de control.

V. Juneja et al. [18]. Investigaron la efectividad del quitosano en la inhibición de la germinación y crecimiento de esporas de *Clostridium perfringens*, aplicado en el periodo de enfriamiento de carne molida cocida de res y pavo. El quitosano se mezcló con la carne de res o de pavo en concentraciones de 0.5, 1.0, 2.0 y 3.0 %; junto con un coctel de 3 cepas de esporas activadas por el calor para obtener una concentración final de esporas de 2 a 3 log₁₀ UFC/g. Se observó que la actividad inhibidora del quitosano dependía de la concentración y tiempo de germinación y crecimiento de la *C. perfringens*. El mejor resultado se obtuvo con quitosano al 3%, que redujo de 4 a 5 log₁₀ UFC/g de espora *C. perfringens*.

S. Yingyuad et al. [19]. Estudiaron los efectos del recubrimiento de quitosano aplicado en el envasado al vacío sobre la calidad y vida útil de la carne de cerdo, durante condiciones de almacenamiento en refrigeración a 2 ± 1 °C. Como muestra de control se utilizó carne de cerdo sin quitosano envasada al vacío. Se demostró que el recubrimiento de quitosano minimizó la oxidación, ocurrieron cambios insignificantes en el color y conteos microbianos en las muestras recubiertas con quitosano y se encontró que todas las muestras eran organolépticamente aceptables durante todo el periodo de almacenamiento.

H. Chen et al. [20]. Estudiaron el efecto de recubrimientos elaborados a partir de la solución β -CD-Citral combinada con quitosano y lo aplicaron en filetes de res almacenados a $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Al concluir el estudio, las muestras recubiertas con el complejo de inclusión β -CD-Citral redujeron el nitrógeno básico volátil total en 3.0 mg/100g. El valor de recuento de bacterias aeróbicas fue inferior a 1.5 Log10 y las propiedades sensoriales aumentaron en un 10%. El valor de pH se redujo en 0.60 unidades, mientras que las muestras de control alcanzaron el límite de aceptación.

K. Rambabu et al. [21]. Desarrollaron películas de quitosano con la adición de extracto de hojas de mango (EHM) con el objetivo de mejorar su actividad antioxidante. A mayor concentración de EHM en las películas, se obtuvieron películas de mayor grosor y menor contenido de humedad. El análisis de permeabilidad al vapor mostró una reducción en la hidrofiliidad y penetración de vapor de agua en las películas adicionadas con EHM.

CAPITULO II METODOLOGÍA

La Figura 5 Contiene un diagrama general sobre el proceso de obtención y caracterización del quitosano obtenido a partir de exoesqueletos de camarón.

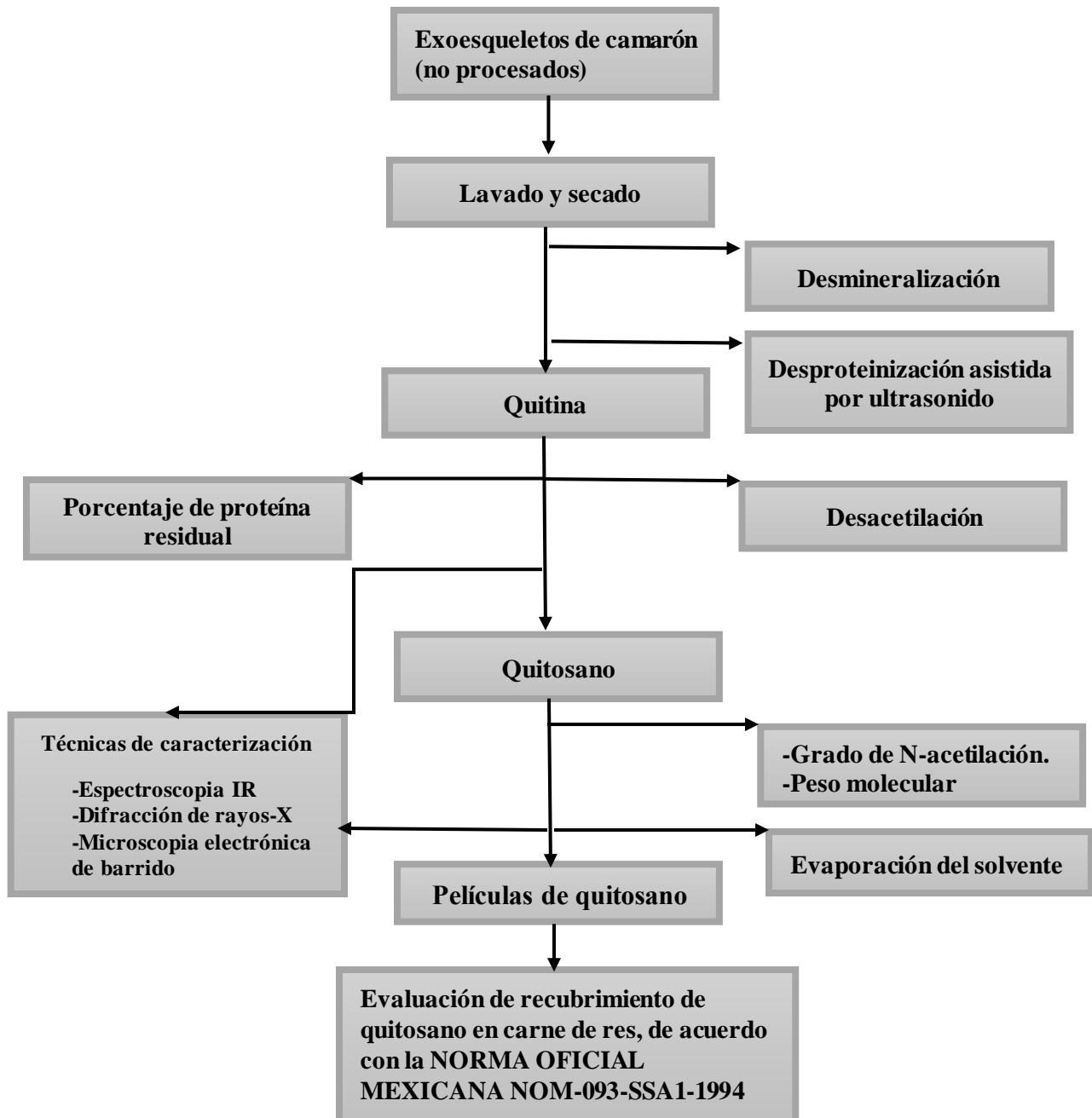


Figura 5. Diagrama general de la metodología.

2.1. Preparación de las muestras

Se recolectaron exoesqueletos sin cocinar de desechos de pescaderías y se procedió a su lavado, secado, pulverizado y tamizado. En el lavado se eliminaron de los exoesqueletos patas, cola y restos de materia orgánica, se dejaron escurrir a temperatura ambiente durante 24 horas. Para eliminar el contenido de agua restante se secaron en una estufa a una temperatura de 90 °C durante 3 horas. Una vez secos, los exoesqueletos se molieron en un molino de piedras. La muestra pulverizada se pasó a través de un tamiz de malla 250 y posteriormente por un tamiz de malla 325, quedando el tamaño de partícula en un intervalo de 53-44 μm , Figura 6.



Figura 6. Exoesqueletos de camarón en polvo.

2.2. Aislamiento de la quitina

la quitina, precursor del quitosano, se obtuvo por el método químico, que consiste en la desmineralización y la desproteínización. En la desmineralización, la muestra se colocó en un vaso de precipitados con HCl 0.6 M, considerando una relación 1:11 m/v, y se hizo reaccionar durante tres horas a 30 °C con agitación constante de 300 rpm Figura 8. Posteriormente se recolectó la muestra y con ayuda de una centrifuga se lavó con agua destilada hasta pH neutro para después secarse, primero a temperatura ambiente durante 24 horas para eliminar el exceso de agua y después a 90 °C durante 3 horas para eliminar la humedad remanente. La desproteínización se realizó con NaOH al 1 % m/v con una relación 1:5 m/v a una temperatura de 28 °C y con uso de agitación constante de 300 rpm durante 24 horas Figura 7. En este trabajo se se implementó la desproteínización asistida por ultrasonido en un baño ultrasónico a

frecuencia alta variando el tiempo de sonicación en 10, 15, 20, 25, 30, 35 y 40 minutos Figura 9. Al finalizar la reacción la muestra fue lavada a pH neutro y posteriormente secada. En esta etapa la muestra ya es de quitina.

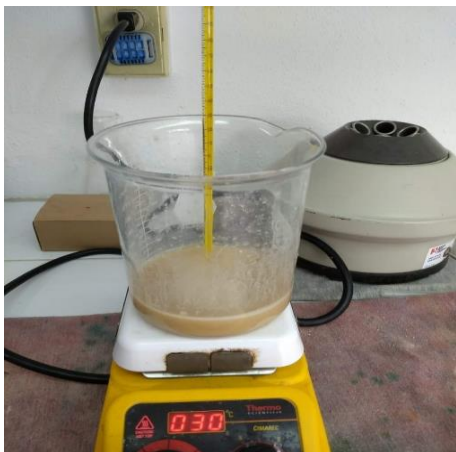


Figura 8. Desmineralización.



Figura 7. Desproteínización química.



Figura 9. Baño de ultrasonido.

2.3.Desacetilación parcial de la quitina

La desacetilación se llevó a cabo con NaOH al 50 % utilizando la proporción de 1:4 m/v esto con la finalidad de obtener un porcentaje de desacetilación. La reacción con agitación constante de 700 rpm se llevó a cabo a una temperatura de 70 °C durante las primeras dos horas y a 115 °C durante las dos siguientes horas. Se utilizó un sistema refrigerante para evitar la evaporación de la disolución de NaOH y favorecer el contacto entre el reactivo y la quitina durante la reacción,

Figura 10. Por último, se realizó el lavado y secado de cada muestra de la misma forma en que se realizó para la etapa de Desproteinización.



Figura 10. Desacetilación de la quitina.

2.4.Preparación de membranas

Las membranas se prepararon por el método de evaporación del solvente. Se disolvieron 0.20 g de quitosano en 10 mL de ácido acético 1 M. La disolución se vertió en una caja Petri y se evaporó a 50 °C durante 24 horas.

2.5.Caracterización de quitina y quitosano

2.5.1. Espectroscopia de infrarrojo por transformada (FTIR)

El espectro IR de cada muestra se obtuvo en un espectrofotómetro de infrarrojo Perkin Elmer con transformada de Fourier y sistema ATR. Se utilizaron aproximadamente 0.05 g de cada una, y se realizó en la región de 500-4000 cm^{-1} que es donde se encuentran las vibraciones propias de los grupos funcionales orgánicos. Los grupos funcionales del quitosano son -OH, NH_2 , C=O, CH_2 , -NH, C-O-C y C-H.

2.5.2. Difracción de rayos X (DRX)

Los difractogramas de quitina y quitosano, se obtuvieron con radiación proveniente del ánodo CuK con una longitud de onda de 1.54 empleando un difractómetro Bruker D8 discover SE2. El intervalo angular fue de 5 a 70° con incrementos de 0.2° y el tiempo de medición fue de 3 segundos/incremento.

2.5.3. Contenido de proteínas

El contenido de proteína residual en la quitina se establece por el porcentaje de nitrógeno total contenido en las muestras; este se determinó por el método de micro-Kjeldahl [22] con un factor de 6.25, utilizando la ecuación 1.

$$\%Pr = \frac{(14.0)(N)(V)(100)(F)}{m(1000)} \quad (1)$$

Donde:

N = Normalidad del HCl

V = Vol. De HCl para la muestra en mL – Vol. De HCl para el blanco en mL

14.01 = Peso atómico del Nitrógeno

m = Masa de la muestra en gramos

F = 6.25 (Valor asignado para proteínas en general)

2.5.4. Grado de desacetilación

El grado de desacetilación (GD) se determinó de acuerdo con la metodología reportada en la referencia [21]. En esta se toma como referencia el espectro de infrarrojo del quitosano. Se obtiene el área de las bandas de absorción correspondientes a los grupos funcionales amina III (1320cm⁻¹) y CH₂ (1420cm⁻¹) y el GD se determina con la ecuación 2 [23].

$$\frac{A_{1320}}{A_{1420}} = 0.3822 + 0.0313DA \quad (2)$$

Donde:

DA = Grado de acetilación (%)

Grado de desacetilación = 100-DA

A_{1320} = Área bajo la curva de la banda de absorción en el número de onda 1320cm⁻¹

A_{1420} = Área bajo la curva de la banda de absorción en el número de onda 1420cm⁻¹

2.5.5. Peso molecular

El peso molecular del quitosano (peso molecular promedio viscoso (M_v)) se determinó mediante viscosimetría capilar. Para ello se utilizó un viscosímetro tipo Ubbelohde a una temperatura de 25 °C. Las muestras de quitosano se prepararon por disolución en una solución buffer de ácido acético (0.30M) /acetato de sodio (0.20M). Una vez establecidas las condiciones de trabajo, se procedió a determinar el tiempo de caída de la disolución polimérica quitosano / buffer, Figura 11, para hallar la viscosidad. La viscosidad intrínseca se determinó utilizando la ecuación 3.

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

Donde $[\eta]$ es la viscosidad intrínseca, K y a son dos constantes empíricas que dependen del sistema de disolvente-polímero a una determinada temperatura. Para estas condiciones los parámetros establecidos de acuerdo con la literatura son $K=7.4 \times 10^{-4}$ y $a=0.86$ [8].



Figura 11. Medición de viscosidad específica.

2.5.6. Microscopia electrónica de barrido

Para determinar el tamaño de partícula se utilizó un microscopio electrónico de barrido modelo Jeol USM-6610LV. El campo magnético del microscopio permitió enfocar los rayos catódicos (electrones) y se obtuvo una imagen, que, por examen de la superficie de las estructuras, permitió la observación y la caracterización de las partículas.

2.6. Aplicación de membranas y polvo de quitosano en bistec y carne molida de res

El color de la carne es una de las propiedades organolépticas claves para determinar si ésta se encuentra en estado adecuado para su consumo, además de influir en la decisión de compra del consumidor. El color característico de la carne es rojo cereza brillante; con el transcurrir del tiempo cambia a un color marrón indeseable, causado por la oxidación de oximioglobina convirtiéndose en metamioglobina [24]. En el presente estudio se evaluó la vida útil de la carne de res a través de la determinación de su color rojo característico.

Se elaboró una membrana con cada muestra de quitosano. El bistec y la carne molida se adquirieron en un supermercado de la zona y se prepararon porciones de 1 g. Cada muestra de carne se recubrió con una membrana de quitosano de 10 cm de diámetro (Figura 12). Se utilizaron 0.08 g de quitosano en polvo para recubrir tanto al bistec como a la carne molida (Figura 13). A las muestras control no se les aplicó quitosano. Todas ellas se almacenaron en refrigeración a 4 °C durante 10 días.



Figura 12. Muestras de bistec y carne molida de res recubiertas con a) membranas de quitosano y b) polvo de quitosano.

2.6.1. Evaluación de color

Se midió el color cada 24 horas durante 10 días con un colorímetro marca HunterLab. Se midió la luminosidad (L^* , de 0 a 100), el parámetro a^* , y el parámetro b^* . a^* representa los colores rojo y verde (positivos y negativos, respectivamente) y b^* los colores amarillo y azul (positivo y negativo, respectivamente). A partir de estos valores se calcularon las coordenadas de color cromático (C_{ab}^*), ecuación 4. Este es más útil y sensible para detectar cambios en el color rojo de la carne de res y otros productos cárnicos [15].

$$C_{ab}^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (4)$$

CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Características de las muestras

Las muestras de quitina y quitosano se obtuvieron en polvo, tal como se muestra en la Tabla 3. Se puede observar que conforme aumenta el tiempo de sonicación el color cambia de claro a oscuro en las muestras de quitina. Esta tendencia tam bien se observa en las muestras de quitosano. El color del quitosano se midió utilizando un colorímetro marca HunterLab. Se midieron los parámetros L^* , a^* y b^* . El índice de blancura se calculó con la ecuación 5 [25].

$$WI = 100 - [(100 - L^*)^2 + (a^*)^2 + (b^*)^2]^{0.5} \quad (5)$$

La Tabla 4 contiene el índice de blancura de las muestras. Se observa que a medida que aumenta el tiempo de sonicación hay un decremento en el índice de blancura, posiblemente se debe que al mismo tiempo que se realiza la desproteínización por sonicación, hay una oxidación de los pigmentos existentes en los camarones, como la astaxantina que intensifica el color del polvo de quitosano [26].

Tabla 3. Muestras de quitinas y quitosanos obtenidos.















<i>Muestra</i>	<i>Tiempo de sonicación (minutos)</i>						
	10	15	20	25	30	35	40
<i>Quitina</i>							
<i>Quitosano</i>							

Tabla 4. Índice de blancura (WI) de las muestras de quitosano.

Tiempo de sonicación (min)	Blancura (WI)
10	40.974
15	41.697
20	43.307
25	39.478
30	35.918
35	35.784
40	36.542

3.2. Quitina

3.2.1. Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)

En la Figura 13 se muestran los espectros de infrarrojo de las muestras de quitina obtenidas con desproteínización asistida por ultrasonido con variación en el tiempo de sonicación en 10, 15, 20, 25, 30, 35, y 40 minutos. y en la Tabla 5 se muestra la asignación de bandas de absorción. En todos los espectros pueden distinguirse las bandas de los grupos funcionales característicos de la quitina. La banda de vibración -OH a $3431\text{-}3484\text{ cm}^{-1}$, las bandas de las amidas NH_2 y NH en $1621\text{-}1624\text{ cm}^{-1}$ y $1533\text{-}1545\text{ cm}^{-1}$, respectivamente.

En la Figura 14 las bandas características por estiramiento de C-O-C se hallan en $1146\text{-}1156$ y las del C-O en $1073\text{-}1014\text{ cm}^{-1}$. Otra señal característica es la deformación de CH en $883\text{-}897\text{ cm}^{-1}$. Este comportamiento corresponde a lo reportado por Chávez et al. [27]. La Figura 12 también contiene el espectro de la quitina obtenida por el método químico, el cual contiene las mismas bandas de absorción de los grupos funcionales de la quitina obtenida asistida por ultrasonido. Estos resultados coinciden con lo reportado por Brunner et al. [28].

El análisis por FTIR mostró similitud en todos los espectros de las muestras de quitina obtenidas. Sin embargo, hubo diferencias sutiles en la profundidad de las bandas correspondientes a las amidas NH y N . Esto se debe al cambio en el porcentaje de acetilación de las muestras [29],

comportamiento relacionado con el tiempo de sonicación aplicado en el proceso de desproteinización. El tiempo de tratamiento con ultrasonido influye directamente en el rendimiento de extracción de proteínas, dando como resultado quitina con mayor pureza [30]. Lo anterior puede confirmarse por la ausencia de bandas de absorción en el intervalo de 1650-1700 cm^{-1} correspondientes a los grupos C=O de los grupos terminales COOH, característicos de las proteínas. En el caso de la quitina obtenida por el método químico, se observan señales a 1758 y 1700 cm^{-1} , que evidencia la presencia de una pequeña cantidad de proteínas que no se eliminaron en el proceso.

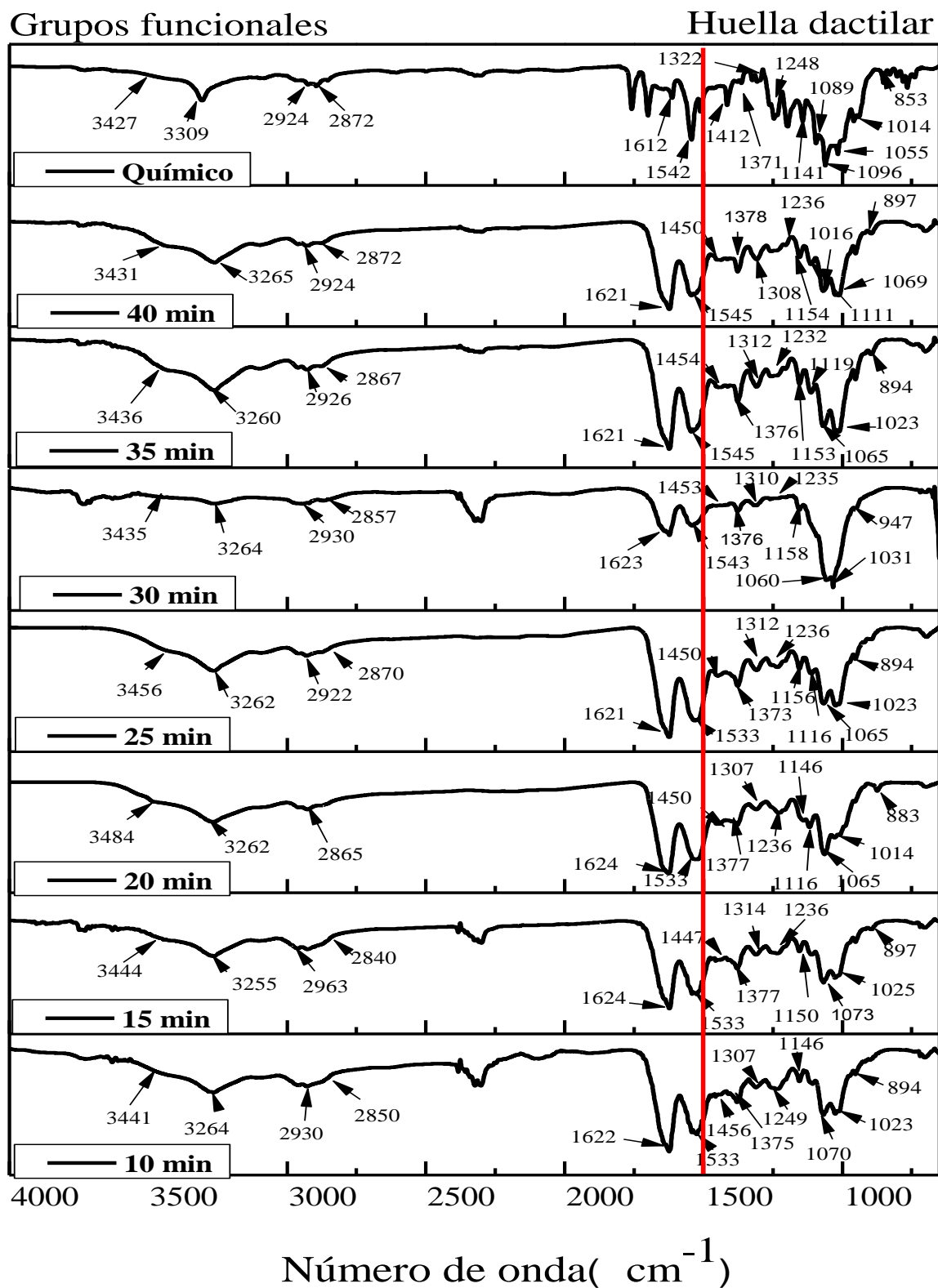


Figura 13. Espectros IR de muestras de quitina obtenida a partir desproteínización asistida por ultrasonido en frecuencia alta y diferente tiempo de sonicación.

Huella dactilar

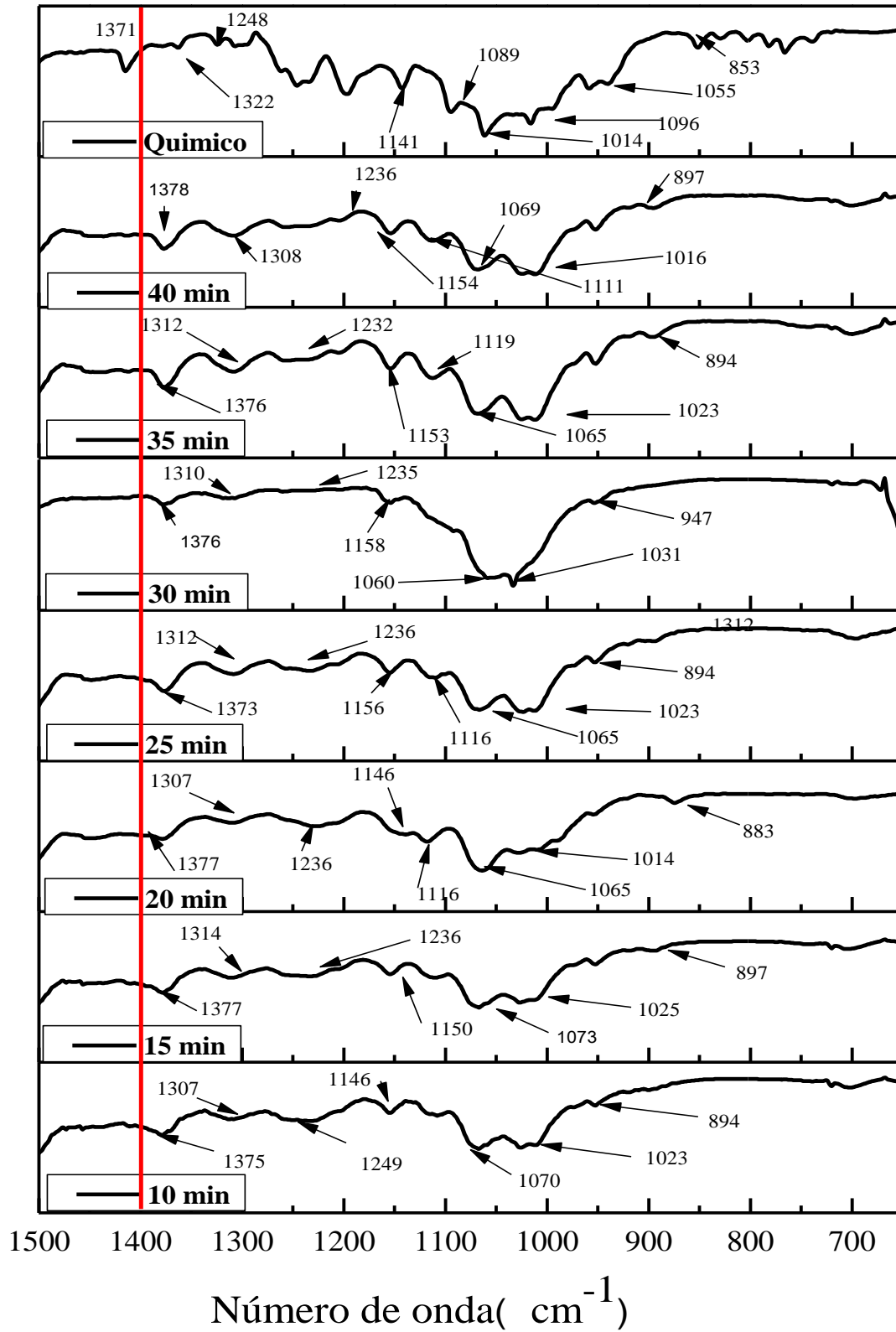


Figura 14. Zona de huella dactilar para los espectros IR de las muestras de quitina.

Tabla 5. Asignación de las bandas de absorción representativas de los espectros IR de las muestras de quitina.

GRUPOS FUNCIONALES	Modo de vibración	Quitina						
		Método químico (referencia)	10 minutos	15 minutos	20 minutos	25 minutos	35 minutos	40 minutos
<i>OH</i>	<i>Estiramiento</i>	3427	3441	3444	3484	3456	3436	3431
<i>NH</i>	<i>Estiramiento</i>	3309	3264	3255	3262	3262	3260	3265
<i>CH₂-CH₃</i>	<i>Estiramiento</i>	2924	2930	2963	2928	2922	2929	2924
<i>CH</i>	<i>Estiramiento</i>	2872	2850	2840	2865	2870	2867	2872
<i>NH₂, banda característica</i>	<i>Débil</i>	1660	1622	1624	1624	1621	1621	1621
<i>NH, banda característica</i>	<i>Doblamiento</i>	1542	1533	1533	1533	1533	1545	1545
<i>CH₃</i>	<i>Doblamiento en el plano</i>	1412	1456	1447	1450	1450	1454	1450
<i>CH</i>	<i>Doblamiento</i>	1371	1375	1377	1377	1373	1376	1378
<i>N, banda característica</i>	<i>Estiramiento</i>	1322	1307	1314	1307	1312	1312	1308
<i>OH</i>	<i>Doblamiento</i>	1248	1249	1236	1236	1236	1232	1236
<i>Puente asimétrico de oxígeno, extensión C-O-C</i>	<i>Estiramiento asimétrico</i>	1141	1146	1150	1146	1156	1153	1154
<i>C-O con C₃-OH</i>	<i>Estiramiento</i>	1055	1070	1073	1065	1065	1069	1069
<i>C-O con C₆-OH</i>	<i>Estiramiento</i>	1014	1023	1025	1014	1023	1014	1016

3.2.2. Difracción de Rayos X (DRX)

La Figura 15 contiene los difractogramas de las muestras de quitina obtenidas con desproteínización asistida por ultrasonido; para fines de comparación se muestra el difractograma de la quitina obtenida por el método químico. Todos los patrones de difracción de rayos X presentan las reflexiones características de la quitina, de acuerdo con Hidalgo et al. [31]. Es decir, existe una estructura cristalina similar en todas ellas. La quitina química presenta un pico de difracción aproximado a 26° que corresponde a trazas de CaCO₃ [32].

Las reflexiones obtenidas coinciden con lo reportado por Hidalgo et al. [31]. Presentan un pico principal entre 19 y 20°; y un pico secundario entre 9° y 10°. Todas las muestras presentan fases cristalinas de corto alcance y fases amorfas. Se observa un aumento en la intensidad de los picos principales de los difractogramas en relación al tiempo de sonicación, esto resulta en muestras de quitina con menos impurezas presentes y mayor cristalinidad al aumentar el lapso de tiempo [33].

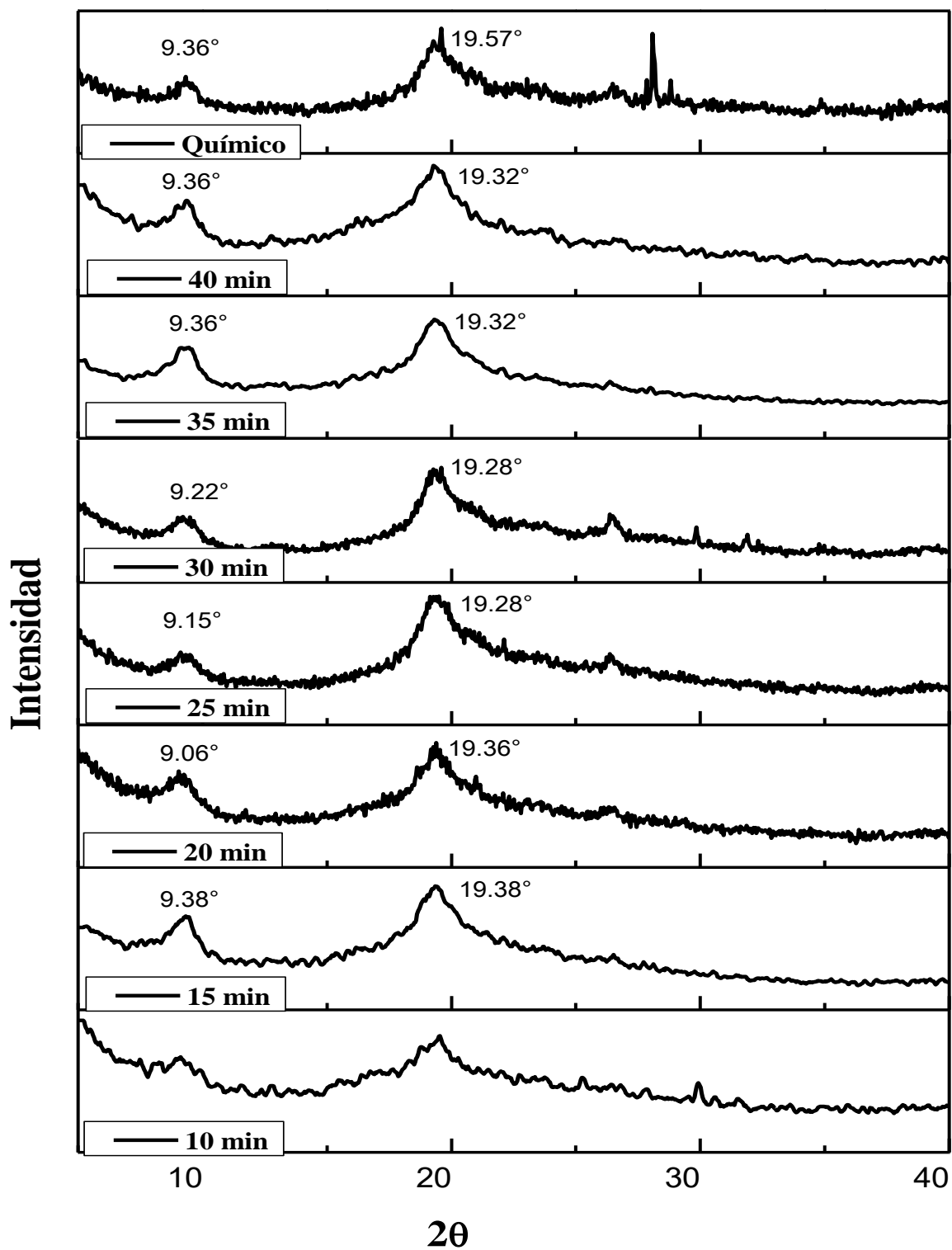


Figura 15. Difractogramas de las muestras de quitinas obtenidas con proceso de desproteización asistido por ultrasonido en frecuencia alta variando el tiempo de sonicación.

3.2.3. Contenido de proteínas

En la Tabla 6 se muestra la cantidad de nitrógeno (%) contenido en las muestras de quitina tratadas con diferente tiempo de sonicación. A medida que aumenta este parámetro el contenido de nitrógeno disminuye, a mayor tiempo de exposición al efecto de vibración causado por las ondas mecánicas generadas por el ultrasonido, se produce un mayor efecto de cavitación [30]. Este efecto produce esfuerzos cortantes que inducen la ruptura de enlaces de hidrógeno y otros enlaces intermoleculares o intramoleculares, dando como resultado que la matriz proteína-quitina se degrade, facilitando así la lixiviación de las proteínas [34].

El contenido de proteína no disminuye linealmente como función del tiempo de sonicación (Figura 16), esto es atribuido a que no se realizó un control sobre la relación sólido/solvente [25,27]. Shisarth et al. reportaron que la relación de sólido/solvente tiene un efecto sobre contenido la extracción de proteínas. Un incremento en la proporción del solvente mejora la extracción de proteínas, esto se debe a un aumento en la propagación de ondas de ultrasonido en el solvente, dando como resultado una mayor intensidad de la cavitación. Sin embargo, un exceso de solvente, que para efectos de este trabajo se utilizó agua, reduce la eficiencia de extracción atribuido al aumento de radicales libres por la disociación inducida del agua [35].

Tabla 6. Contenido de Nitrógeno total en las muestras de quitina tratadas con ultrasonido y quitina obtenida por el método químico.

Tiempo de sonicación (minutos)	Contenido de Nitrógeno (%)
10	6.31
15	6.34
20	5.66
25	3.50
30	1.96
35	4.15
40	2.61
Método químico	5.66

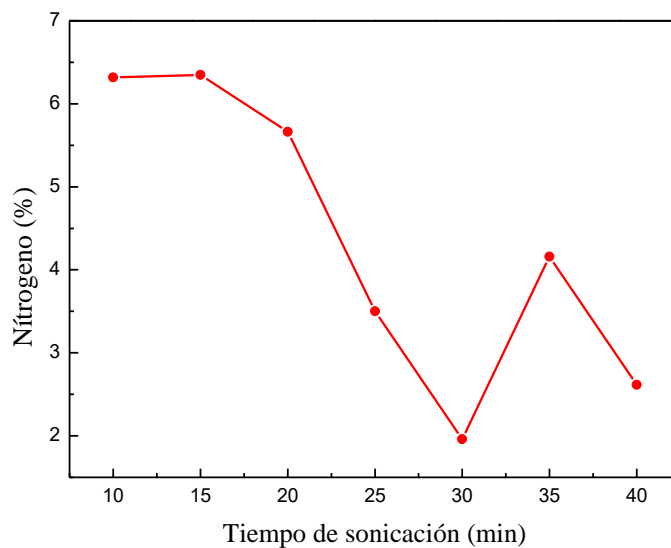


Figura 16. Efecto del tiempo de sonicación en el porcentaje de nitrógeno contenido en las muestras de quitina.

3.2.4. Microscopía electrónica de barrido

La Figura 17 muestra el efecto del ultrasonido sobre la morfología de las muestras de quitina. Se observan partículas con la forma característica de hojuela y con erosión en la superficie de estas. Esto se puede atribuir a la fuerza de corte, ondas de choque y turbulencia, resultado de la exposición al ultrasonido; en algunos casos se pueden apreciar micro grabados producto de los efectos de superposición de las ondas estacionarias del ultrasonido [36].

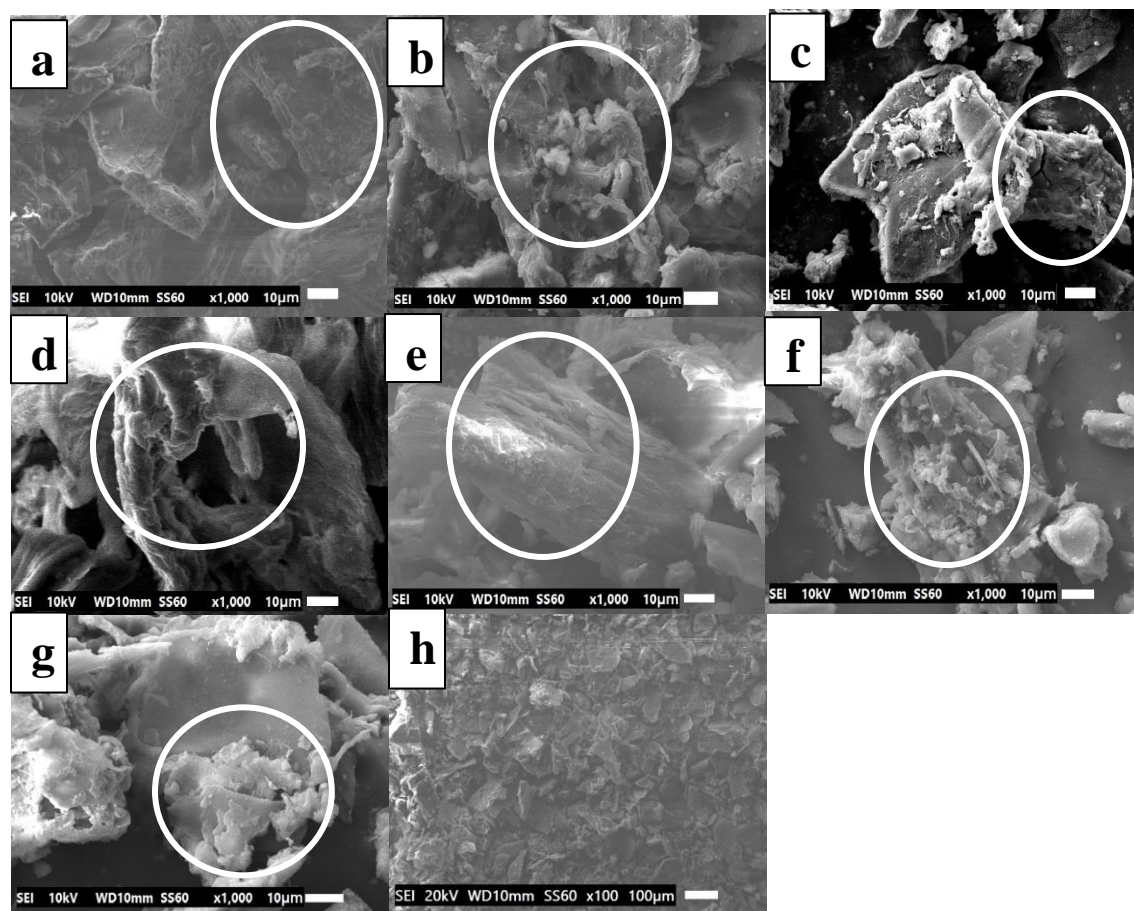


Figura 17. Imágenes SEM de muestras de quitina de (a) 10, (b) 15, (c) 20, (d) 25, (e) 30, (f) 35 y (g) 40 minutos de sonicación; (h) forma de partículas de quitina.

El tamaño de partícula se calculó a través de las micrografías SEM de las muestras, la partícula se consideró con forma de círculo y se midió su diámetro equivalente de acuerdo con su escala en número de megapíxeles. En la Figura 18 se muestra el tamaño de partícula como función del tiempo de sonicación para todas las muestras de quitina que se obtuvieron con desproteínización asistida por ultrasonido. Se puede observar que un aumento en el tiempo de sonicación disminuye el tamaño de partícula. El ultrasonido produce un efecto de sonofragmentación que consiste en la rotura de partículas en fragmentos de tamaño inclusive nanométrico, por causa del choque entre las partículas y las ondas de choque originadas por el proceso de cavitación [37]. Por lo que el tiempo de sonicación tiene un efecto inverso en el tamaño de la partícula [38].

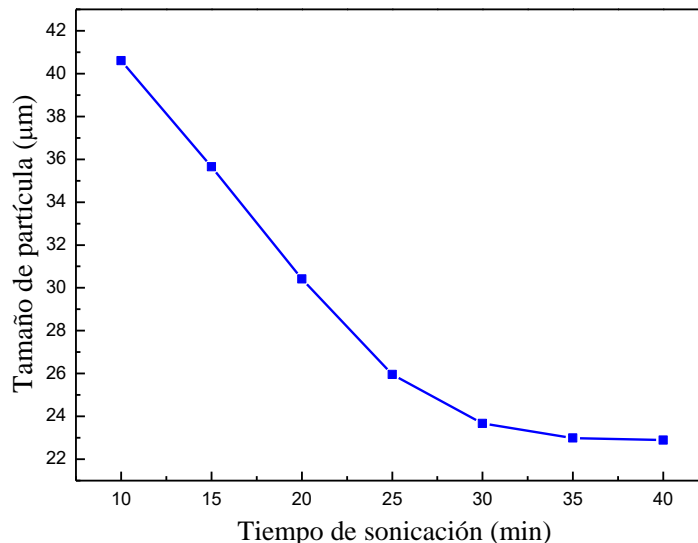


Figura 18. Tamaño de partícula como función del tiempo de sonicación de las muestras de quitina.

3.3. Quitosano

3.3.1. Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)

Todas las muestras de quitina obtenidas previamente se desacetilaron con NaOH para así obtener quitosano. En la Figura 19 se muestran los espectros FTIR de todas las muestras obtenidas y en la Tabla 7 se presenta la asignación de las bandas de absorción. Los espectros de todas las muestras de quitosano contienen las bandas de absorción características de quitosano reportadas en la literatura, Kumirska et al. [39]. Estos espectros coinciden con el espectro de quitosano comercial de la marca Sigma. La banda de vibración que se ubica en el intervalo de 3439 a 3432 cm^{-1} corresponde al estiramiento del grupo -OH, así como el estiramiento del -NH en 3255-3306 cm^{-1} . El estiramiento asimétrico de CH_2 y el simétrico del CH se encuentran en 2914-2927 y 2847-2875 cm^{-1} , respectivamente. Las bandas características de las amidas NH_2 en 1621-1653 cm^{-1} y NH en 1541-1558 cm^{-1} . La ausencia de bandas en la región de 1540 cm^{-1} indica la eliminación de proteínas, lo cual concuerda de con lo reportado por Mohammed et al. [40]. En el espectro correspondiente al quitosano obtenido por el método químico, se encuentra una banda en 1544 cm^{-1} , lo que indica la existencia de proteínas que no fueron eliminadas, aun después del proceso de desacetilación.

En la zona de la huella dactilar, Figura 20, se observa la banda correspondiente al estiramiento asimétrico del puente C-O-C en $1148-1154\text{ cm}^{-1}$ y el estiramiento simétrico de C-O con CH₃ en $1061-1072\text{ cm}^{-1}$.

En todos los espectros se puede apreciar que hay una disminución en la intensidad de las bandas de absorción en $1541-1558$ y $1306-1312\text{ cm}^{-1}$ que son características del contenido residual del grupo N-acetilo. Se observa también un aumento en la profundidad de las bandas correspondientes a los grupos NH₂ y CH₂ en $1613-1653$ y $1415-1421\text{ cm}^{-1}$, respectivamente; a mayor profundidad de estas bandas, se espera un aumento en el grado de desacetilación del quitosano obtenido. La variación en la intensidad de estas bandas está directamente relacionada con el tiempo de sonicación.

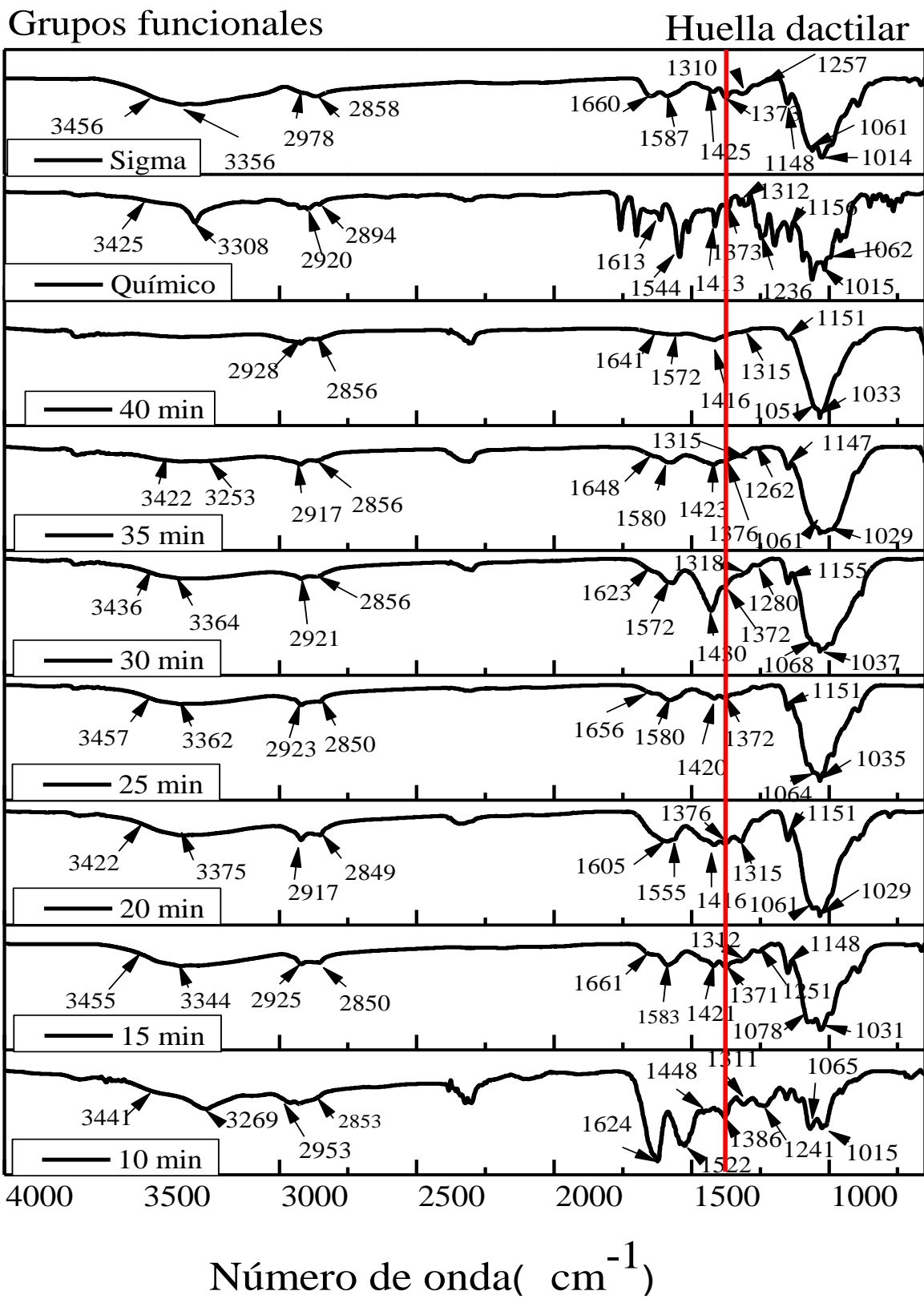


Figura 19. Espectros IR de las muestras de quitosano obtenidas.

Región de huella dactilar

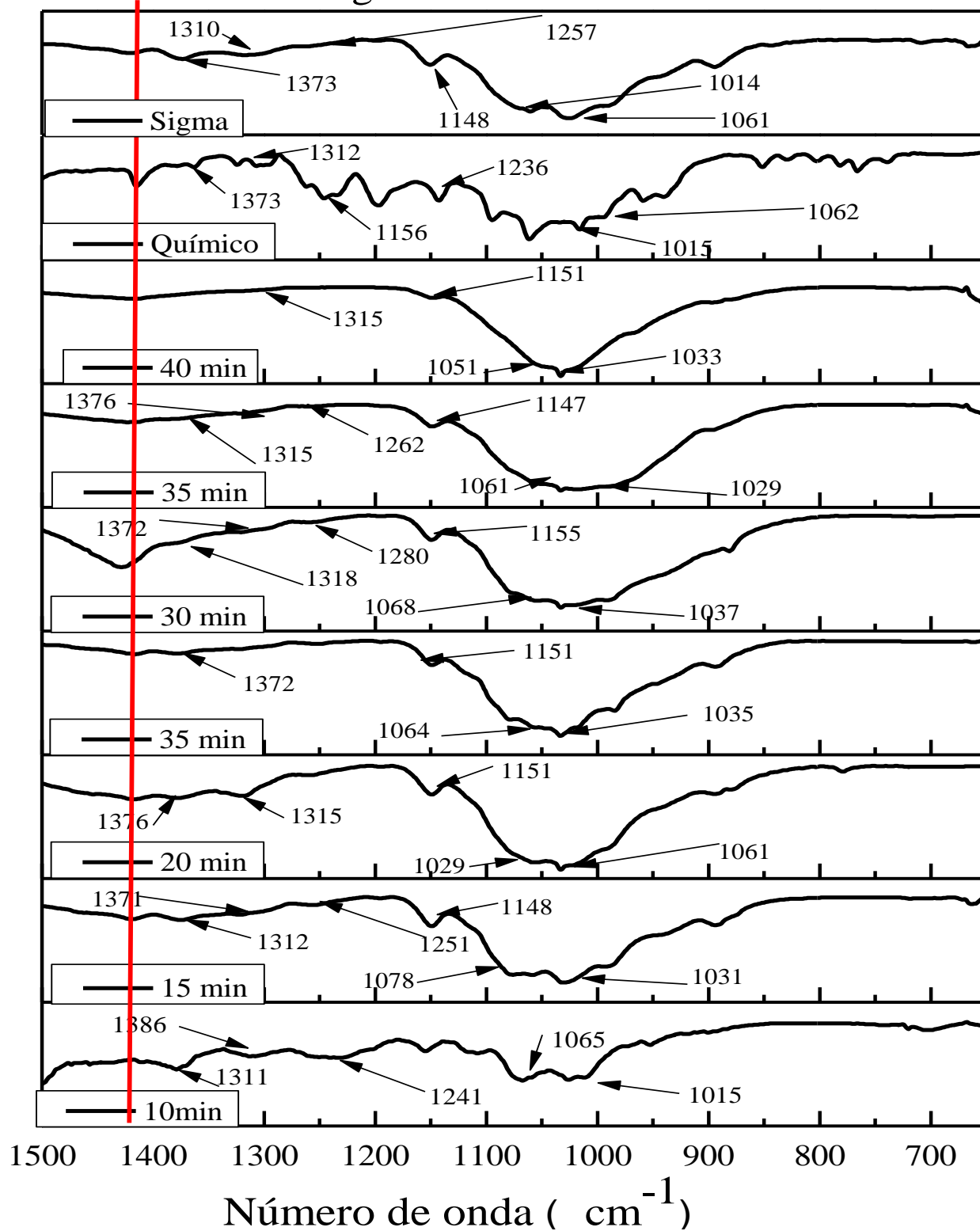


Figura 20. Región huella dactilar de los espectros de quitosano.

Tabla 7. Asignación de las bandas de absorción representativas de los espectros IR de las muestras de quitosano.

GRUPOS FUNCIONALES	Quitosano								
	Método químico (referencia)	Sigma	10 minutos	15 minutos	20 minutos	25 minutos	30 minutos	35 minutos	40 minutos
<i>OH, estiramiento</i>	3425, débil	3456, débil	3442, débil	3441, débil	3441, débil	3441	3433	3439	3433
<i>NH, estiramiento</i>	3308	3356, débil	3260, débil	3257, débil	3255, débil	3267	3259	3306	3259
<i>CH₂-CH₃, estiramiento asimétrico</i>	2920	2914	2922	2927	2922	2920	2920	2929	2924
<i>CH, estiramiento</i>	2894	2867	2851	2856	2847	2855	2875	2853	2880
<i>NH₂, banda característica</i>	1613	1660	1622	1653	1621	1619	1622	1613	1623
<i>NH, banda característica</i>	1544	1587	1556	1556	1557	1548	1554	1541	1558
<i>CH₂, doblamiento en el plano</i>	1413	1425	1415	1421	1415	1415	1415	1417	1419
<i>CH, doblamiento</i>	1373	1373	1374	1380	1375	1377	1375	1373	1374
<i>N, banda característica</i>	1318	1310	1312	1306	1310	1322	1306	1312	1312
<i>OH, doblamiento</i>	1243	1257, débil	/	/	/	1255	1259	1241	1259
<i>Puente asimétrico de oxígeno, extensión C-O-C</i>	1146	1148	1152	1150	1152	1148	1154	1138	1154
<i>Estiramiento de C-O con C₃-OH</i>	1062	1061	/	/	/	1065	1072	1061	1067
<i>Estiramiento de C-O con C₆-OH</i>	1015	1014	1029	1025	1023	1017	1025	1019	1019

3.3.2. Difracción de Rayos X (DRX)

En la Figura 21 se presentan los difractogramas de las muestras de quitosano; para efectos de comparación se muestra el difractograma del quitosano comercial Sigma Aldrich. En los patrones de quitosano comercial y de las muestras de quitosano obtenido a partir de quitina desproteinizada con tiempos de sonicación de 15 a 35 minutos se observan dos picos principales,

uno de gran intensidad en un intervalo de 19.8° - 20.1° y uno secundario entre 10.2° y 10.4° . Ambas reflexiones son características del espectro DRX de quitosano [41]. Al igual que en la quitina, se aprecian regiones cristalinas de corto alcance junto con fases amorfas, las muestras de quitosano obtenido muestran una mayor intensidad en los picos característicos en comparación con el espectro del quitosano comercial. Se concluye que el proceso de sonicación favorece la obtención de quitosano con mayor cristalinidad [36].

Sin embargo, en las muestras con tiempo de sonicación de 10 minutos y 40 minutos se observa un mayor porcentaje de fases amorfas en comparación con las otras muestras, además de no presentar los picos característicos. Para la muestra de 40 minutos se puede deber a que presenta un alto grado de desacetilación cercano al 100% por lo que su composición se asemejaría más a quitano. En el caso de la muestra de 10 minutos se considera que el tiempo de sonicación no fue suficiente para realizar una eficaz desproteinización, quedando un contenido considerable de proteína residual en la quitina que dificulta una desacetilación eficiente y ocasiona una disminución considerable en la cristalinidad del quitosano.

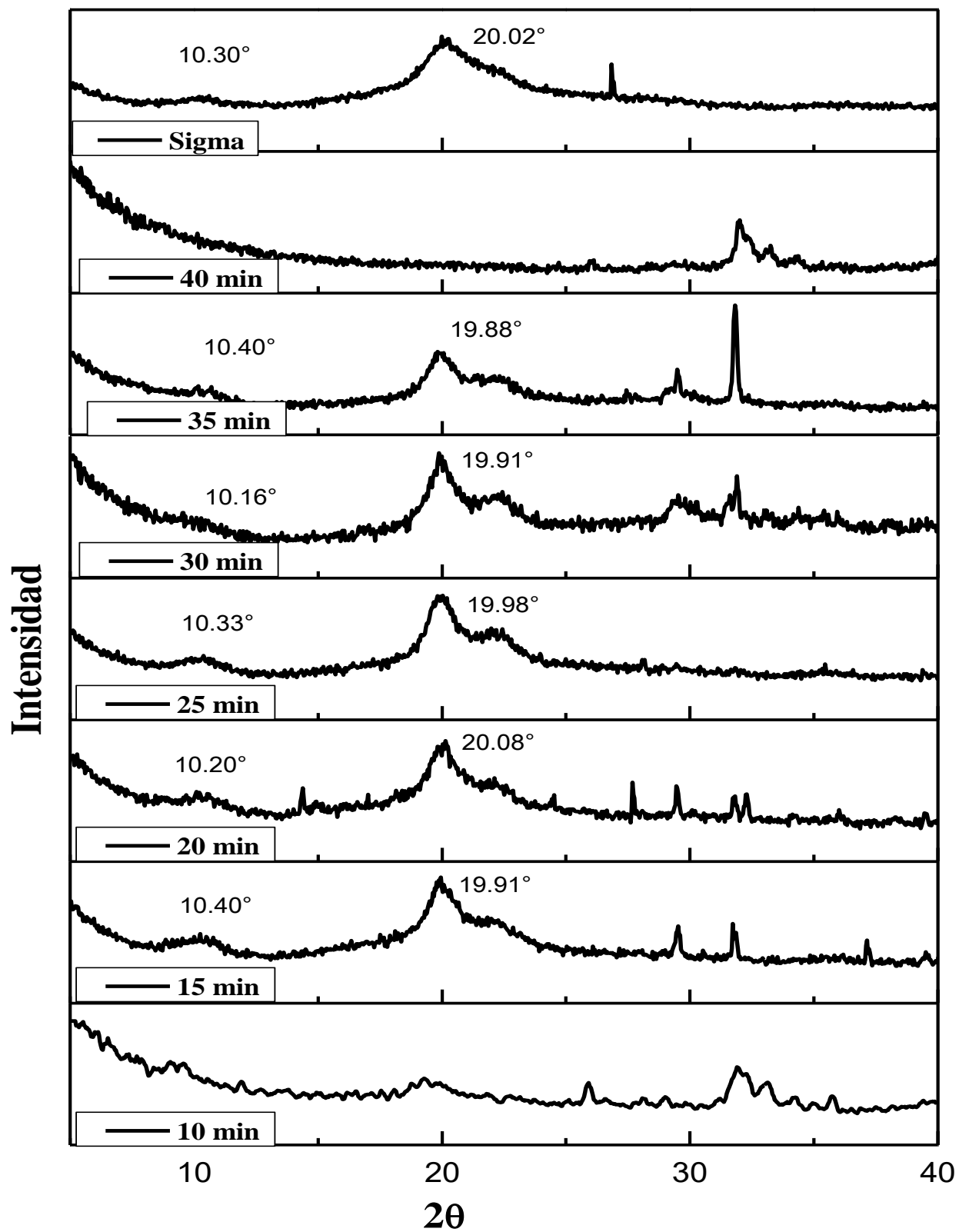


Figura 21. Difractogramas de las muestras de quitosano obtenido.

3.3.3. Grado de Desacetilación

La Tabla 8 contiene el grado de desacetilación (GD) de las muestras de quitosano. Este parámetro se obtuvo a partir del espectro de IR de las muestras de quitosano. Se utilizó la relación entre las bandas de absorción en 1420 cm^{-1} y 1320 cm^{-1} (A_{1420}/A_{1320}) [23], que corresponden a los grupos funcionales NH y CH₂, respectivamente; la relación A_{1420}/A_{1320} presenta el error más bajo. Se observa que, al incrementar el tiempo de sonicación para tratar la quitina, el grado de desacetilación del quitosano producido es mayor. El GD más bajo se obtuvo a los 10 minutos de sonicación y el más alto se produjo a los 30 minutos. En la Figura 22 se aprecia que el incremento del GD no es lineal, este comportamiento está relacionado con el contenido de proteína residual presente en las muestras de quitina, Tabla 6. Las muestras que presentaron menor contenido de proteína son aquellas que tienen los mayores grados de desacetilación. Un menor contenido de proteína en la quitina facilita la accesibilidad del solvente para lograr una mayor desacetilación [32, 33].

Tabla 8. Grado de Desacetilación de las muestras de quitosano obtenidas a partir de la quitina extraída con ultrasonido.

Tiempo de sonicación (minutos)	Grado de desacetilación (%)
10	73.314
15	80.604
20	90.965
25	92.860
30	100.937
35	93.134
40	94.034

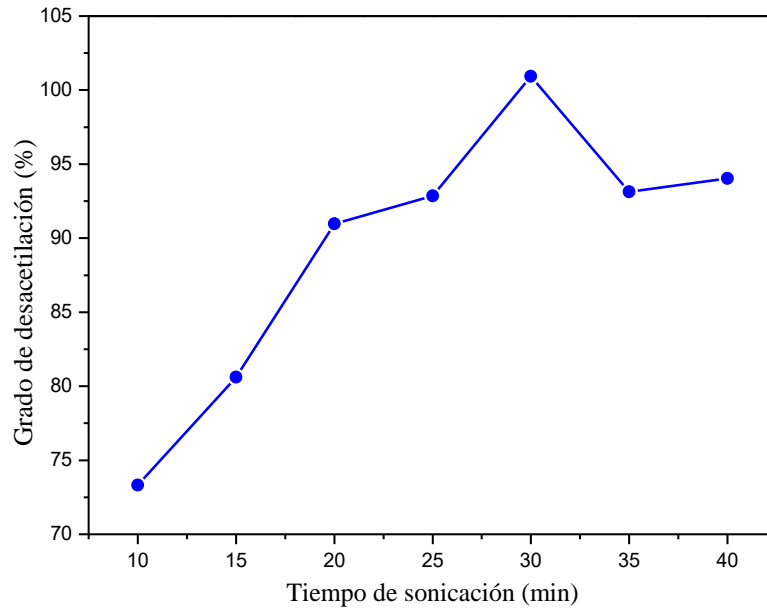


Figura 22. Grado de desacetilación de las muestras de quitosano obtenidas.

3.3.4. Peso molecular

En la Tabla 9 se muestran los resultados del peso molecular de las muestras de quitosano, obtenidos por viscosimetría capilar, se consideran de bajo y medio peso molecular de acuerdo a la clasificación de Zhang et al. [43]. No se aprecia un comportamiento lineal de los resultados en relación con el tiempo de sonicación. Diversos autores indican que el peso molecular se ve afectado por el proceso de desproteización empleado para el aislamiento de la quitina; Synowiecki et al. establecen que muestras de quitina con bajo contenido de nitrógeno dan como resultado quitosanos con mayores valores de viscosidad y por consiguiente mayor peso molecular [44]. Sin embargo, Kyoon et al. reportan que se obtuvieron muestras de quitosano con alto peso molecular a partir de quitinas que no pasaron por un proceso de desproteización. Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con la idea de ambos autores, por lo que se concluye que es necesario tener un mayor control y estudiar más a fondo sobre el efecto que tienen las condiciones de operación para la obtención de quitosano en el peso molecular.

Tabla 9. *Peso molecular de las muestras de quitosano obtenidas a partir de la quitina extraída con ultrasonido.*

Tiempo sonicación (minutos)	Peso molecular (KDalton)	Clasificación
10	1.15	Bajo
15	73.61	Medio
20	11.8	Bajo
25	86.82	Medio
30	9.68	Bajo
35	60.51	Medio
40	55.66	Medio

3.3.5. Microscopia electrónica de barrido

Respecto a la morfología de las muestras de quitosano (Figura 23 y Figura 24), las partículas aún conservan su forma característica de hojuela y se aprecia un incremento en la erosión de estas, posiblemente causado por la acción del solvente empleado en la desacetilación.

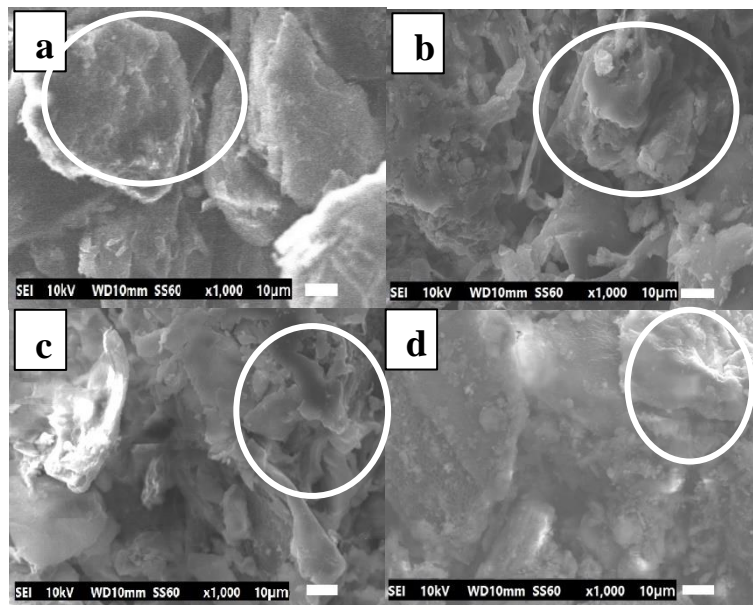


Figura 23. . *Imágenes SEM de muestras de quitosano de (a) 10, (b) 15, (c) 20 y (d) 25 minutos de sonicación.*

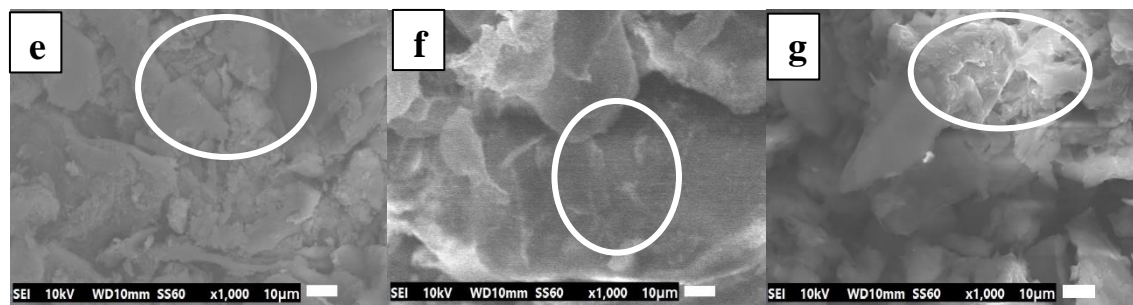


Figura 24. Imágenes SEM de muestras de quitosano (e) 30, (f) 35 y (g) 40 minutos de sonicación.

No se observan diferencias significativas en relación con el tamaño de partícula de las muestras de quitina Figura 25. Se concluye que el proceso de desacetilación no produce efecto sobre el tamaño de partícula del quitosano que se obtiene.

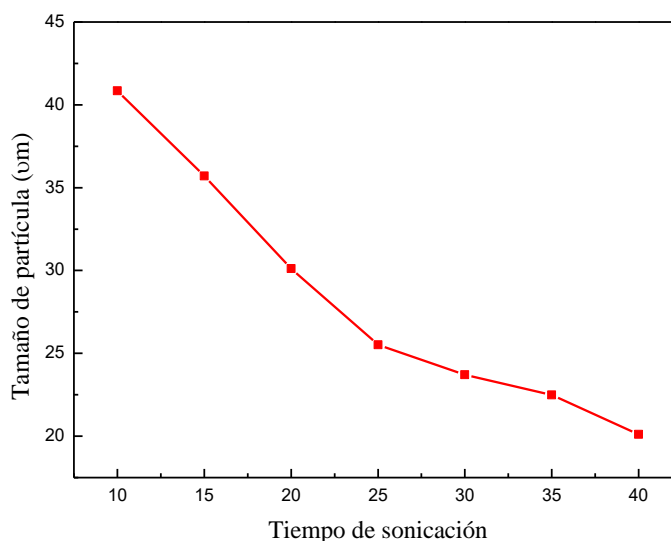


Figura 25. Tamaño de partícula como función del tiempo de sonicación de las muestras de quitosano.

3.4. Rendimiento

El rendimiento de quitina (base seca) obtenida a partir del lote de exoesqueletos de camarón crudo por desproteinización asistida por ultrasonido fue de 47.68 %. El rendimiento obtenido en este trabajo es mucho mayor al reportado por M. S. Hossain y A. Iqbal (2014), que extrajeron quitina a partir de exoesqueletos de camarón por el método químico con una variación de rendimiento entre 13.12%-17.36% [45]. El incremento del rendimiento de la quitina obtenida en este trabajo podría deberse que al realizar la desproteinización asistida por ultrasonido, en comparación por el método químico que emplea una base alcalina, se elimina una etapa de lavado, evitando que haya pérdida de muestra. Sin embargo, el rendimiento de quitosano

producido a partir de la quitina extraída fue de 11.89%. En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se observa que un aumento en el tiempo de sonicación disminuyó el rendimiento total del quitosano obtenido. Al, incrementar el tiempo de sonicación sucede una sonofragmentación de partículas que ocasiona la disociación y descomposición de la quitina junto con las proteínas. Esto podría resultar en la formación de pequeñas moléculas que se encuentran en forma de agregados que se pierden al realizar el lavado del quitosano [28, 38].

Tiempo sonicación, min.	Exoesqueletos de camarón, g.	Quitina, g.	Quitosano g.	R. Quitina base seca, %	R. Quitosano base seca, %
10	10	3.5916	1.5341	35.916	15.341
15	10	3.9175	1.0427	39.175	10.427
20	10	2.2765	0.3563	22.765	3.563
25	10	5.342	0.6524	53.42	6.524
30	10	7.1538	1.1074	71.538	11.074
35	17	9.0939	2.2031	53.49352941	12.95941176
40	11	6.321	2.571	57.46363636	23.37272727
Rendimientos totales				47.68159511	11.89444843

3.5. Conservación de la carne de res

En la Figura 27 se presentan las muestras de bistec de res recubiertas con membranas de quitosano y la muestra control sin recubrir. Se observa una gran variación en el color de la muestra control con un rojo brillante al día 1 en comparación al día 10 que tiene un rojo oscuro. Sin embargo, en las muestras con los recubrimientos de 15 y 25 minutos de sonicación esta variación es menor y no se aprecia diferencia entre el color de ambas.

La Figura 28 contiene las muestras de carne molida de res recubiertas con las membranas de quitosano y la muestra control sin recubrir. Se observa un considerable cambio de color en la muestra de control que va de un rojo brillante en el día 1 a un rojo oscuro en el día 10. Al igual que en las muestras de bistec cubiertas con membranas de quitosano, el cambio en las muestras de 40 y 25 minutos de sonicación el cambio es mínimo.



Figura 26. Muestras de bistec y carne molida de res cubiertas con polvo de quitosano.

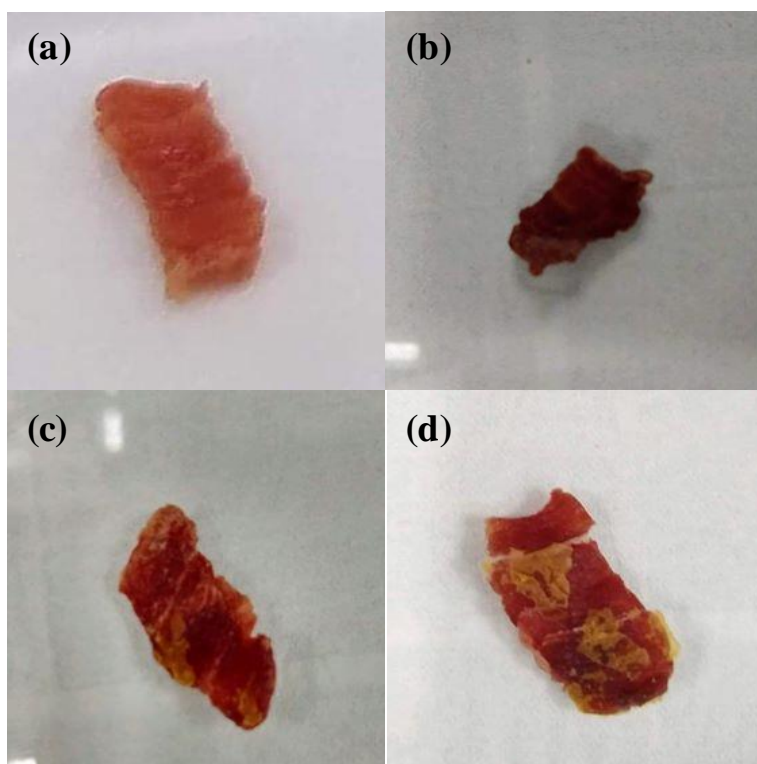


Figura 27. Muestras de bistec de res. (a) control al día 1, (b) control al día 10, (c) 15 minutos al día 10, (d) 25 minutos al día 10.

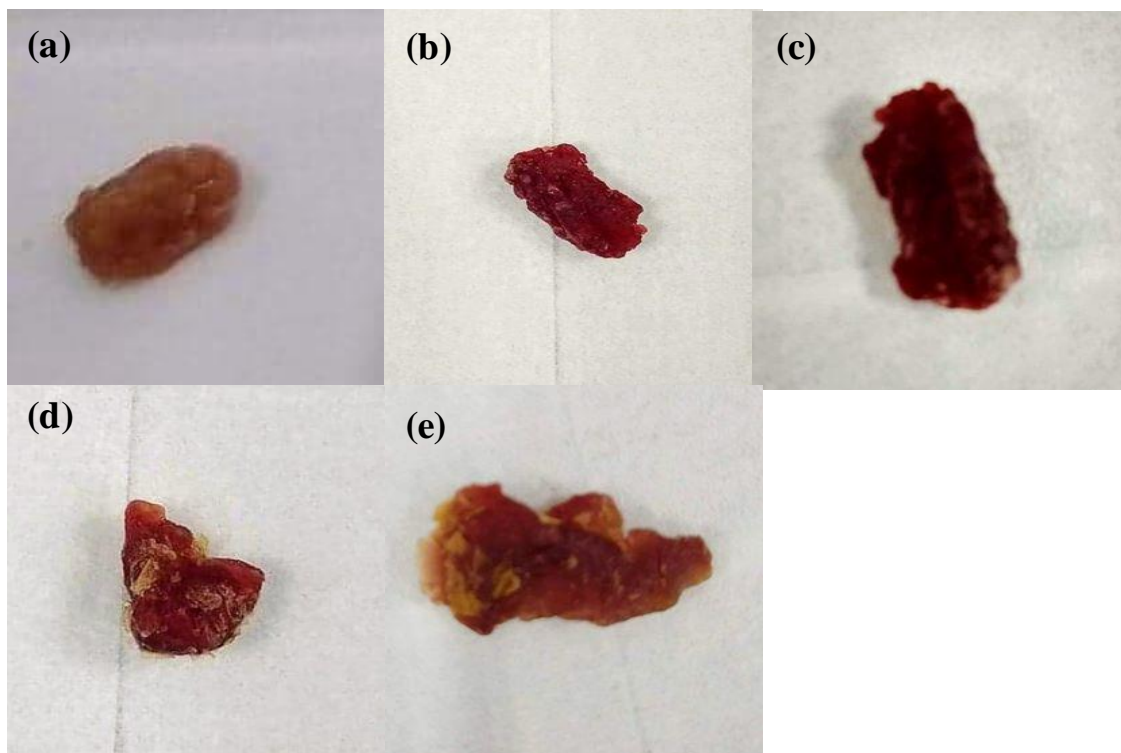


Figura 28. Muestras de carne molida, (a) control al día 1, (b) control al día 4, (c) control al día 10, (d) 40 minutos al día 4, (e) 25 minutos al día 10.

3.5.1. Parámetro a^*

Este parámetro indica la intensidad del color rojo en la carne; mantener valores altos de a^* es un buen indicador de que las membranas de quitosano tienen un efecto positivo para prevenir la oxidación en la carne de res y así obtener una prolongación del color rojo deseado durante su almacenamiento.

En la Figura 29 se muestra la variación del parámetro a^* en las muestras de bistec recubiertas con la membrana de quitosano durante el periodo de estudio. La muestra cubierta con la membrana de 15 minutos de sonicación mantuvo los valores de a^* más altos, con un valor de 5.738 en el día 10; esto indica que la carne recubierta con la membrana mantuvo un color rojo más fuerte al final del periodo. La muestra control tuvo un desempeño menor, $a^* = 5.446$, Figura 27.

La Figura 30 presenta la variación de a^* en las muestras de carne molida. En este caso, con la membrana de quitosano de 25 minutos de sonicación se obtuvieron los valores más altos del indicador a^* (4.299) al final del periodo de estudio. Los resultados obtenidos presentan poca

dispersión, el mismo comportamiento se observa en el caso del bistec. La muestra control al décimo día, perdió considerablemente su color (3.404). Cabe notar que la muestra cubierta con la membrana de quitosano de 40 minutos de sonicación alcanzó el valor más alto (8.168) en el día 4; más del doble del que presenta la muestra control (4.030). Este valor, aunque disminuye, es superior al resto de las demás muestras, hasta el día 7. La vida útil en exhibición de la carne es de tres días; con esta membrana, se estaría aumentando cuatro días, lo cual representaría mayor probabilidad de venta y, por lo tanto, menos pérdidas, Figura 28.

El mecanismo de retención de color por efecto del quitosano está relacionado con su capacidad quelante para varios iones metálicos, debido a que sus grupos amino e hidroxilo actúan como donadores de electrones. El hierro que es un componente de la metamioglobina y otros componentes de la carne, promueve la oxidación de esta a través de los radicales libres, puede ser absorbido por el quitosano y esta interacción puede retrasar la oxidación de lípidos y prevenir la decoloración de la superficie de la carne refrigerada [42, 43].

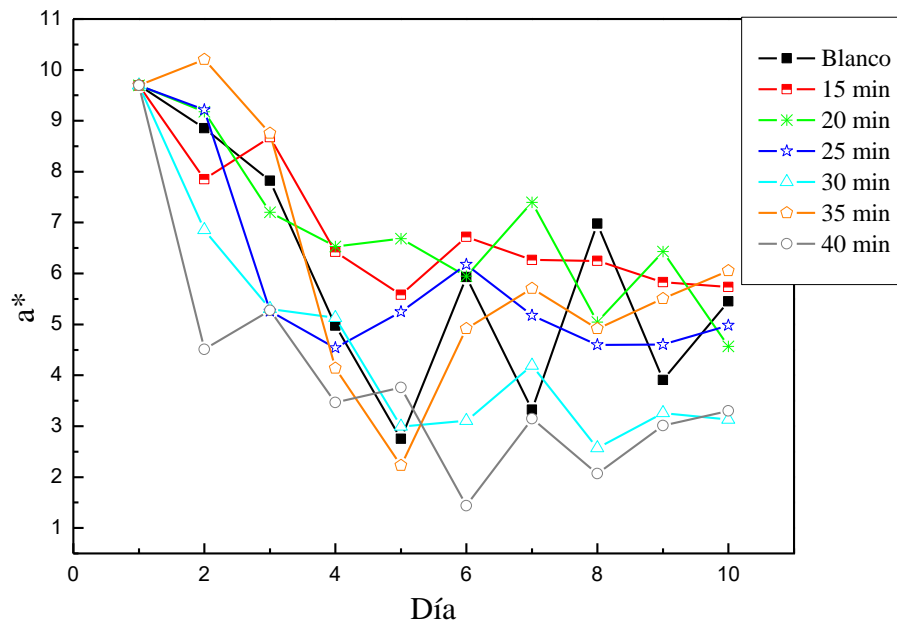


Figura 29. Parámetro a^* para las muestras de bistec almacenadas en refrigeración durante 10 días.

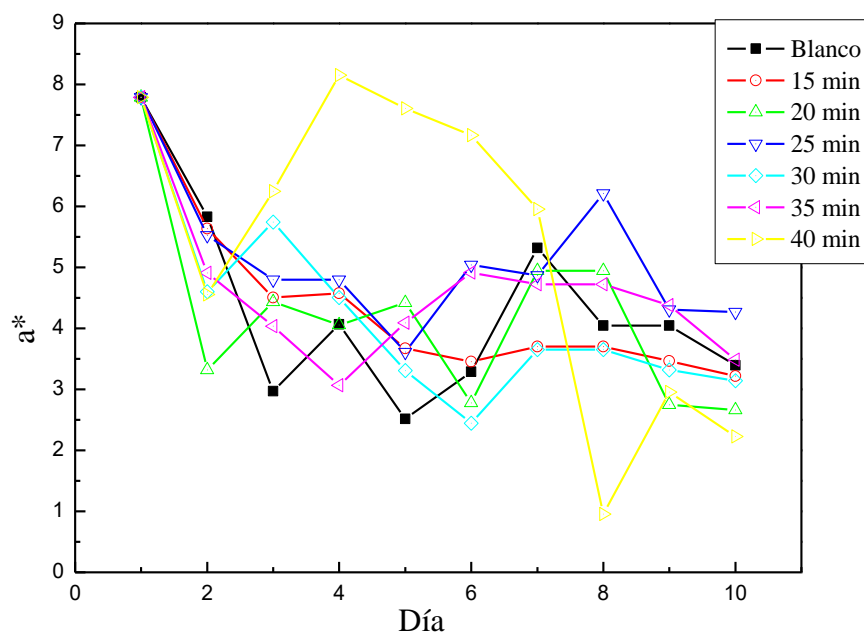


Figura 30. Parámetro a^* para las muestras de carne molida almacenadas en refrigeración durante 10 días.

3.5.2. Croma (C_{ab}^*)

El Croma es un parámetro que indica la intensidad del color y engloba al parámetro b^* , por lo que puede resultar más sensible para detectar cambios en el color rojo de la carne. Además, es un buen indicador de la floración de la carne recién expuesta al aire; el oxígeno es absorbido por la mioglobina de la carne para formar oximioglobina que le confiere un color purpura. Valores bajos de C_{ab}^* se consideran pálidos, mientras que los valores altos se consideran saturados. Por lo tanto, se considera un color ideal en la carne mientras más altos sean los valores de C_{ab}^* [49].

En la Figura 31 se presentan los valores calculados de Croma (C_{ab}^*) para las muestras de bistec durante un periodo de 10 días. La membrana elaborada con quitosano de 25 minutos de sonicación mostró un comportamiento estable y los valores más altos de C_{ab}^* en el bistec en relación con las demás muestras, al día 10 el valor fue de $C_{ab}^* = 8.022$, que es mayor en comparación con la muestra control $C_{ab}^* = 7.915$ evaluada en el mismo periodo, Figura 27.

La Figura 32 muestra los valores de C_{ab}^* calculados para las muestras de carne molida en un periodo de 10 días. Se observa que la muestra con la membrana de quitosano de 25 minutos de sonicación obtuvo los valores de C_{ab}^* más altos y estables en el transcurso del periodo de

almacenamiento en comparación con las otras muestras, con un valor final de $C_{ab}^* = 6.716$, mayor que el de la muestra control $C_{ab}^* = 4.605$, Figura 28.

Se puede concluir que las muestras de quitosano de 15 minutos, 25 minutos y 40 minutos tienen una potente actividad antioxidante que fue capaz de prevenir el deterioro oxidativo de la carne de res. El quitosano utilizado es de peso molecular medio, Tabla 9. Los Resultados concuerdan con estudios previos donde reportan que quitosanos con mayor viscosidad tienen un mayor efecto antioxidante [45, 46].

Para el caso de las muestras de carne de res cubiertas con polvo de quitosano, debido a que para efectos de este estudio se está utilizando un análisis de caracterización óptico. Al realizar las mediciones de color influía el color del polvo de quitosano sin poder asegurar que se estaba midiendo el color verdadero de las carnes Figura 26 . Por lo que no fue posible evaluar el cambio de color de las muestras en función del tiempo.

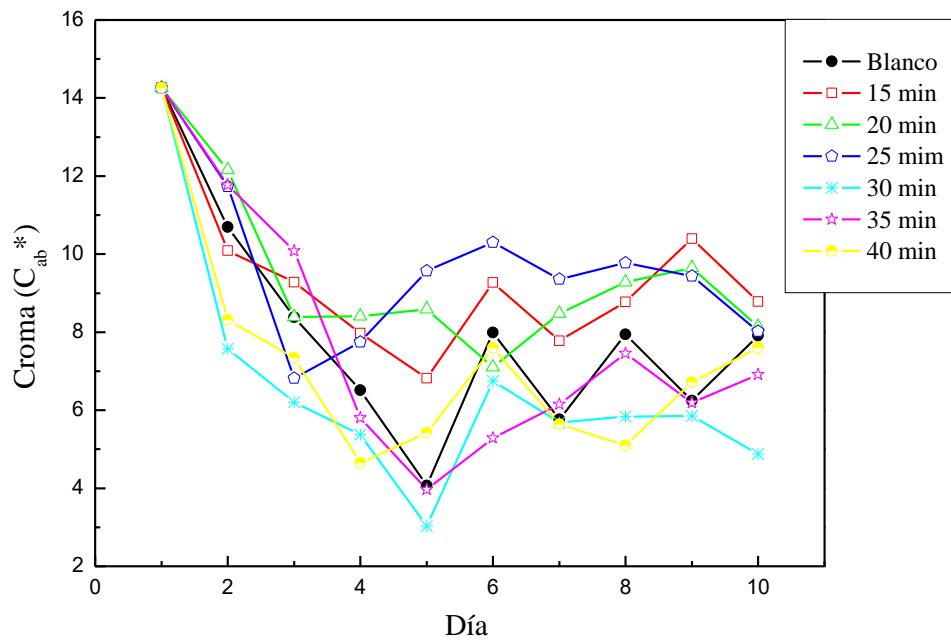


Figura 31. Parámetro C_{ab}^* para las muestras de bistec almacenadas en refrigeración durante 10 días.

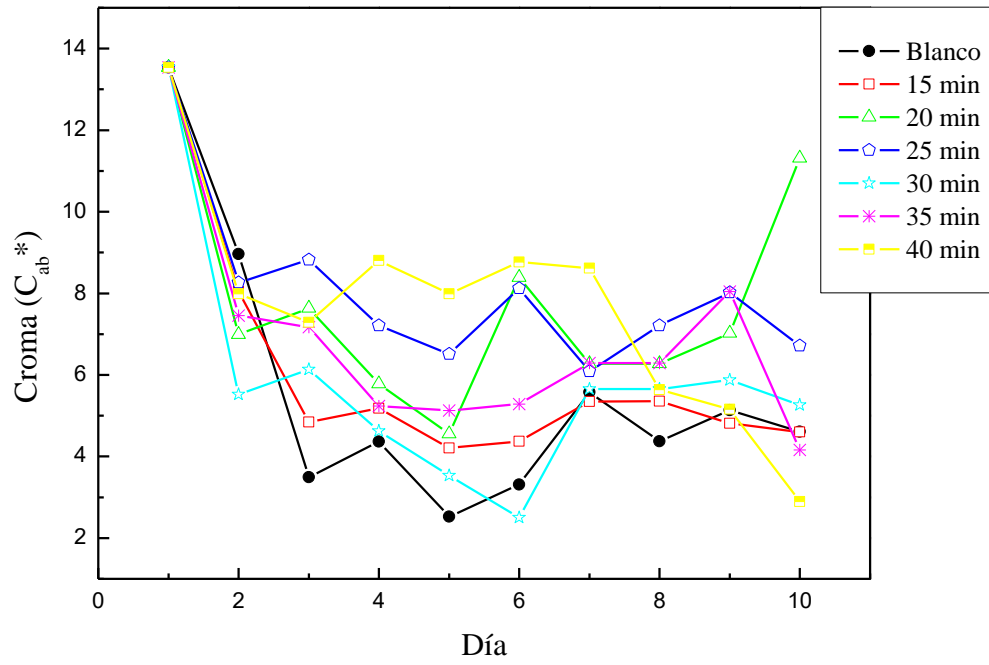


Figura 32. Parámetro C_{ab}^* para las muestras de carne molida almacenadas en refrigeración durante 10 días.

CONCLUSIONES

- ❖ Se obtuvo quitosano con diferente grado de desacetilación, el incremento en el tiempo de sonicación da como resultado quitosano con mayor grado de desacetilación y peso molecular medio y bajo.
- ❖ El tiempo de sonicación tiene un efecto inverso sobre el índice de blancura del quitosano, a medida que aumenta el tiempo este disminuye, debido a la oxidación de los pigmentos presentes en el camarón al momento de realizar la desproteinización.
- ❖ Un aumento en el tiempo de sonicación disminuye el rendimiento total del quitosano obtenido asociado a la disminución del tamaño de partícula en la quitina lo que facilita la pérdida de masa al realizar el lavado del quitosano.
- ❖ A medida que aumenta el tiempo de sonicación se obtiene una desproteinización más eficiente, el contenido de nitrógeno residual contenido en la quitina es menor.
- ❖ El tiempo de sonicación influye en la cristalinidad de la quitina, conforme aumenta el tiempo de sonicación se obtiene quitina más cristalina y con menos impurezas.
- ❖ El ultrasonido ejerce un efecto de reducción en el tamaño de partícula de la quitina.
- ❖ Para fines de este trabajo, resulta más eficiente el recubrimiento de la carne de res con membranas de quitosano.
- ❖ El quitosano con peso molecular medio es el más efectivo para conservar el rojo fresco de la carne, resultado de su potente actividad antioxidante.
- ❖ El quitosano de 15, 25 y 40 minutos de sonicación presentaron los valores mas altos en la conservación del rojo fresco de la carne con referencia a la muestra de control. Todos tienen un peso molecular medio de 73.61 KD, 86.82 KD y 55.66 KD, respectivamente. El grado de desacetilación para el de 15 min es de 80.60 %, para el de 25 min es de 92.86 % y para el de 40 min es de 94.03 %. El tamaño de partícula para estos quitosanos es de 35.70 μm , 25.51 μm y 20.10, respectivamente.

RECOMENDACIONES

- ❖ Se obtuvieron quitosanos con bajo y medio peso molecular, aunque ambos resultados concuerdan con lo reportado sobre el efecto de sonicación en función del tiempo de sonicación. Es necesario tener un mayor control y estudiar más a fondo el efecto que tienen las condiciones de operación para la obtención de quitosano en el peso molecular.
- ❖ Se detectó que es necesario llevar un control sobre la relación soluto/solvente en el proceso de ultrasonido, debido a que esta es una variable que influye en el proceso de desproteinización.
- ❖ Se recomienda mejorar la permeabilidad de las membranas con el fin de evitar que la carne entre en contacto con el oxígeno, debido a que este desencadena el proceso de oxidación de la carne.

REFERENCIAS

- [1] OECD/FAO, *OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2014*. OECD Publishing, 2014.
- [2] Grupo técnico de pérdidas y mermas de alimentos, “Desperdicio de alimentos en México,” *SEDESOL*, Ciudad de México, 2016.
- [3] S.-K. Kim, *Chitin, chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives*, 1st ed. Boca Raton, florida: Taylor y Francis Group, 2011.
- [4] E. Agulló *et al.*, *Quitina y Quitosano: Obtención, caracterización y aplicaciones*, 1st ed. Perú: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú, 2004.
- [5] J. Synowiecki and N. A. Al-khateeb, “Productions, Properties , and Some New Applications of Chitin and Its Derivatives Production , Properties , and Some New Applications of Chitin and Its Derivatives,” *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, no. September 2011, pp. 37–41, 2010.
- [6] P. Sorlier *et al.*, “Relation between the Degree of Acetylation and the Electrostatic Properties of Chitin and Chitosan,” *Biomacromolecules*, vol. 2, pp. 765–772, 2001.
- [7] V. Zargar, M. Asghari, and A. Dashti, “A Review on Chitin and Chitosan Polymers: Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives, and Applications,” *ChemBioEng Rev.*, vol. 2, no. 3, pp. 204–226, 2015.
- [8] M. Rinaudo, “Chitin and chitosan: Properties and applications,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 31, no. 7, pp. 603–632, 2006.
- [9] C. Valenzuela and V. J. Ignacio, “Potenciales aplicaciones de películas de quitosano en alimentos de origen animal : una revisión .,” *Av. en Ciencias Vet.*, vol. 27, no. 1, pp. 33–47, 2012.
- [10] M. K. F. Zakrzewska Anna, Boorsma Andre, Brul Stanley, Hellingwerf Klaas, “Transcriptional Response of *Saccharomyces cerevisiae* to the Plasma Membrane-Perturbing Compound Chitosan,” *Eukaryot. Cell*, vol. 4, no. 4, pp. 703–715, 2005.
- [11] J. Giraldo, “Propiedades, Obtención, Caracterización y Aplicaciones del quitosano.” 2015.

- [12] L. Carrillo and C. Audisio, “Manual de Microbiología de los Alimentos,” *Man. Microbiologia los Aliment.*, vol. 1, no. 2, pp. 102–116, 2007.
- [13] E. Borch, M. L. Kant-Muermans, and Y. Blixt, “Bacterial spoilage of meat and cured meat products,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 33, no. 1, pp. 103–120, 1996.
- [14] Y. Huang, X. Zeng, Q. Zhu, K. Lu, Q. Xu, and C. Ye, “Development of an active packaging with molecularly imprinted polymers for beef preservation,” *Packag. Technol. Sci.*, vol. 31, no. 4, pp. 213–220, 2018.
- [15] G. P. Cardoso, M. P. Dutra, P. R. Fontes, A. de L. S. Ramos, L. A. de M. Gomide, and E. M. Ramos, “Selection of a chitosan gelatin-based edible coating for color preservation of beef in retail display,” *Meat Sci.*, vol. 114, pp. 85–94, 2016.
- [16] J. Quesada, E. Sendra, C. Navarro, and E. Sayas-Barberá, “Antimicrobial Active Packaging including Chitosan Films with *Thymus vulgaris* L. Essential Oil for Ready-to-Eat Meat,” *Foods*, vol. 5, no. 3, 2016.
- [17] M. K. Chatli, S. Kaura, M. Jairath, N. Mehta, P. Kumar, and J. Sahoo, “Storage stability of raw chevon chunks packaged in composite, bioactive films at refrigeration temperature,” *Anim. Prod. Sci.*, vol. 54, no. 9, pp. 1328–1332, 2014.
- [18] V. K. Juneja, H. Thippareddi, L. Bari, Y. Inatsu, S. Kawamoto, and M. Friedman, “Chitosan Protects Cooked Ground Beef and Turkey Against *Clostridium perfringens* Spores During Chilling,” *J. Food Sci.*, vol. 71, no. 6, pp. M236–M240, Aug. 2006.
- [19] S. Yingyuad, S. Ruamsin, D. Reekprkhon, S. Douglas, S. Pongamphai, and U. Siripatrawan, “Effect of chitosan coating and vacuum packaging on the quality of refrigerated grilled pork,” *Packag. Technol. Sci.*, vol. 19, no. 3, pp. 149–157, Mar. 2006.
- [20] H. CHEN, J. SHU, P. LI, B. CHEN, N. A. LI, and L. I. LI, “Application of Coating Chitosan Film-forming Solution Combined -CD-Citral Inclusion Complex on Beef Fillet,” *J. Food Nutr. Res.*, vol. 2, no. 10, pp. 692–697, Sep. 2014.
- [21] K. Rambabu, G. Bharath, F. Banat, P. Loke, and H. Hernández, “International Journal of Biological Macromolecules Mango leaf extract incorporated chitosan antioxidant film for active food packaging,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 126, pp. 1234–1243, 2019.

- [22] AOAC (Association of Official Analytical Chemists), “Official methods of analysis of AOAC international 15 edition,” *Assoc. Off. Agric. Chem.*, vol. 1, no. 15 Edition, 1997.
- [23] J. Brugnerotto, J. Lizardi, F. M. Goycoolea, W. Argüelles-Monal, J. Desbrières, and M. Rinaudo, “An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization,” *Polymer (Guildf.)*, vol. 42, no. 8, pp. 3569–3580, 2001.
- [24] R. Battisti *et al.*, “Gelatin-coated paper with antimicrobial and antioxidant effect for beef packaging,” vol. 11, pp. 115–124, 2017.
- [25] E. Ploydee and S. Chaiyanan, “Production of High Viscosity Chitosan from Biologically Purified Chitin Isolated by Microbial Fermentation and Deproteinization,” vol. 2014, 2014.
- [26] M. Nouri, F. Khodaiyan, S. H. Razavi, and M. A. Mousavi, “The Effect of Different Chemical and Physical Processing on the Physicochemical and Functional Characterization of Chitosan Extracted from Shrimp Waste Species of Indian White Shrimp,” vol. 32, no. 1, 2015.
- [27] A. C. V. Chávez Huerta, Sabrina Acevedo, “Extracción y caracterización de proteínas recuperadas en el en el proceso de producción de quitosano,” no. March 2016, 2017.
- [28] E. Brunner *et al.*, “Chitin-based scaffolds are an integral part of the skeleton of the marine demosponge *Ianthella basta*,” *J. Struct. Biol.*, vol. 168, no. 3, pp. 539–547, 2009.
- [29] V. Chitin, F. G. Pearson, R. H. Marchessault, and C. Y. Liang, “Infrared Spectra of Crystalline Polysaccharides .,” vol. XLIII, pp. 101–116, 1960.
- [30] A. Görgüç, C. Bircan, and F. M. Yılmaz, “Sesame bran as an unexploited by-product : Effect of enzyme and ultrasound- assisted extraction on the recovery of protein and antioxidant compounds,” *Food Chem.*, vol. 283, no. January, pp. 637–645, 2019.
- [31] C. Hidalgo, M. Fernández, O. M. Nieto, A. a Paneque, G. Fernández, and J. C. Llópez, “Estudio de quitosanos cubanos derivados de la quitina de la langosta,” *Rev. Iberoam.*, vol. 10, no. 1, pp. 11–27, 2009.
- [32] D. C. B. Aida Liliana Barbosa L., Lucía Carmona1, “Caracterización fisicoquímica de un

- biomaterial marino con fines de restauración de bienes culturales,” *Acad. Colomb. Cienc.*, vol. 35, no. 136, pp. 303–314, 2011.
- [33] S.Z. Gunnar t. kjartansson and a. j. w. kristberg kristbergsson, “Sonication-Assisted Extraction of Chitin from North Atlantic Shrimps (*Pandalus borealis*),” pp. 5894–5902, 2006.
- [34] A. Singh and S. Benjakul, “Ultrasound-Assisted Extraction of Chitosan from Squid Pen : Molecular Characterization and Fat Binding Capacity,” vol. 84, 2019.
- [35] X. Fu, T. Belwal, G. Cravotto, and Z. Luo, “Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—A review of current status,” *Ultrason. Sonochem.*, p. 104726, 2019.
- [36] L. Zhu, J. Li, J. Mai, and M. Chang, “Ultrasound-assisted synthesis of chitosan from fungal precursors for biomedical applications,” *Chem. Eng. J.*, vol. 357, no. September 2018, pp. 498–507, 2019.
- [37] R. Hiller and B. P. Barber, “Spectrum of Synchronous Picosecond Sonoluminescence,” vol. 69, no. 8, pp. 1182–1184, 1992.
- [38] P. Development, E. Esmaeilzadeh, M. A. Faramarzi, M. A. Amini, and A. R. Najafabadi, “Effects of processing parameters on particle size of ultrasound prepared chitosan nanoparticles: An Artificial Neural Networks Study,” no. June, 2012.
- [39] J. Kumirska, Z. Kaczy, and A. Bychowska, “Application of Spectroscopic Methods for Structural Analysis of Chitin and Chitosan,” pp. 1567–1636, 2010.
- [40] M. H. Mohammed, P. A. Williams, and O. Tverezovskaya, “Food Hydrocolloids Extraction of chitin from prawn shells and conversion to low molecular mass chitosan,” *Food Hydrocoll.*, vol. 31, no. 2, pp. 166–171, 2013.
- [41] W. A. Escobar, Sierra, Diana Marcela, Ossa, Orozco, Claudia Patricia, Quintana, Marco Antonio, Ospina, “Optimización de un protocolo de extracción de quitina y quitosano desde caparzones de crustáceos.” vol. 18, no. 1, pp. 260–266, 2013.
- [42] S. Korea and B. Rouge, “Comparison of Physicochemical , Binding , and Antibacterial

- Properties of Chitosans Prepared without and with,” 2003.
- [43] W. Zhang, H. Zhao, J. Zhang, Z. Sheng, J. Cao, and W. Jiang, “Different molecular weights chitosan coatings delay the senescence of postharvest nectarine fruit in relation to changes of redox state and respiratory pathway metabolism,” *Food Chem.*, vol. 289, pp. 160–168, 2019.
- [44] J. Synowiecki and N. A. Al-Khateeb, “Production, Properties, and Some New Applications of Chitin and Its Derivatives,” *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 43, no. 2, pp. 145–171, 2003.
- [45] M. S. Hossain and A. Iqbal, “Production and characterization of chitosan from shrimp waste,” *J. Bangladesh Agril. Univ.*, vol. 12, no. 1, pp. 153–160, 2014.
- [46] K. Suslick and B. W. Zieger, “Sonofragmentation of molecular crystals,” *J. Acoust. Soc. Am.*, vol. 133, no. 5, pp. 3594–3594, 2013.
- [47] G. P. Cardoso, M. P. Dutra, P. R. Fontes, A. de L. S. Ramos, L. A. de M. Gomide, and E. M. Ramos, “Selection of a chitosan gelatin-based edible coating for color preservation of beef in retail display,” *Meat Sci.*, vol. 114, pp. 85–94, 2016.
- [48] A. A. Tayel, S. I. A. Ibrahim, M. A. Al-saman, and S. H. Moussa, “Production of fungal chitosan from date wastes and its application as a biopreservative for minced meat,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 69, pp. 471–475, 2014.
- [49] E. Ramos and L. Gomide, *Avaliação da Qualidade de Carnes: fundamentos e metodologias*. 2009.
- [50] J. L. Weist and M. Karel, “Development of a Fluorescence Sensor to Monitor Lipid Oxidation . 1 . Fluorescence Spectra of Chitosan Powder and Polyamide Powder after Exposure to Volatile Lipid Oxidation Products,” pp. 1158–1162, 1992.
- [51] Y. O. U. I. N. J. Eon, J. A. Y. V. A. K. Amil, and F. E. S. Hahidi, “Chitosan as an Edible Invisible Film for Quality Preservation of Herring and Atlantic Cod,” 2002.