



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

”Efecto de la incorporación de extracto de tamarindo (*Tamarindus indica*) con actividad antioxidante en la elaboración y funcionalidad de películas biodegradables proteína-almidón”

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA:

Q. A. LUIS HUMBERTO LÓPEZ HERNÁNDEZ

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Edith Ponce Alquicira

ASESORES

Dr. Jorge Soriano Santos

Dr. Alfonso Totosaus Sánchez

México, D.F.

Agosto del 2010.

El posgrado en la UAM-Iztapalapa está incluido en el padrón de posgrados de excelencia del CONACYT, además cuenta con el apoyo del mismo bajo la referencia 001465 para la Maestría en Biotecnología.

Este trabajo forma parte del proyecto “Caracterización Molecular de Bacteriocinas y su Inclusión en el Diseño de Empaques Biodegradables con Actividad Antimicrobiana” con clave: CB-2008-01-105870, financiado por el Fondo SEP-CONACYT.

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la
Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**Efecto de la incorporación de extracto de Tamarindo (*Tamarindus indica*)
con actividad antioxidante en la elaboración y funcionalidad de películas
biodegradables proteína-almidón.**

Qué presentó

Q. A. Luis Humberto López Hernández

El día 25 de Agosto del 2010

Director: Dra. Edith Ponce Alquicira

Universidad Autónoma Metropolitana



Jurado

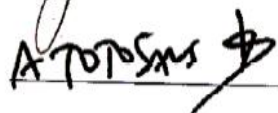
Asesor: Dr. Jorge Soriano Santos

Universidad Autónoma Metropolitana



Asesor: Dr. Alfonso Totosaus Sánchez

Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec



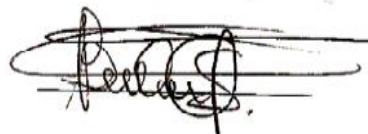
Sinodal: Dr. Carlos Regalado González

Universidad Autónoma de Querétaro



Sinodal: Dra. Baciliza Quintero Salazar

Universidad Autónoma del Estado de México



RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue elaborar películas biodegradables a partir de mezclas de aislado de proteína de suero de leche (APSL) y almidón nativo de papa (ANP) así como evaluar las propiedades fisicoquímicas, mecánicas y antioxidantes debidas a la incorporación de extractos fenólicos de tamarindo (*Tamarindus indica*).

En la primera etapa se obtuvieron dos harinas, una de semillas (HS) y la otra del recubrimiento de semillas (HRS) del fruto de tamarindo. La extracción de compuestos fenólicos se realizó con etanol o metanol; los extractos obtenidos se dividieron en dos fracciones una de las cuales fue liofilizada y la otra se mantuvo en líquido, generándose cinco extractos (HS: Se2, Sm1 y Em3; HRS: Ee2 y Em1) a los cuales se les determinó la concentración de polifenoles totales (PT), taninos (T) y flavonoides (F); así como la actividad antioxidante (AAn) mediante las pruebas de DPPH y FRAP. El extracto Se2 proveniente de la HS mostró la mayor actividad antioxidante por lo que fue analizado mediante HPLC para determinar el perfil de polifenoles y seleccionado como fuente de compuestos antioxidantes en la elaboración de películas. Para este extracto, el contenido de PT fue 33.40 ± 0.024 mg ácido gálico/100g, T de 34.80 ± 0.025 mg/100g y F de 20.60 ± 0.090 mg catequina/100g; con AAn de 203.28 ± 0.246 equivalentes de Trolox en mg/L de extracto por FRAP y el tiempo necesario para reducir el 50% de la concentración inicial de DPPH fue de 15.5 min. El perfil cromatográfico de polifenoles mostró la presencia de procianidina B₂, (+)-catequina y (-)-epicatequina, como principales componentes.

En la segunda etapa se plantearon siete soluciones formadoras de película (SFP) variando la proporción porcentual de APSL y ANP [N1 (100:0), N2 (80:20), N3 (60:40), N4 (50:50), N5 (40:60), N6 (20:80) y N7 (0:100) a pH 8.5 y glicerol 3.7 g/100mL], a las cuales se les incorporaron 3 diferentes concentraciones del extracto antioxidante Se2 (0.0010, 0.0020, 0.0025 g de polifenoles/mL de SFP). Todas las SFP, incluidas aquellas sin el extracto de tamarindo tuvieron actividad antiradicalaria sobre DPPH; sin embargo, la formulación N3 en sus tres concentraciones de extracto (N31, N32 y N33) mostró mayor actividad comparada con el resto de SFP ($P \leq 0.05$).

Las películas se elaboraron por el método de vertido y secado en placas de vidrio, encontrando que aquellas elaboradas con la formulación N5 (40:60 de APSL y ANP) presentaron los menores espesores (0.1163 ± 0.009 mm) y la mayor concentración de proteína soluble ($P \leq 0.05$). El menor porcentaje de película solubilizada (%PS) se presentó en las formulaciones con bajas concentraciones de antioxidantes como la N2 (21.13 ± 2.22 a $21.26 \pm 2.82\%$), en tanto que el mayor %PS observado fue para las películas N6 (28.73 ± 1.68 a $34.57 \pm 3.83\%$). En cuanto a la AAn en la solución después de solubilizar la película se encontró que los tratamientos de la formulación N6 (N61, N62 y N63) mantuvieron una mayor AAn ($P \leq 0.05$).

Finalmente, a las películas se les determinó las siguientes propiedades mecánicas: resistencia a la tensión (σ), % de elongación (ϵ), módulo de Young (E) y la relación σ/ϵ . Se observaron diferencias significativas entre las formulaciones ($P \leq 0.05$). Se ha reportado que a valores bajos de σ y E combinados con altos valores de ϵ representan películas fáciles de estirar pero difíciles de romper, las cuales se consideran como ideales por su parecido con el comportamiento mecánico de matrices de materiales sintéticos. Las únicas películas con este comportamiento fueron aquellas de la combinación 40:60 de APSL-ANP (N51, N52 y N53) con los siguientes resultados, respectivamente: σ (3.131 ± 0.628 , 3.933 ± 0.114 y 3.922 ± 0.157 N/m²), ϵ (42.632 ± 0.482 , 38.467 ± 0.482 y $26.329 \pm 7.019\%$), E (0.346 ± 0.034 , 0.503 ± 0.074 y 0.519 ± 0.012 N/m²) y σ/ϵ (8.987 ± 0.901 , 7.921 ± 1.102 y 7.564 ± 0.474).

La extracción de polifenoles a partir de desechos de la industria del tamarindo permitió generar una fuente rica en compuestos con actividad antioxidante, los cuales al ser incorporados en matrices de películas de mezclas de APSL-ANP modificaron las propiedades fisicoquímicas y/o mecánicas pero mantuvieron la actividad antioxidante, por lo que puede ser una alternativa en el desarrollo de empaques activos.

ABSTRACT

The aim of this work was to develop biodegradable films from mixtures of whey protein isolated (WPI) and native potato starch (NPS) as well as evaluate the physicochemical, mechanical and antioxidants due to the incorporation of tamarind (*Tamarindus indica*) phenolic extracts.

In the first stage two flours were obtained, one from the tamarind fruit seed (FS) and another from the seed coating (FSC). The extraction of phenolic compounds was made by ethanol or methanol; obtained extracts were divided into two parts one of which was lyophilized and the other was maintained in liquid, thus generating five extracts (FS: Se2, Sm1 and EM3; FSC: EE2 and EM1), that were determined for concentration of total polyphenols (TP), tannins (T) and flavonoids (F), as well as, they determined antioxidant activity (AnA) using the DPPH and FRAP tests. Se2 extract from the FS showed the highest antioxidant activity, this fraction was analyzed by HPLC to determine the polyphenols profile and selected as a source of antioxidant compounds for the film production stage. The content of TP was 33.40 ± 0.024 mg acid gallic/100g, T of 34.80 ± 0.025 mg/100g and F of 20.60 ± 0.090 mg catechin/100g, with AnA of 203.28 ± 0.246 Trolox equivalents in mg/L extract by FRAP, the time required to reduce 50% if the initial concentration of DPPH was 15.5 min. The chromatographic profile of polyphenols showed the presence of procyanidin B2, (+)-catechin and (-)-epicatechin, as major components.

In the second stage, seven film-forming solutions were formulated (FFS) by varying the percentage share of WPI and NPS [N1 (100:0), N2 (80:20), N3 (60:40), N4 (50:50), N5 (40:60), N6 (20:80) and N7 (0:100) at pH 8.5 and 3.7 g glycerol/100ml], FFS were incorporated with three different concentrations (0.0010, 0.0020, 0.0025 g of polyphenols/mL FFS) of Se2 antioxidant extract. All FFS, including those without the tamarind extract showed antiradical activity over DPPH. However, the formulation N3 with three concentrations of extract (N31, N32 and N33) showed greater activity compared with the rest of FFS ($P \leq 0.05$).

Films were prepared by the method of casting and drying over glasses plates, it was found that those films made with the formulation N5 (40:60 WPI and NPS) had the lowest thicknesses (0.1163 ± 0.009 mm) and the highest concentration of soluble protein ($P\leq 0.05$). The lowest percentage of solubilized film (%PS) was presented in the formulations with lower concentrations of antioxidants such as N2 (21.13 ± 2.22 to $21.26\pm 2.82\%$), while the higher %PS was observed for films N6 (28.73 ± 1.68 to $34.57\pm 3.83\%$). As for the AnA in the solution obtained after a film solubilization was higher for the N6 formulation (N61, N62 and N63; $P\leq 0.05$).

Finally, films were subjected to texture analysis to evaluate their mechanical properties (strength strain (σ), % elongation (ϵ), the Young's modulus (E) and the relationship (σ/ϵ). A significant difference between formulations ($P\leq 0.05$) was observed. It has been reported that low values of σ and E combined with high values of ϵ correspond to resistant and easy stretch films, which are considered as ideal for its resemblance to the mechanical behavior synthetic matrix films. Only films containing WPI and NPS in the 40:60 ratio, corresponding the N5 formulation (N51, N52 and N53) showed the above mechanical behavior, with the following results: σ (3.131 ± 0.628 , 3.933 ± 0.114 and 3.922 ± 0.157 N/m²), ϵ (42.632 ± 0.482 , 38.467 ± 0.482 and $26.329\pm 7.019\%$), E (0.346 ± 0.034 , 0.503 ± 0.074 and 0.519 ± 0.012 N/m²) and σ/ϵ (8.987 ± 0.901 , 7.921 ± 1.102 and 7.564 ± 0.474).

Tamarind waste products may generate a rich source of polyphenolics compounds with antioxidant activity, which can be incorporated into films matrices of WPI and NPS maintaining the antioxidant activity. Therefore, results indicate that the generated extract can be an alternative in the development of active packaging.

DEDICATORIAS

A mis padres:

María de la Luz Hernández Reyes y Juan López; por formarme en mi primer escuela “la familia”, por su apoyo en una etapa más de mi desarrollo profesional y humano, por tenerme la paciencia en mis malos momentos durante este trabajo, en especial por su cariño y esa ilusión mostrada en sus ojos para culminar este escalón más en mi vida y aún faltan más triunfos...Gracias...

A *mis hermanos:*

Por los pequeños consejos y momentos fuera de la escuela que me ayudaron a no estresarme de más, en especial a *Tere* que me ayudó mucho cuando escribía, a veces con solo estar a mi lado compartiendo noches de escritura...Gracias...

A mi prima *Ivonne W:*

A quien le tuve la confianza de contarle mis problemas y triunfos, quien me aconsejó y apoyó, quien aguantó “mi forma de ser”, en especial por esas tardes-noches con un cigarro o un café para salir por un momento de la rutina...Gracias...

A *Sonia:*

A quien sólo conocí yo!!! No importa el que no hayas podido estar presente, sabes que siempre estarás aquí, aunque no sea físicamente. Te reconozco el aguante que tuviste hacia mí, más cuando me volvía loco, tú formas parte muy importante en mi vida y en éste logro, no tienes idea de lo que siento por ti, probablemente otro tomo más para decirlo...Gracias...

A *mi familia:*

Tías y Tíos, a mis primos y “sobrinos” *Jean, Lalo, Andy, Mine, Lupis, Beto, Agus, Caro, Vale, Saúl, July, Diana y Sebas.* Que siempre me dieron una sonrisa, un golpe, un consejo y me alentaron a seguir adelante, espero que vean las cosas diferentes de lo que podrían ser, que el estudio no les resuelve la vida pero si se las aligera!!! Échenle ganas!!! Las cosas se vuelven más complicadas pero muy satisfactorias...Gracias...

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por ser parte de mi, por no dejarme separar la Fe de la Ciencia, por darme esa tranquilidad en mis noches para poder empezar un día más, por darme la vida que he merecido y ganado hasta éste momento!!!

A la *Dra. Edith Ponce A.* quien me aceptó en su grupo de trabajo y dio la confianza de plantear éste proyecto, quien me orientó en el desarrollo y sugirió como a bordar mi trabajo. Por sus consejos y todo su apoyo... Gracias...

Como olvidar a mi “*alma mater*” la **UNAM**, si a cada paso que doy recuerdo lo que me decían en las aulas, lo que nunca creí volver a ver y lo mucho y variado que aprendí en ella, ahora en mi nueva casa la **UAM** la estancia fue más tranquila y satisfactoria... Gracias a ambas...

Un especial agradecimiento a la *Dra. Basy* por su apoyo, consejos e ideas y por ésta revisión a la tesis que me hizo verla desde otro punto de vista... no cabe duda... Gracias Basy...

A los doctores *Jorge Soriano Santos, Alfonso Totosaus Sánchez y Carlos Regalado González* por su apreciable tiempo participando en la revisión de mi tesis, por sus notas, comentarios y sugerencias que me sirvieron para completar el trabajo final... Gracias...

A mis compañeros del S-130, mi nueva familia por estos casi dos años!!! *Juanito, Yeni, Isadora, Violeta, Ruth, Arturo, Erika y Alma.* Por esos momentos de sobremesa y tardes buscando respuestas. Por los consejos en algunas de las técnicas planteadas en este trabajo y durante los seminarios que tanto disfrutamos!!! Jajajaja!!! Gracias por su amistad!!!

A mis compañeros de maestría que tuvieron una pequeña aportación en estos años, pero sobre todo por su amistad dentro y fuera de las clases... a *Majo, Karla, Susi, Cris, Paco, Rod, Pao* y todos los demás que me hayan faltado, que por espacio no caben en esta hoja pero son considerados como parte de mi maestría en la *UAM-Iztapalapa.*

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	IV
ABSTRACT	VI
1. INTRODUCCIÓN	17
2. JUSTIFICACIÓN	19
3. ANTECEDENTES	20
3.1. Los empaques en alimentos	20
3.2. Empaques activos	20
3.3. Películas biodegradables	21
3.3.1. Películas de origen proteico	22
3.3.1.1. Aislado de proteína de suero de leche (APSL)	23
3.3.2. Películas a partir de polisacáridos	25
3.3.3. Películas a partir de mezcla de proteínas-polisacáridos	27
3.4. Plastificantes	27
3.5. Agentes antioxidantes	29
3.6. El tamarindo (<i>Tamarindus indica</i>)	33
4. HIPÓTESIS	36
5. OBJETIVOS	37
5.1. OBJETIVO GENERAL	37
5.2. OBJETIVOS PARTICULARES	37
6. DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO	38
7. MATERIAL Y MÉTODOS	39
ETAPA 1.	
7.1. Reactivos y materia prima para la obtención de extracto de tamarindo	39
7.2. Obtención de harina de frutos de tamarindo	39
7.3. Composición proximal de las harinas de frutos de tamarindo	40
7.4. Extracción y cuantificación de los compuestos polifenólicos en harinas de frutos de tamarindo	40
7.4.1. Determinación de polifenoles totales	41
7.4.2. Determinación de taninos	41
7.4.3. Determinación de flavonoides	41
7.5. Determinación de la actividad antioxidante en los extractos obtenidos a partir de las harinas de frutos de tamarindo	42

7.5.1. Análisis cualitativo de compuestos polifenólicos por cromatografía de capa fina	42
7.5.2. Ensayo de Poder de Reducción/Antioxidante Férrico (FRAP)	42
7.5.3. Ensayo DPPH	43
7.6. Análisis cualitativo de compuestos polifenólicos por HPLC	44
ETAPA 2.	
7.7. Elaboración de películas biodegradables	45
7.7.1. Material de las películas	45
7.7.2. Elaboración de las soluciones formadoras de películas (SFP)	47
7.7.2.1. Polifenoles totales en SFP	47
7.7.2.2. Actividad Antioxidante en SFP	47
7.7.2.3. Elaboración de las películas	47
7.8. Evaluación de las características fisicoquímicas de las películas	48
7.8.1. Determinación de la solubilidad	48
7.8.1.1. Proteína soluble	48
7.8.1.2. Polifenoles totales residuales	49
7.8.1.3. Actividad antioxidante en la solución solubilizadora	49
7.8.1.4. Perfil cromatográfico de la solución solubilizadora por HPLC	49
7.9. Evaluación de las características mecánicas de las películas	49
7.9.1. Determinación de la fuerza a la tensión	49
7.9.2. Determinación de % de elongación	50
7.9.3. Determinación del módulo elástico	50
7.10. Diseño y análisis experimental	50
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
ETAPA 1.	
8.1. Obtención de harinas de fruto de tamarindo	52
8.2. Composición proximal de las harinas del fruto de tamarindo	52
8.3. Extracción de compuestos polifenólicos a partir de las harinas	53
8.3.1. Cuantificación de compuestos polifenólicos a partir de los extractos de las diferentes harinas	54
8.3.1.1. Determinación de polifenoles totales, taninos y flavonoides	54
8.4. Determinación de la actividad antioxidante en los extractos obtenidos a partir de las harinas de frutos de tamarindo	55

8.4.1. Análisis cualitativo de compuestos polifenólicos por cromatografía de capa fina	55
8.4.2. Ensayo de poder reducción/antioxidante férrico (FRAP)	57
8.4.3. Ensayo DPPH·	59
ETAPA 2.	
8.5. Elaboración de películas biodegradables	63
8.6. Actividad antioxidante en la SFP	65
8.6.1. DPPH· y Polifenoles Totales	65
8.7. Evaluación de las características fisicoquímicas de las películas biodegradables	68
8.7.1. Espesor de las películas biodegradables	68
8.7.2. Determinación de la solubilidad	69
8.7.2.1. Proteína soluble y película solubilizada	69
8.7.2.2. Polifenoles totales residuales y actividad antioxidante en la solución solubilizadora	72
8.7.2.3. Perfil cromatográfico de polifenoles en la solución solubilizadora	74
8.8. Evaluación de las características mecánicas de las películas	80
8.8.1. Determinación de la fuerza a la tensión (s)	80
8.8.2. Determinación de la elongación (e)	81
8.8.3. Determinación del módulo de Young (E)	82
9. CONCLUSIONES	86
10. PERSPECTIVAS	87
11. BIBLIOGRAFÍA	88
12. ANEXO	104
12.1. Cuadros	104
12.2. Gráficos	105
12.3. Estadísticos	108

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Formulaciones de dos componentes (APSL y ANP) para la elaboración de películas.	45
Cuadro 2. Formulaciones con APSL/ANP con tres diferentes concentraciones de extracto.	46
Cuadro 3. Análisis bromatológico de las harinas obtenidas.	53
Cuadro 4. Rendimiento de los extractos a partir de las harinas obtenidas.	54
Cuadro 5. Composición de compuestos polifenólicos a partir de las harinas obtenidas.	55
Cuadro 6. Pruebas cualitativas para presencia de actividad reductora y antiradicalaria de polifenoles en los extractos a partir de las harinas obtenidas.	56
Cuadro 7. Actividad reductora de los extractos en equivalentes de Trolox sobre el reactivo de FRAP.	58
Cuadro 8. Curva modelo de actividad antiradicalaria por efecto de catequina.	60
Cuadro 9. Curva de actividad antiradicalaria de los extractos sobre DPPH•.	61
Cuadro 10. Actividad antioxidante de las SFP de APSL-Almidón.	66
Cuadro 11. Espesor de películas biodegradables ASL-Almidón con la incorporación de polifenoles.	68
Cuadro 12. Porcentaje de película biodegradable y proteína solubilizada con la incorporación de polifenoles.	71
Cuadro 13. Contenido de proteína, polifenoles y actividad antiradicalaria de películas biodegradables APSL-Almidón con la incorporación de polifenoles después de solubilizar.	73
Cuadro 14. Parámetros mecánicos de películas biodegradables APSL-Almidón nativo de papa adicionadas con polifenoles.	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama general de trabajo experimental.	38
Figura 2. A) Recubrimiento de semilla de tamarindo y B) harina de recubrimiento de semilla.	52
Figura 3. A) Semillas de tamarindo y B) harina de semillas de tamarindo.	52
Figura 4. A) Pruebas cualitativas para presencia de compuestos polifenólicos y B) Prueba cualitativa para actividad reductora de polifenoles en los extractos a partir de las harinas obtenidas.	56
Figura 5. Prueba cualitativa para presencia de actividad antiradicalaria de polifenoles en los extractos a partir de las harinas obtenidas.	57
Figura 6. Películas de APSL 100% (N1) de izquierda a derecha se observa el incremento en las concentraciones de compuestos polifenólicos de tamarindo.	64
Figura 7. Películas de APSL 80% y almidón 20% (N2) de izquierda a derecha se observa el incremento en las concentraciones de compuestos polifenólicos de tamarindo.	65
Figura 8. Representación gráfica de la actividad antioxidante de la formulación 60:40% (APSL-ANP) donde a menor tamaño de la barra mayor actividad antioxidante. N33 corresponde a dicha formulación con la incorporación de la tercera concentración de polifenoles (0.0025 g/mL de SFP) de tamarindo.	67
Figura 9. Representación gráfica de los espesores de las diversas combinaciones APSL-ANP adicionadas con tres diversas concentraciones de compuestos polifenólicos de tamarindo.	68
Figura 10. Representación gráfica de la comparación de 100% de APSL contra 80:20 (N2) y 20:80 (N6) de APSL-ANP por efecto de la adición de alguna de las concentraciones de antioxidantes de extracto de tamarindo.	70
Figura 11. Mezcla de estándares según lo reportado por Tsao y Yang (2003).	74
Figura 12. Mezcla de estándares de laboratorio leída a 280nm. En orden de aparición por tiempo de retención: 1) ácido gálico a los 4.7 min, 2) catequina a los 15.14 min, 3) ácido cafeico a los 21.0 min, 4) epicatequina a los 25.87 min, 5) ácido felúrico a los 39.26 min, 6) rutina a los 50.90 min y 7) quercetina a los 64.55 min.	75
Figura 13. Cromatograma del extracto de tamarindo a 320nm.	76
Figura 14. Estructuras reportadas por Sudjaroen <i>et al.</i> , (2005): 1.- (+)-catequina, 2.- procianidina B ₂ y 3.- (-)-epicatequina.	76

Figura 15. Cromatograma del agua obtenida de la solubilización de la película N13 a 280nm.	77
Figura 16. Cromatograma del agua obtenida de la solubilización de la película N23 a 280nm.	77
Figura 17. Cromatograma del agua obtenida de la solubilización de la película N33 a 280nm.	78
Figura 18. Cromatograma del agua obtenida de la solubilización de la película N43 a 280nm.	78
Figura 19. Cromatograma del agua obtenida de la solubilización de la película N53 a 280nm.	78
Figura 20. Cromatograma del agua obtenida de la solubilización de la película N63 a 280nm.	79
Figura 21. Cromatograma del agua obtenida de la solubilización de la película N73 a 280nm.	79
Figura 22. Fuerza a la tensión contra porcentaje de deformación de películas N43 obtenido por texturómetro.	83

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Actividad reductora de Fe (III) por efecto de Se2.	58
Gráfico 2. Actividad reductora de Fe (III) por efecto de Sm1.	58
Gráfico 3. Actividad reductora de Fe (III) por efecto de Em3.	59
Gráfico 4. Curva de actividad antiradicalaria por efecto de catequina.	60
Gráfico 5. Curva de actividad antiradicalaria por Ee2 (1/10) sobre DPPH• con EC ₅₀ =3.27min.	62
Gráfico 6. Curva de actividad antiradicalaria por Sm1 (1/2000) sobre DPPH• con EC ₅₀ <1min.	62
Gráfico 7. Curva de actividad antiradicalaria por Se2 (1/2000) sobre DPPH• con EC ₅₀ =15.5min.	62

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los principales problemas en la conservación de alimentos es el desarrollo de microorganismos, tanto flora responsable de deterioro como patógenos, ya que podrían causar pérdidas económicas, así como severos problemas de salud en los consumidores. Los alimentos de origen animal, principalmente productos cárnicos son especialmente sensibles a este fenómeno; además la alteración microbiana puede generar diversos cambios en las características nutricionales, fisicoquímicas y sensoriales (Han, 2000b; Ouatarra *et al.*, 2000; Quintavalla y Vicini, 2002). Por otro lado, los lípidos presentes en este tipo de alimentos son muy susceptibles a reacciones de oxidación por efecto de diversos factores como la exposición al oxígeno, metales y luz, entre otros. Lo que induce cambios en su estructura y funcionalidad, alterando la calidad del producto. Tradicionalmente, los empaques han tenido como única función la de contener y proteger al producto de la contaminación externa, sin embargo, en años recientes diversas investigaciones científicas y tecnológicas se han orientado al desarrollo de empaques activos que retrasan o inhiben el desarrollo de reacciones asociadas al deterioro (Suppakul *et al.*, 2003; Yam *et al.*, 2005).

Si bien, las películas plásticas han probado ser una excelente barrera de protección, éstas se degradan muy lentamente por lo que se consideran una fuente de contaminación y su utilización es tema de discusión a nivel mundial. En respuesta a esta problemática se han desarrollado los denominados empaques biodegradables, son fácilmente degradados por lo que tienen un bajo impacto ambiental (Cao *et al.*, 2007; Khwaldia *et al.*, 2004; Kim y Ustunol, 2001; Tharanathan, 2003 y Wu *et al.*, 2002). No obstante, las propiedades de barrera hacia la humedad, el oxígeno o dióxido de carbono, aromas y lípidos, varían acorde con la naturaleza de la matriz de la película biodegradable (Ou *et al.*, 2004 y 2005, Sanjurjo *et al.*, 2006). Las películas biodegradables se consideran un sistema de acarreamiento de diversos compuestos como antioxidantes y antimicrobianos que pueden prolongar la vida de anaquel y conservar la calidad sensorial en los alimentos (Ahvenaine, 2000; Cha y Chinnan, 2004; Han, 2000b; Lungu y Johnson, 2005; Min *et al.*, 2005, Min y Krochta, 2005; Ozcan, 2003; Ponce *et al.*, 2004 y Pranoto *et al.*, 2005).

Por otro lado, el tamarindo (*Tamarindus indica*) posee un alto contenido de compuestos fenólicos que pueden actuar como antioxidantes y antimicrobianos (Kumar y Vaithyanathan, 1990; Young *et al.*, 1993, Kroll y Rawel, 2001 y Amarowicz *et al.*, 1995 y 2008). En México este fruto es empleado en su mayoría como materia prima para la elaboración de dulces, concentrados y saborizantes para agua; siendo las semillas y el propio fruto en general subutilizado.

Se ha observado que las proteínas (principalmente aislado de proteína de suero de leche) así como los almidones nativos generan películas con excelentes características fisicoquímicas y mecánicas que podrían complementarse entre sí, con el objetivo de mejorar las propiedades de barrera. Sin embargo, existe poca información respecto a la elaboración de películas con la combinación de estas dos matrices y menos en relación a la incorporación de compuestos fenólicos, ya que estos compuestos podrían modificar la interacción entre los dos tipos de biopolímeros y alterar las propiedades fisicoquímicas y mecánicas de las películas. Por ello, el objetivo de la presente tesis de maestría es extraer y caracterizar los compuestos fenólicos presentes en la harina de frutos de Tamarindo y evaluar su incorporación como agentes activos en películas elaboradas con un matriz de proteína y almidón.

2. JUSTIFICACIÓN

Uno de los principales problemas de la industria alimentaria son las grandes pérdidas económicas por la descomposición de los alimentos; posteriormente estos productos deteriorados propiciarán enfermedades a los consumidores con la consecuente disminución en la adquisición del producto. Por otro lado, debido a que los empaques sintéticos son causa del incremento de la contaminación ambiental, al no degradarse y acumularse en el planeta; se trabaja en estudios para generar nuevos sistemas de empaque biodegradables a partir de matrices poliméricas con la incorporación de conservadores preferentemente de origen natural para aumentar la vida de anaquel de los alimentos. Son pocos los estudios que existen acerca del uso de desechos agroindustriales como es el caso de la industria del tamarindo (*Tamarindus indica*) como una fuente rica en compuestos fenólicos. Por ello, se plantea la producción de películas proteína-almidón adicionadas con compuestos polifenólicos con actividad antioxidante, los cuales podrían mejorar las propiedades mecánicas y fisicoquímicas de las películas. Se plantea la mezcla: aislado de proteína suero de leche (APSL) con almidón nativo de papa (ANP), debido a que no existen muchos trabajos con esta combinación y menos con la incorporación de compuestos con actividad antioxidante obtenidos a partir de desechos agroindustriales; sin variar las propiedades de las películas.

3. ANTECEDENTES

3.1. Los empaques en alimentos

Durante la evolución del hombre, la vida nómada al ser de un sitio a otro, las tribus necesitaban llevar comida sin perecer en los viajes; con ello surge la agricultura que permite su asentamiento y termina la etapa nómada de los antiguos hombres, surgió entonces la necesidad de conservar y/o movilizar sus productos cultivados, recolectados o de caza (Miller y Krochta, 1997). En los últimos 50 años se han generado gran número de reportes respecto a la producción de películas elaboradas principalmente con polímeros sintéticos, con la finalidad de proteger y contener a los alimentos. Sin embargo, la degradación de estas películas plásticas se lleva a cabo después de varios cientos de años y el proceso de reciclado es limitado, por lo que son consideradas como una fuente de contaminación para el medio ambiente (Magaña-Alemán, 2007 y Murillo-Martínez, 2008). Con el crecimiento de la población, los recursos naturales limitados y la contaminación ambiental, se generó la necesidad de usar recursos renovables para producir películas biodegradables; aunado a la creciente demanda de alimentos frescos, sanos y seguros; que en conjunto han dado lugar a la aparición de empaques que además de brindar protección frente al medio ambiente o al intercambio de gases y vapor de agua, mantengan la calidad sensorial, nutricional y microbiológica del producto empacado (Cha y Chinnan, 2004; Han, 2000b; Ouatarra *et al.*, 2000).

3.2. Empaques activos

Los empaques, en un principio contribuyeron al desarrollo de los sistemas de distribución. Sin embargo, esto ha cambiado debido a la creciente demanda por alimentos mínimamente procesados y con pocos aditivos, preferentemente naturales (Quintero-Salazar *et al.*, 2006). Muchos de los cambios en el alimento ocurren después del procesado, por ello, surgió una nueva generación de empaques: Los “empaques inteligentes” y los “empaques activos” (Suppakul *et al.*, 2003 y Yam *et al.*, 2005).

- Un “empaque inteligente” es un sistema que permite el monitoreo de las condiciones de los alimentos empacados (Ahvenainen, 2000; Yam *et al.*, 2005).

- Los “empaques activos” (Han, 2000a y b) se definen como un sistema en donde: empaque, alimento y ambiente interaccionan entre sí para prolongar la vida de anaquel o mejorar la seguridad microbiológica y/o las propiedades sensoriales del producto (Han y Krochta, 2007; Min *et al.*, 2005; Min y Krochta, 2005; Oussalah *et al.*, 2004; Quintero-Salazar *et al.*, 2006; Rojas-Graü *et al.*, 2006; Suppakul *et al.*, 2003 y Tapia *et al.*, 2007).

De acuerdo con Yam *et al.* (2005) las funciones de un empaque se pueden clasificar en cuatro categorías:

1. *Protección* contra mal manejo, factores ambientales y contaminación física o microbiana,
2. *Presentar o informar* al consumidor sobre el estado del alimento,
3. *Conveniencia* de acuerdo a las necesidades de la empresa productora y del consumidor,
4. *Contención* con la finalidad de controlar las características fisicoquímicas del alimento.

Por ello se desarrollan películas biodegradables que puedan contener compuestos naturales para minimizar los cambios post-empacado (Sivarooban *et al.*, 2008). Los empaques activos que puedan acarrear aditivos y nutrientes, pueden ser biodegradables o no biodegradables, además de liberar de forma controlada los agentes activos (Han, 2000a; Khwaldia *et al.*, 2004; Suppakul *et al.*, 2003 y Wu *et al.*, 2002).

3.3. Películas biodegradables

Las patentes de películas biodegradables surgieron en el año 1950. Los empaques con actividad antioxidante podrían ser clasificados en 2 grupos: 1) los que contienen un agente antioxidante que migra hacia la superficie del alimento, 2) los que actúan sólo en la superficie del alimento sin que el agente migre (Suppakul *et al.*, 2003).

La aplicación de recubrimientos y películas a los alimentos, ofrecen las siguientes ventajas: reducen la pérdida de humedad, previenen la formación de exudado, pueden retardar la oxidación de lípidos y reducen la absorción de compuestos volátiles que deterioran el sabor (McHugh *et al.*, 1993 y Murillo-Martínez, 2008).

La migración de una sustancia activa contenida en un empaque es un factor importante en el control de calidad de los alimentos (Choi *et al.*, 2001). Kim *et al.*, (2000) sugieren que la actividad del agente contenido en una película no depende solamente del grado de migración sino también de la naturaleza del medio en el cual se lleva a cabo.

La funcionalidad y desempeño de las películas biodegradables, dependen de las propiedades de barrera y mecánicas (solubilidad, permeabilidad, flexibilidad, transparencia, porcentaje de elongación, etc.) derivadas de la composición de la matriz polimérica, de su proceso de formación y del método de aplicación; por lo que es posible aplicarlas para aumentar la integridad del alimento, la apariencia y para prevenir las reacciones de rancidez (Arvanitoyannis *et al.*, 1999; Choi y Han, 2002; Gontard *et al.*, 1992; Mali *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2006 y Rojas-Graü *et al.*, 2006).

3.3.1. Películas de origen proteico

El proceso para la generación de una película a partir de biopolímeros como las proteínas involucra la desnaturalización y formación de enlaces cruzados, que pueden ser covalentes, puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, interacciones electrostáticas o fuerzas de Van der Waals, entre otras. Un incremento en la temperatura propicia el establecimiento de enlaces disulfuro en películas proteicas (Guckian *et al.*, 2005), en tanto que las interacciones electrostáticas se favorecen al trabajar a valores de pH alejados del punto isoeléctrico (PI). El balance entre los diversos tipos de enlaces generados en la matriz de proteína se refleja en sus propiedades mecánicas y de barrera. En el caso de películas de redes particuladas, éstas se pueden formar por arreglos al azar que dan por consiguiente la formación de agregados “cluster-cluster”, inducidas por cambios de pH, fuerza iónica y la presencia de agentes desnaturalizantes (Fennema y Tannenbaum, 1985).

La formación de películas es fuertemente influenciada por la concentración de proteína, temperatura de procesado, pH, fuerza iónica y composición del aislado (Maté y Krochta, 1995; Nagano *et al.*, 1994 y Renkema y Van Vliet, 2004).

Dentro de las películas biodegradables elaboradas a partir de proteínas, se encuentran diversas fuentes como son: maíz (zeína), suero de leche (aislado de proteína de suero de leche), soya (aislado de proteína de soya), trigo (gluten y gluteína), etc., que combinadas con agentes plastificantes (glicerol o sorbitol) en solución, pueden moldearse fácilmente para fabricar recubrimientos y películas (Krochta y De Mulder-Johnson, 1997). El método de formación de la película puede alterar las propiedades mecánicas de las películas de proteína (Dawson *et al.*, 2003; Eswaranandam *et al.*, 2004; Gennadios *et al.*, 1997; Ko *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2002; Were *et al.*, 1999 y Wooster *et al.*, 2006). En general, las películas de origen proteico son una barrera pobre frente a la humedad (Pérez-Gago y Krochta, 2000). Fairley *et al.* (1996) demostraron que sí en las matrices de las películas se encontraba una alta cantidad de puentes de hidrógeno estos podrían afectar la permeabilidad al vapor de agua, sin importar que dentro de la misma matriz existan pocos enlaces disulfuro. Cha *et al.* (2003), Dawson *et al.* (2003), Ko *et al.* (2001) y Teerakarn *et al.* (2002) encontraron que las películas elaboradas a partir de proteínas con mayor grado de hidrofobicidad en un ambiente ácido, propiciaban una mayor inhibición contra *L. innocua* y que la incorporación y liberación de sustancias activas depende tanto del tipo de proteína, así como de la estructura molecular del compuesto activo (Sivarrooban *et al.*, 2008). Las películas de proteínas son muy atractivas debido a sus propiedades de barrera contra aceites o grasas y compuestos volátiles, y su ventaja de permeabilidad a gases (Gontard *et al.*, 1992 y Han *et al.*, 2000b).

3.3.1.1. Aislado de proteína de suero de leche (APSL)

Siendo el APSL un subproducto de la industria de quesos y con pocos usos en la actualidad, además de la elaboración de “requesón”. Las proteínas del suero de leche forman películas insolubles debido a las diversas interacciones generadas después de la desnaturalización (Smith, 1994). El APSL tiene una composición química de aproximadamente 90% proteínas propias del suero.

Dentro de la fracción proteica se encuentran cuatro diferentes proteínas y en los componentes minoritarios están los lípidos, lactosa y minerales. En cuanto al contenido proteico, se ha reportado que las α -lactoalbúminas y β -lactoglobulinas se encuentran entre un 19-22% y 48-51% respectivamente (Ebner y Brodbeck, 1968 y Kontopidis *et al.*, 2004). Por otro lado, los tratamientos térmicos propician la desnaturalización de estas proteínas entre 50-70°C, dentro de la cadena proteica ocurre un desdoblamiento de la estructura y la sucesiva exposición de los grupos -SH y aminoácidos hidrofóbicos; para promover nuevas interacciones hidrofóbicas y enlaces disulfuro que al ser solidificadas, las proteínas se vuelven insolubles y forman agregados (Onwulata *et al.*, 2005 y Towned y Gyuricsek, 1973).

Las α -lactoalbúminas, son las de segundo orden de importancia del suero de leche. Se ha observado que tienen actividad biológica, ya que es parte primordial del sistema enzimático empleado en la síntesis de lactosa; la masa molecular varía entre 15 y 16kDa. Contienen residuos de ácido glutámico y leucina en posiciones terminales, tienen un alto contenido de residuos de triptófano y cisteína; cuatro enlaces disulfuro, pero no presentes grupos -SH libres. De manera parecida, la β -lactoglobulina se puede asociar-disociar dependiendo del pH y cambios de conformación (Gálvez *et al.*, 2006). Las β -lactoglobulinas tienen 162 residuos de aminoácidos dentro de su estructura. Esta proteína, en su estructura secundaria tiene un 10% de α -hélices, 43% de láminas β -antiparalelas y 47% de estructuras al azar sin ordenamiento característico. La presencia de un grupo -tiol (residuos 119 ó 121) y dos enlaces disulfuro produce una estructura espacial relativamente rígida; tiene una masa molecular de 18.4kDa (Kontopidis *et al.*, 2004). Este tipo de lactoglobulinas se pueden asociar según el pH del medio, a $\text{pH} > 8.0$ se generan monómeros, a $5.0 < \text{pH} < 8.0$ proliferarán los dímeros los cuales pueden llegar a formar octámeros cuando $3.5 < \text{pH} < 5.2$ (Gálvez *et al.*, 2006). Cuando el contenido de grupos hidrofílicos disminuye y las interacciones puente de hidrogeno/hidrofóbicas se incrementa, dan como resultado las altas propiedades mecánicas y de resistencia al agua (Kumar *et al.*, 2008). El tratamiento térmico de las proteínas conduce al desdoblamiento y la exposición de las estructuras hidrofóbicas seguidas del rearrreglo y la interacción de moléculas (Towned y Gyuricsek, 1973).

3.3.2. Películas a partir de polisacáridos

Varias formulaciones de películas y recubrimientos se han reportado en los últimos 10 años a base de polisacáridos (Averous y Boquillon, 2004). Una de las mayores fuentes de polisacáridos son los almidones (Bello-Pérez *et al.*, 2000), de gránulos entre 5 y 100 μm de diámetro e insolubles en agua. La producción e industrialización de almidones representa una buena alternativa para el desarrollo e incremento de la economía de países en vías de desarrollo (Müller *et al.*, 2008). Se pueden encontrar polisacáridos lineales (amilosa 30%) o ramificados (amilopectina 70%) compuestos de unidades de D-glucopiranosil. Los polisacáridos son polioles por tener muchos OH libres que pueden generar puentes de hidrógeno con el agua. Tanto los almidones nativos como los modificados, tienen un gran número de aplicaciones en la industria alimentaria (Jansson, 2004 y Mali *et al.*, 2005).

Las unidades de D-glucopiranosil en la amilosa están unidas por enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$ y dan lugar a una hélice; de carácter lipofílico en el centro y en el exterior los grupos hidroxilo (hidrofílico). La amilopectina tiene diversas ramificaciones que le dan estructuras de dobles hélices. Los almidones son una fuente renovable que puede ser modificada para incrementar sus propiedades funcionales (Mali *et al.*, 2005 y Zobel, 1994). La naturaleza hidrofílica del almidón es una de sus mayores limitaciones en el desarrollo de películas (Huijbrechts *et al.*, 2008). Una alternativa es el uso de almidones modificados para disminuir esta desventaja; dentro de estos podemos encontrar: entrecruzamiento de cadenas de polímeros, derivatización sin entrecruzamiento, despolimerización y pregelantización; donde la derivatización química puede ser: esterificación, eterificación, alilados y metilados (Fringant *et al.*, 1998; Huijbrechts *et al.*, 2008; Lafargue *et al.*, 2007; López *et al.*, 2008 y Shogren *et al.*, 1993), para mejorar sus propiedades como: características de cocción, incremento de solubilidad, variación en la viscosidad, inhibición de la formación de geles, mejora de la estabilidad e incremento en la formación de películas y resistencia al agua, por mencionar algunas. La incorporación de grupos hidroxipropil en almidones de maíz, debilitan los enlaces entre las moléculas de almidón incrementando el poder de hinchazón y de solubilidad sobre el calentamiento del gránulo (Liu *et al.*, 1999 y Tharanathan, 2003).

Los hidroxipropil almidones y la acetilación hasta un 0.09% disminuye la temperatura de gelatinización e incrementa la claridad en pastas (Romero-Bastida *et al.*, 2005). Dependiendo de la relación amilosa/amilopectina presente en los almidones, se inducirá la formación de distintas películas (Fang *et al.*, 2005; López *et al.*, 2008 y Soares *et al.*, 2005). Si los polímeros de una película son termodinámicamente incompatibles puede haber separación de fases. Estos tipos de películas se pueden ver afectadas por la estructura molecular, masa molecular, temperatura, calidad del plastificante, pH y fuerza iónica (Narchi *et al.*, 2009 y Tolstoguzov, 1994).

En los años 45-60's se observó por diversos autores, que los almidones alilados después de la exposición al aire, exhibían una textura gomosa, y los recubrimientos resistían la solubilización, debido a la polimerización cruzada causada por la oxidación. Huijbrechts *et al.* (2008) reportaron que el poder de hinchazón de los almidones modificados se incrementa a mayor grado de sustitución o incorporación de grupos funcionales; debido a que las interacciones se reducen entre las moléculas propiciando un incremento en la hidrofiliidad.

Varios estudios realizados a películas con diversas fuentes de polisacáridos se han reportado en la literatura; con mayor interés lo relacionado al intercambio de gases y a la pérdida de agua debida a la naturaleza hidrofílica por ello, se han hecho investigaciones con la incorporación de lípidos (Arvanitoyannis *et al.*, 1998; García *et al.*, 2000; Krochta y De Mulder-Johnston, 1997 y Pagella *et al.*, 2002).

Fang *et al.* (2005) reportaron el uso de almidones modificados esterificados en la preparación de películas a base de polímeros de carbohidratos. Flores *et al.* (2007) y Paes *et al.* (2008) estudiaron diferentes métodos de procesamiento (gelatinización y técnicas de secado) para obtener películas con almidón de yuca y encontraron que: a largos tiempos de gelatinización y bajas velocidades de secado, se obtenía una película más sólida, cristalina y baja permeabilidad al agua; por otro lado, al gelatinizar rápido y a bajas velocidades de secado, se observaba que las características elásticas disminuían y la permeabilidad se incrementaba ligeramente.

López *et al.* (2008) estudiaron el uso de almidones modificados (acetilados) de maíz en un 5%, donde se obtenían los valores más bajos de permeabilidad al agua empleando glicerol en un 1.5% como agente plastificante.

3.3.3. Películas a partir de mezcla de proteínas-polisacáridos

La producción de películas biodegradables de carbohidratos y proteínas ha bajado sus costos en la materia prima y puede jugar un importante papel en la preservación de los alimentos (Avérous *et al.*, 2001; Gennadios *et al.*, 2002; Krochta y Miller, 1997). Las proteínas y polisacáridos son los más utilizados para la elaboración de buenas películas. Aunque ambas, pueden ser razonablemente efectivas como barreras a gases (O₂ y CO₂), pero su permeabilidad al vapor de agua es relativamente elevada (Arvanitoyannis *et al.*, 1996; Baldwin *et al.*, 1995 y Psomiadou *et al.*, 1996). La formación de películas biodegradables a partir de polisacáridos y proteínas es debida a la gran habilidad de establecer interacciones poliméricas y crear una red continua responsable de las propiedades funcionales de la película: por ello las investigaciones han ido en constante crecimiento (Gennadios *et al.*, 1997; Giancone *et al.*, 2008 y Krochta y De Mulder-Johnson, 1997).

Según Arvanitoyannis *et al.* (1998) a mayor cantidad de glicerol (15, 20 y 25 g/100 mL), la fuerza de tensión disminuía, pero la deformación aumentaba y a concentraciones pequeñas de glicerol (2, 5, 8 y 10 g/100 mL) el efecto era contrario en películas almidón-proteína. La capacidad de interacción de las proteínas del suero de leche con moléculas de la misma o de otra especie, carbohidratos o lípidos, las convierte en un material versátil para su aplicación en productos alimenticios y en la elaboración de películas o recubrimientos que brindan protección al alimento como una barrera inerte (Di Pierro *et al.*, 2006).

3.4. Plastificantes

El agua es el más común de los plastificantes, pero su control en los polímeros es muy difícil (Gontard *et al.*, 1992). El contenido total de plastificante no debe exceder un 25% de la mezcla (Bazuin y Eisenberg, 1986). Los plastificantes reducen las atracciones intermoleculares entre cadenas poliméricas (proteínas y almidones) adyacentes para así incrementar la flexibilidad de

la película (Donhowe y Fennema, 1993; García *et al.*, 2000 y Romero-Bastida *et al.*, 2005). Generalmente los plastificantes disminuyen la permeabilidad al vapor de agua (Gontard *et al.*, 1993, Müller *et al.*, 2007). Si se agregaran surfactantes a la solución formadora de la película se esperaría una disminución a la permeabilidad del vapor de agua, ya que se estarían incorporando moléculas con características hidrofóbicas (Rodríguez *et al.*, 2006). Rodríguez *et al.* (2006) utilizaron glicerol como plastificante y Tween 20 como surfactante en la elaboración de películas a base de almidón de papa (2% p/p); en sus resultados se observa que existe un efecto sinérgico; donde a 20% de glicerol y 5% de Tween 20 la elongación aumentaba; pero la fuerza de extensión disminuía; a 20% glicerol y 0.5% de Tween 20 se observa un efecto inverso.

La adición de plastificantes a películas de almidón ayudan a disminuir la brillantez por reducción de fuerzas intermoleculares, incrementando la movilidad de las cadenas, decreciendo la transición de espejo de estos materiales e improvisando su flexibilidad (Galdeano *et al.*, 2008). Por otro lado, Romero-Bastida *et al.* (2005) encontraron que la elaboración de películas comestibles con otra fuente de almidón (0.03%) como son mango y plátano, con glicerol (0.015%) como plastificante y dos formas de preparación de las soluciones formadoras de películas (en frío con NaOH y con calor), las películas con gelatinización en caliente, arrojaron los mejores resultados en cuanto a propiedades mecánicas (fuerza de extensión, elasticidad y elongación), en permeabilidad al vapor de agua y solubilidad.

Arvanitoyannis y Biliaderis (1998) y Arvanitoyannis *et al.* (1998) observaron que a concentraciones de 2-5% de glicerol se obtenían buenas propiedades en películas de metilcelulosa y para almidones modificados de 5-25% en combinación con gelatina. Para la elaboración de películas a base de almidones, se han empleado plastificantes como el glicerol y sorbitol (Arvanitoyannis y Biliaderis, 1998; Arvanitoyannis *et al.*, 1998; Gaudin *et al.*, 1999; Myllarinen *et al.*, 2002; Rodríguez *et al.*, 2006; Romero-Bastida *et al.*, 2005 y Soares *et al.*, 2005).

Ponce *et al.* (2008) y Schou *et al.* (2005) reportaron el uso de glicerol en proporción de 0.25% cuando se empleaba caseína y en carboximetilcelulosa al 1.9%. El APSL adicionado con agentes plastificantes (glicerol, sorbitol, etc.) forma películas insolubles en agua, transparentes, aroma y sabor suave, flexibles, blandas, biodegradables y con excelentes propiedades mecánicas (Jiancai y Hongda, 2000; Mate y Krochta, 1995 y Miller *et al.*, 1998).

3.5. Agentes antioxidantes

Desde tiempos ancestrales se han visto efectos benéficos por el uso de plantas en la salud humana (Yokozawa *et al.*, 1998); el papel de los vegetales y productos alimenticios en la prevención de enfermedades ha sido atribuido en parte, a las propiedades antioxidantes de sus compuestos polifenólicos. Los alimentos ricos en compuestos polifenólicos, bebidas y extractos de plantas, tales como el vino tinto, el extracto de semilla de uva, té verde y tamarindo, entre otros, son una gran fuente de componentes con características como: hipolipidémicos, anti-arterioesclerosis, antiinflamatorios, inmunomoduladores y antioxidantes (Auger *et al.*, 2005; Kanashiro *et al.*, 2009; Martinello *et al.*, 2006; Riemersma *et al.*, 2001, Soriano-Santos *et al.*, 2006 y Vinson *et al.*, 2004). Por otro lado, el consumo de alimentos ricos en polifenoles ha sido asociado con la sensación de astringencia (Lee y Lawless, 1991 y Troszyska *et al.*, 2006) además, exhiben una efectiva actividad inhibitoria contra microorganismos patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.* y *E. coli* (Kim *et al.*, 2000 y Oussalah *et al.*, 2004).

Los antioxidantes son sustancias que pueden retrasar o reducir la velocidad de oxidación de las sustancias autooxidables. Los principales antioxidantes liposolubles ordinariamente utilizados en los alimentos son fenoles monihídricos o polihídricos con diversos sustituyentes en el anillo. Para que su eficacia sea máxima, los antioxidantes primarios se suelen combinar con los fenólicos o con diversos agentes quelantes. El mecanismo básico de acción de los antioxidantes es retrasar la acción de autooxidación para inhibir la formación de radicales libres o interrumpir la cadena de propagación de radicales libres. Algunos investigadores de los años 40's, postularon que los antioxidantes inhibían la reacción en cadena actuando como donadores de hidrógeno o aceptores de radicales libres (Fennema y Tannenbaum, 1985).

Los antioxidantes fenólicos son excelentes donadores de hidrógeno o electrones y sus radicales intermediarios son relativamente estables, debido a la deslocalización por resonancia y a la carencia de posiciones adecuadas para el ataque por el oxígeno molecular (Fennema y Tannenbaum, 1985). Según Porter (1980) existe una gran importancia del carácter anfifílico de las moléculas de antioxidantes fenólicas, en su determinación en sistemas bifásicos y multifásicos y que su uso dependerá de la relación superficie/volumen: si es pequeña, los antioxidantes de carácter hidrofílico-lipofílico serían los más adecuados, pero si la relación es grande, entonces se emplearían solo los de carácter lipofílico. En la elección de un antioxidante se debe considerar: la facilidad de incorporación, resistencia al procesado, estabilidad al pH, tendencia a producir decoloraciones o aromas extraños, disponibilidad y costo. La *Meat Inspection Act* permite solo el uso entre 0.01-0.02% del peso fresco de estos antioxidantes en productos cárnicos.

La habilidad de grupos hidroxilo y dobles enlaces conjugados en los grupos reactivos determinan la eficacia de los extractos naturales en la inhibición de los patógenos y su efecto antioxidante (Ultee *et al.*, 2002). El modo de acción es generalmente considerado por alteración de la membrana citoplasmática, interrupción de la fuerza motriz de protones, flujo de electrones, transporte activo y/o coagulación del contenido celular para el caso de actividad antimicrobiana (Burt, 2004). La incorporación de ascorbilo, palmitato, α -tocoferol y aceites esenciales dentro de películas o recubrimientos, pueden evitar la oxidación de los ácidos grasos de los alimentos (Han y Krochta, 2007). Se ha encontrado que los extractos y principalmente el extracto de semillas de uva tiene una efectiva actividad antimicrobiana y antioxidante en alimentos (Ahn *et al.*, 2004 y Theivendran *et al.*, 2006). Según Oussalah *et al.* (2004) en estudios de películas biodegradables de proteínas adicionadas con extractos naturales de orégano, salvia, romero, ajo y pimiento morrón encontraron efectos antimicrobianos y antioxidantes en carnes.

Por otro lado, Seydim *et al.* (2006) emplearon aceites esenciales de carvacrol, timol y eugenol contra microorganismos patógenos, donde a concentraciones del 4% y principalmente con carvacrol, se observaba una buena actividad antimicrobiana en películas elaboradas de aislado de proteína de suero de leche a pH 8. Rojas-Graü *et al.* (2007) utilizaron concentraciones de 0.1% de carvacrol, con resultados satisfactorios sobre *E. coli*, siendo el pH de las películas cercano a 5.0.

Según Sivarooban *et al.* (2008) el extracto de semillas de uva (1% p/v) en combinación con nisina (10000 IU/g) en películas comestibles de proteína aislado de soya a un pH de 6.0 ± 0.5 , incrementaba el efecto contra *L. monocytogenes*. Las especias y semillas de leguminosas son ricas en compuestos polifenólicos, tales como: taninos hidrolizables y condensados (Dadalioglu y Evrendilek, 2004 y Trosyńska *et al.*, 2002 y 2006). Las semillas de colores diferentes del blanco, son las de mayor contenido de taninos condensados (Trosyńska *et al.*, 2006). Los compuestos fenólicos son el mayor grupo de compuestos que se cree son los responsables de la actividad antimicrobiana y antioxidante de muchos extractos de plantas (Lin *et al.*, 2004). Desde entonces los polifenoles (incluidos los taninos) han demostrado una variedad de actividades biológicas (Okuda, *et al.*, 1991 y Yokosawa, 1998). Una importante característica de los polifenoles es su capacidad de unión con proteínas y carbohidratos, la formación de complejos solubles e insolubles a través de puentes de hidrógeno y enlaces hidrofóbicos (Barry *et al.*, 1986 y Spaargaren, 2000). Se ha observado que las interacciones tanino-proteína ocurren en un intervalo de pH de 3.5 a 7; además de que los taninos libres pueden reaccionar con otras proteínas, carbohidratos, minerales, enzimas digestivas, etc., dando lugar a nuevos complejos (López *et al.*, 2004 y McNabb *et al.*, 1993). Los compuestos fenólicos desequilibran principalmente la función de las membranas celulares lo cual causa un retraso del crecimiento y multiplicación de las bacterias (McAllister *et al.*, 1994). Se dice que, los compuestos fenólicos están involucrados en la adhesión, en la unión de proteínas y pared celular, en la inactivación enzimática y en la inclusión de la pared celular y/o de DNA durante la inactivación de patógenos (Davidson, 2001).

Giner-Chávez (1996) estudió que la precipitación de proteínas depende de: la estructura química de los taninos, su peso molecular, la estructura química de las proteínas relacionadas y la forma de interactuar con diferentes grados de afinidad por proteínas. Una de las desventajas del empleo de taninos en alimentos es la astringencia generada por la interacción con glicoproteínas salivales (Silanikove *et al.*, 2001). Otros compuestos como las proantocianidinas con unidades monoméricas consistentes de (taninos condensados) flavin-3-ol (Poncet-Legrand *et al.*, 2006 y Waters *et al.*, 1994) pueden unirse a la caseína y así disminuir su hidrólisis por la flora bacteriana, lo que demuestra una estabilidad a la proteína por efecto de estos compuestos, ya que las proantocianidinas son multiagregados, capaces de unirse simultáneamente a más de un sitio en la superficie de las proteínas, inicialmente por puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, para después dar interacciones covalentes (Sarni-Manchado *et al.*, 1999; Siebert *et al.*, 1996 y Tanner *et al.*, 1994).

Las proteínas con altos pesos moleculares, altos contenidos de prolina y aminoácidos hidrofóbicos tienen mayor afinidad por taninos los cuales inducen cambios en su conformación (Asquith, 1986). Según Melencic *et al.* (2008) y Troszyńska *et al.* (2006) el frijol rojo, soya, lenteja verde, chicharos y habas son los que mayores cantidades de compuestos polifenólicos contienen (ácidos fenólicos, flavonoides y antocianidinas) y que los compuestos de menor peso molecular tienen más afinidad a precipitar proteínas.

Yokozawa *et al.* (1998) encontraron una gran variedad de taninos y flavonoides que tienen elevada actividad antioxidante debido a los grupos orto-hidroxil, pero también poseen una fuerte actividad anti-radicales libres, y que la acción de los taninos se incrementa a mayor número de grupos galloil. En otros estudios se ha observado, que los compuestos fenólicos tienen una mayor actividad inhibitoria contra bacterias Gram-positivas que contra Gram-negativas (Beuchat y Golden, 1989). Esta capacidad patogénica de las bacterias Gram-negativas está usualmente asociada con la presencia de la capa de lipopolisacáridos, los cuales están involucrados en la reducción de la sensibilidad de estas bacterias contra extractos naturales y nisina (Sivarooban *et al.*, 2008).

Amarowicz *et al.* (2008) evaluaron la actividad antibacteriana de taninos constituyentes de semillas de trigo, fríjol rojo, avellanas y nuez fresca; teniendo el fríjol rojo una mayor variedad de compuestos polifenólicos incluidos taninos condensados; contra microorganismos patógenos y deteriorantes de alimentos.

3.6. El tamarindo (*Tamarindus indica*)

La introducción del tamarindo al continente Americano se dio entre los años 1700 y 1800, probablemente junto con los primeros embarques de esclavos del oeste de África. El tamarindo es una vaina de color café canela de forma alargada semicurva de 6 a 20cm de longitud y de 3-4cm de ancho, en periodo de maduración las vainas se tornan de un ligero color pardo con epicarpio quebradizo, conteniendo varias semillas (3-10) envueltas por pulpa fibrosa de color café oscuro, los estrechamientos parciales de la vaina muestran el número de semillas contenidas en cada fruto (Salunkhe y Desai, 1984).

Las semillas son de forma ovalada, comprimidas lateralmente, lisas, con la testa café lustrosa, de 1cm de largo aproximadamente, carecen de endospermo y presentan un par de cotiledones gruesos y su radícula es pequeña y recta (Salunke y Desai, 1984). Este fruto se encuentra dentro de la familia de las leguminosas (*Caesalpinaceae*) y consiste de: semillas (33.9%), pulpa (55.0%) y fibra-cascara (11.1%); es un producto rico en azúcares, ácidos orgánicos, pectinas, vitaminas (tiamina y niacina) y minerales (fósforo y potasio); además de que ha sido usado como especia en algunos alimentos (Carasek y Pawliszyn, 2006 y Gunasena y Hughes, 2000).

El polvo obtenido de los núcleos de las semillas, puede ser empleado para bebidas, panificación, películas y geles (Bhattacharya *et al.*, 1991 y 1994); también ha sido empleado para reemplazar al almidón de algodón y su uso en la industria papelera (Goyal *et al.*, 2007).

El germen obtenido de las semillas es usado para elaborar gomas y para modificar la viscosidad en comidas japonesas; en algunas zonas rurales de la India se emplea la pulpa de tamarindo seca junto con las semillas para prevenir la rancidez e incrementar la vida media del aceite de coco (Siddhuraju, 2007). El jugo de tamarindo consumido por la población, usualmente contiene 5% de extracto de pulpa (Paula *et al.*, 2009).

El tamarindo es de las frutas tropicales con los niveles más bajos de agua y probablemente como consecuencia tienen los niveles más altos de proteína, carbohidratos y minerales que ninguna otra fruta. En muchos países asiáticos, el tamarindo ha sido empleado en la medicina tradicional como antimicrobiano, digestivo, laxante, expectorante, antidiabetogénico e inmunomodulador (Al-Fatimi *et al.*, 2007; Komutarin *et al.*, 2004 y Ushanandini *et al.*, 2006). La importancia y el papel de sus componentes no nutritivos, particularmente ácidos fenólicos, flavonoides y taninos de alto peso molecular como antioxidantes naturales se ha incrementado (Siddhuraju, 2007). Recientes estudios han reportado que el extracto del fruto de tamarindo, es rico en compuestos polifenólicos, reduce la arterioesclerosis progresiva y el estrés oxidativo en animales de laboratorio así como en ensayos *in Vitro* (Martinello *et al.*, 2006).

Komutarin *et al.* (2004), Lamien-Meda *et al.* (2008), Martinello *et al.* (2006) y Sudjaroen *et al.* (2005) determinaron la presencia de altas concentraciones de polifenoles y flavonoides en los extractos de diferentes partes del fruto de tamarindo, como son: las semillas y fruto (pulpa y pericarpio). Komutarin *et al.* (2004) reportaron que los flavonoides son los mayores constituyentes en el extracto del recubrimiento de las semillas de *T. indica*. Kanashiro *et al.* (2007) encontraron rutina, un compuesto parental glicosilado del flavonoide quercetina. Diversos investigadores, han logrado aislar varios componentes de las semillas de tamarindo como son: 2-hidroxi-3',4'-dihidroxiacetofenona, metil 3,4-dihidroxibenzoato, 3,4-dihidroxifenilacetato y (-)-epicatequina en adición a proantocianidinas oligoméricas (Tsuda *et al.*, 1993, 1994 y 1995).

Actualmente es de las frutas de mayor importancia a nivel mundial y puede llegar a cultivarse en más de 50 países tropicales y subtropicales. Las mayores áreas de producción son Asia, África y América (Kumar y Bhattacharya, 2008 y Sudjaroen *et al.*, 2005). Este fruto es empleado en su mayoría como materia prima de dulces, concentrados y saborizantes para agua. En el país no se encuentra muy explotada su funcionalidad, además de que existe aún mucho desperdicio de este fruto; los estados de Colima, Guerrero, Oaxaca, Chiapas y Michoacán son los estados con mayor producción a nivel nacional.

En México, según la SAGARPA (2008) la producción de tamarindo en el 2007 fue de 34,823.16 toneladas; aunque con un bajo rendimiento (ton/ha) de sólo el 4.61% y un precio por tonelada de alrededor de \$5,318.27. Si bien del 2006 al 2007 se incrementó la producción; el rendimiento disminuyó y el costo por tonelada aumentó en un 9.9%. Para el 2008 el panorama fue ligeramente parecido en cuanto a la producción, la cual fue de 38,681.69 ton equivalentes a un rendimiento del 4.92%; sin embargo, el precio por tonelada disminuyó en un 14.57% con un precio de \$4,543.60.

4. HIPÓTESIS

Si a matrices formadoras de películas de aislado de proteína de suero de leche y almidón nativo de papa se les incorpora una fuente natural de compuestos polifenólicos a partir de tamarindo (*Tamarindus indica*); entonces se esperaría generar al menos una película con actividad antioxidante sin afectar las propiedades fisicoquímicas y mecánicas de estas.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Elaborar películas biodegradables proteína-almidón y evaluar las propiedades fisicoquímicas, mecánicas y antioxidantes debidas a la incorporación de extractos del fruto de tamarindo (*Tamarindus indica*) como fuente de compuestos polifenólicos.

5.2. OBJETIVOS PARTICULARES

ETAPA 1.

- Obtener y caracterizar las harinas y extractos del fruto de tamarindo (*Tamarindus indica*).
- Seleccionar la harina o extracto con mayor contenido de compuestos fenólicos con actividad antioxidante.

ETAPA 2.

- Evaluar la actividad antioxidante de la solución formadora de películas y las películas así como su relación con los compuestos polifenólicos en un diseño de mezclas en base a dos componentes: aislado de proteína de suero de leche y almidón nativo.
- Evaluar las propiedades fisicoquímicas y mecánicas de las películas por efecto de la incorporación de compuestos polifenólicos.

6. DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO

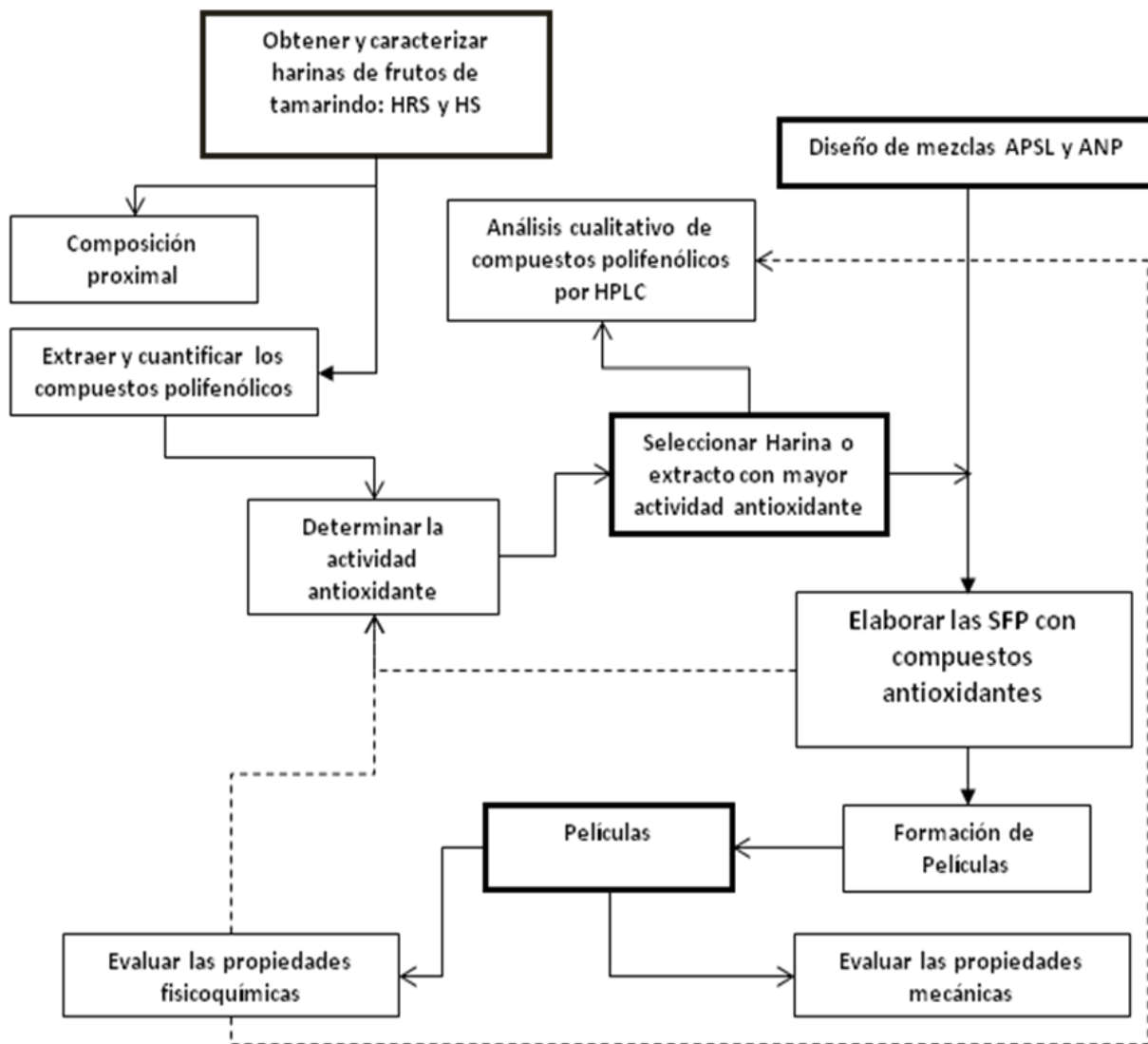


Figura 1. Diagrama general de trabajo experimental.

Donde:

HS: es harina de semillas de tamarindo.

HRS: es harina de recubrimiento de semillas de tamarindo.

APSL: es aislado de proteína de suero de leche.

ANP: es almidón nativo de papa.

SFP: es solución formadora de películas.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

ETAPA 1.

7.1. Reactivos y materia prima para la obtención de extracto de tamarindo

En esta primera etapa se empleó: hexano, ácido acético, ácido clorhídrico, ácido bórico, hidróxido de sodio, etanol, metanol, carbonato de sodio, nitrato de sodio, tricloruro de aluminio, etil acetato, ácido fórmico, cloruro férrico hexahidratado, ferricianuro de potasio y acetato de sodio, todos grado reactivo de J.T. Baker Chemical Co. (N.J., E.U.A).

Ácido gálico, catequina, Trolox, 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ), 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH·), polivinilpirrolidona y reactivo Fenol-Folin-Ciocalteu 2N de Sigma-Aldrich (Alemania) estándares y grado analítico. Ácido acético y acetonitrilo grado HPLC de J.T. Baker Chemical Co. (N.J., E.U.A). Se utilizaron placas de 10 x 10 cm de HPTLC Sílica gel 60F254 (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y jeringas de 22 mm de diámetro marca Millipore (E.U.A) con filtros Millipore de 22 µm de poro.

La materia prima empleada fueron frutos de tamarindo (*Tamarindus indica*) de baja calidad libres de materia extraña, adquiridos en la Central de Abastos de la Ciudad de México provenientes del estado de Guerrero.

7.2. Obtención de harina de frutos de tamarindo

Después de haberse removido la cáscara y pulpa de los frutos; se separó el recubrimiento de las semillas; estos fueron acondicionados y molidos según lo descrito por Siddhuraju (2007) con ligeras modificaciones para obtener harinas tamizadas en una malla del No. 40; generando:

- Harina de recubrimiento de semillas de tamarindo: HRS
- Harina de semillas de tamarindo: HS

Todas las harinas fueron almacenadas en frascos de plástico con tapa de rosca, a temperatura ambiente y en oscuridad hasta su próximo análisis.

7.3. Composición proximal de las harinas de frutos de tamarindo

Se determinó el contenido de grasa, cenizas, proteínas y humedad; a cada harina de acuerdo a lo descrito por la AOAC (1995). El contenido de carbohidratos totales se calculó por diferencia de los componentes analizados en el laboratorio. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

7.4. Extracción y cuantificación de los compuestos polifenólicos en harinas de frutos de Tamarindo

Se realizó la extracción y cuantificación de compuestos fenólicos a cada una de las harinas obtenidas en la sección 7.1. de acuerdo a dos métodos: según Siddhuraju (2007), consistió de una extracción-concentración-liofilización, empleando como medio de extracción etanol al 95% a 25 °C por 24 h y remoción del solvente mediante un rotavapor modelo RV0551 (Janke&Kunkel, Staufen, Alemania) a 40±2 °C por 30 min, posteriormente se liofilizó con una liofilizadora LaBConco (Freeze Dry System/Freezone4.5, K.C., E. U.A.). Y el segundo método, según Ahmad *et al.* (1998) consistió de extracción-concentración; llevando a cabo la extracción con etanol al 95% a 25 °C por 24 h y evaporación por rotavapor a 40±2 °C por 15 min hasta tener un volumen de 100 mL. Para ambas extracciones se empleó también metanol. El producto resultante fue almacenado en frascos ámbar a 4 °C hasta su posterior análisis.

Para la cuantificación de las fracciones polifenólicas y posteriores análisis, se prepararon a partir de cada extracto liofilizado o extracto líquido diluciones decimales (1/10, 1/100, 1/200, 1/1000 y 1/10000). Se prepararon soluciones etanólicas o metanólicas a partir de los extractos liofilizados a una concentración de 0.025 g/10 mL de alcohol. Posteriormente, fueron llevadas a cabo las diluciones pertinentes. Las siguientes determinaciones fueron hechas por triplicado y se empleó un espectrofotómetro DU 650 (Beckman. USA).

7.4.1. Determinación de polifenoles totales: se llevó a cabo por el método descrito por Folin y Ciocalteu (1972) y modificaciones de Singleton *et al.* (2000). Se emplearon 100 μ l de extracto, los cuales fueron transferidos a un matraz volumétrico de 10 mL, se agregaron 0.6 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu y 2 mL de solución de carbonato de sodio (200 g/L) el volumen final se completó con agua destilada; inmediatamente los matraces se agitaron con un vortex y se colocaron en la oscuridad por 40 min. La absorbencia fue leída a 725 nm. Los fenoles totales se calcularon como equivalentes de ácido gálico por interpolación de una curva de calibración (ver anexo 12, gráfico 8), expresados como mg ácido gálico/100 g de extracto.

7.4.2. Determinación de taninos: el contenido de taninos se determinó por el procedimiento antes mencionado, después de remover los taninos por adsorción en polivinilpirrolidona (PVPP). La cantidad final se obtuvo de la diferencia del contenido total de fenoles antes y después del tratamiento con el polímero; se reportó la cantidad de taninos/100 g de extracto (Makkar *et al.*, 2000).

7.4.3. Determinación de flavonoides: se determinó de acuerdo a lo reportado por Miliauskas *et al.* (2004) con modificaciones de Kim *et al.* (2003) y Skerget *et al.* (2005). Se tomaron 1.25 mL de agua destilada, 0.25 mL del extracto preparado en la sección 7.3. y se adicionaron 75 μ L de NaNO₂ (5%) para dejar reposar por 6 min. Posteriormente se adicionaron 0.15 mL de tricloruro de aluminio en etanol (20 g/L) para otro reposo de 5 min; finalmente se agregaron 0.5 mL de NaOH 1M y se completó el volumen a 2.5 mL. La absorbencia se determinó a los 25 min a una longitud de onda de 510 nm. El contenido de flavonoides se expresó como equivalentes de catequina por interpolación en una curva de calibración (ver anexo 12, gráfico 9) en 100 g de extracto.

7.5. Determinación de la actividad antioxidante de los extractos obtenidos a partir de las harinas de frutos de tamarindo

Todas las determinaciones que a continuación se describen se realizaron por triplicado.

7.5.1. Análisis cualitativo de compuestos polifenólicos por cromatografía de capa fina

La cromatografía de capa fina se llevó a cabo según Soares *et al.* (2009) y ligeras modificaciones en placas con sílica gel. Se colocaron 10 μ L de los extractos en la base de las placas, las cuales se colocaron en una cámara cerrada con etil-acetato:agua:ácido fórmico (85:15:10). Después de avanzar aproximadamente 8 cm la fase móvil, las placas se secaron y se emplearon dos soluciones reveladoras:

A: cloruro férrico y ferricianuro de potasio (ambas al 1% p/v) para localizar los compuestos fenólicos. El reactivo fue preparado *in situ*. El reactivo tuvo una coloración naranja-café al ser adicionado el primer reactivo y al dar positivo se tornaron manchas color azul en zonas positivas y blancas en áreas negativas con el segundo reactivo.

B: 0.04% DPPH en etanol, se empleó para detectar la presencia de compuestos con actividad antioxidante. El uso del reactivo púrpura detectó la presencia de estos al tornarse manchas de color blanco sobre las placas con color morado. Los resultados se reportaron como positivo o negativo.

7.5.2. Ensayo de poder de reducción/antioxidante férrico (FRAP)

En contraste con otros métodos, este no usa radicales (Benzie y Strain, 1996), su fundamento se basa en la actividad reductora de compuestos; mediante las reacciones de transferencia de electrones. Consiste en la reducción del complejo $[\text{Fe(III)(TPTZ)}_2]^{3+}$ a $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{2+}$ por efecto de compuestos reductores.

Se trabajó de acuerdo a Huang *et al.* (2005) y modificaciones propias, se emplearon 25 μL de muestra o etanol (para el blanco) y 75 μL de agua, a los cuales se les adicionaron 0.75 mL del reactivo de FRAP recién preparado e incubado a 37 °C; el cual consistió de 2.5 mL de cloruro férrico hexahidratado (20 mM), 2.5 mL de 2,4,6-Tripiridil-s-triazina (TPTZ) 10 mM en HCl 40 mM y 25 mL de buffer de acetatos 0.3 M, pH 3.6. Las absorbencias se leyeron a 593 nm a los 5 s y cada 15 s; por 5 min. La curva estándar se elaboró con Trolox según lo reportado por Fang *et al.* 2009, Siddhuraju, 2007 y Pulido *et al.* 2000. Se reportó el promedio de 3 determinaciones.

7.5.3. Ensayo DPPH

DPPH en su forma radical que es 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH^{\bullet}) absorbe a una longitud de onda de 515 nm; la absorbencia disminuye por reducción del radical a partir de un componente antiradicalario presente en la muestra (Böhm y Schlesier, 2004). Según Brand-Williams *et al.* (1995) y modificaciones de Sánchez-Moreno *et al.* (1998), Simirgiotis *et al.* (2008) y Sharififar *et al.* (2009), se emplearon 100 μL de extracto y se adicionaron 3.9 mL de solución alcohólica de DPPH^{\bullet} (0.025 g/L). El decremento en la absorbencia se determinó a 515 nm cada 15 min sucesivamente hasta completar 1 h, o bien hasta que las lecturas fueran constantes, las muestras se mantuvieron en la oscuridad. Se realizaron curvas de catequina en concentraciones de 1, 0.8, 0.6, 0.4 y 0.2 mg/mL como antioxidante modelo (Siddhuraju, 2007).

La actividad antiradicalaria (EC_{50}) está definida por la cantidad de antioxidante necesaria para disminuir la concentración inicial de DPPH^{\bullet} en un 50%. Y el tiempo de actividad antiradicalaria (TEC_{50}) es definido como el tiempo necesario para disminuir en un 50% la concentración inicial de DPPH. El porcentaje de DPPH remanente se calculó como sigue:

$$\% \text{DPPH}^{\bullet}_{\text{R}} = [(\text{DPPH}^{\bullet})_{\text{T}=\text{n}} / (\text{DPPH}^{\bullet})_{\text{T}=0}] * 100$$

Donde:

$\% \text{DPPH}^{\bullet}_{\text{R}}$ = porcentaje de DPPH^{\bullet} remanente.

$\text{DPPH}^{\bullet}_{\text{T}=\text{n}}$ = porcentaje de al tiempo de lectura establecido.

$\text{DPPH}^{\bullet}_{\text{T}=0}$ = porcentaje de al tiempo cero de lectura.

7.6. Análisis cualitativo de compuestos polifenólicos por HPLC

Se empleó la metodología propuesta por Tsao y Yang (2003) con algunas modificaciones. El extracto con mayor actividad antioxidante seleccionado previamente, se filtró a través de papel filtro Whatman no.1. Previo a la inyección en el equipo las muestras se filtraron con jeringas y filtros de 22 mm de diámetro con poro de 0.22 μm (Millipore, E.U.A). El sistema HPLC empleado fue Waters™ 600 Controller-Millipore con loop de 20 μL equipado con una bomba cuaternaria 600E Waters™, desgasificador Waters™ In-line Degasser AF y detector de arreglo de diodos Waters™ 2996 Photodiode Array detector. Para la separación de los compuestos fenólicos se empleó una columna C18 Econosphere™ (250 mm x 4.6 mm de diámetro interno, tamaño de partícula de 5 μm) con precolumna C18 Econosphere™ All-Guard™ de 7.5 mm x 4.6 mm d. i. (Alltech, Deerfield, Il. E.U.A). La fase móvil binaria consistió de 6% ácido acético en acetato de sodio 2 mM (pH 2.55, Solvente A) y acetonitrilo (solvente B). El flujo fue mantenido constante a 1.0 ml/min por el tiempo total de corrida de 70 min. El sistema de corrida fue de gradiente: 0-15% de B en 45 min, 15-30% de B en 15 min, 30-50% de B en 5 min y de 50-100% de B en 5 min. El volumen de inyección fue de 20 μl . El detector fue programado para leer a 280, 320, 360 y 520 nm en un monitoreo simultáneo. La muestra se inyectó por duplicado y los cromatogramas reportados se obtuvieron a 320 y 520 nm.

ETAPA 2.

7.7. Elaboración de películas biodegradables

7.7.1. Material de las películas

Se empleó aislado de proteína de suero de leche (APSL) el cual fue donado por Bipro, Davisco Foods International, Le Sueur, M.N., E.U.A., y almidón nativo de papa (ANP) adquirido de Industrias Alimenticias FABPSA®, S.A. de C.V. México, D.F. Se utilizó glicerol de J.T. Baker Chemical Co. (N.J., E.U.A) como agente plastificante. Se empleó como tercer componente el extracto de tamarindo que presentó la mayor actividad antioxidante en la Etapa 1. Para el vertido de las soluciones formadoras de películas se emplearon vidrios con superficies delimitadas con cinta masking-tape Janel™ 121 (Janel®, México, D.F) de 10 x 10 y 15 x 15 cm previamente cubiertos con forro adhesivo Diamante™ (Navitek ® cintas adhesivas, México, D.F).

Las formulaciones de las películas se muestran a continuación y como referencia se tomó lo reportado por algunos autores (Sanjurjo *et al.*, 2006, Rodríguez *et al.*, 2006, Soares *et al.*, 2005, Romero-Bastida *et al.*, 2005), cabe señalar que se empleó almidón de papa, debido a ser un almidón común y de fácil acceso a bajo precio.

Cuadro 1. Formulaciones de dos componentes (APSL y ANP) para la elaboración de películas.

Formulación	X ₁ =APSL (8.7g/100)	X ₂ =ANP (8.7g/100)
N1	1.00	0.00
N2	0.80	0.20
N3	0.60	0.40
N4	0.50	0.50
N5	0.40	0.60
N6	0.20	0.80
N7	0.00	1.00

Debido a los resultados de la primera etapa; se encontró que la solución madre tenía una elevada concentración de polifenoles, además de que la mayor actividad antiradicalaria era para el extracto sólido etanólico; por ello se plantearon las siguientes concentraciones: 0.0010, 0.0020 0.0025 g de polifenoles/mL de solución formadora de película (SFP); el arreglo final queda de la siguiente forma:

Cuadro 2. Formulaciones con APSL/ANP con tres diferentes concentraciones de extracto.

Tratamiento	APSL (8.7g/100)	ANP (8.7g/100)	Concentración de polifenoles g/mL SFP
N1	1.00	0.00	Control (sin extracto)
N11	1.00	0.00	0.0010
N12	1.00	0.00	0.0020
N13	1.00	0.00	0.0025
N2	0.80	0.20	Control (sin extracto)
N21	0.80	0.20	0.0010
N22	0.80	0.20	0.0020
N23	0.80	0.20	0.0025
N3	0.60	0.40	Control (sin extracto)
N31	0.60	0.40	0.0010
N32	0.60	0.40	0.0020
N33	0.60	0.40	0.0025
N4	0.50	0.50	Control (sin extracto)
N41	0.50	0.50	0.0010
N42	0.50	0.50	0.0020
N43	0.50	0.50	0.0025
N5	0.40	0.60	Control (sin extracto)
N51	0.40	0.60	0.0010
N52	0.40	0.60	0.0020
N53	0.40	0.60	0.0025
N6	0.20	0.80	Control (sin extracto)
N61	0.20	0.80	0.0010
N62	0.20	0.80	0.0020
N63	0.20	0.80	0.0025
N7	0.00	1.00	Control (sin extracto)
N71	0.00	1.00	0.0010
N72	0.00	1.00	0.0020
N73	0.00	1.00	0.0025

7.7.2. Elaboración de las soluciones formadoras de películas (SFP)

Se produjeron 9 películas para cada formulación de acuerdo al cuadro 2, empleando glicerol a una concentración de 3.7 g/100 mL para cada SFP. La SFP se ajustó a un pH de 8.5 (Sivaroban *et al.*, 2008, Jia *et al.*, 2008, Yong y Rhee, 2001). Las mezclas se homogeneizaron a 19000 rpm por 5 min con un homogeneizador Biospec™ 9611 (Biospec, Bartlesville, Suiza) y se sometieron a tratamiento térmico en baño de agua a 70 °C para inducir la desnaturalización por 25 min. Posteriormente se enfriaron y adicionó la cantidad de extracto establecida previamente.

7.7.2.1. Polifenoles totales en SFP

Se determinó el contenido total de polifenoles en la SFP después de la incorporación del extracto de tamarindo de acuerdo al apartado 7.4.1.

7.7.2.2. Actividad antioxidante en la SFP

Se determinó la actividad antioxidante en la solución formadora de película después de la incorporación de los compuestos polifenólicos de acuerdo al apartado 7.5.3.

7.7.2.3. Elaboración de las películas

Se vertieron las SFP en vidrios previamente acondicionados y se colocaron en una cámara de humedad controlada 24-48 h (36% HR) a temperatura ambiente para su secado (Quintero-Salazar *et al.*, 2006; Murillo-Martínez, 2008). A cada película se le midió el espesor con un micrómetro digital 293-811/MDC-1 (Mituyoto, Japón) en al menos 20 puntos diferentes.

7.8. Evaluación de las características fisicoquímicas de las películas

7.8.1. Determinación de la solubilidad

Se empleó el método reportado por Gontard *et al.* (1992) y Ustunol y Mert (2004), con ligeras modificaciones de Murillo-Martínez (2008) y propias. Secciones de 2.5 cm² de películas fueron acondicionadas a 55% HR a 23 °C por 48 h aproximadamente, en un desecador con una solución saturada de nitrato de magnesio hexahidratado grado reactivo de J.T. Baker Chemical Co. (NJ, E.U.A) para obtener el peso seco inicial (PS_I), posteriormente se pesaron muestras de 0.50 g en una balanza Adventurer™ (OHAUS, Pane Brook, N.J. USA). Las muestras se colocaron en 25 mL de agua destilada y se mantuvieron en agitación a 75 rpm a 25 °C durante 36 h. Posteriormente, se colocaron en una estufa a 100 °C por 12 h y se volvieron a reacondicionar a la humedad antes mencionada, para obtener el peso de la película que no fue solubilizada (PS_f). El porcentaje de material soluble se calculó mediante la siguiente expresión:

$$\% \text{ Solubilidad} = [(PS_I - PS_f) / PS_I] \times 100$$

Donde:

PS_I = peso seco inicial de la película antes de solubilizar.

PS_f = peso seco final de la película después de solubilizada.

7.8.1.1. Proteína soluble

De acuerdo a lo reportado por Kunte *et al.* (1997) y Cho *et al.* (2007). Trozos de películas (2.5 x 2.5 cm) fueron colocados en un desecador por 72 h. Se pesaron 0.50 g de muestra y colocaron en matraces con 25 mL de agua destilada a temperatura ambiente por 24 h.

Posteriormente se centrifugaron a 10000 rpm por 5 min. Al supernadante se le determinó el contenido de proteína acorde al método de Biuret. Se utilizó albúmina de huevo como estándar para la cuantificación y los resultados se reportaron como mg de proteína total detectado en 25 mL de la solución solubilizadora.

7.8.1.2. Polifenoles totales residuales

Se determinó el contenido total de polifenoles de acuerdo al apartado 7.4.1. en la solución obtenida después de la solubilización de la película en la sección 7.8.1.

7.8.1.3. Actividad antioxidante en la solución solubilizadora

Se determinó la actividad antioxidante de acuerdo al apartado 7.5.3. en la solución obtenida después de la solubilización de la película en la sección 7.8.1.

7.8.1.4. Perfil cromatográfico de la solución solubilizadora por HPLC

Se determinó el perfil polifenólico según la sección 7.6. de la solución obtenida después de la solubilización de la película de acuerdo al apartado 7.8.1.

7.9. Evaluación de las características mecánicas de las películas

Las determinaciones se realizaron por triplicado, estas se llevaron a cabo entre 20% y 40% de la máxima fuerza en la zona elástica.

7.9.1. Determinación de la fuerza a la tensión

La determinación de la fuerza a la tensión (σ) se llevó de acuerdo al método estándar ASTM D882-01 (2001a), Murillo-Martínez *et al.* (2009) y Cao *et al.* (2007). Las muestras fueron acondicionadas previamente según la sección 7.7.1. Se empleó un texturómetro con pinzas (TA-XT2i Texture Analyser, Scarsdale, N.Y. USA). Para cada determinación se colocó una tira de película de 150 x 10 mm a una distancia inicial de 100 mm. La velocidad de estiramiento fue de 10 mm/min con una carga de 1 N y sensibilidad de 0.5 N. Las propiedades de tensión se calcularon según Pérez-Gago y Krochta (2000), por el gráfico de tensión (Fuerza a la tensión/unidad de área) contra deformación (adimensional). La fuerza a la tensión (N/m^2) es la ejercida por el brazo del aparato al estirar la película hasta el rompimiento de la película o una deformación considerable.

7.9.2. Determinación del porcentaje de elongación (ϵ)

El % de elongación (ϵ) fue calculado a partir de la división de la elongación al momento de la ruptura de la muestra por la longitud inicial (100mm) multiplicado por 100 (ASTM D882-01, 2001a y Cao *et al.*, 2007).

7.9.3. Determinación del módulo de Young

La medición del módulo de Young ($E = \sigma/\epsilon$) es un dato intrínseco de la rigidez o dureza de las películas y corresponde a la pendiente de la regresión lineal del gráfico de fuerza a la tensión contra deformación unitaria registrada entre el 20-40% de la curva (Mauer *et al.*, 2000). Estos resultados nos permitieron calcular el módulo de Young, el cual es una constante dada por E, la cual es la fuerza necesaria por unidad de superficie, para producir un estiramiento del material igual a su longitud inicial siendo una razón de incremento esfuerzo-deformación.

7.10. Diseño y análisis experimental

Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el paquete computacional SPSS v 17.0 para Windows (SPSS Inc. Chicago, Il., E.U.A). Las determinaciones descritas en toda la metodología fueron hechas por triplicado.

ETAPA 1.

- Se utilizaron pruebas de t-student ($P \leq 0.05$) para las variables respuesta (proteína, grasa, cenizas, azúcares totales, humedad, polifenoles totales, taninos y flavonoides) para encontrar diferencias significativas entre las harinas de cada una de las fracciones de frutos o extractos de tamarindo con respecto a sus variables respuesta. Se reportaron los promedios \pm desviación estándar de tres réplicas por determinación.
- Para analizar los resultados de actividad antioxidante (DPPH y FRAP) de los apartados 7.4.2. y 7.4.3., los factores o variables independientes fueron los cinco extractos generados de: harina de recubrimiento de semillas (HRS) y de semillas (HS).

Posteriormente, se efectuó un análisis de varianza (ANOVA) y para encontrar diferencias significativas entre los extractos se empleó la prueba de Duncan ($P \leq 0.05$). Se reportaron los promedios \pm desviación estándar de tres réplicas por determinación.

ETAPA 2.

- El diseño de mezclas planteado en el apartado 7.7.1. (cuadro 2) consistió de tres factores; en un diseño completamente al azar para generar SFP y películas. Donde; los factores fueron el aislado de proteína de suero de leche (APSL), almidón nativo de papa (ANP) y concentración de polifenoles (1, 2 y 3); generando los tratamientos a partir de 7 combinaciones diferentes desde 100% de alguno de los componentes proteicos o carbohidratos con disminución cada 20%, tomando en cuenta una combinación de 50:50. Se generaron códigos para los tratamientos como se muestra en el cuadro 2 para un total de 21 tratamientos con incorporación de compuestos polifenólicos y 7 testigos.
- Para el análisis de SFP y de la solución solubilizadora en lo que se refiere a actividad antioxidante, así como los datos recabados de las variables respuesta: fisicoquímicas (% de película solubilizada, proteína soluble, polifenoles residuales en SFP y solución solubilizadora) y mecánicas (fuerza a la tensión, % de elongación, módulo de Young y la relación fuerza a la tensión sobre elongación); además de otra variable como el espesor, se efectuó un análisis de varianzas (ANOVA) y para encontrar diferencias significativas entre las medias de los tratamientos se empleó la prueba de Duncan ($P \leq 0.05$). Se reportaron los promedios \pm desviación estándar de tres réplicas para cada variable respuesta.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ETAPA 1.

8.1. Obtención de harinas de frutos de tamarindo

De acuerdo a la metodología planteada en la sección 7.2., se obtuvieron dos harinas: 5.825kg de harina de semillas (HS) y 0.65kg de harina de recubrimiento de semillas (HRS) a partir de 13-15kg de fruto limpio.

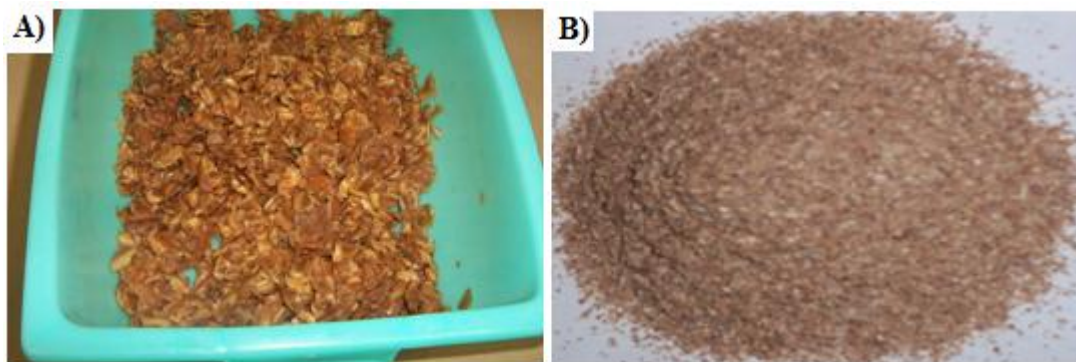


Figura 2. A) Recubrimiento de semilla de tamarindo y B) harina de recubrimiento de semilla.

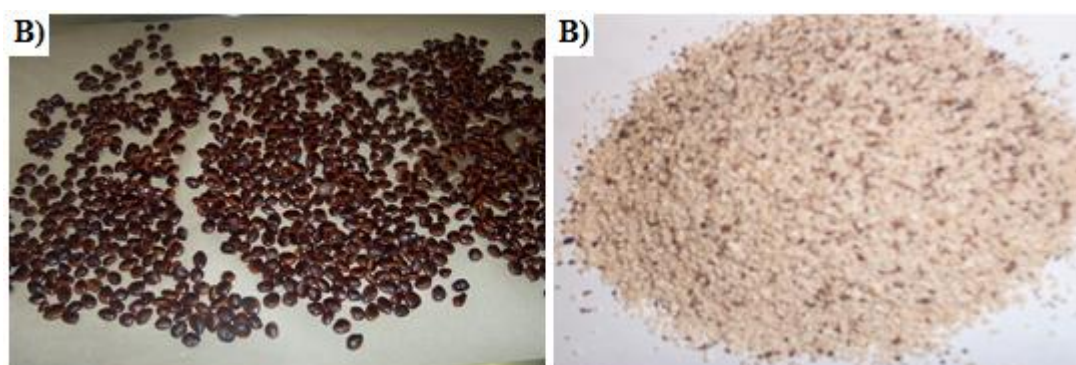


Figura 3. A) Semillas de tamarindo y B) harina de semillas de tamarindo.

8.2. Composición proximal de las harinas del fruto de tamarindo

Se llevaron a cabo las determinaciones de grasa, cenizas, proteína y contenido de humedad de las dos harinas obtenidas (HS y HRS) de acuerdo a lo recomendado por la AOAC (1995); el contenido de carbohidratos totales fue por diferencia. Los resultados son significativamente diferentes entre sí para cada uno de los componentes ($p \leq 0.05$), se muestra el promedio \pm desviación estándar en el cuadro 3.

Cuadro 3. Análisis bromatológico de las harinas obtenidas.

Harina	$\bar{Y} \pm \sigma$				
	% Humedad	% Proteína	% Cenizas	% Grasa	Carbohidratos totales (g/L)
HS	9.083±0.012	14.127±1.003	6.110±0.040	3.537±0.225	67.143±1.274
HRS	10.397±0.982	16.235±0.945	4.173±0.205	5.873±0.107	63.322±2.239

*Se muestran promedios \pm desviación estándar de tres repeticiones.

*Todos los resultados dentro de columnas son significativamente diferentes entre sí ($P \leq 0.05$).

Como se puede observar y de acuerdo a lo reportado por Bhattacharya *et al.* (1994), se esperaba que la harina a partir del recubrimiento de semilla tuviera un menor contenido de carbohidratos que las semillas, aunque mayor contenido de grasa y cenizas. La harina de las semillas debido a que proviene de una estructura de desarrollo de la planta; debe tener grandes cantidades de estos compuestos para poder llevar a cabo el proceso de germinación. Además, las semillas de tamarindo son deficientes en aminoácidos esenciales: cisteína y metionina (0.63%) aunque, la proteína del núcleo de las semillas es rica en lisina (5.96%), ácido glutámico (18.5%), ácido aspártico (11.6%), glicina (9.1%) e isoleucina (4.1%) y su digestibilidad *in vitro* llega a 71.3%. La proporción de aminoácidos hidrofóbicos es de 28.2% e hidrofílicos de 42.3% (Bhattacharya *et al.*, 1994).

8.3. Extracción de compuestos polifenólicos a partir de las harinas

Los extractos polifenólicos se obtuvieron de acuerdo a la sección 7.4., observándose que por el método 1 (extracción- evaporación- liofilización) para el caso del extracto a partir de HRS, al transcurrir la remoción del solvente en el rotavapor se producía un fenómeno de caramelización y consistencia grasa, dificultando la obtención de un residuo sólido y seco; por tal motivo, solo se obtuvo un extracto líquido. Siddhuraju (2007) reportó hasta un 24.4% de rendimiento en la extracción metanólica con un procedimiento ácido previo al acondicionamiento de las semillas.

Aunque, en el presente trabajo, las semillas sólo fueron secadas a temperatura ambiente y molidas; el rendimiento de los extractos sólidos en cualquiera de los dos solventes (etanol o metanol) fueron numéricamente parecidos entre sí.

Por otro lado, se obtuvieron extractos sólidos de color rojo ladrillo brillante a partir de la HS por el método 1, los cuales mostraron solubilidad en etanol o metanol después de dos minutos de agitación. Como se observa (Cuadro 4), el rendimiento de extracto sólido en cualquiera de los medios de extracción se encuentra entre 12.91-13.66% y ambas medias son iguales entre sí ($P \leq 0.05$). Los resultados y rendimientos se muestran en el siguiente cuadro:

Cuadro 4. Rendimiento de los extractos a partir de las harinas obtenidas.

Muestra	Peso de muestra (g)	Medio de Extracción (350 mL)	Cantidad de Extracto (g ó mL)	Rendimiento	Código del extracto
HS	30.009	Metanol	70 mL	NR	Em3
HS	30.029	Etanol	4.102 g *	13.66%	Se2
HS	30.123	Metanol	3.889 g *	12.91%	Sm1
HRS	30.063	Etanol	150 mL	NR	Ee2
HRS	30.210	Metanol	70 mL	NR	Em1

*Las cantidades de extracto marcadas con * no son diferentes entre sí a $P \leq 0.05$.

* Letra inicial de código del extracto “E” significa extracto líquido y “S” extracto sólido.

* NR = no reportado.

8.3.1. Cuantificación de compuestos polifenólicos a partir de los extractos de las diferentes harinas

8.3.1.1. Determinación de polifenoles totales, taninos y flavonoides

Se generaron dos curvas de calibración, una de ácido gálico para polifenoles totales y otra de catequina para flavonoides (Anexo 12); las ecuaciones obtenidas por regresión lineal se muestran a continuación:

$$\text{Ácido Gálico} = (A - 0.1665)/1.9974$$

$$\text{Catequina} = (A - 0.0669)/4.0748$$

Como se observa en el cuadro 5, el extracto metanólico (Em3) de HS; seguido de los sólidos Sm1 y Se2, son los productos con mayor contenido de polifenoles totales, flavonoides y taninos ($P \leq 0.05$). Se ha reportado, que las semillas de leguminosas y principalmente de colores rojizos, tienen mayor contenido de polifenoles totales (Siddhuraju, 2007 y Amarowicz *et al.*, 2008). Siddhuraju y Becker (2006) reportaron la formación de complejos en la pared celular tanino-proteína y tanino-carbohidrato que tienen baja o nula solubilidad en medio metanólico.

Cuadro 5. Composición de compuestos polifenólicos a partir de las harinas obtenidas.

Muestra	Polifenoles Totales (eq. Ácido gálico)	Taninos	Flavonoides (eq. Catequina)
	$\bar{Y} \pm \sigma$ (mg/100g)		
Em1	44.9±0.016 ^d	41.9±0.016 ^d	13.05±0.027 ^e
Sm1	106.6±0.018 ^b	59.0±0.028 ^b	21.0±0.065 ^b
Se2	104.1±0.023 ^c	53.4±0.021 ^c	20.1±0.111 ^d
Ee2	33.40±0.024 ^e	34.80±0.025 ^e	20.60±0.090 ^c
Em3	113.7±0.022 ^a	88.6±0.120 ^a	30.10±0.018 ^a

*Se muestran promedios \pm desviación estándar de tres repeticiones

^{a,b,c...} superíndices diferentes dentro de columnas son significativamente diferentes entre sí ($p \leq 0.05$).

Siddhuraju (2007) reportó que los extractos de tamarindo en dos medios de extracción (metanol y acetona), el contenido de polifenoles oscilaba entre 26.25-32.44 mg/100g de muestra; siendo los resultados de este trabajo mayores (33.40-113.70 mg/100g de muestra) debido al tiempo de extracción y al proceso de concentración para obtener un extracto sólido. Por otro lado, Luengthanaphol *et al.* (2004) reportaron que la extracción con etanol era mucho mejor que la extracción con CO₂ y etil acetato, la extracción en dicho trabajo fue de aproximadamente 32 mg de (-)-epicatequina/100g de semillas de tamarindo.

8.4. Determinación de la actividad antioxidante en extractos obtenidos de harinas de tamarindo

8.4.1. Análisis cualitativo de compuestos polifenólicos por cromatografía de capa fina

Esta prueba, permitió de manera rápida corroborar los resultados de la sección 8.3.1.1., en cuanto a presencia de polifenoles; además de determinar cualitativamente la presencia de compuestos polifenólicos con actividad antioxidante. Cabe señalar, que no hay referencia de comparación con alguna otra muestra de tamarindo. Sin embargo, como se puede observar en las figuras 4 y 5, todos los extractos resultaron positivos tanto a la primera y segunda solución reveladora en cuanto a presencia de polifenoles con actividad reductora y antiradicalaria; los resultados se resumen en el siguiente cuadro:

Cuadro 6. Pruebas cualitativas para presencia de actividad reductora y antiradicalaria de polifenoles en los extractos a partir de las harinas obtenidas.

Muestra	Polifenoles	Polifenoles con actividad reductora	Polifenoles con actividad antiradicalaria
Coloración positiva	Amarilla-café	Azul	Zonas blancas en fondo violeta
Em1	+++	+	++
Ee2	+++	+++	+++
Em3	+++	++	+++
Sm1	+++	+++	+++
Se2	+++	++	+

*A mayor número de + mayor intensidad de coloración en la reacción positiva.

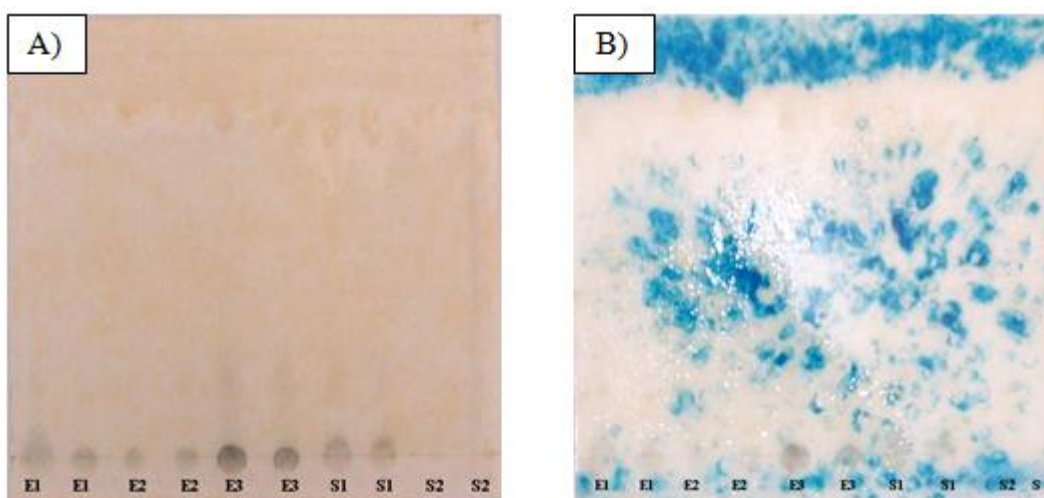


Figura 4. A) Pruebas cualitativas para presencia de compuestos polifenólicos y B) Prueba cualitativa para actividad reductora de polifenoles en los extractos a partir de las harinas obtenidas.

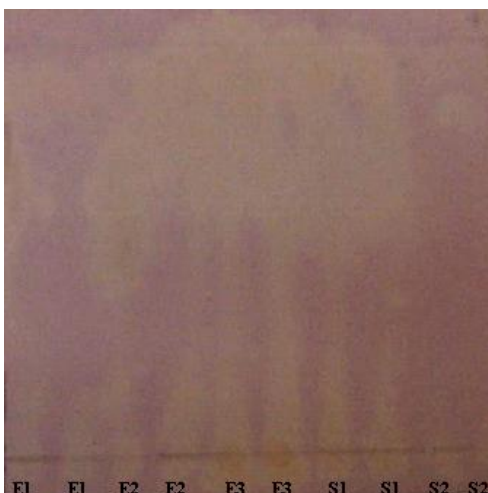


Figura 5. Prueba cualitativa para presencia de actividad antiradicalaria de polifenoles en los extractos a partir de las harinas obtenidas.

Soares *et al.* (2009) reportaron presencia de compuestos polifenólicos, reductores y con actividad antioxidante en extractos de champiñones, a través de la metodología previamente descrita en la sección 7.5.1., reportando las coloraciones descritas en dicha sección; corroborando entonces, la presencia en los extractos de harina de semilla y recubrimiento del fruto de tamarindo.

8.4.2. Ensayo de poder de reducción/antioxidante férrico (FRAP)

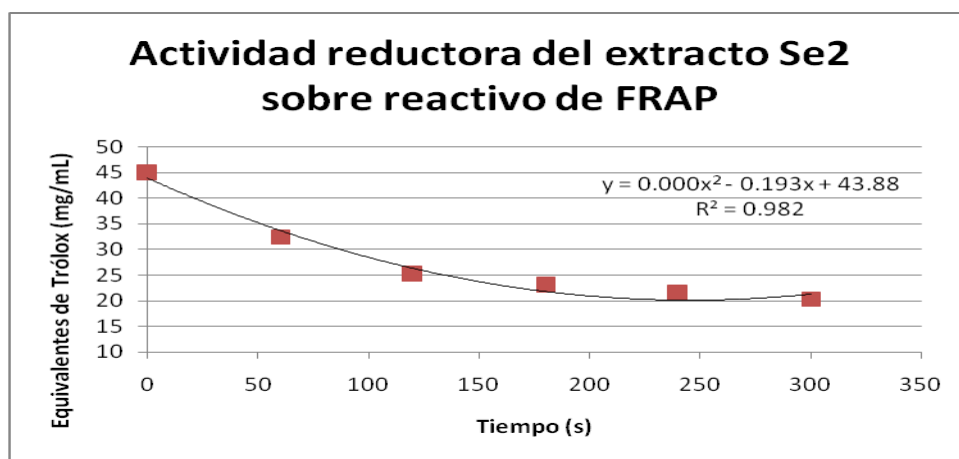
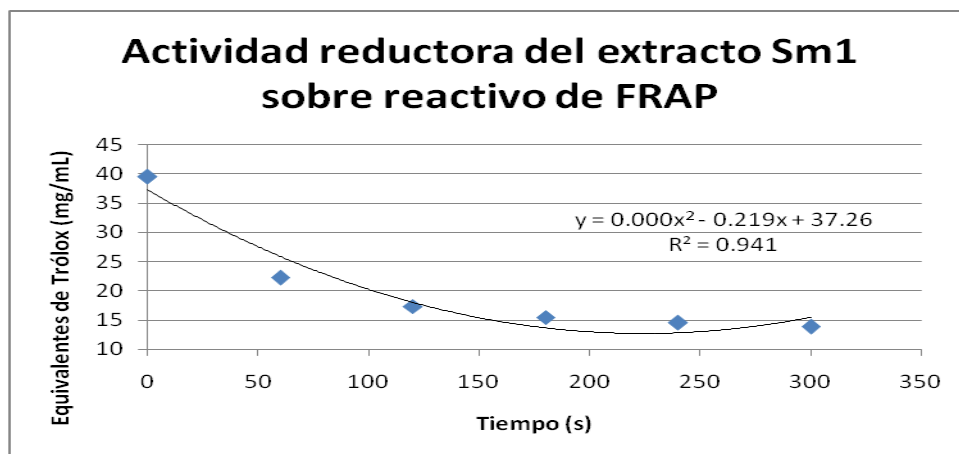
Como primer punto, se efectuó una curva estándar a partir de Trolox para así poder reportar los resultados de los extractos como equivalentes Trolox de actividad antioxidante; solo se tomaron los intervalos de 1 min durante 5 min. En la sección de anexos, se muestran las absorbencias de las seis diferentes concentraciones (40000 $\mu\text{mol/L}$ a 1000 $\mu\text{mol/L}$). Posteriormente, se calculó la actividad antioxidante reductora de TPTZ-Fe (III) a TPTZ-Fe (II) mediante ecuación lineal de la interpolación de las absorbencias de los extractos con la concentración de TPTZ-Fe (II) como equivalentes de Trolox (ver Gráficos 1, 2 y 3). En el cuadro 7, se puede observar que a los 5 min de reacción se alcanza la mayor actividad antioxidante, ya que se cuantifica la menor cantidad de ATPTZ-Fe (III) como equivalentes de Trolox. Los extractos en metanol (Em3 y Sm1), presentaron la mayor actividad reductora de hierro (III) a $P \leq 0.05$; seguidos del extracto sólido etanólico Se2.

Cuadro 7. Actividad reductora de los extractos en equivalentes de Trolox sobre el reactivo de FRAP.

Tiempo (s)	Equivalentes de Trolox con capacidad antioxidante mg/L de extracto				
	<i>Em1</i>	<i>Ee2</i>	<i>Em3</i>	<i>Sm1</i>	<i>Se2</i>
	$\bar{Y} \pm \sigma$				
60	578.56 \pm 0.133 ^e	535.54 \pm 0.059 ^d	236.04 \pm 0.140 ^a	222.07 \pm 0.279 ^b	324.55 \pm 0.304 ^c
120	564.72 \pm 0.125	501.90 \pm 0.049	177.12 \pm 0.107	173.10 \pm 0.188	251.27 \pm 0.251
180	555.93 \pm 0.154	492.62 \pm 0.048	150.12 \pm 0.102	154.96 \pm 0.169	229.80 \pm 0.252
240	554.36 \pm 0.171	486.43 \pm 0.055	133.38 \pm 0.090	145.39 \pm 0.154	213.90 \pm 0.248
300	552.70 \pm 0.176 ^e	481.56 \pm 0.055 ^d	122.76 \pm 0.083 ^a	138.83 \pm 0.136 ^b	203.28 \pm 0.246 ^c

*Promedio \pm Desviación estándar de tres replicas.

^{a,b,c...} superíndices diferentes dentro de renglones son significativamente diferentes entre sí ($p \leq 0.05$).

**Gráfico 1. Actividad reductora de Fe (III) por efecto de Se2.****Gráfico 2. Actividad reductora de Fe (III) por efecto de Sm1.**

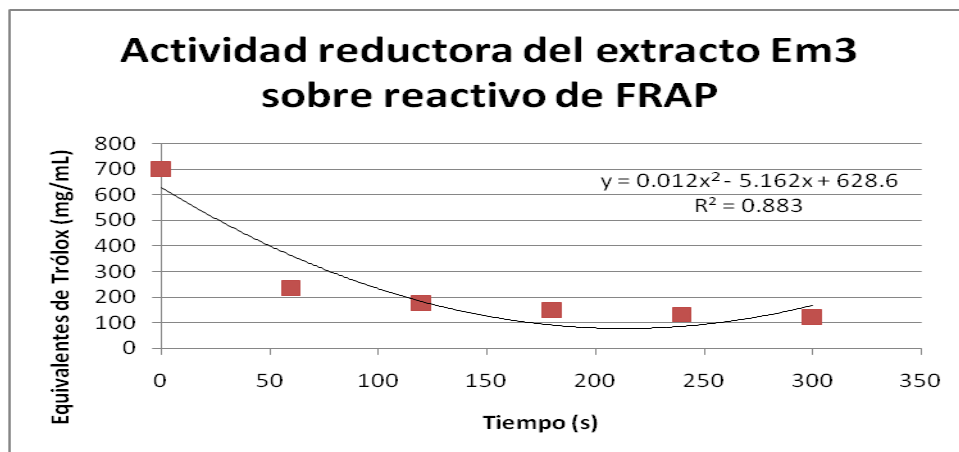


Gráfico 3. Actividad reductora de Fe (III) por efecto de Em3.

Shi *et al.* (2009) reportaron que el extracto de varias flores de origen chino, presentaron mayor actividad FRAP comparada con extractos de galato de epigallocatequina y ácido ascórbico. Según los resultados obtenidos, la actividad antioxidante FRAP de los extractos de Tamarindo va de Em3>Sm1>Se2>Ee2>Em1, dichos resultados son diferentes entre sí a una $P \leq 0.05$; probablemente este poder reductor se deba a la presencia de derivados hidroxilados del benceno y a (-)-epicatequina presente en los recubrimientos de semilla para el caso de los extractos Ee2 y Em1 (Siddhuraju, 2007).

Siddhuraju (2002) reportó que el poder reductor de compuestos bioactivos (principalmente fenoles de bajo y alto peso molecular), provenientes de diversas semillas tenían alta actividad antioxidante sobre radicales libres. Otros estudios de (-)-epicatequina en chocolate han demostrado *in vitro* un excelente potencial antioxidante férrico reductor (Serafine *et al.*, 2003).

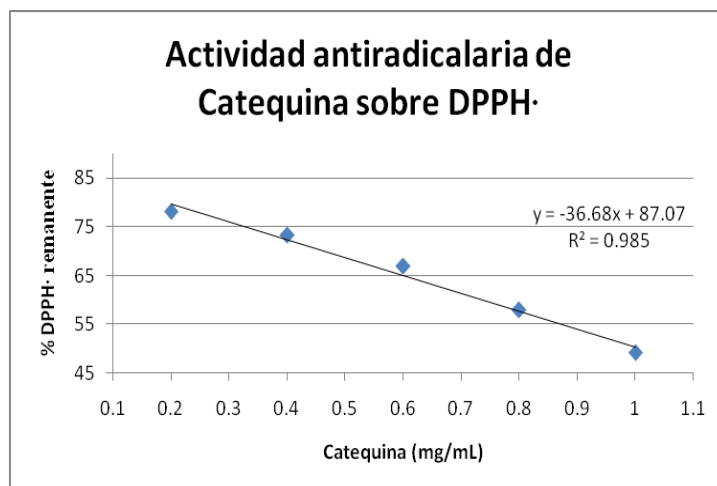
8.4.3. Ensayo DPPH•

Como primer punto, se determinó la actividad antiradicalaria por parte de catequina para obtener series de curvas modelo de actividad antioxidante; para cada concentración de estándar (Cuadro 8 y Gráfico 4). Posteriormente, se evaluaron los diferentes extractos obtenidos a partir de las harinas HS y HRS.

Cuadro 8. Curva modelo de actividad antiradicalaria por efecto de catequina.

Concentración (mg/mL)	% DPPH• remanente ($\bar{Y} \pm \sigma$)			
	t=10'	t=20'	t=30'	t=40'
1.0	66.51±2.10	60.35±3.15	54.23±3.46	49.15±2.63
0.8	72.14±1.30	66.90±1.86	61.32±1.88	57.89±1.91
0.6	79.45±1.63	73.95±1.59	69.17±2.43	66.91±2.46
0.4	84.94±1.32	79.27±0.81	75.76±0.40	73.23±0.69
0.2	91.32±1.59	87.18±1.65	80.87±1.19	78.16±1.76

*Promedio \pm Desviación estándar de tres replicas.

**Gráfico 4. Curva de actividad antiradicalaria por efecto de catequina.**

A partir del gráfico 13 (Anexo 12.2), se determinó el $TEC_{50} = 37.97$ min; siendo el tiempo requerido para disminuir en un 50% la concentración de DPPH• por efecto de la catequina. Por otro lado, se determinó la EC_{50} a partir del gráfico 4; que es la concentración de antioxidante necesaria para disminuir en un 50% la concentración de DPPH•. Despejando de la ecuación mostrada en el gráfico, se obtiene que $EC_{50} = 1.0106$ mg/mL de catequina.

Únicamente se reportó el TEC_{50} para las diluciones que presentaron absorbencias que se ajustaran próximas al 50% de DPPH• remanente, a través de las curvas obtenidas de actividad antiradicalaria para cada extracto; porcentajes remanentes bajos de DPPH indican alta actividad antioxidante.

Cuadro 9. Curva de actividad antiradicalaria de los extractos sobre DPPH•.

Extracto (dilución)	% DPPH• remanente ($\bar{Y} \pm \sigma$)					
	t=10'	t=20'	t=30'	t=40'	t=50'	t=60'
Em1 (1/10)	81.7±1.4 ^d	78.2±1.3 ^c	76.4±1.8 ^c	72.4±1.3 ^c	70.2±2.1 ^d	67.9±2.2 ^d
Ee2 (1/10)	56.0±2.1 ^b	29.5±6.3 ^a	20.2±5.8 ^a	14.9±4.9 ^a	11.5±4.2 ^a	9.7±3.3 ^a
Em3 (1/1000)	75.2±2.4 ^c	72.4±1.9 ^c	70.9±1.6 ^c	69.8±1.5 ^c	69.2±1.6 ^d	67.9±1.4 ^d
Sm1 (1/2000)	47.7±0.8 ^a	47.0±0.8 ^b	46.2±0.9 ^b	45.0±0.9 ^b	44.3±1.0 ^c	44.0±0.9 ^c
Se2 (1/2000)	52.2±0.6 ^b	49.6±1.3 ^b	45.0±1.3 ^b	41.0±0.7 ^b	39.2±1.6 ^b	38.7±1.6 ^b

*Promedio \pm Desviación estándar de tres replicas.

^{a,b,c...} superíndices diferentes dentro de columnas son significativamente diferentes entre sí ($p \leq 0.05$).

En el cuadro 9, se observan las diluciones en las cuales disminuyó la concentración de DPPH remanente en un 50% o próximas a este porcentaje. De acuerdo a esto, el Sm1 con media y desviación igual a 47.7±0.8% de DPPH remanente al t=10' había disminuído más del 50% de DPPH remanente ($P \leq 0.05$) en comparación con los demás extractos en el siguiente orden: Sm1 < Se2 < Ee2 < Em3 < Em1.

Sin embargo, a partir del minuto 20 se puede observar un cambio en el orden de actividad antiradicalaria quedando: Ee2 < Se2 < Sm1 < Em3 < Em1 siendo el extracto etanólico de la harina del recubrimiento la que mayor actividad antiradicalaria presentó, seguida de Se2 y Sm1 con medias y desviaciones de 47.7±0.8 y 49.6±1.3 sin diferencias estadísticas entre ellos. Por otro lado, los extractos líquidos metanólicos (Em1 y Em3) disminuyeron en un 50% el DPPH después de 60 min. Los siguientes gráficos (5, 6 y 7) muestran el comportamiento de los diferentes extractos de las harinas de tamarindo sobre DPPH•, para cada una se determinó su TEC₅₀.

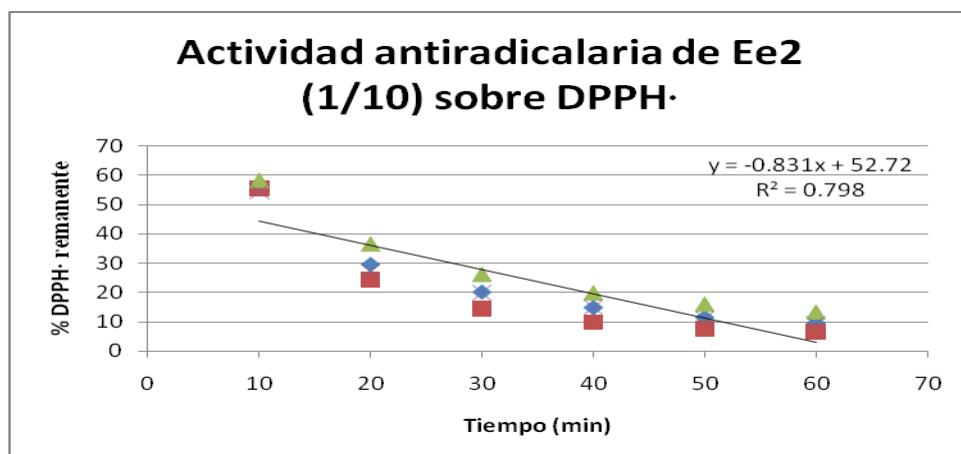


Gráfico 5. Curva de actividad antiradicalaria por Ee2 (1/10) sobre DPPH· con $TEC_{50}=3.27$ min.

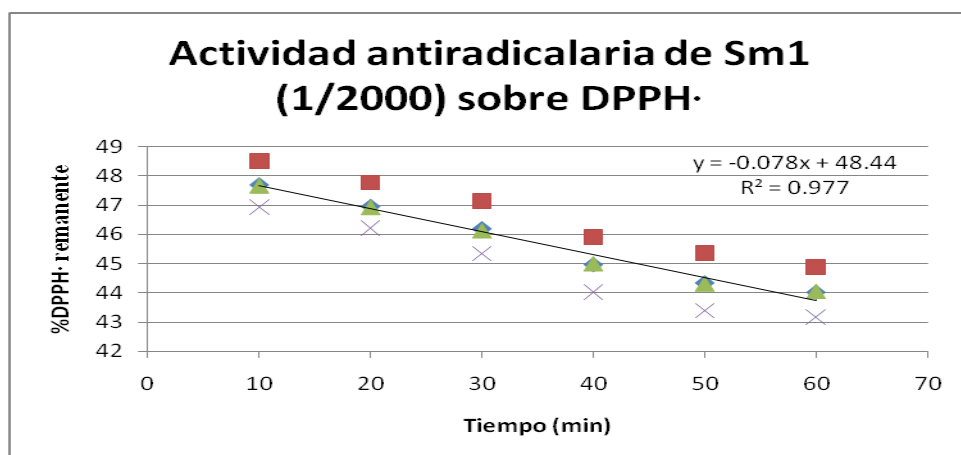


Gráfico 6. Curva de actividad antiradicalaria por Sm1 (1/2000) sobre DPPH· con $TEC_{50}<1$ min.

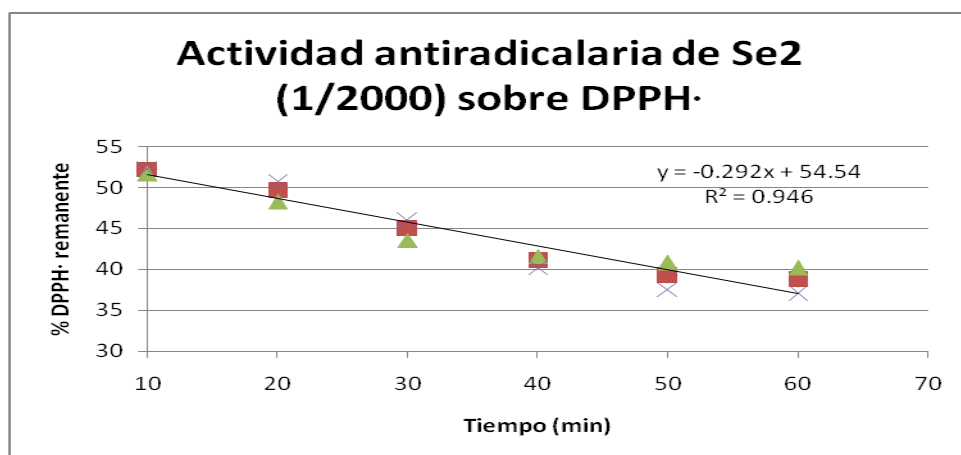


Gráfico 7. Curva de actividad antiradicalaria por Se2 (1/2000) sobre DPPH· con $TEC_{50}=15.5$ min.

Siddharaju (2007) reportó que en los diversos extractos de semillas de tamarindo, la actividad en todas las muestra fue directamente proporcional al contenido de fenoles incluyendo los taninos. Años atrás este mismo autor y colaboradores (2002) reportaron que altas concentraciones de taninos (proantocianidinas) extraídos de *Cassia fistula* tenían una elevada actividad secuestrante de radicales DPPH. De manera similar, Amarowicz *et al.* (2000) reportaron que los taninos obtenidos de canola exhibieron una alta actividad sobre radicales DPPH.

Se ha propuesto que la actividad antiradicalaria sobre DPPH por efecto de polifenoles se debe a la sustitución de grupos hidroxil en los anillos fenólicos (Brand-Williams *et al.*, 1995). Sharififar *et al.* (2009) hicieron una comparación de diversos solventes de extracción, donde cabe resaltar que los extractos en medio metanólico eran los que mejores resultados arrojaron sobre el radical DPPH. Luengthanaphol *et al.* (2004) y Tsuda *et al.* (1995) encontraron que se obtiene un mayor rendimiento de extracción de (-)-epicatequina al emplear etanol.

ETAPA 2.

8.5. Elaboración de películas biodegradables

Se planteó el diseño de mezclas con una fuente de proteína APSL y otra de almidón nativo de papa (ANP) obteniendo 7 formulaciones, donde cada formulación se elaboró con alguna de las tres diferentes concentraciones de polifenoles planteadas en la sección 7.7.1. Posteriormente se procedió a estandarizar la metodología de elaboración y se encontró que después de haberse probado diversas condiciones, por ejemplo la temperatura de desnaturalización; esta se modificó con respecto a lo reportado en otros trabajos para desnaturalizar de manera más adecuada la proteína presente y cuidando que la temperatura no afectara al almidón. Se trabajó a pH y concentración de glicerol de acuerdo a lo reportado por Murillo-Martínez (2008). Algo muy importante a considerar es la temperatura de secado, ya que esta se encuentra estrechamente relacionada con la temperatura que pueda existir en el medio ambiente; siendo éste punto el más importante y crítico para obtención de películas.

En las figuras 6 y 7 se puede observar las 4 diferentes películas obtenidas para cada formulación (N1 y N2), donde el color rojo se empieza a intensificar a medida que aumenta la concentración de polifenoles adicionada. De manera general se muestran resumidas las condiciones de elaboración de las películas:

- Glicerol: 3.7 ml/100mL
- pH: 8.5
- Homogeneizado: 5 min
- Temperatura de desnaturalización y gelificación: 70 °C
- Tiempo de desnaturalización y gelificación: APSL (25 min) y ANP (7 min)
- Volumen de vertido: 30mL (15x15 cm) y 15 mL (10x10 cm)
- Expansión de la SFP: capilaridad
- Desgasificado: opcional por 20 min, dependiendo de la mezcla.
- Temperatura de secado: ambiente (15-27 °C)
- Tiempo de secado: 48/36 h

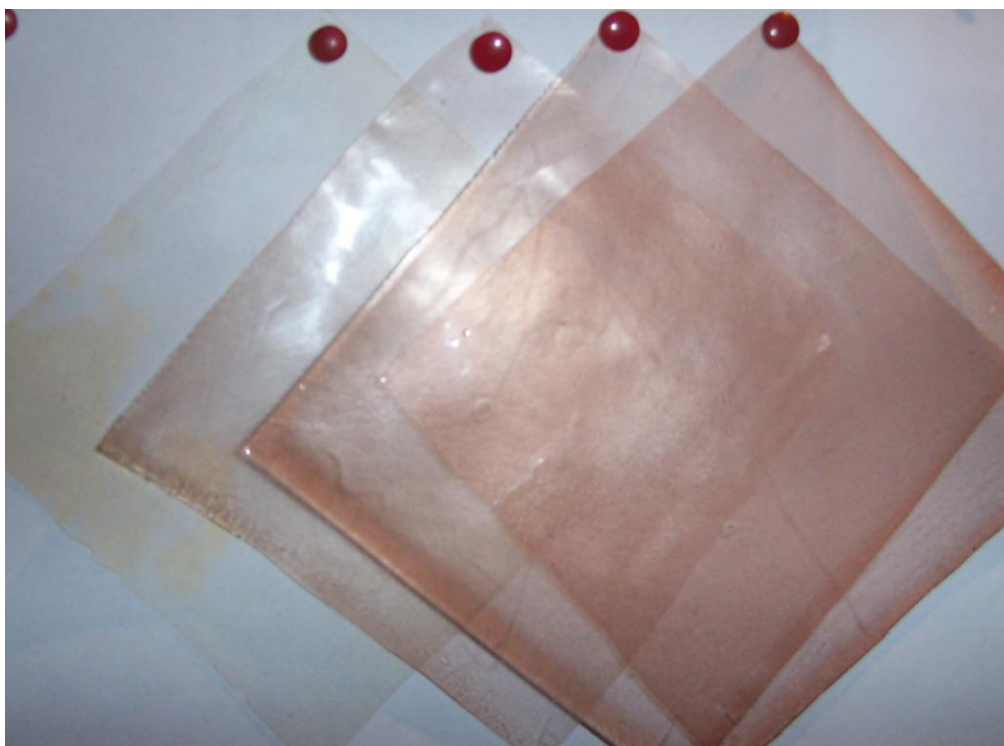


Figura 6. Películas de APSL 100% (N1) de izquierda a derecha se observa el incremento en las concentraciones de compuestos polifenólicos de tamarindo.

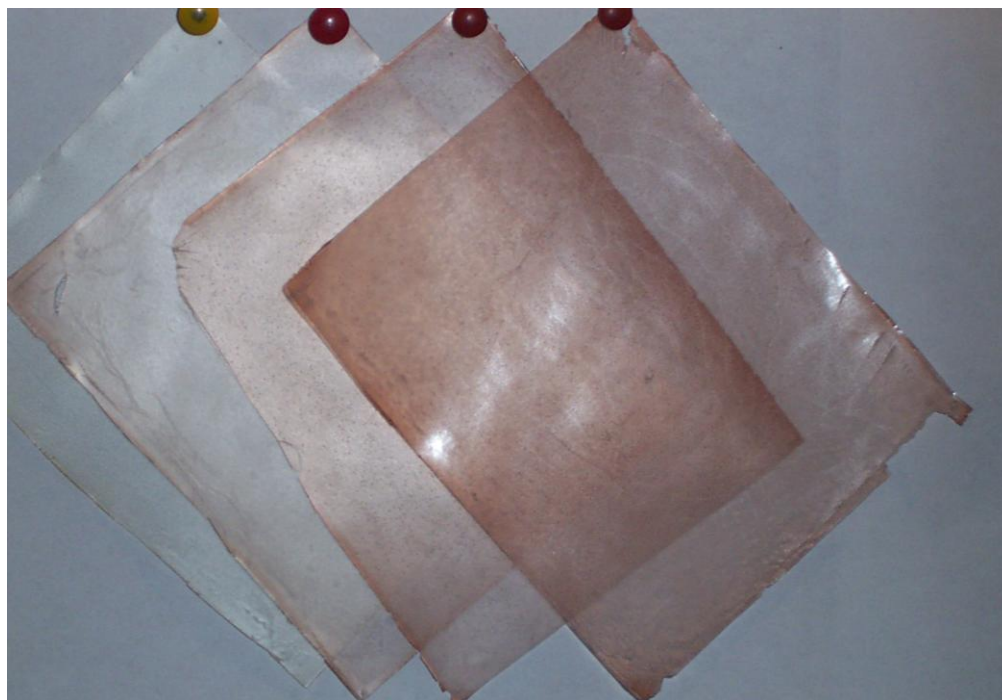


Figura 7. Películas de APSL 80% y almidón 20% (N2) de izquierda a derecha se observa el incremento en las concentraciones de compuestos polifenólicos de tamarindo.

8.6. Actividad antioxidante en la SFP

8.6.1. DPPH· y Polifenoles Totales

Se determinó la actividad antioxidante (antiradicalaria) para las combinaciones de APSL y ANP, así como el contenido de polifenoles totales libres en la solución formadora de películas. Como puede observarse en el cuadro 10, la actividad antioxidante se ve disminuida con respecto al control en la mayoría de los tratamientos, ya que la cantidad de DPPH· remanente es mayor. Esto podría deberse a que los polifenoles interactúan con la matriz polimérica y sólo juegan el papel de ligazón entre los polímeros, como puede notarse en todos los casos sigue existiendo actividad antioxidante, sin embargo no se puede establecer de manera correcta si es por los polifenoles ligados ya sea al aislado de suero de leche o al almidón o en su defecto únicamente por los polifenoles que no han interactuado con la matriz.

Cuadro 10. Actividad antioxidante de las SFP de APSL-ANP.

Formula	%DPPH· residual			Polifenoles Totales mg de ácido gálico/mL
	T=15'	T=30'	T=45'	
N1	5.14±1.08 ^a	6.04±0.99 ^a	7.14±1.44 ^a	0.0
N11	11.00±1.08 ^{cd}	10.68±0.73 ^{bc}	10.59±1.73 ^{bc}	2.9x10 ⁻³ ±0.0002 ^d
N12	11.96±1.54 ^{cdef}	11.74±2.36 ^{bcd}	12.18±1.06 ^{bcd}	4.4x10⁻³±0.0003^b
N13	13.76±0.78 ^{def}	13.90±0.49 ^{cd}	14.51±1.20 ^d	3.2 x10 ⁻³ ±0.0004 ^c
N2	12.97±1.18 ^{cdef}	13.53±1.75 ^{cd}	13.01±1.15 ^{cd}	0.0
N21	14.90±4.19 ^{def}	19.40±5.16 ^f	18.79±0.36 ^e	6.0x10 ⁻⁴ ±0.0002 ^{ef}
N22	9.34±2.05 ^{bc}	12.92±2.44 ^{cd}	12.11±1.64 ^{bcd}	0.0
N23	11.29±3.67 ^{cde}	15.27±2.39 ^{de}	13.84±4.13 ^d	0.0
N3	48.92±1.29 ^j	51.99±1.36 ^k	49.27±0.60 ^{jk}	0.0
N31	41.05±3.38^{hi}	56.01±1.74 ^l	44.25±1.04ⁱ	5.8x10⁻³±0.0002^a
N32	43.94±2.04ⁱ	59.98±2.23 ^m	47.74±1.93 ^j	0.0000
N33	15.18±3.20^{ef}	18.22±2.27^{ef}	19.79±1.94^e	3.4x10⁻³±0.0003^c
N4	29.09±1.53 ^g	30.43±1.81 ^g	33.90±1.87 ^h	0.0
N41	47.95±1.79 ^{jk}	51.13±1.08 ^k	52.64±1.97 ^l	0.0
N42	48.16±3.89 ^j	48.49±2.26 ^{jk}	50.78±0.99 ^{kl}	4.0x10 ⁻⁴ ±0.0002 ^{fg}
N43	44.36±1.89 ^{ij}	46.40±0.63 ^j	49.35±0.66 ^{jk}	8.0x10 ⁻⁴ ±0.0002 ^e
N5	6.48±1.11 ^{ab}	8.90±1.29 ^{ab}	9.06±0.91 ^{ab}	0.0
N51	31.24±1.98 ^g	35.94±0.93 ^h	33.96±1.66 ^h	7.0x10 ⁻⁴ ±0.0001 ^{ef}
N52	38.34±2.61 ^h	40.30±1.79 ⁱ	29.10±1.46 ^g	3.0x10 ⁻⁴ ±0.0001 ^{gh}
N53	38.55±1.54 ^h	41.34±0.89 ⁱ	24.72±1.34 ^f	9.0x10⁻⁴±0.0002^e
N6	15.95±1.53 ^f	18.11±0.84 ^{jk}	14.66±1.20 ^d	0.0
N61	38.90±2.34 ^h	49.51±1.16 ^h	43.04±3.19 ⁱ	5.8x10⁻³±0.0001^a
N62	41.66±1.13 ^{hi}	51.63±1.39 ^k	51.63±2.16 ^{kl}	0.0
N63	55.97±2.53 ^k	66.08±3.08 ⁿ	61.91±1.6 ^m	0.0
N7	65.40±1.96 ^l	67.20±1.10 ⁿ	75.06±1.92 ^p	0.0
N71	64.89±2.45 ^l	63.91±2.53 ⁿ	69.11±1.46ⁿ	7.0x10 ⁻⁴ ±0.0002 ^{ef}
N72	71.15±1.31 ^m	65.43±2.14 ⁿ	73.74±0.98 ^{op}	0.0
N73	73.38±0.94 ^m	65.11±1.41 ⁿ	71.88±2.58^{no}	0.0

*Promedio ± Desviación estándar de tres replicas.

^{a,b,c...} superíndices diferentes dentro de columnas son significativamente diferentes entre sí (p≤0.05).

*La composición de las formulaciones se puede revisar en el cuadro 2 (página 40).

A excepción del tratamiento N33 (ver figura 8), donde en los tres tiempos de lectura, la actividad se aumenta en promedio en un 64.58% significativamente a una P≤0.05 con respecto a N3 (testigo); existen tratamientos en cada formulación que arrojan resultados numéricamente menores pero no estadísticamente; o sea, se incrementa ligeramente la actividad antioxidante, tal es el caso de las formulaciones: N22 y N71 durante el transcurso de la reacción; N31, N32 a los 15 y 45 min y N72 y N73 a los tiempos 30 y 45 min; aunque el tratamiento N31 tiene una mayor actividad significativa (P≤0.05) a los tiempos 15 y 45 min con promedios y desviación estándar igual a 41.05±3.38 y 44.25±1.04% respectivamente con respecto a su control N3 con valor igual a 48.92±1.29 y 49.27±0.60% de DPPH remanente.

N32, N71 y N73 solo son diferentes significativamente ($P \leq 0.05$) con respecto a sus testigos a un solo tiempo de reacción. De manera general en el cuadro 10 se observa que la actividad antioxidante disminuye conforme se incrementa el contenido de almidón en la solución formadora de película y que la adición de alguna de las concentraciones de polifenoles a las SFP no aumenta significativamente la actividad antioxidante salvo los casos particulares mencionados anteriormente.

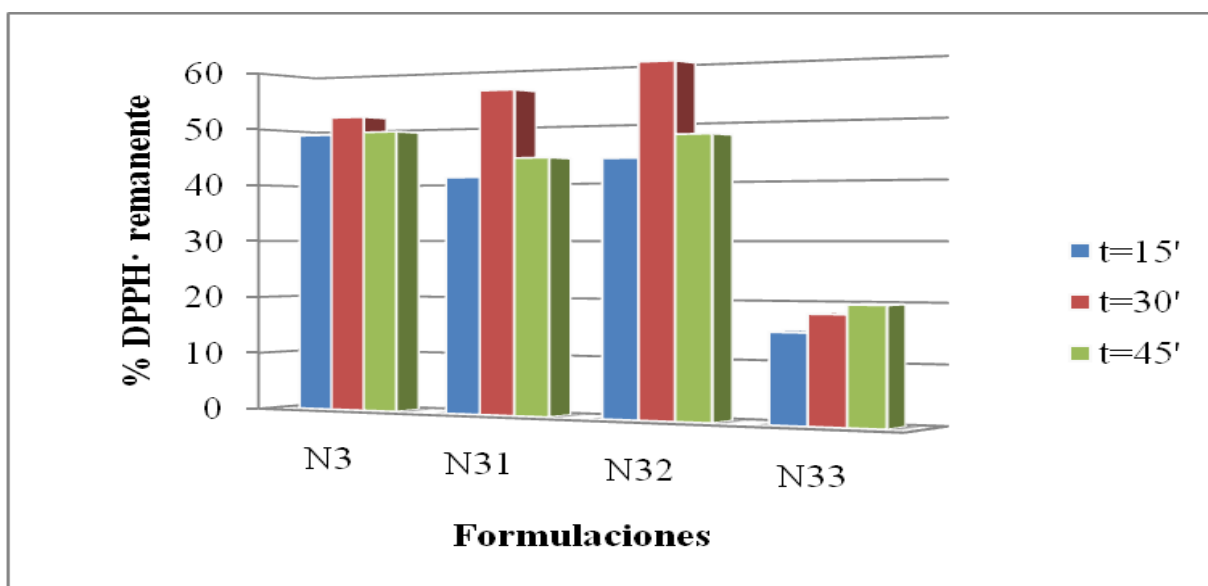


Figura 8. Representación gráfica de la actividad antioxidante de la formulación 60:40% (APSL-ANP) donde a menor tamaño de la barra mayor actividad antioxidante. N33 corresponde a dicha formulación con la incorporación de la tercera concentración de polifenoles (0.0025 g/mL de SFP) de tamarindo.

Por otro lado, los tratamientos, N21>N61>N12>N13>N33; fueron los de mayor contenido de polifenoles cuantificados en la SFP significativamente diferentes de cada uno de sus controles ($P \leq 0.05$); posiblemente al incorporarse en menor concentración (N21 y N61), las interacciones proteína-proteína, proteína-almidón o almidón-almidón tengan mayor probabilidad de suceder y exista algún tipo de impedimento estérico o polaridad que impida que los polifenoles se incorporen a la matriz.

8.7. Evaluación de las características fisicoquímicas de las películas biodegradables

8.7.1. Espesor de las películas biodegradables

El volumen vertido para las películas en moldes de 15 x 15 cm fue de 30 mL. A todas las películas obtenidas se les midió el espesor; en el siguiente cuadro se pueden observar los resultados promedio y desviación estándar para cada formulación y concentración de antioxidante.

Cuadro 11. Espesor de películas biodegradables APSL-Almidón con la incorporación de polifenoles.

Formulación	g polifenoles/ml de SFP			
	Control	0.0010	0.0020	0.0025
	Espesor (mm)			
N1	0.1552±0.043 ^{bc}	0.1393±0.026^{def}	0.1488±0.035 ^{cd}	0.1591±0.018 ^{bc}
N2	0.1407±0.035 ^{de}	0.1245±0.011^{ghij}	0.1293±0.007 ^{efghij}	0.1286±0.017 ^{efghij}
N3	0.1282±0.018 ^{efghij}	0.1251±0.028 ^{fghij}	0.1355±0.028 ^{efg}	0.1217±0.008 ^{ghij}
N4	0.1260±0.012 ^{fghij}	0.1170±0.012 ^{hijk}	0.1193±0.010 ^{hij}	0.1163±0.009 ^{ijk}
N5	0.1045±0.016 ^k	0.1167±0.012 ^{hijk}	0.1163±0.009 ^{ijk}	0.1213±0.010^{ghij}
N6	0.1301±0.034 ^{efghi}	0.1312±0.025 ^{efgh}	0.1151±0.012^{jk}	0.1390±0.033 ^{def}
N7	0.1614±0.025 ^{bc}	0.1647±0.010 ^b	0.1662±0.019 ^{ab}	0.1783±0.012^a

*Promedio ± Desviación estándar de 24 lecturas en tres replicas por formulación.
a,b,c... superíndices diferentes son significativamente diferentes entre sí (p≤0.05).

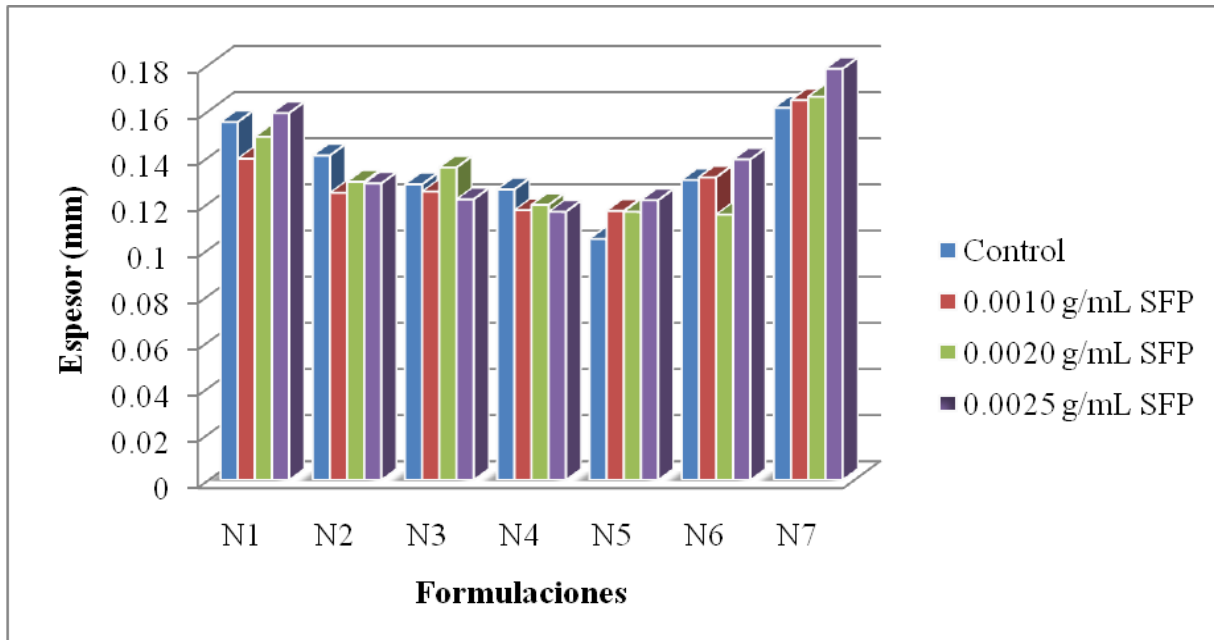


Figura 9. Representación gráfica de los espesores de las diversas combinaciones APSL-ANP adicionadas con tres diversas concentraciones de compuestos polifenólicos de tamarindo.

En la figura 9, se puede observar la tendencia de las formulaciones en cuanto a espesor, observándose que los tratamientos con mayor espesor (0.1552-0.1783 mm) significativamente diferentes ($P \leq 0.05$) son los que se elaboraron a partir de un solo componente ya sea APSL o almidón nativo de papa (ANP).

También se observar que conforme se acerca a las combinaciones 50:50% de APSL-ANP, los espesores tienden a ser los menores significativamente. Sin embargo, en las combinaciones 40:60 y 20:80% de APSL-ANP sólo cuando se incorporó la mayor concentración de polifenoles de tamarindo (0.0025 g/mL de SFP) se generaron las películas con mayor espesor significativamente con respecto a sus respectivos testigos N5 y N6 ($P \leq 0.05$). Probablemente este efecto se deba a que a mayores concentraciones de almidón exista una mayor capacidad de hinchazón y por tanto se genera un mayor espesor en las películas. Cabe señalar, que las formulaciones restantes sin tomar en cuenta N53 y N63; no tuvieron un efecto significativo debido a la incorporación de alguna de las concentraciones de polifenoles.

8.7.2. Determinación de la solubilidad

8.7.2.1. Proteína soluble y película solubilizada

Como se puede observar en el cuadro 12, en las formulaciones N1 y N2 a partir de las concentración 0.0020 y 0.0025 g de polifenoles/mL de SFP, el porcentaje de solubilización es menor ($P \leq 0.05$) con respecto a los controles sin extracto de tamarindo; dichos tratamientos N12, N13, N22 y N23 con medias \pm desviaciones iguales a 5.27 ± 1.21 , 5.43 ± 1.37 , 21.13 ± 2.22 y 21.26 ± 2.82 respectivamente.

Cuando se tiene 100% de proteína (APSL) se observa la menor concentración de proteína solubiliza ($P \leq 0.05$) del resto de los tratamientos con un intervalo de medias de entre 0.1168-0.1591 mg/mL, esto debido a que existe una mayor interacción entre las cadenas peptídicas; por efecto de la desnaturalización y el reordenamiento de las cadenas, además de la incorporación de los polifenoles, se logra obtener una matriz insoluble, esto reportado por diversos autores.

En la figura 10 se puede apreciar el efecto en la formulación N6 (20:80 de APSL-ANP), donde se determinó un menor % de solubilización de la película empleando 0.0010 y 0.0020 g de polifenoles/mL de SFP ($P \leq 0.05$); siendo éste un efecto contrario a la combinación N2 (80:20 de APSL-ANP).

Por lo anterior, se podría pensar que no existe una interacción muy fuerte cuando se tiene exceso de carbohidratos en la matriz polimérica, pero con la incorporación de bajas concentraciones de polifenoles (0.0010 g/mL de SFP) se puede llegar a estabilizar la matriz disminuyendo la solubilización de la película. Se observa un efecto contrario si en la combinación APSL-ANP se tiene exceso de proteína, la cual es estabilizada si son incorporadas concentraciones altas de polifenoles (0.0025 g/mL de SFP).

En diversas investigaciones se ha reportado que existen interacciones proteína-tanino por puentes de hidrógeno, principalmente Haslam (2007) reportó que la interacción con las proteínas es a través de los aminoácidos prolina, glicina y glutamina (70-88% de todos los aminoácidos en una proteína).

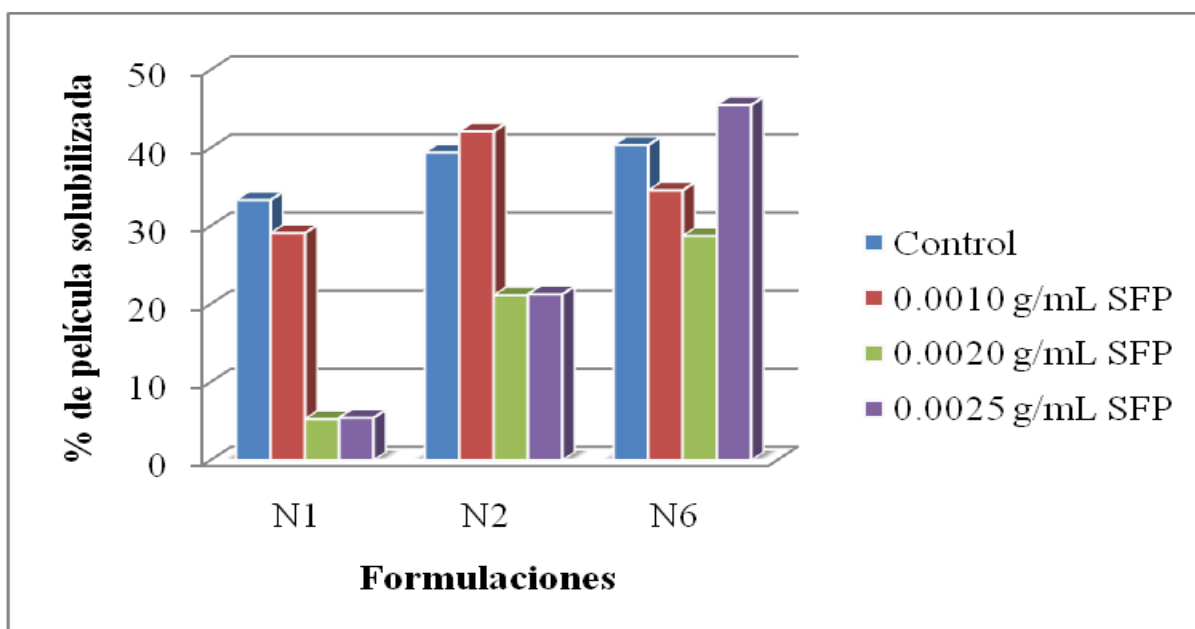


Figura 10. Representación gráfica de la comparación de 100% de APSL contra 80:20 (N2) y 20:80 (N6) de APSL-ANP por efecto de la adición de alguna de las concentraciones de antioxidantes de extracto de tamarindo.

Cuadro 12. Porcentaje de película biodegradable y proteína solubilizada con la incorporación de polifenoles.

Formula	% Solubilización	Proteína soluble (mg/mL)
N1	33.33±0.35 ^{ef}	0.1168±0.0108 ^a
N11	29.10±2.36 ^{de}	0.1371±0.0043 ^a
N12	5.27±1.21^a	0.1591±0.0043 ^a
N13	5.43±1.37^a	0.1535±0.0047 ^a
N2	39.43±1.39 ^g	0.4123±0.0088 ^{cd}
N21	42.13±2.38 ^{ghi}	0.3887±0.0215 ^{bc}
N22	21.13±2.22^c	0.6117±0.1089 ^{fg}
N23	21.26±2.82^c	0.6500±0.0183 ^{ghi}
N3	31.07±1.53 ^{def}	0.6946±0.0353 ^{ij}
N31	44.60±1.49 ^{hi}	0.5647±0.0237^f
N32	31.30±1.45 ^e	0.6734±0.0322 ^{hij}
N33	41.40±2.31 ^{ghi}	0.5727±0.0144^f
N4	21.40±1.73 ^c	0.7517±0.0328 ^k
N41	34.53±2.70 ^f	0.4663±0.0160^e
N42	34.73±2.76 ^f	0.6608±0.0201^{ghi}
N43	39.83±1.87 ^g	0.3847±0.0143^{bc}
N5	10.33±0.95 ^b	0.6407±0.0254 ^{ghi}
N51	23.13±1.58 ^c	0.5054±0.0421^e
N52	30.37±3.02 ^{def}	0.7175±0.0419 ^{ik}
N53	40.00±2.21 ^g	0.6278±0.0327 ^{gh}
N6	40.37±1.10 ^{gh}	0.4128±0.0332 ^{cd}
N61	34.57±3.83^f	0.4612±0.0261 ^{de}
N62	28.73±1.68^d	0.3762±0.0246 ^{bc}
N63	45.50±2.35 ⁱ	0.3388±0.0139^b
N7	52.53±2.17 ^j	0.0000
N71	53.83±4.69 ^{jk}	0.0000
N72	58.03±4.15 ^k	0.0000
N73	57.70±4.64 ^k	0.0000

*Promedio ± Desviación estándar de tres replicas.

^{a,b,c...} superíndices diferentes dentro de columnas son significativamente diferentes entre sí ($p \leq 0.05$).

*La composición de las formulaciones se puede revisar en el cuadro 2 (página 40).

En los diferentes tratamientos de la formulación N4 con la incorporación de antioxidantes se observa la menor pérdida de proteína ($P \leq 0.05$) por solubilización con respecto a su testigo (0.7517 ± 0.0328), con medias \pm desviación estándares en un intervalo de 0.3847 ± 0.0143 a 0.4663 ± 0.0160 mg/mL de solución; esto posiblemente a que al encontrarse en iguales proporciones la matriz polimérica (50:50) existe una interacción más homogénea y que la incorporación de polifenoles disminuye la liberación de proteína al medio de solubilización. De igual manera en los tratamientos de N3, N5 y N6 existe al menos un tratamiento con menor proteína solubilizada con respecto a su testigo ($P \leq 0.05$).

8.7.2.2. Polifenoles totales residuales y actividad antioxidante en la solución solubilizadora

Se determinó el contenido de polifenoles solubilizados a las 24 h de las películas. Como se puede observar en el cuadro 13, cuando existe una proporción entre 80:20 (N2) ó 20:80 (N6) de APSL-ANP a partir de 0.0020 y 0.0025 g de polifenoles/mL SFP se encontraron las mayores concentraciones de polifenoles ($P \leq 0.05$) solubilizados o liberados al medio acuoso; infiriendo que a estas concentraciones de matriz polimérica podríamos esperar una mayor difusividad de los polifenoles hacia otra fase.

Por el contrario, de manera general se observa la menor liberación de polifenoles ($P \leq 0.05$), cuando se incorpora una concentración de 0.0010 g/mL de SFP con respecto a sus otras dos concentraciones; esto posiblemente debido a que al ser una concentración menor, los compuestos queden más inmersos en la matriz y son difícil de solubilizarlos.

Para las formulación N4 y N5 con antioxidantes se observa el mismo comportamiento de menor a mayor concentración de polifenoles residuales: $N43 < N41 < N42$ y $N73 < N71 < N72$; ya que con la primera y tercera concentración de polifenoles se obtienen datos de polifenoles solubilizados menores y significativamente diferentes entre sí, pero diferentes con respecto a la segunda concentración ($P \leq 0.05$) en la cual se tiene una mayor cantidad de polifenoles solubilizados. Por el contrario, para las formulaciones N2 y N3 se observa un efecto directamente proporcional, conforme se incrementa la concentración de extracto se incrementa el porcentaje de polifenoles solubilizados.

También se determinó si la actividad antioxidante continuaba después de solidificar la película y haber sido sometida a solubilización; encontrándose que efectivamente la actividad existía y era mayor que cuando se analizó la actividad sobre DPPH en las soluciones formadoras de películas.

Cuadro 13. Contenido de proteína, polifenoles y actividad antiradicalaria de películas biodegradables APSL-Almidón con la incorporación de polifenoles después de solubilizar.

Formula	Polifenoles totales residuales (mg/mL)	%DPPH· remanente		
		T=15'	T=30'	T=45'
N1	0.0	4.39±2.60 ^{abcd}	5.05±3.70 ^{abcde}	5.27±4.70 ^{abc}
N11	2.9x10⁻³±0.0003ⁿ	2.51±2.64 ^{abc}	3.67±2.70 ^{abcd}	7.55±1.15 ^{bcd}
N12	6.9x10 ⁻² ±0.0018 ^{fgh}	1.39±1.03 ^{ab}	2.45±1.11 ^{abc}	3.31±2.31 ^a
N13	7.4x10 ⁻² ±0.0012 ^{ef}	2.78±1.20 ^{abc}	4.56±1.79 ^{abcde}	4.98±2.61 ^{abc}
N2	0.0	1.14±0.54 ^a	1.53±0.58 ^a	2.22±1.47 ^a
N21	6.2x10⁻³±0.0013^{mn}	2.48±0.86 ^{abc}	4.45±2.01 ^{abcde}	4.15±0.96 ^{ab}
N22	1.5x10⁻¹±0.0038^c	2.02±0.83 ^{abc}	2.85±0.80 ^{abcd}	3.41±1.06 ^a
N23	1.6x10⁻¹±0.0009^b	2.45±0.74 ^{abc}	1.65±0.70 ^a	2.95±1.11 ^a
N3	0.0	23.58±3.80 ^j	20.73±3.05 ^h	12.84±1.40 ^{gh}
N31	2.6x10⁻²±0.0024^l	29.04±2.57 ^j	58.07±1.26 ^k	67.21±0.77 ^m
N32	5.3x10 ⁻² ±0.0026 ^j	32.95±1.47 ^k	21.53±3.44 ^{hi}	27.73±2.04 ^k
N33	6.1x10 ⁻² ±0.0018 ⁱ	27.72±7.69 ^j	29.67±4.50 ^j	79.12±3.88 ⁿ
N4	0.0	2.89±0.98 ^{abc}	6.19±1.19 ^{cdef}	5.66±0.45 ^{abc}
N41	6.6x10 ⁻² ±0.0018 ^{ghi}	3.06±1.31 ^{abc}	3.86±0.37^{ab}	3.48±1.49 ^a
N42	6.7x10 ⁻² ±0.0022 ^{ghi}	3.02±1.36 ^{abc}	5.64±0.53 ^{cde}	6.12±0.49 ^{abcd}
N43	2.0x10 ⁻² ±0.0035 ^l	4.36±1.12 ^{abcd}	7.66±1.72 ^{ef}	8.32±1.47 ^{cde}
N5	0.0	8.03±0.97 ^{de}	9.80±0.80 ^f	12.16±1.00 ^{fgh}
N51	6.2x10 ⁻² ±0.0072 ⁱ	0.56±0.73^a	6.44±1.01 ^{def}	8.67±1.02 ^{cdef}
N52	7.2x10 ⁻² ±0.0065 ^{fg}	8.85±1.45 ^{ef}	15.34±2.31 ^g	14.92±3.64 ^{hi}
N53	3.3x10 ⁻² ±0.0060 ^k	5.91±1.83 ^{cde}	6.59±1.61 ^{def}	11.33±1.45 ^{efg}
N6	0.0	18.6±1.60 ^h	24.58±3.61 ⁱ	33.01±1.13 ^l
N61	7.8x10⁻²±0.0066^e	13.56±1.20^g	15.06±2.56^g	23.98±3.76^j
N62	1.9x10⁻¹±0.0034^a	5.72±2.38^{bcde}	6.27±1.27^{cdef}	7.99±1.13^{cde}
N63	1.2x10⁻¹±0.0037^d	12.77±1.99^g	14.36±1.14^g	16.65±1.97ⁱ
N7	0.0	5.73±1.64 ^{bcde}	5.55±1.12 ^{bcde}	9.61±1.55 ^{defg}
N71	1.0x10⁻²±0.0018^m	12.17±2.40 ^{fg}	15.12±0.43 ^g	16.92±1.76 ⁱ
N72	6.5x10 ⁻² ±0.0054 ^{hi}	0.81±0.42^a	1.73±0.56 ^{ab}	2.92±1.26^a
N73	1.9x10 ⁻² ±0.0015 ^l	2.96±0.75 ^{abc}	2.68±0.80 ^{abcd}	2.83±0.69^a

*Promedio ± Desviación estándar de tres replicas.

^{a,b,c...} superíndices diferentes dentro de columnas son significativamente diferentes entre sí (p≤0.05).

*La composición de las formulaciones se puede revisar en el cuadro 2 (página 40).

Se observa que numéricamente en algunos casos, los tratamientos arrojaron mayor actividad antioxidante con respecto a sus testigos. Solamente los tratamientos de la formulación N6 tiene mayor actividad antioxidante (P≤0.05) con respecto a su testigo, ya que se tiene un menor porcentaje de DPPH remanente. Otro caso particular son los tratamientos N72 y N73 (2.92±1.26 y 2.83±0.69 respectivamente) que disminuyen (P≤0.05) con respecto a su testigo el porcentaje de DPPH en solución hasta transcurridos 45 min.

En la formulación N51 se observa que en todos los tiempos son diferentes y con mayor actividad antioxidante numéricamente con respecto al testigo y que sólo a los 15 min se observa una mayor actividad significativamente ($P \leq 0.05$). De manera general, a excepción de los casos antes mencionados, ningún otro tratamiento aumenta su actividad antioxidante con respecto a su testigo significativamente.

8.7.2.3. Perfil cromatográfico de polifenoles en la solución solubilizadora

El método HPLC es reportado para la cuantificación y separación de cinco de los mayores grupos de polifenoles encontrados en frutas y productos relacionados: anillos solos de ácidos fenólicos (ácido hidroxibenzoico y derivados del ácido hidroxicinámico), flavan-3-oles, flavonoles, antocianinas y dihidrochalconas. Los flavonoides pueden ser clasificados dentro de las antocianidinas, flavan-3-oles, flavones, flavanonas y flavonoles. Algunos flavan-3-oles pueden encontrarse como dímeros, trímeros y polímeros.

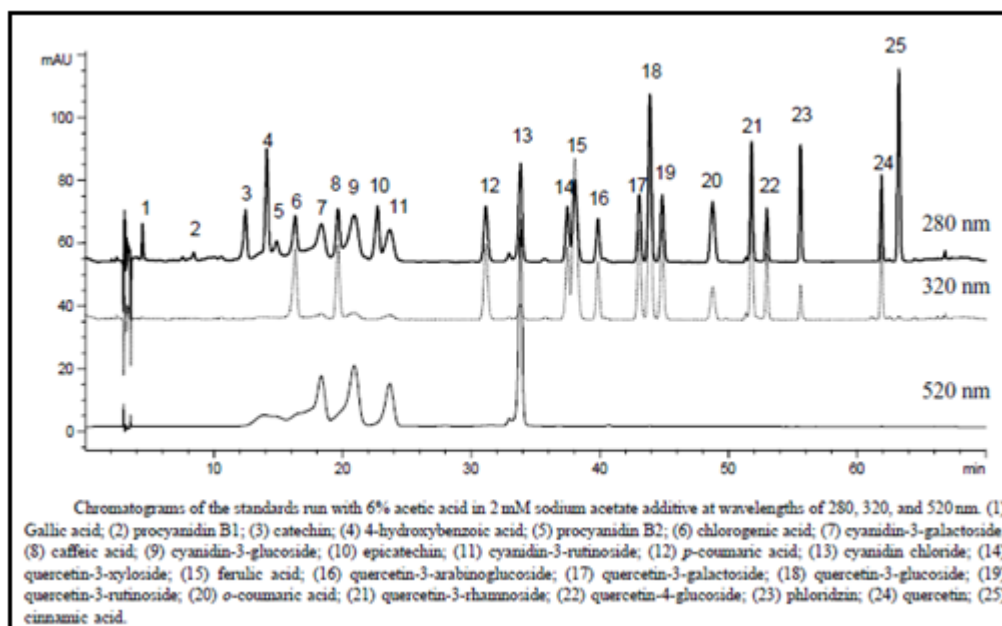


Figura 11. Mezcla de estándares según lo reportado por Tsao y Yang (2003).

Se corrieron algunos de los estándares bajo las mismas condiciones de trabajo del artículo de referencia de la figura 11 (Tsao y Yang, 2003). Encontrándose que los tiempos de retención para dichos compuestos se encontraban entre 30-60s desplazados hacia la izquierda con respecto a lo probado en el laboratorio (Figura 12); por ello se decidió emplear ambos cromatogramas para hacer un análisis cualitativo de los posibles compuestos presentes. Como primera parte en el extracto sólido etanólico de tamarindo (Se2) empleado en la elaboración de las películas y posteriormente en la solución obtenida después de la solubilización de las películas incorporadas con 0.0025 g de polifenoles/mL de solución formadora de película.

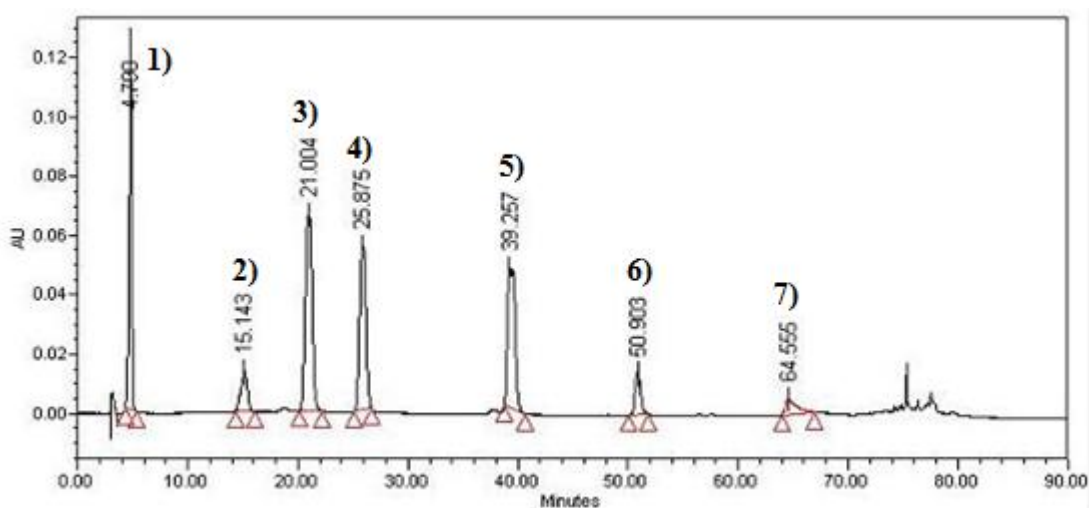


Figura 12. Mezcla de estándares de laboratorio leída a 280nm. En orden de aparición por tiempo de retención: 1) ácido gálico a los 4.7 min, 2) catequina a los 15.14 min, 3) ácido cafeico a los 21.0 min, 4) epicatequina a los 25.87 min, 5) ácido felúrico a los 39.26 min, 6) rutina a los 50.90 min y 7) quercetina a los 64.55 min.

En la figura 13; se puede observar el cromatograma a 280 nm de la muestra del extracto de tamarindo; observándose principalmente cinco pequeños picos; como pico 1 se podría tener cianidin-3-O-glucósido o procianidina; para el pico 2 se esperaría fuera cianidin-3-galactósido, ellagitanino o cianidin-malonil-glucósido; posiblemente el pico 3 pertenezca a un trímero de procianidina, pelargonidin-malonil-glucósido o cianidin-3-galactósido; el pico 4 podría ser quercentin-3-xilósido, kaempferol cumaroil-hexósido y el pico 5 tal vez sea ácido-O-cumárico, quercetina-3-glucósido, rutina o quercetin-3-galactósido.

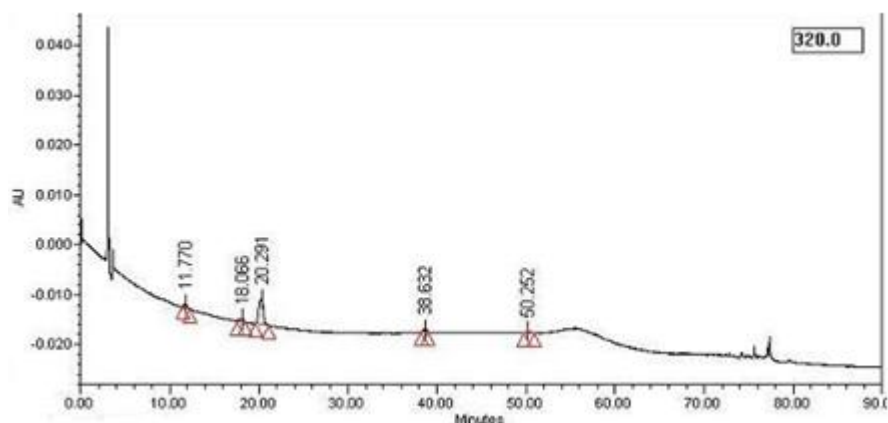


Figura 13. Cromatograma del extracto de tamarindo a 320nm.

Acorde a lo reportado por Sudjaroen *et al.* (2005) en muestras de extracto metanólico de semillas de tamarindo y con las mismas fases móviles variando el gradiente de elución, reporta la presencia de procianidina B₂, (+)-catequina y (-)-epicatequina a 340 nm (Figura 14). Por tanto, se encontraron tres picos cercanos a estos tiempos de retención; que hacen suponer la presencia de los tres componentes mencionados.

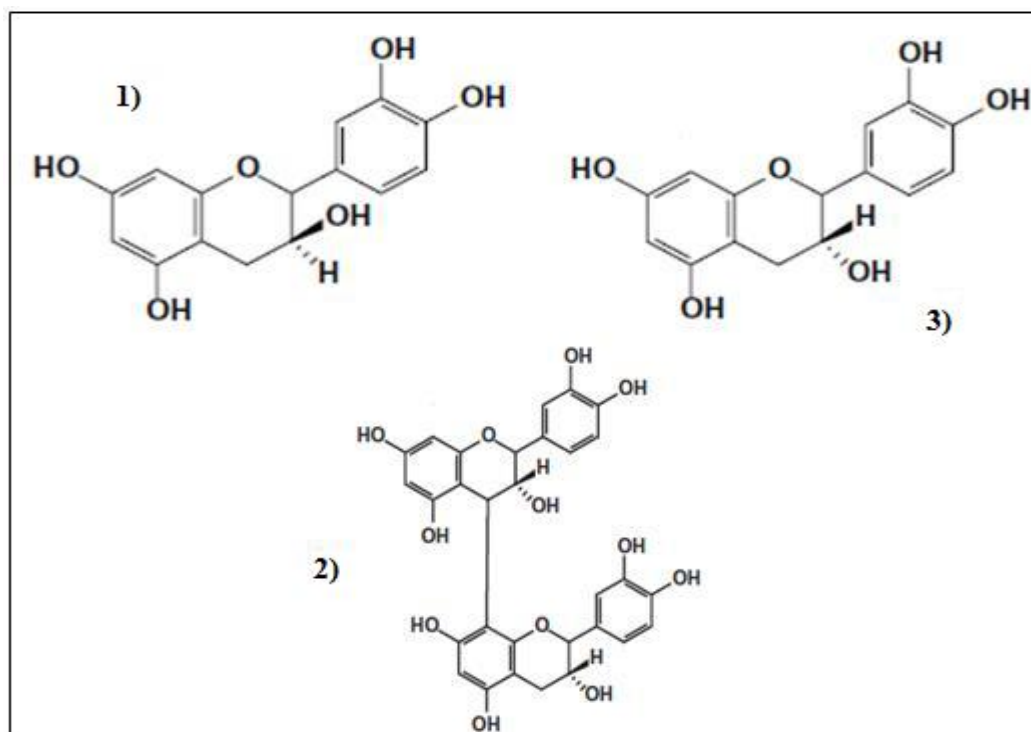


Figura 14. Estructuras reportadas por Sudjaroen *et al.*, (2005): 1.- (+)-catequina, 2.- procianidina B₂ y 3.- (-)-epicatequina.

Decámeros y nonámeros de procianidinas podría ser el pico con tiempo de retención 38.66 min. El último pico podría referirse a taninos poliméricos según lo reportado por Sudjaroen *et al.* (2005). También se menciona que la cantidad (-)-epicatequina/(+)-catequina es de 933 mg/kg, de procianidina dimérica o B2 es de 1526 mg/kg y de taninos poliméricos de 10118 mg/kg de semillas de tamarindo. Luengthanaphol *et al.* (2004) reportó la extracción de (-)-epicatequina en extracciones con fluidos supercríticos y etanol. Las siguientes figuras (15 a 21) muestran los cromatogramas que pertenecen a las soluciones obtenidas después de la solubilización de las películas.

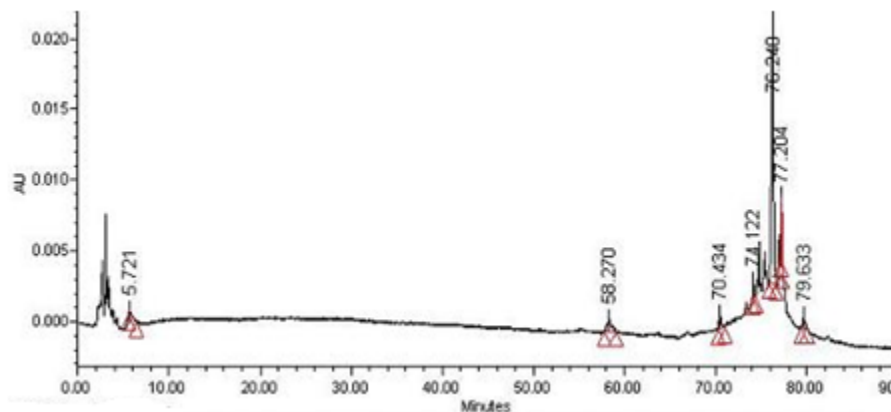


Figura 15. Cromatograma del agua obtenida de la solubilización de la película N13 a 280nm.

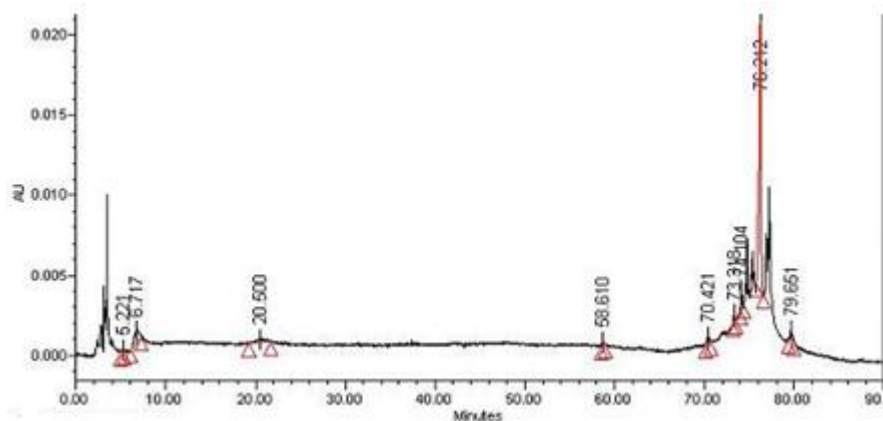


Figura 16. Cromatograma del agua obtenida de la solubilización de la película N23 a 280nm.

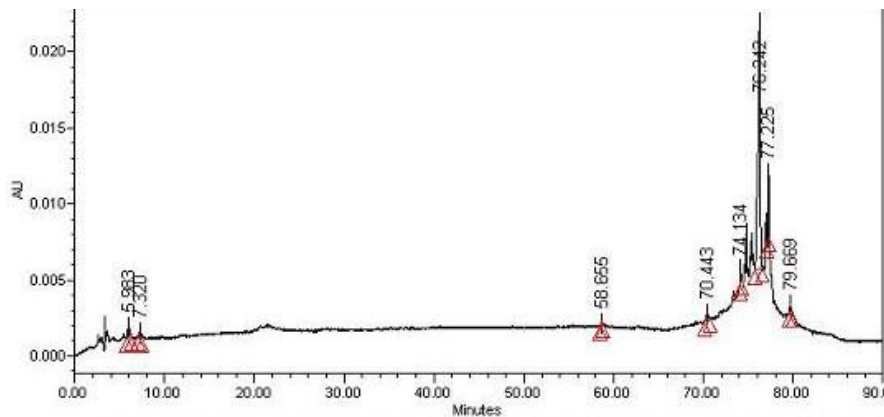


Figura 17. Cromatograma del agua obtenida de la solubilización de la película N33 a 280nm.

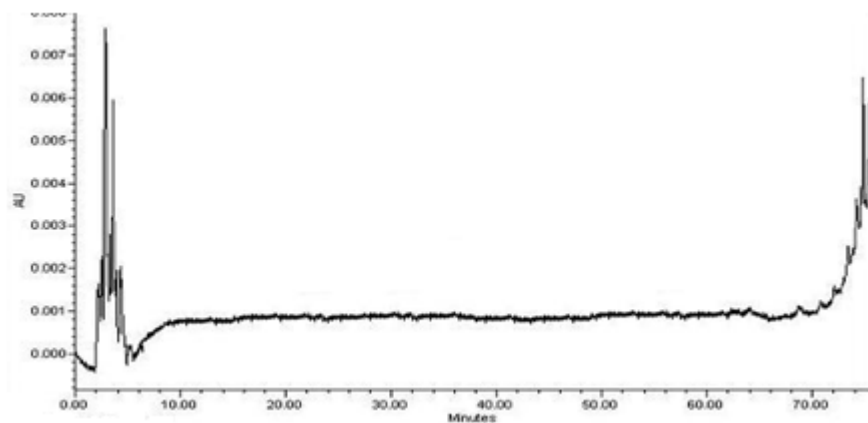


Figura 18. Cromatograma del agua obtenida de la solubilización de la película N43 a 280nm.

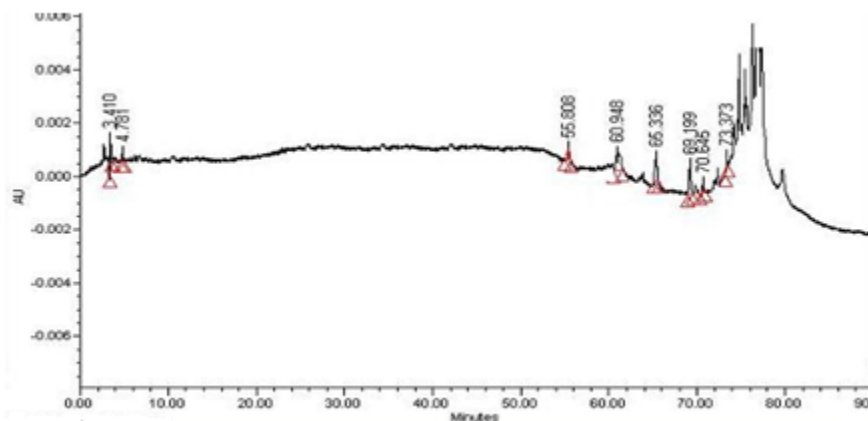


Figura 19. Cromatograma del agua obtenida de la solubilización de la película N53 a 280nm.

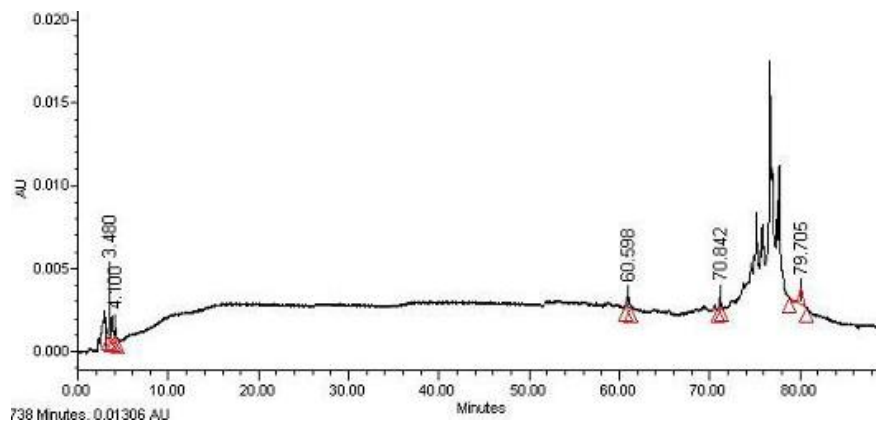


Figura 20. Cromatograma del agua obtenida de la solubilización de la película N63 a 280nm.

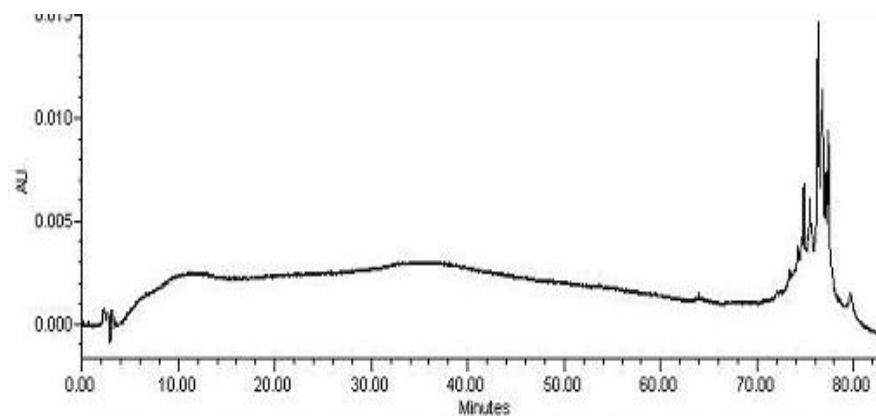


Figura 21. Cromatograma del agua obtenida de la solubilización de la película N73 a 280nm.

Como se puede observar, en todos los cromatogramas anteriores, del tratamiento N13 al N73, se alcanza a observar picos entre los 60 a 70 min de retención posiblemente taninos poliméricos; cabe señalar que los picos de (-)-epicatequina y (+)-catequina se pierden, lo que hace suponer que son adsorbidos en la matriz polimérica y se anclan de una forma más estable a las proteínas y/o carbohidratos posiblemente por la gran cantidad de puentes de hidrógeno. Aunque el pico de procianidina B2 (~20 min) se conserva en al menos hasta la combinación 50:50 de APSL-ANP, al incrementarse el contenido de almidón este desaparece.

Siddhuraju (2007) reporta que años atrás algunos investigadores postularon que los compuestos fenólicos de altos pesos moleculares (taninos) tenían mayor habilidad para secuestrar radicales libres y que su efectividad dependía del peso molecular, número de anillos aromáticos y la naturaleza de los grupos hidroxil de sustitución de grupos funcionales específicos. Por otro lado, la formación de complejos tanino-proteína, tanto solubles como insolubles son el resultado del tipo de procesamiento que se lleve a cabo en la semilla.

8.8. Evaluación de las características mecánicas de las películas

El que los materiales plásticos no tengan siempre características con la misma tendencia como es el caso de soportar una mayor fuerza a la tensión y % de elongación es característico de cada polímero; además de que las propiedades mecánicas de cada película dependerán del espesor. En la figura 22 se puede observar los parámetros de estudio de esta sección.

8.8.1. Determinación de la fuerza a la tensión (σ)

El cuadro 14, muestra los resultados de los tratamientos de las formulaciones N1, N4, N5 y N7 en sus tres diferentes concentraciones de polifenoles; los cuales presentaron mayor resistencia a la fuerza de tensión ($P \leq 0.05$) con respecto a sus testigos. A la mayor concentración de APSL (100%) se reportaron las mayores fuerzas con media \pm desviación estándar iguales a 16.235 ± 0.306 , 13.790 ± 0.573 y 12.191 ± 1.601 N/m² para N12, N13 y N11 respectivamente; por el contrario cuando se tenía 100% de ANP también por efecto de la adición de los polifenoles la fuerza a la tensión determinada fue significativamente mayor ($P \leq 0.05$) a su testigo pero muy por debajo de N1 (100% APSL). Sin embargo, se busca una combinación APSL-ANP que por efecto de la incorporación de compuestos polifenólicos se mejore la resistencia a la tensión; esto se encontró en las formulaciones N4 y N5 con las tres diferentes concentraciones de antioxidantes, las cuales tenían mayor resistencia a la fuerza de tensión significativamente con respecto a sus testigos ($P \leq 0.05$); teniendo un intervalo de fuerza a la tensión de 3.131 ± 0.628 a 5.795 ± 0.275 . En lo que respecta a los tratamientos N2, N3 y N6 se observa al menos una concentración de polifenoles que tiene efecto significativo mayor a sus testigos; las dos formulaciones restantes comparten significancia con sus testigos.

Cuadro 14. Parámetros mecánicos de películas biodegradables APSL-Almidón nativo de papa adicionadas con polifenoles.

Formula	σ Fuerza a la tensión (N/m ²)	% Elongación (ϵ)	E (N/m ²) Módulo de Young	σ/ϵ
N1	8.030±0.325 ^f	20.869±2.642 ^{defg}	1.946±0.247 ^{fgh}	4.163±0.446 ^{defghi}
N11	12.191±1.601^c	15.128±0.519 ^{ghij}	3.001±0.309 ^{ij}	4.075±0.496 ^{efghi}
N12	16.235±0.306^a	18.922±7.099 ^{efgh}	4.449±0.230 ^k	3.657±0.227 ^{fghi}
N13	13.790±0.573^b	26.314±4.286 ^{bcd}	3.744±0.490 ^{jk}	3.728±0.541 ^{fghi}
N2	9.191±0.980 ^e	17.729±2.304 ^{fghi}	3.017±0.416 ^{ij}	3.071±0.388 ^{ghi}
N21	10.183±0.430^d	26.516±1.949^{bcd}	23.361±2.266 ^m	0.438±0.038^k
N22	8.846±0.738 ^{ef}	7.086±1.662^{lmn}	2.776±0.092 ^{hi}	3.185±0.222 ^{ghi}
N23	9.028±0.626 ^e	6.242±0.641^{mn}	2.906±0.293 ^{ij}	3.113±0.099 ^{ghi}
N3	6.315±0.036 ^{gh}	12.580±2.057 ^{ijkl}	1.335±0.522 ^{defg}	5.437±2.725 ^{cde}
N31	5.297±0.307^{ij}	21.928±0.909^{def}	1.186±0.168 ^{bcde}	4.544±0.861 ^{cdefg}
N32	5.853±0.223 ^{hi}	17.578±2.745 ^{fghi}	1.373±0.171 ^{defg}	4.296±0.410 ^{cdefgh}
N33	8.638±0.553^{ef}	19.238±2.524^{efg}	1.931±0.184 ^{fgh}	4.482±0.160 ^{cdefg}
N4	1.681±0.070 ^m	10.958±1.241 ^{ijklm}	0.292±0.022 ^{ab}	5.760±0.285 ^{cd}
N41	5.795±0.275^{hi}	8.657±0.894 ^{klmn}	2.226±0.057 ^{ghi}	2.605±0.145^{ij}
N42	3.383±0.236^l	17.983±3.563^{efghi}	0.680±0.061^{abcd}	4.981±0.129 ^{cdef}
N43	4.527±0.267^{jk}	28.175±4.774^{bc}	0.791±0.058^{abcd}	5.751±0.647 ^{cd}
N5	0.386±0.032 ⁿ	8.988±1.642 ^{klmn}	0.067±0.006^a	5.852±0.983 ^c
N51	3.131±0.628^l	42.632±0.482^a	0.346±0.034^{ab}	8.987±0.901^a
N52	3.933±0.114^{kl}	38.467±2.279^a	0.503±0.074^{abc}	7.921±1.102^{ab}
N53	3.922±0.157^{kl}	26.329±7.019^{bcd}	0.519±0.012^{abc}	7.564±0.474^{ab}
N60	ND	ND	ND	ND
N61	0.811±0.208 ^{mn}	13.314±2.065 ^{hijk}	0.222±0.035^{ab}	3.855±1.970 ^{efghi}
N62	1.5700.036 ^m	30.568±4.699^b	0.294±0.032^{ab}	5.371±0.539 ^{cde}
N63	3.787±0.435^{kl}	23.526±0.882^{cde}	0.531±0.141^{abc}	7.312±1.035^b
N7	1.387±0.130 ^m	17.217±2.866 ^{fghi}	0.154±0.004^a	8.993±0.758 ^a
N71	3.801±0.358^{kl}	6.208±0.496^{mn}	0.872±0.011^{abcd}	4.359±0.444^{cdefgh}
N72	6.859±0.645^g	3.405±2.136ⁿ	5.539±0.857 ^l	1.251±0.147^{jk}
N73	4.608±0.746^{jk}	8.619±0.753^{klmn}	1.626±0.194 ^{efg}	2.827±0.172^{hi}

*Promedio ± Desviación estándar de tres replicas.

^{a,b,c...} superíndices diferentes dentro de columnas son significativamente diferentes entre sí ($p \leq 0.05$).

*La composición de las formulaciones se puede revisar en el cuadro 2 (página 40).

8.8.2. Determinación del porcentaje de elongación (ϵ)

Por otro lado, en lo que respecta a los resultados (Cuadro 14) del porcentaje de elongación (ϵ); se alcanzaron mayores elongaciones ($P \leq 0.05$) en las formulaciones con 60% de almidón (N5) con medias \pm desviación estándar de 38.467±2.279 y 42.632±0.482% para N53 y N52 respectivamente. Se observa que en los tratamientos de las formulaciones N3, N4 y N6 al menos 2 de cada 3 tratamientos con antioxidantes en las formulaciones son significativamente mayores a sus testigos ($P \leq 0.05$).

El efecto más contrastante se observó en los tratamientos N7, los cuales al incorporar extractos de tamarindo, generaba las películas más frágiles para la prueba de elongación, registrando un decremento en la elongación significativamente menor con respecto a su testigo.

Con respecto a los resultados de fuerza a la tensión y porcentaje de elongación se observa que los tratamientos de las formulaciones N4 y N5 generan películas con mayor resistencia a una fuerza de tensión y elongación significativamente con respecto a sus testigos de APSL-ANP ($P \leq 0.05$).

8.8.3. Determinación del módulo de Young (E)

El modulo de Young explica la dureza o rigidez de la película o material plástico; en conjunto con la relación o proporción (ratio) de σ/ϵ que se encuentra relacionado *in situ* con el perfil de la película; se pretende tener valores bajos para E y altos para σ/ϵ , ya que valores contrarios son característicos de películas defectuosas. Por lo reportado en el cuadro 14, aunque no existieron tratamientos que disminuyeran significativamente el valor de E con respecto a sus testigos, se observó que las formulaciones N4, N5 y N6 a excepción de N41 disminuyeron significativamente el módulo E ($P \leq 0.05$) con respecto al resto de los tratamientos hasta compartir el grupo “c” de superíndices registrados en dicho cuadro; en un intervalo de 0.067 ± 0.006 a 0.791 ± 0.058 . Los tratamientos N7 y N71, también generaron bajos valores de E significativamente, pero no estaban en combinación con APSL.

Por el contrario, los valores de E se incrementan a medida que aumenta el porcentaje de APSL en las formulaciones desde 60% hasta 100% (N3, N2 y N1), además de la formulación N72 que corresponde a un 100% de almidón.

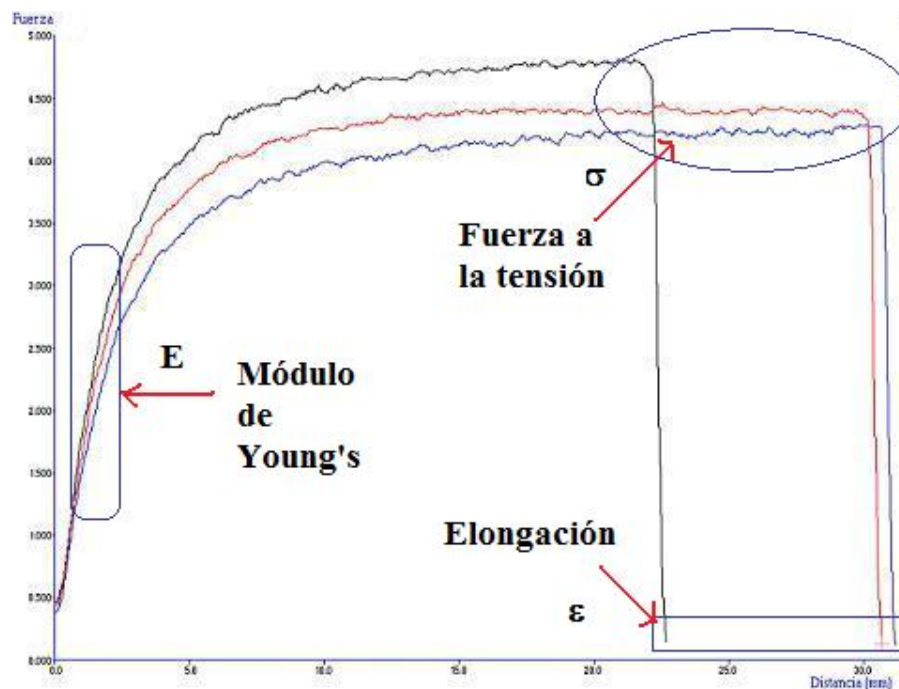


Figura 22. Fuerza a la tensión contra porcentaje de deformación de películas N43 obtenido por texturómetro.

En cuanto a σ/ϵ ; se buscaban los mayores resultados, tal es el caso de las tres combinaciones de la formulación N5 y la N63 compartiendo hasta el superíndice “b” de significancia ($P \leq 0.05$) con respecto a las demás formulaciones; las medias \pm desviación estándar son las siguientes en orden decreciente: N7(8.993 ± 0.758) > N51(8.987 ± 0.901) > N52(7.921 ± 1.102) > N53(7.564 ± 0.474) > N63(7.312 ± 1.035). En las combinaciones restantes no existen diferencias significativas de los tratamientos con compuestos polifenólicos con respecto a sus testigos, en algunos tratamientos llegan a ser significativos los resultados pero por debajo del valor correspondiente al testigo de la combinación.

De manera general el intervalo de σ/ϵ en los tratamientos de la formulación N1 va de 3.657 ± 0.227 a 4.163 ± 0.446 , en contraste con lo que reporta Murillo-Martínez *et al.* (2009); valores de fuerza a la tensión (3.84 - 6.29 N/m²), elongación (3.35-8.86%), Young (1.67 - 2.66 N/m²) y σ/ϵ (2.042 - 2.522) para películas solo con 100% de APSL en la misma concentración variando las condiciones de elaboración.

Para fuerza a la tensión solo los tratamientos de las formulaciones N3 a N7 excepto N3, N33 y N72 se encuentran en el intervalo; los tratamientos de las formulaciones N1 y N2 y las excepciones son mayores con respecto a lo reportado. En cuanto al porcentaje de elongación la mayoría de los tratamientos se encuentran por arriba de lo reportado y para E los tratamientos N3, N4, N5, N6 y N7 excepto N72 se encuentran dentro o por debajo del intervalo reportado.

Magaña-Alemán (2007) explica que grandes valores de σ y ε combinados con bajos valores de E representan a películas difíciles de estirar y de romper; pero valores bajos de σ y E combinados con altos valores de ε representan películas fáciles de estirar pero difíciles de romper.

Con respecto a lo anterior, se observa que la combinación 40:60 de APSL-ANP (N5) generó los mayores valores para ε y la relación σ/ε y los menores resultados para σ y E; significativamente con respecto a su testigo ($P \leq 0.05$) y demás combinaciones de matriz con intervalos de medias y desviación estándar iguales a: σ (3.131 ± 0.628 a 3.933 ± 0.114), ε (26.329 ± 7.019 a 42.632 ± 0.482), E (0.346 ± 0.034 a 0.519 ± 0.012) y σ/ε (7.564 ± 0.474 a 8.987 ± 0.901). Se puede observar también que por la adición de compuestos polifenólicos se observa un efecto directamente proporcional sobre los parámetros σ y E, pero inversamente proporcional sobre ε y σ/ε .

Arvanitoyannis *et al.* (1998) reportaron la elaboración de películas con una matriz de almidón hidroxipilado y gelatina 50:50 con 5% de glicerol a 60 °C obteniendo una fuerza a la tensión de 78.0 ± 6.3 N/m² y ε de $5.3 \pm 0.6\%$; este mismo autor pero en el año 1999; reportaron que películas con 35-90% de almidón en combinación con metil celulosa arrojaban fuerza a la tensión de 12.6-73.1 N/m² y elongación entre 4-24.5%.

López *et al.* (2008) determinaron que las películas a partir de almidón de maíz modificado con 3.25% de glicerol tuvieron fuerza a la tensión entre 2.5-3.5 N/m² y ϵ entre 36-38%.

Romero-Bastida *et al.* (2005) analizaron fuentes no convencionales de almidón al 3% a partir de mango y plátano y 1.5 g/100mL de glicerol; encontrando que la fuerza a la tensión para plátano era cercana a 25 N/m² y en mango cerca de 20 N/m²; que el porcentaje de elongación era de 40 y 32% para plátano y mango respectivamente y el modulo de Young para ambos se encontraba entre 1.5 N/m².

Finalmente Rojas-Graü *et al.* (2007) elaboraron películas con alginato y puré de manzana adicionadas de diversos extractos de especias, determinando que la fuerza a la tensión oscilaba entre 2.52-2.90 N/m², el % de elongación entre 51.06-58.33% y que E entre 5.75-7.07 N/m².

9. CONCLUSIONES

Etapa1.

- La harina de semillas tuvo la mayor concentración de polifenoles (113.70 ± 0.022 mg eq. AG/100g). Los extractos metanólicos y etanólicos de la harina de semillas mostraron una mayor actividad antioxidante evaluada por la capacidad reductora de Fe^{3+} (FRAP). Cuando los extractos fueron liofilizados mostraron una mayor actividad de inhibición del DPPH· (50% a los 15.5 min).

Etapa2.

- La adición del extracto Se2 mejoró la estabilidad de las películas con respecto a sus testigos elaborados sólo con proteína-almidón.
- Con respecto a la actividad antioxidante de las películas formadas, una mayor concentración de almidón en la matriz favoreció la disponibilidad de los compuestos fenólicos debido a que no permitió la interacción con las proteínas y tuvo como efecto aparentemente una mayor inhibición del DPPH·.
- En la mayoría de las propiedades mecánicas se observan diferencias significativas ($P \leq 0.05$) por efecto de la incorporación del extracto de tamarindo (Se2).

Con base en lo anterior:

La extracción de polifenoles a partir de desechos de la industria del tamarindo como son las semillas; nos permitió generar una fuente rica en compuestos con actividad antioxidante, los cuales al ser incorporados a diversas combinaciones APSL-ANP modificaron las características fisicoquímicas y/o mecánicas. La matriz que presentó las mejores propiedades fisicoquímicas, mecánicas y de actividad antioxidante fue la N5 compuesta por 40:60 (APSL-ANP) y adicionada del extracto Se2 a diferentes concentraciones (0.0010, 0.0020 y 0.0025 g polifenoles/mL de SFP). Por esta razón podría ser una alternativa para la elaboración de empaques activos.

10. PERSPECTIVAS

Para complementar esta investigación convendría llevar a cabo un análisis más detallado del perfil polifenólico por HPLC en los productos obtenidos de diversos medios de extracción además de evaluar la actividad antioxidante por otros métodos como: ensayo TEAC (ABTS·) u otro tipo de ensayos para evaluar la capacidad secuestrante de radicales (H_2O_2 , radical hidroxil y/o radical $O_2^{\cdot-}$). Sería adecuado probar estos extractos en sistemas modelo lipídicos y en productos cárnicos. Para completar el estudio de los extractos de tamarindo, es de suma importancia efectuar estudios antimicrobianos, ya que algunos autores reportan cierta actividad bacteriostática y fúngica de los compuestos polifenólicos contra microorganismos patógenos y deteriorantes de alimentos.

Posteriormente; sería adecuado plantear más variables en la elaboración de las películas como son pH, temperatura de desnaturalización y gelificación, concentración de glicerol y mayores concentraciones de compuestos polifenólicos incorporados a la matriz. Por otro, se podrían emplear las harinas producidas a partir del recubrimiento y semillas de tamarindo directamente en la elaboración de películas.

Después de tener las películas elaboradas sería pertinente plantear otro tipo de prueba que nos permita determinar la actividad antioxidante por efecto de la película aplicada a algún producto y nuevamente efectuar pruebas de solubilidad para comprobar la actividad antioxidante de compuestos solubles. Aunado a esto, convendría evaluar la difusividad de los compuestos polifenólicos en sistemas modelos, que nos permita estudiar la posible migración de estos productos a la superficie de los productos.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, I; Mehmood, Z; Mohammad, F. 1998. Screening of some Indian medical plants for their antimicrobial properties. *Journal of Ethnopharmacology*. 62: 183–193.
- Ahn, J; Grun, I. U; Mustapha, A. 2004. Antimicrobial and antioxidant activities of natural extracts in vitro and in ground beef. *Journal of Food Protection*. 67(1): 148-155.
- Ahvenainen, R. 2000. Active and intelligent packaging. En *Novel Food packaging techniques*. Editor: Ahvenainen R., Editorial CRC Press, Boca Raton, Florida, E.U. Pp: 5-21.
- Al-Fatimi, M; Wurster, M; Schroder, G; Lindequist, U. 2007. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of selected medicinal plants from Yemen. *J. Ethnopharmacology*. 111, 657–666.
- Amarowicz, R; Piskula, M; Honke, J; Rudnicka, B; Trosynska, A; Kozłowska, H. 1995. Extraction of phenolic compounds from lentil seeds (*Lens culinaris*) with various solvents. *Polish Journal of Food and Nutritional Science*. 41: 53-62.
- Amarowicz, R; Dykes, G. A; Pegg, R. B. 2008. Antibacterial activity of tannin constituents from *Phaseolus vulgaris*, *Fagopyrum esculentum*, *Corylus avellana* and *Juglans nigra*. *Fitoterapia*. 79: 217-219.
- AOAC. 1995. *Official Methods of Analysis* (15th edición). Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA.
- Arvanitoyannis, I; Psomiadou, E; Nakayama, A. 1996. Edible films made from sodium caseinate, starches, sugars or glycerol; Part 1. *Carbohydrate Polymers*. 31: 179–192.
- Arvanitoyannis, I; Biliaderis, C. G. 1998. Physical properties of polyol-plasticized edible films made from sodium caseinate and soluble starch blends. *Food Chemistry*. 62: 333-342.
- Arvanitoyannis, I; Nakayama, A; Aiba, S. 1998. Edible films made from hydroxypropyl starch and gelatin and plasticized by polyols and water. *Carbohydrate Polymers*. 36: 105-119.
- Arvanitoyannis, I; Biliaderis, C. G. 1999. Physical properties of polyol-plasticized edible blends made of methyl cellulose and soluble starch. *Carbohydrate Polymers*. 38: 47–58.
- Avérous, L; Fringant, C; Moro, L. 2001. Plasticized starch–cellulose interactions in polysaccharides composites. *Polymer*. 42: 6565–6572.
- Avérous, L; Boquillo, N. 2004. Biocomposites based on plasticized starch: thermal and mechanical behaviours. *Carbohydrate Polymers*. 56: 111–122.
- Asquith, T. N. Butler, L. G. 1986. Interactions of condensed tannins with selected proteins. *Phytochemistry*. 25: 1591-1593.
- ASTM. 2001a. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. Annual book of ASTM standards. Designation D882-01. Philadelphia. American Society for Testing Materials.
-

- ASTM. 2001b. Standard test method for water vapour transmission of materials. Annual book of ASTM standards. Designation E 96-01. Philadelphia. American Society for Testing Materials.
- Auger, C; Teissedre, P. L; Gérain, P; Lequeux, N; Bornet, A; Serisier, S; Besançon, P; Caporiccio, B; Cristol, J.P; Rouanet, J.M. 2005. Dietary wine phenolics catechin, quercetin, and resveratrol efficiently protect hypercholesterolemic hamsters against aortic fatty streak accumulation. *Journal Agriculture and Food Chemistry*. 53: 2015–2021.
- Baldwin, E. A; Nisperos-Carriedo, M. O; Baker, R. A. 1995. Use of edible coatings to preserve quality of lightly (and slightly) processed products. *Critical Review in Food Science and Nutrition*. 35: 509-524.
- Barry, T. N; Manley, T. R. 1986. Interrelationships between the concentrations of total condensed tannin, free condensed tannin and lignin in lotus sp. And their possible consequences in ruminant nutrition. *Journal of Science and Food Agriculture*. 37: 248-254.
- Bhattacharya, S; Bal, S; Bhattacharya, S. 1991. Rheological behaviour of tamarind (*Tamarindus indica*) kernel powder suspension. *Journal of Food Engineering*. 13: 151-158.
- Bhattacharya, S; Bal, S; Mukherjee, R. K. 1994. Functional and nutritional properties of tamarind (*Tamarindus indica*) kernel protein. *Food Chemistry*. 49: 1-9.
- Bazuin, C. G; Eisenberg, A. 1986. Dynamic mechanical properties of plasticized polystyrene based ionomers. I. Glassy to rubbery zones. *J. Polym. Sci.: Part B: Polymers Physics*. 24: 1137-1153.
- Bello-Pérez, L. A; Agama-Acevedo, E; Sáyago, S. G; Figueroa, J. D. C. 2000. Some structural, physicochemical and functional studies of banana starches isolated from two varieties growing in Guerrero, Mexico. *Starch/Stärke*. 52: 68-73.
- Benzie, I. F; Strain, J. J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 239:70-76.
- Beuchat, L. R. y Goleen, D. A. 1989. Antimicrobial occurring naturally in foods. *Food Technology*. 43: 134-142.
- Beutler, H. O. 1984. Enzymatische bestimmung von stärke in Lebensmitteln mit hilfe der hexokinase-methode. *Starch/Stärke*. 30: 309-312.
- Boatright, W. L; Hettiarachchy, N. S. 1995. Soy protein isolate solubility and surface hydrophobicity as affected by antioxidants. *Journal Food Science*. 60: 798-800.
- Böhm, V. Schlesier, K. 2004. Methods to evaluate the antioxidant activity. *Production Practices and Quality Assessment of Food Crops. Quality Handling and Evaluation*. Kluwer Academic Publishers. 3:55-71.

- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.
- Brand-Williams, W; Cuvellyer, M. E; Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*. 28: 25-30.
- Burt, S. A. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. *International Journal of Food Microbiology*. 94: 223–253.
- Caillard, R; remondetto, g. E; Matteescu, M. A; Subirade, M. 2008. Characterization of amino cross-linked soy protein hydrogels. *Food Chemistry*. 73(5): 283-291.
- Cao, N; Fu, Y; He, J. 2007. Mechanical properties of gelatine films cross-linked, respectively, by feluric acid and tannin acid. *Food Hydrocolloids*. 21: 575-584.
- Carasek, E; Pawliszyn, J. 2006. Screening of tropical fruit volatile compounds using solid-phase microextraction (SPME) . bers and internally cooled SPME . ber. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 54: 8688–8696.
- Carpenter, J. E; Gianessi, L. P. 2000. Agricultural biotechnology: benefits of transgenic soybeans. Washington, D. C. Natl. Center for Food and Agricultural Policy.
- Carvalho, R. A; Grosso, C. R. F. 2004. Characterization of gelatin based films modified with transglutaminase, glyoxal and formaldehyde. *Food Hydrocolloids*. 18: 717–726.
- Cornell, J. A. 1980. Experiments with mixtures: Design models, and the analysis of mixture date. New York: John Wiley and Sons. Pp: 2-63.
- Cha, D.S; Chen, J; Park, H. J; Chinnan, M. S. 2003. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in tofu by use of a polyethylene film coated with a cellulosic solution containing nisin. *Internatinal Journal of Food Science Technologies*. 38: 499-503.
- Cha, D. S; Chinnan, M. S. 2004. Biopolymer-based antimicrobial packaging: A Review. *Critical Review of Food Science Nutrition*. 44: 223-237.
- Choi, J. O; Park, J. M; Park, H. J; Lee, D. S. 2001. Migration of preservative from antimicrobial coating into water. *Food Science of Biotechnology*. 10(3): 327-30.
- Choi, W. S; Han, J. H. 2002. Film-forming mechanism and heat denaturation effect on the physical and chemical properties of pea-protein-isolate edible films. *Journal of Food Science*. 67: 1399-1406.
- Cho, S. Y; Park, J-W; batt, H. P; Thomas, R. L. 2007. Edible films made from membrane processed soy protein concentrates. *LWT-Food Science and Technology*. 40: 418–423.

- Dadalioglu, I; Evrendilek, G. 2004. Chemical compositions and antibacterial effects of essential oils of Turkish orégano (*Origanum minutiflorum*), bay laurel (*Laurus nobilis*), Spanish lavender (*Lavandula stoechas* L.), and fennel (*Foeniculum vulgare*) on common foodborne pathogens. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 52: 8255-8260.
- Davidson, P. M. 2001. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. *Food Microbiology*. 2: 611-616.
- Dawson, P. L; Hirt, D. E; Rieck, J. R; Acton, J.C; Sotthibandhu, A. 2003. Nisin release from films is affected by both protein type, and film-forming method. *Food Research International*. 36: 959-968.
- Donhowe, I. G; Fennema, O. 1993. The effects of plasticizers on crystallinity, permeability and mechanical properties of methylcellulose films. *Journal of Food Processing and Preservation*. 17(4): 247-257.
- Eswaranandam, S; Hettiarachchy, J. M. G. 2004. Effects of citric, lactic, malic, and tartaric acids on antimicrobial activity of nisin-incorporated soy protein film against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella garminara*. *Journal of Food Science*. 69: 79-84.
- Fairley, P; Monahan, F. J; German, J. B; Krochta, J. M. 1996. Mechanical properties and water permeability of edible films from whey protein isolate and sodium dodecyl sulfate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44(2): 438-443.
- Fang, J. M; Fowler, P. A; Escrig, C; Gonzalez, R; Costa, J. A; Chamudis, L. 2005. Development of biodegradable laminate films derived from naturally occurring carbohydrate polymers. *Carbohydrate Polymers*. 60(1): 39-42.
- Fang, Z; Zhang, Y; Lü, Y; Ma, G; Chen, J; Liu, D; Ye, X. 2009. Phenolic compounds and antioxidant capacities of bayberry juices. *Food Chemistry*. 113: 884-888.
- Fennema, O. R; Tannenbaum, S. R. 1985. Introduction to food chemistry. In: O.R. Fennema, Editor, *Food Chemistry*, Marcel Dekker, New York. Pp. 1-20.
- Flores, S; Fama, L; Rojas, A. M; Goyanes, S; Gerschenson, L. 2007. Physical properties of tapioca-starch edible films: Influence of filmmaking and potassium sorbate. *Food Research International*. 40(2): 257-265.
- Folin, O. y Ciocalteu, V. 1972. On tyrosine and tryptophane determination in proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 27: 627-650.
- Fringant, C; Rinaudo, M; Foray, M. F; Bardet, M. 1998. Preparation of mixed esters of starch or use of an external plasticizer: Two different ways to change the properties of starch acetate films. *Carbohydrate Polymers*. 35: 97-106.

- Galdeano, M. C; Mali, S; Grossmann, M. V. A; Yamashita, F; García, M. A. 2008. Effects of plasticizers on the properties of oat starch films. *Materials Science and Engineering*. Paginación en trámite.
- García, M. A; Martino, M. N; Zanitzky, N. E. 2000. Microstructural characterization of plasticized starch-based films. *Starch/Stärke*. 52: 118–124.
- Gaudin, S; Lourdin, D; Le Botlan, D; Ilari, J. L; Colonna, P. 1999. Plasticization and mobility in starch-sorbitol films. *Journal of Cereal Science*. 29(3): 273–284.
- Gennadios, A; Hanna, M. A; Kurth, L. B. 1997. Application of edible coatings on meats, poultry and sea foods: A review. *LWT-Food Science and technology*. 30: 337-350.
- Gennadios, A. 2002. Protein-based films and coatings. Boca Raton, USA: CRC Press. Pp. 164.
- Giancone, T; Torrieri, E.; Masi, P; Michon, C. 2008. Protein-polysaccharide interactions: Phase behaviour of pectin-soy flour mixture. *Food Hydrocolloids*. Paginación en trámite.
- Giner-Chavez, B. I. 1996. Condensed tannins in tropical forages. Ph. D. Thesis, Cornell University, Ithaca, NY, USA.
- Gontard, N; Guilbert, S; Cuq, J. L. 1992. Edible wheat gluten films: influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. *Journal of Food Science*. 57: 190-199.
- Gontard, N; Guilbert, S; Cuq, J. L. 1993. Water and glycerol as plasticizers affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten films. *Journal of Food Science*. 58: 206–211.
- Goyal, P; Kumar, V; Sharma, P. 2007. Carboxymethylation of Tamarind kernel powder. *Carbohydrate Polymers*. 69: 251–255.
- Guckian, S; Dwyer, C; O’Sullivan, M. 2005. Properties of and mechanisms of protein interactions in films formed from different proportions of heated and unheated whey protein solutions. *Food Hydrocolloids*. 223: 91-95.
- Gunasena, H.P., Hughes, M., 2000. Tamarind. International Center for Underutilized Crops, UK.
- Hagermann, A; Harwey-Mueller, I; Makkar, H. P. S. 2000. Quantification of tannins in tree foliage-a laboratory manual. FAO/IAEA working doc. IAEA. Vienna, Pp: 4-7.
- Han, J. H. 2000a. Antimicrobial food packaging. En *Novel Food packaging techniques*. Editor: Ahvenainen R., Editorial CRC Press, Boca Raton, Florida, E.U. Pp: 50-70.
- Han, J. H. 2000b. Antimicrobial food packaging. *Food Technology*. 54(3): 56-65.
- Han, J. H; Krochta, J. M. 2007. Physical properties of whey protein coating solution and films containin antioxidants. *Journal of Food Science*. 72: 308-314.

- Haslam, E. 2007. Vegetable tannins-Lessons of a phytochemical lifetime. *Phytochemistry*. 68: 2713-2721.
- Heng, P. W. S; Chan, L. W; Ong, K. T. 2003. Influence of storage conditions and type of plastizer on ethylcellulose and acrylate films formed from aqueous dispersions. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*. 6: 334-344.
- Huang, D; Ou, B; Prior, R. L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 53: 1841-1856.
- Huijbrechts, A. M. L; Desse, M; Budtova, T; Franssen, M. C. R; Visser, G. M; Boeriu, C. G; Sudhölter, E. J. R. 2008. Physicochemical properties of etherified maize starches. *Carbohydrate Polymers*. 74: 170-184.
- Jansson, A. 2004. Thuvnander Influence of thickness on the mechanical properties for starch films. *Carbohydrate Polymers*. 56: 499-503.
- Jiancai, L; Hongda, C. 2000. Biodegradation of whey protein-based edible films. *Journal of Polymers and Environmental*. 8: 135-143.
- Kanashiro, A; Souza, J. G; Kabeya, L. M; Azzolini, A. E. C. S; Lucisano-Valim, Y. M. 2007. Elastase release by stimulated neutrophils inhibited by flavonoids: importance of the catechol group. *Z. Naturforsch. C*. 62: 357-361.
- Kanashiro, A; Andrade, D. C. O; Kabeya, L. M; Turato, W. M; Faccioli, L. H; Uyemura, S. A; Lucisano-Valim, Y. M. 2009. Modulatory effects of rutin on biochemical and hematological parameters in hypercholesterolemic Golden Syrian hamsters. *An. Acac. Bras. Cienc*. 81: 1-6.
- Kepler, D; Decker, K. 1974. In *methoden der enzymatischen analyse* (Bergmeyer, H.). Verlag Chemie, Weinheim in *Methods of Enzymatic Analysis*. 2da. Edición. Vol. 3. Verlag Chemie, Weinheim/Academic Press. Inc. N. Y. Pp: 1127-1131
- Khwaldia, K; Perez, C; Banon, S; Desobry, S; Hardy, J. 2004. Milk proteins for edible films and coatings. *Critical Reviews of Food Science and Nutrition*. 44: 239-251.
- Kim, Y. M; Lee, N. K; Paik, H. D; Lee, D. S. 2000. Migration of bacteriocin from bacteriocin-coated film and its antimicrobial activity. *Food Science of Biotechnology*. 9(5): 325-329.
- Kim, S. J; Ustunol, Z. 2001. Solubility and moisture sorption isotherms of whey-protein-based edible films as influenced by lipid and plasticizer incorporation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49(9): 438-439.
- Kim, D; Jeoung, S. Lee, Ch. 2003. Antioxidant capacity of phenolic phitochemicals from various cultivars of plumbs. *Food chemistry*. 81: 321-326.

- Ko, S; Janes, M. E; Hettiarachchy, N. S; Johnson, M. G. 2001. Physical and chemical properties of edible films containing nisin and their action against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Science*. 66: 1006-1011.
- Komutarin, T; Azadi, L; Butterworth, L; Keil, D; Chitsomboon, B; Suttajit, M; Meade, B. J. 2004. Extract of the seed coat of *Tamarindus indica* inhibits nitric oxide production by murine macrophages in vitro and in vivo. *Food Chemistry and Toxicology*. 42: 649–658.
- Kontopidis, G; Holt, C; Sawyer, L. 2004. Invited review. β -lactoglobulin: Binding properties, structure and function. *Journal Dairy Science*. 87: 785-796.
- Krochta, J. M; Miller, K. S. 1997. Oxygen and aroma barrier properties of edible films: a review. *Trends of Food Science and Technology*. 8: 228–237.
- Krochta, J. M. y De Mulder-Johnson, C. 1997. Edible and biodegradable polymer films. *Food Technology*. 51(2): 61-74.
- Kroll, J; Rawell, H. M. 2001. Reactions of plant phenols with myoglobin: influence of chemical structure of the phenolic compounds. *Journal of Food Science*. 66: 48-58.
- Kumar, R; Vaithyanathan, S. 1990. Occurrence, nutritional significance and effect on animal productivity of tannins in tree leaves. *Animal Feed Science and Technology*. 30: 21-38.
- Kumar, C. S; Bhattacharya, S. 2008. Tamarind seed: properties, processing and utilization. *Crit. Rev. Food Science and Nutrition*. 48: 1–20.
- Kumar, R; Liu, D; Zhang, L. 2008. Advances in proteinous biomaterials. *Journal Biobased Material and Bioenergy*. 2: 1-24.
- Kunte, L. A; Gennadios, A; Cuppett, S. L; Hanna, M. A; Weller, C. L. 1997. Cast films from soy protein isolates and fractions. *Cereal Chemistry*. 74: 115-118.
- Lamien-Meda, A; Lamien, C. E; Compaoré, M. M; Meda, R. N; Kiendrebeogo, M; Zeba, B; Millogo, J. F; Nacoulma, O. G. 2008. Polyphenol content and antioxidant activity of fourteen wild edible fruits from Burkina Faso. *Molecules*. 13: 581–594.
- Lafargue, D; Lourdin, D; Doublier, J. L. 2007. Film-forming properties of a modified starch/(κ -carrageenan mixture in relation to its rheological behaviour. *Carbohydrate Polymers*. 70(1): 101–111.
- Lee, C. B; Lawles, H. T. 1991. Time-course of astringent sensations. *Chemical Senses*. 16: 225-238.
- Lin, H. C; Chen, P. C; Cheng, T. J; Chen, R. L. C. 2004. Formation of tannin– albumin nano-particles at neutral pH as measured by light scattering techniques. *Analytical Biochemistry*. 325(1): 117–120.

- Liu, H; Ramsden, L; Corke, H. 1999. Physical properties and enzymatic digestibility of hydroxypropylated ae, wx, and normal maize starch. *Carbohydrate Polymers*. 40(3): 175.
- López, J; Tejada, I; Vásquez, C; De Dios-Garza, J; Shimada, A. 2004. Condensed tannins in humid tropical fodder crops and their *in Vitro* biological activity. *Journal of Science Food and Agriculture*. 84: 291-294.
- López, O. V; García, M. A; Zaritzky, N. E. 2008. Film forming capacity of chemically modified corn starches. *Carbohydrate Polymers*. 73: 573–581.
- Luengthanaphol, S; Mongkholkhajornsilp, D; Douglas, S; Douglas, P. L; Pengsopa, L; Pongamphai, S. 2004. Extraction of antioxidants from sweet Thai tamarind seed coat-preliminary experiments. *Journal of Food Engineering*. 63: 247-252.
- Lungu, B; Johnson, M. G. 2005. Potassium sorbate does not increase control of *Listeria monocytogenes* when added to zein coatings with nisin on the surface of full fat turkey frankfurter pieces in a model system at 4 °C. *Journal of Food Science*. 70(2): 95-99.
- Magaña-Alemán, F. 2007. Diseño de un material de empaque biodegradable a base de aislado de proteína de suero adicionado con agentes antimicrobianos naturales. Tesis de Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Fac. Química, UAQ.
- Makkar, H. P. S; Hagermann, A; Mueller-Harvey, I. 2000. Quantification of tannins in tree foliage-a laboratory manual. FAO/IAEA working document. IAEA. Vienna, Pp: 23-24.
- Mali, S; Grossmann, M. V. E; García, M. A; Martino, M. N; Zaritzky, N. E. 2005. Mechanical and thermal properties of yam starch films. *Carbohydrate Polymers*. 157-164.
- Martinello, F; Soares, S. M; Franco, J. J; Santos, A. C; Sugohara, A; Garcia, S. B; Curti, C; Uyemura, S. A. 2006. Hypolipemic and antioxidant activities from *Tamarindus indica* L. Pulp fruit extract in hypercholesterolemic hamsters. *Food Chemistry and Toxicology*. 44: 810–818.
- Mate, J. I; Krochta, J. M. 1996. Comparison of oxygen and water vapor permeabilities of whey protein isolate and lactoglobulin edible films. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 44:3001-3004.
- Mauer, L. J; Smith, D. E; Labuza, T. P. 2000. Water vapor permeability, mechanical, and structural properties of edible β -casein films. *International Dairy Journal*. 10(5-6): 353-358.
- McAllister, T. A; Bae, H. D; Jones, G. A; Cheng, K. J. 1994. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *Journal of Animal Science*. 72: 3004-3018.
- McHugh, T. H; Avena-Bustillos, R; Krochta, J. M. 1993. Hydrophilic edible films: modified procedure for water vapour permeability and explanation of thickness effects. *Journal of Food Science*. 58(4): 899-903.

- McNabb, W. C; Waghorn, G. C; Barry, T. N; Shelton, L. D. 1993. The effect of condensed tannins in *Lotus pendunculatus* on the digestion and metabolism of methionine, cysteine and inorganic sulphure in sheep. *British Journal of Nutrition*. 70: 647-661.
- Melencic, D; Maksimovic, Z; Popovic, M; Miladinovic, J. 2008. Polyphenol contents and antioxidant activity of soybean seed extracts. *Bioresource Technology*. 99: 6688-6691.
- Miliauskas, G; Venskutonis, P. R; van Beek, T. A. 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*. 85: 231-237.
- Miller, K. S; Krochta, J. M. 1997. Oxygen and aroma barrier properties of edible films: A review. *Trends of Food Science and Technology*. 8: 228-37.
- Miller, K. S; Upadhyaya, S. K; Krochta, J. M. 1998. Permeability of d-limonene in whey protein films. *Journal of Food Science*. 63: 244-247.
- Min, S. y Krochta, J. 2005. Inhibition of *Penicillium commune* by edible whey protein films incorporating lactoferrin, lacto-ferrin hydrolysate, and lactoperoxidase systems. *Journal of Food Science*. 70(2): 87-94.
- Min, S; Harris, L. J; Krochta, J. M. 2005. *Listeria monocytogenes* inhibition by whey protein films and coatings incorporating the lactoperoxidase system. *Journal of Food Science*. 70(7): 317-324.
- Müller, C. M. O; Yamashita, F; Laurindo, J. B. 2007. Evaluation of the effect of glycerol and sorbitol concentration and water activity on the water barrier properties of cassava starch films through a solubility approach. *Carbohydrate Polymers*. 65: 324-335.
- Müller, C. M. O; Laurindo, J. B; Yamashita, F. 2008. Effect of cellulose fibers addition on the mechanical properties and water vapor barrier of starch-based films. *Food Hydrocolloids*. 1–6.
- Murillo-Martínez, M. M. 2008. Evaluación de propiedades fisicoquímicas y antimicrobianas de películas comestibles adicionadas con Nisina y/o Glucosa oxidasa. Tesis de Maestría en Biotecnología. UAM-I.
- Myllarinen, P; Partanen, R; Seppala, J; Forssell, P. 2002. Effect of glycerol on behaviour of amylase and amylopectin films. *Carbohydrates Polymers*. 50: 355-361.
- Nagano, T; Akasaka, T; Nishinari, K. 1994. Dynamic viscoelastic properties of gkycinin and β -conglycinin gels from soybeans. *Biopolymers*. 34: 1303-1309.
- Narchi, I; Vial, Ch; Djelveh, G. 2009. Effect of protein-polysaccharide mixtures on the continuous manufacturing of foamed food products. *Food Hydrocolloids*. 23: 188–201.
- Okuda, T., Yoshida, T. y Hatano, T. 1991. Plants and tradicional medicine in: *Economic and Medicinal Plant Research*. Academic Press, NY, USA. 5: 129-165.

- Onwulata, C. I; Isobe, S; Tomasula, P. M; Cooke, P. H. 2005. Properties of whey protein isolates extruded under acidic and alkaline conditions. *Journal of Dairy Science*. 89: 71-81.
- Ou, S; Kwok, K. C. 2004. Review feluric acid: Pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. *Journal of the Science and Food Agriculture*. 84: 1261-1269.
- Ou, S; Wang, Y; Tang, S; Huang, C; Jackson, M. G. 2005. Role of feluric acid in preparing edible films from soy protein isolate. *Journal of Food Engineering*. 70(2): 205-210.
- Ouatara, B; Simard, R. E; Piette, G; Bejín, A; Holler, R. A. 2000. Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. *International Journal of Food Microbiology*. 62: 139-148.
- Oussallah, M; Caillet, S; Salmieri, S; Saucier, L; Lacroix, M. 2004. Antimicrobial and antioxidant effects of milk protein based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 52: 5598–5605.
- Ozcan, M. 2003. Antioxidant activities of rosemary, sage and sumac extract and their combinations on stability of natural peanut oil. *Journal of Medicinal Food*. 6(3): 267-270.
- Paes, S. S; Yakimets, I; Mitchell, J. R. 2008. Influence of gelatinization process on functional properties of cassava starch films. *Food Hydrocolloids*. 22: 788–797.
- Pagella, C; Spigno, G; De Faveri, D. M. 2002. Characterization of starch based edible coatings. *Food and Bioproducts Processing*. 80: 193–198.
- Paula, F. S; Kabeya, L. M; Kanashiro, A; de Figueiredo, A. S. G; Azzolini, A. E. C. S; Uyemura, S. A; Lucisano-Valim, Y. M. 2009. Modulation of human neutrophil oxidative metabolism and degranulation by extract of *Tamarindus indica* L. fruit pulp. *Food and Chemical Toxicology*. 47: 163–170.
- Park, S. K; Hettiarachchy, N. S; Ju, Y. Z; Gennadios, A. 2002. Formation and properties of soy protein films and coatings. In *Protein based films and coatings*. CRC Press LLC. 123-137.
- Perez-Gago, M. B; Krochta, J. M. 2000. Drying temperature effect on water vapor permeability and mechanical properties of whey protein-lipid emulsion films. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 48: 2687-2692.
- Ponce, A. G; del Valle, C; Roura, S. 2004. Shelf life of leafy vegetables treated with natural essential oils. *Journal of Food Science*. 69(1): 50-56.
- Ponce, A. G; Rouraa, S. I; del Vallea, C. E; Moreiraa, M. R. 2008. Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts: *In vitro* and *in vivo* studies. *Postharvest Biology and Technology*. 49: 294–300.

- Poncet-Legrand, C; Edelmann, A; Putaux, J. L; Cartalade, D; Sarni-Manchado, P; Vernhet, A. 2006. Poly(l-proline) interactions with flavan-3-ols units: Influence of the molecular structure and the polyphenol/protein ratio. *Food Hydrocolloids*. 20: 687-697.
- Porter, W. L. 1980. Recent trends in food applications of antioxidants. *Autoxidation in Food Biological Systems* (M. G. Simic and M. Karel, eds.), Plenum Press, NY. 295-365.
- Pranoto, Y; Rakshit, S. Salokhe, V. 2005. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. *LWT-Food Science and Technology*. 38: 859-865.
- Psomiadou, E; Arvanitoyannis, I; Yamamoto, N. 1996. Edible films made from natural resources; microcrystalline cellulose (MCC), methyl cellulose (MC) and corn starch and polyols. Part 2. *Carbohydrate Polymers*. 31: 193-204.
- Pulido, R; Bravo, L; Saura-Calixto, F. 2000. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48: 3396-3402.
- Quintavalla, S; Vicini, L. 2002. Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Science*. 62: 373-380.
- Quintero S. B; Vernon-Carter, E. J; Guerrero-Legarreta, I; Ponce-Alquicira, E. 2006. Incorporation of antilisterial bacteriocin-like inhibitory substance from *Pediococcus parvulus* VKMX133 into film-forming protein matrices with different hydrophobicity. *Journal of Food Science*. 70: 398-403.
- Renkema, J. M. S; Knabben, J. H. M; Van Vliet, T. 2001. Gel formation by β -glycinin and glycinin and their mixtures. *Food Hydrocolloids*. 15: 407-414.
- Renkema, J. M. S; Van Vliet, T. 2004. Concentration dependence of dynamic moduli of heat-induced soy protein hydrogels. *Food Hydrocolloids*. 18: 483-487.
- Riemersma, R. A; Rice-Evans, C. A; Tyrrell, R. M; Clifford, M. N. 2001. Tea flavonoids and cardiovascular health. *Journal of Medicine*. 94: 277-282.
- Rodríguez, M; Osés, J; Ziani, K; Maté, J. I. 2006. Combined effect of plasticizers and surfactants on the physical properties of starch based edible films. *Food Research International*. 39: 840-846.
- Rojas-Graü, M. A; Avena-Bustillos, R. J; Friedman, M; Henika, P. R; Martín-Belloso, O; McHugh, T. H. 2006. Mechanical, barrier, and antimicrobial properties of apple puree edible films containing plant essential oils. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 54: 9262-9667.

- Rojas-Graü, M. A; Avena-Bustillos, R. J; Olsen, C; Friedman, M; Henika, P. R; Martín-Belloso, O; Pan, Z; Hugo, T. H. 2007. Effect of plant essential oils and oil compounds on mechanical, barrier and antimicrobial properties of alginate-apple puree edible films. *Journal of Food Engineering*. 81: 634-641.
- Romero-Bastida, C; Bello-Pérez, L; García, M. A; Martino, M. N; Solorza-Feria, J; Zaritzky, N. E. 2005. Physicochemical and micro structural characterization of films prepared by thermal and cold gelatinization from non-conventional sources of starches. *Carbohydrates Polymers*. 60: 235-244.
- SAGARPA. SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2008. En: <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/index.php?idCat=159&idSegCat=1>.
- Sánchez-Moreno, C; Larrauri, J. A; Saura-Calixto, F. A. 1998. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 76: 270-276.
- Sanjurjo, K; Flores, S; Gerschenson, L; Jagus, R. 2006. Study of the performance of nisin supported in edible films. *Food Research International*. 39: 749-754.
- Sarni-Manchado, P; Deleris, A; Avallone, S; Cheynier, V; Moutounet, M. 1999. Analysis and characterization of wine condensed tannins precipitated by protein used as fining agent in enology. *American Journal of Enology and Viticulture*. 50(1): 81-86.
- Schou, M; Longares, A; Montesinos-Herrero, C; Monahan, F; O’Riordan, D; O’Sullivan, M. 2005. Properties of edible sodium caseinate films and their application as food wrapping. *LWT-Food Science and Technology*. 38: 605–610.
- Seydim, A. C; Sarikus, G. 2006. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food Research International*. 39: 639-644.
- Sharififar, F; Dehghn-Nudeh, G; Mirtajaldini, M. 2009. Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium L.* *Food Chemistry*. 112: 885-888.
- Shi, J; Gong, J; Liu, J; Wu, X; Zhang, Y. 2009. Antioxidant capacity of extract from edible flowers of *Prunus mume* in China and its active components. *LWT-Food Science and Technology*. 42: 477-482.
- Shogren, R. L; Fanta, G. F; Doane, W. M. 1993. Development of starch based plastics: A reexamination of selected polymer systems in historical perspective. *Starch/Stärke*. 45: 276–280.

- Siddhuraju, P. 2007. Antioxidant Activity of polyphenolic compounds extracted from defatted raw and dry heated *Tamarindus indica* seed coat. Swiss Society of Food Science and Technology. LWT-Food Science and Technology. 40: 982-990.
- Siebert, K. J; Troukhanova, N. V; Lynn, P. Y. 1996. Nature of polyphenol–protein interactions. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 44: 80-85.
- Silanikove, N; Perevolotsky, A; Provenza, F. D. 2001. Use of tannin-binding chemicals to assay for tannins and their negative postingestive affects in ruminants. Animal Feed Science and Technology. 91: 69-81.
- Simirgiotis, M; Theoduloz, C; Caligari, P; Schmeda-Hirschmann, G. 2008. Comparison of phenolic composition and antioxidant properties of two native Chilean and one domestic strawberry genotypes. Food Chemistry. Paginación en trámite.
- Singh, P; Kumar, R; Sabapathy, S. N; Bawa, S. 2008. Functional and edible uses of soy protein products. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 7: 14- 28.
- Sivaroban, T; Hettiarachchy, N. S; Johnson, M. G. 2008. Physical and antimicrobial properties of grape seed extract, nisin, and EDTA incorporated soy protein edible films. Food Research International. Paginación en trámite.
- Skerget, M; Kotnik, P; Hadolin, M; Rizner-Hras, A; Simonic, M; Knez, Z. 2005. Phenols, proanthocyanidins, flavons and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. Food Chemistry. 89: 191-198.
- Smith, D. M. 1994. Protein interactions in gels: protein-protein interaction. Protein functionality in food systems. Institute of Food Technologists. Chicago, Illinois, E. U. 209-224.
- Soares, A. A; Marques de Souza, C. G; Marina, D. F; Pezente, F. G; Gomes da Costa, S. M; Marina, P. R. 2009. Antioxidant activity and total phenolic content of *Agaricus brasiliensis* (*Agaricus blazei* Murril) in two stages of maturity. Food Chemistry. 112: 775-781.
- Soares, R. M. D; Lima, A. M. F; Oliveira, R. V. B; Pires, A. T. N; Soldi, V. 2005. Thermal degradation of biodegradable edible films based on Xanthan and starches from different sources. Polymer Degradation Stability. 90: 449-454.
- Soriano-Santos, J; Guerrero-Legarreta, I; Ponce-Alquicira, E. 2006. Acción antioxidante de los flavonoides de frutas y verduras para la preservación de la salud. ContactoS, Revista de educación en Ciencias e Ingeniería. 62: 46-54.
- Spaargaren, O. C. 2000. Other systems of soil classification, in Handbook of Soil Science. Ed. Sumner ME, CRC. Chapter B-5.

- Sudjaroen, Y; Haubner, R; Würtele, G; Hull, W. E; Erben, G; Spiegelhalder, B; Changbumrung, S; Bartsch, H; Owen, R. W. 2005. Isolation and structure elucidation of phenolic antioxidants from tamarind (*Tamarindus indica L.*) seeds and pericarp. *Food Chemistry and Toxicology*. 43: 1673–1682.
- Suppakul, P; Miltz, J; Sonneveld, K; Bigger, S. W. 2003. Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications. *Journal of Food Science*. 68(2): 408–419.
- Tanner, G. J; Moore, A. E; Larkin, P. J. 1994. Proanthocyanidins inhibit hydrolysis of leaf proteins by rumen microflora in vitro. *British Journal of Nutrition*. 71: 947-958.
- Tapia M. S; Rojas-Graü, M. A; Rodríguez, F. J; Ramírez, J; Carmona, A; Martín-Belloso, O. 2007. Alginate and gellan based edible films for probiotic coating on fresh-cut fruits. *Journal of Food Science*. 72: E190-E196.
- Teerakarn, A; Hirt, D; Acton, J.C; Rieck, J.R; Dawson, P.L. 2002. Nisin diffusion in protein films: effects of film type and temperature. *Food Science and Technology*. 67(8): 3019-3025.
- Tharanathan, R. 2003. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends in Food Science and Technology*. 14: 71-78.
- Theivendran, S; Hettiarachchy, N; Johnson, M. 2006. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by nisin combined with grape seed extract or green tea extract in soy protein film coated on turkey frankfurters. *Journal of Food Science*. 71(2): 39-44.
- Tolstoguzov, V.B. 1994. Some physicochemical aspects of protein processing in foods. In G.O. Phillips, P.A. Williams & D.J. Wedlock (Eds.). *Gums and Stabilizers for the Food Industry*. 7: 115-154.
- Townend, R; Gyuricsek, D. M. 1973. Heat denaturation of whey and model protein systems. *Journal of Dairy Science*. 57: 1152-1158.
- Troszyńska, A; Estrella, I; López-Amóres, M. L; Hernández, T. 2002. Antioxidant activity of pea (*Pisum sativum L.*) seed coat acetone extract. *LWT-Food Science and Technology*. 35: 158–165.
- Troszynska, A; Amarowicz, R; Lamparski, G; Wolejszo, A; Barylko-Pikielna, N. 2006. Investigation of astringency of extracts obtained from selected tannins-rich legume seeds. *Food Quality and Preference*. 17: 31-35.
- Tsao, R; Yang, R. 2003. Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1018: 29-40.

- Tsuda, T; Makino, Y; Kato, H; Osawa, T; Kawakishi, S. 1993. Screening for antioxidative activity of edible pulses. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 57: 1606-1608.
- Tsuda, T; Watanabe, M; Ohshima, K; Yamamoto, A; Kawakishi, S; Osawa, T. 1994. Antioxidative components isolated from the seed of Tamarind (*Tamarindus indica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 42: 2671-2674.
- Tsuda, T; Fukaya, Y; Ohshima, K; Yamamoto, A; Kawakishi, S; Osawa, T. 1995. Antioxidative activity of tamarind extract prepared from the seed coat (Japanese). *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology*. 42: 430-435.
- Ultee, A; Bennik, M. H. J; Moezelaar, R. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(4): 1561–1568.
- Ustunol, Z; Mert. 2004. Water solubility, mechanical, barrier, and thermal properties of cross-linked whey protein isolated-based films. *Journal of Food Science*. 69: 129-133.
- Vinson, J. A; Teufel, K; Wu, N. 2004. Green and black teas inhibit atherosclerosis by lipid, antioxidant, and brinolytic mechanisms. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 52: 3661–3665.
- Ushanandini, S; Nagaraju, S; Kumar, K. H; Vedavathi, M; Machiah, D. K; Kemparaju, K; Vishwanath, B. S; Gowda, T. V; Girish, K. S. 2006. The anti-snake venom properties of *Tamarindus indica* (Leguminosae) seed extract. *Phytotherapy Research*. 20: 851–858.
- Waters, E. J; Peng, Z; Pockock, K. F; Jones, G. P; Clarke, P; Williams, P. J. 1994. Solid-state ¹³C NMR investigation into insoluble deposits adhering to the inner glass surface of bottled red wine. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 42: 1761-1766.
- Were, L; Hettiarachchy, N. S; Coleman, M. 1999. Properties of cysteine-added soy protein-wheat gluten films. *Journal of Food Science*. 64: 514–518.
- Wooster, T. J; y Augustina, M. A. 2006. Rheologies of whey protein-dextran conjugate films at the air/water interface. *Journal of Food Engineering*. 4: 521-530.
- Wu, Y; Rhim, J. W; Weller, C. L; Hamouz, F; Cuppett, S. L; Schnepf, M. 2002. Development and application of multicomponent edible coatings and films: A review. *Advance in Food and Nutrition Research*. 44: 347-394.
- Yam, K. L; Takhidtov, P. Y; Miltz, J. 2005. Intelligent Packaging: Concepts and applications. *Journal of Food Science*. 70(1): 1-10.

- Yokozawa, T; Chen, C. O; Dong, E; Tanaka, T; Nonaka, G. I; Nishioka, I. 1998. Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Biochemical Pharmacology*. 56: 213-222.
- Young, J. C; Bong, J. A; Cheong, C. 1993. Isolation and enzyme inhibition of tannins from Korean green tea. *Korean Biochemistry*. 26: 216-223.
- Zobel, H. F. 1994. Starch granule structure. En Alexander, R. J. y Zobel, H. F. *Developments in carbohydrate chemistry* (Pp. 1-36): The American Association of Cereal Chemists.
- Zhou, K; Yu, L. 2006. Total phenolic contents and antioxidant properties of commonly consumed vegetables grown in Colorado. *LWT-Food Science and Technology*. 39: 1155–1162.

12. ANEXO

12.1. Cuadros

Cuadro 15. Absorbencias promedio de la actividad antioxidante de Trolox frente al reactivo del ensayo de FRAP.

Tiempo (s)	FRAP ($\bar{Y} \pm \sigma$)											
	Concentración (mmol/L)											
	40000		30000		20000		10000		5000		1000	
	\bar{Y}	σ	\bar{Y}	σ	\bar{Y}	σ	\bar{Y}	σ	\bar{Y}	σ	\bar{Y}	σ
0	0.9588	0.015	0.5652	0.010	0.3612	0.003	0.1943	0.005	0.0912	0.002	0.0194	0.003
5	0.9614	0.013	0.5667	0.010	0.3630	0.003	0.1954	0.004	0.0920	0.002	0.0203	0.003
15	0.9633	0.013	0.5681	0.010	0.3656	0.003	0.1967	0.005	0.0923	0.002	0.0209	0.003
30	0.9654	0.014	0.5688	0.010	0.3670	0.002	0.1975	0.005	0.0928	0.002	0.0214	0.003
45	0.9661	0.014	0.5690	0.010	0.3675	0.002	0.1983	0.005	0.0929	0.002	0.0222	0.003
60	0.9663	0.014	0.5694	0.010	0.3678	0.002	0.1991	0.005	0.0930	0.002	0.0224	0.003
75	0.9665	0.015	0.5696	0.010	0.3681	0.001	0.1995	0.005	0.0931	0.002	0.0231	0.003
90	0.9667	0.015	0.5697	0.010	0.3682	0.001	0.2004	0.005	0.0934	0.002	0.0239	0.003
105	0.9668	0.015	0.5698	0.010	0.3682	0.001	0.2009	0.005	0.0935	0.002	0.0240	0.002
120	0.9668	0.015	0.5699	0.010	0.3684	0.001	0.2015	0.005	0.0936	0.002	0.0243	0.002
135	0.9669	0.015	0.5700	0.010	0.3685	0.001	0.2019	0.005	0.0937	0.002	0.0246	0.002
150	0.9669	0.015	0.5701	0.010	0.3686	0.001	0.2020	0.005	0.0940	0.002	0.0249	0.002
165	0.9667	0.015	0.5701	0.011	0.3688	0.001	0.2023	0.005	0.0941	0.002	0.0251	0.002
180	0.9667	0.015	0.5702	0.010	0.3690	0.001	0.2026	0.005	0.0944	0.002	0.0252	0.002
195	0.9667	0.014	0.5702	0.010	0.3693	0.001	0.2032	0.005	0.0947	0.002	0.0256	0.002
210	0.9668	0.014	0.5703	0.010	0.3695	0.001	0.2037	0.005	0.0949	0.002	0.0257	0.002
225	0.9669	0.014	0.5703	0.010	0.3696	0.001	0.2040	0.005	0.0951	0.002	0.0258	0.002
240	0.9671	0.014	0.5705	0.010	0.3697	0.001	0.2042	0.005	0.0953	0.002	0.0259	0.002
255	0.9678	0.015	0.5704	0.011	0.3699	0.001	0.2045	0.005	0.0955	0.002	0.0260	0.002
270	0.9682	0.015	0.5705	0.011	0.3700	0.001	0.2047	0.005	0.0956	0.002	0.0261	0.002
285	0.9687	0.016	0.5705	0.011	0.3701	0.001	0.2050	0.005	0.0957	0.001	0.0262	0.002
300	0.9691	0.016	0.5706	0.0106	0.3703	0.001	0.2052	0.005	0.0958	0.002	0.0263	0.002

Cuadro 16. Ecuaciones para determinar la actividad antioxidante de los extractos a diferentes tiempos en el ensayo de FRAP a partir de Trólox.

Tiempo (s)	FRAP	
	Ecuación para cada minuto de reacción	
60	$y = -0.46\ln(x) + 0.936$	$R^2 = 0.980$
120	$y = -0.53\ln(x) + 0.953$	$R^2 = 0.998$
180	$y = -0.53\ln(x) + 0.953$	$R^2 = 0.998$
240	$y = -0.53\ln(x) + 0.953$	$R^2 = 0.998$
300	$y = -0.53\ln(x) + 0.954$	$R^2 = 0.998$

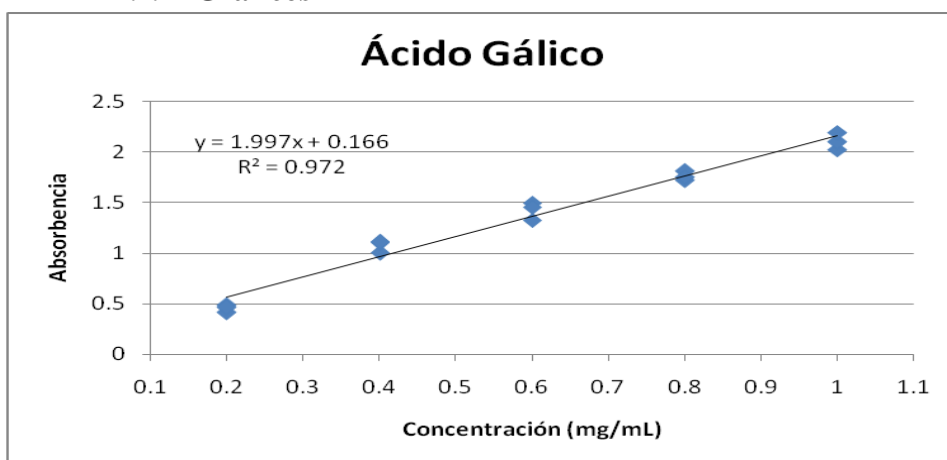
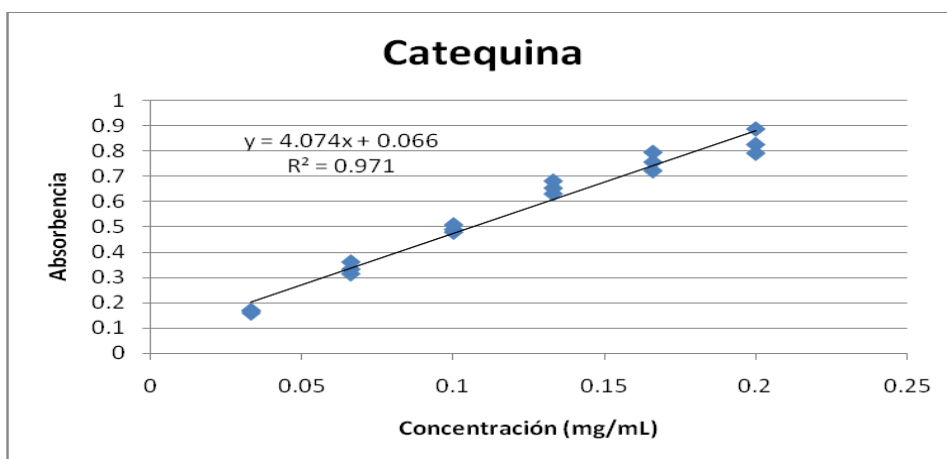
Cuadro 17. Absorbencias promedio obtenidas a partir del extracto sobre el reactivo de FRAP.

Tiempo (s)	FRAP									
	Absorbencias									
	Em1 1/100		Ee2 1/100		Em3 1/200		Sm1 1/10		Se2 1/10	
	\bar{Y}	σ	\bar{Y}	σ	\bar{Y}	σ	\bar{Y}	σ	\bar{Y}	σ
60	0.0301	0.011	0.0853	0.004	0.8621	0.057	0.5715	0.043	0.3958	0.043
120	0.0356	0.012	0.0980	0.005	1.0201	0.066	0.6643	0.053	0.4665	0.053
180	0.0439	0.015	0.1079	0.005	1.1084	0.074	0.7230	0.058	0.5142	0.058
240	0.0455	0.016	0.1146	0.006	1.1710	0.073	0.7567	0.061	0.5524	0.061
300	0.0481	0.017	0.1209	0.006	1.2160	0.073	0.7819	0.064	0.5806	0.064

Cuadro 18. Curva de catequina sobre DPPH.

Concentración (mg/mL)	% DPPH• remanente ($\bar{Y} \pm \sigma$)			
	$t=10'$	$t=20'$	$t=30'$	$t=40'$
1.0	66.51±2.10	60.35±3.15	54.23±3.46	49.15±2.63
0.8	72.14±1.30	66.90±1.86	61.32±1.88	57.89±1.91
0.6	79.45±1.63	73.95±1.59	69.17±2.43	66.91±2.46
0.4	84.94±1.32	79.27±0.81	75.76±0.40	73.23±0.69
0.2	91.32±1.59	87.18±1.65	80.87±1.19	78.16±1.76

12.2. Gráficos

**Gráfico 8.** Curva de calibración para polifenoles totales.**Gráfico 9.** Curva de calibración para flavonoides.

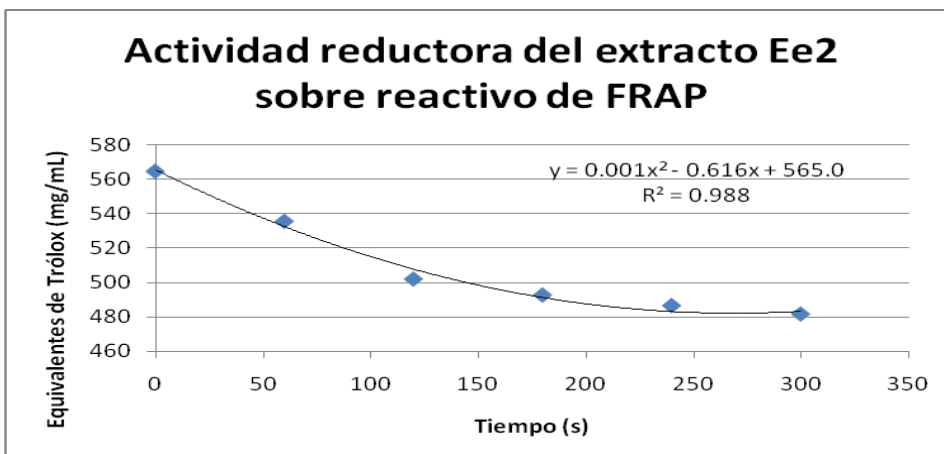


Gráfico 10. Actividad reductora de Fe (III) por efecto de Ee2.

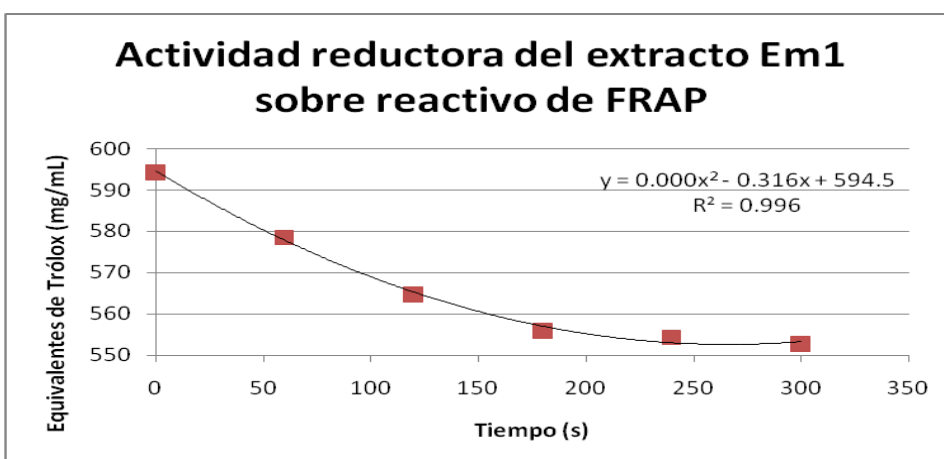


Gráfico 11. Actividad reductora de Fe (III) por efecto de Em1.

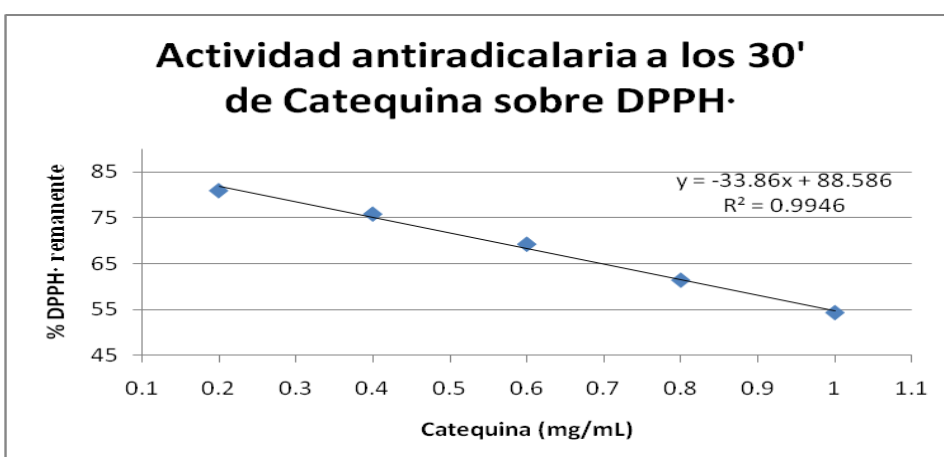


Gráfico 12. Curva estándar de catequina a los 30' de reacción sobre el radical DPPH.

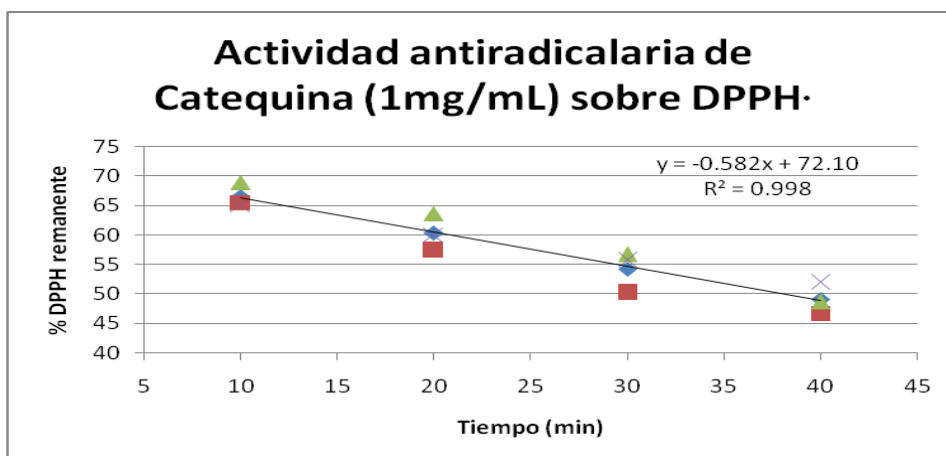


Gráfico 13. Tiempo de acción de catequina sobre DPPH•.

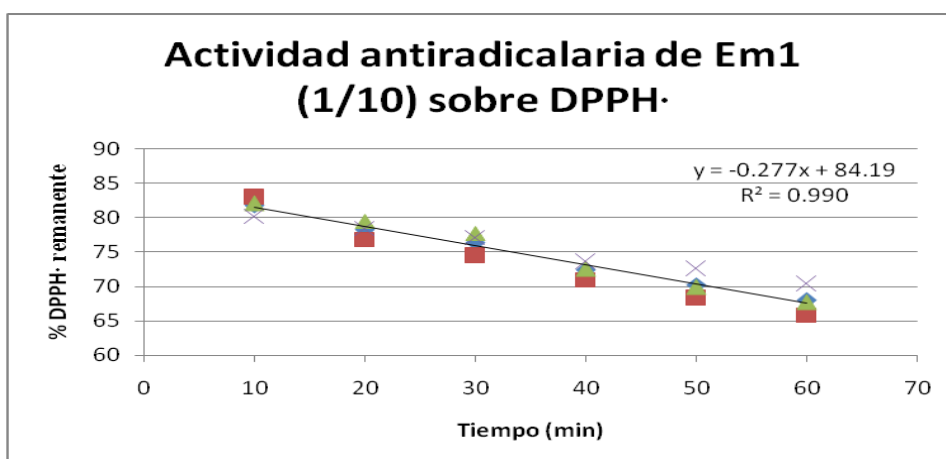


Gráfico 14. Curva de actividad antiradicalaria por Em1 (1/10) sobre DPPH• con $TEC_{50}=123$ min.

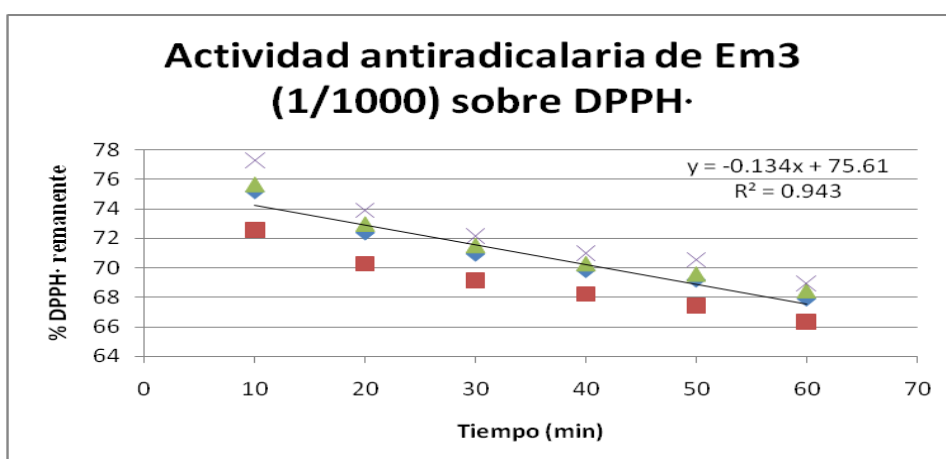


Gráfico 15. Curva de actividad antiradicalaria por Em3 (1/1000) sobre DPPH• con $TEC_{50}=191$ min.

12.3. Estadísticos

Pruebas estadísticas para polifenoles, taninos y flavonoides en los extractos de tamarindo.

Prueba de homogeneidad de varianzas

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Polifenoles	.109	4	10	.977
Taninos	2.328	4	10	.127
Flavonoides	1.236	4	10	.356

Prueba de igualdad de medias

	Estadístico de Welch	gl1	gl2	Sig.
Polifenoles	7580262.792	4	4.967	.000
Taninos	388554.812	4	4.855	.000
Flavonoides	147916.500	4	4.600	.000

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	F	Sig.
Polifenoles	Entre grupos	17478.516	4	4369.629	1.007E7	.000
	Dentro de grupos	.004	10	.000		
	Total	17478.520	14			
Taninos	Entre grupos	5177.136	4	1294.284	392064.704	.000
	Dentro de grupos	.033	10	.003		
	Total	5177.169	14			
Flavonoides	Entre grupos	440.934	4	110.233	21447.041	.000
	Dentro de grupos	.051	10	.005		
	Total	440.985	14			

Polifenoles

Duncan^a

Extracto	N	Subconjunto de $\alpha = 0.05$				
		1	2	3	4	5
Ee2	3	33.40000				
Em1	3		44.90000			
Se2	3			104.10000		
Sm1	3				106.60000	
Em3	3					113.70000
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

a. Usa media armónica para tamaño de muestra = 3.000.

TaninosDuncan^a

Extracto	N	Subconjunto de $\alpha = 0.05$				
		1	2	3	4	5
Ee2	3	34.80000				
Em1	3		41.90000			
Se2	3			53.40000		
Sm1	3				59.00000	
Em3	3					88.60000
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

a. Usa media armónica para tamaño de muestra = 3.000.

FlavonoidesDuncan^a

Extracto	N	Subconjunto de $\alpha = 0.05$				
		1	2	3	4	5
Em1	3	13.05000				
Se2	3		20.10000			
Ee2	3			20.60000		
Sm1	3				21.00000	
Em3	3					30.10000
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

a. Usa media armónica para tamaño de muestra = 3.000.

Pruebas estadísticas para ensayo de FRAP en los extractos de tamarindo.**Prueba de homogeneidad de varianzas**

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
t0	2.145	4	10	.150
t60	1.037	4	10	.435
t120	.946	4	10	.477
t180	.914	4	10	.492
t240	.893	4	10	.503
t300	.956	4	10	.472

Prueba de igualdad de medias

	Estadístico de Welch	gl1	gl2	Sig.
t0	390905.281	4	4.325	.000
t60	2907705.157	4	4.566	.000
t120	5823754.704	4	4.575	.000
t180	6861803.299	4	4.551	.000
t240	7906085.357	4	4.668	.000
t300	9050684.536	4	4.702	.000

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	F	Sig.
t0 Entre grupos	176385.919	4	44096.480	312182.255	.000
Dentro de grupos	1.413	10	.141		
Total	176387.332	14			
t60 Entre grupos	337081.921	4	84270.480	1999256.757	.000
Dentro de grupos	.422	10	.042		
Total	337082.342	14			
t120 Entre grupos	416306.011	4	104076.503	4071768.964	.000
Dentro de grupos	.256	10	.026		
Total	416306.267	14			
t180 Entre grupos	448925.685	4	112231.421	4376054.995	.000
Dentro de grupos	.256	10	.026		
Total	448925.942	14			
t240 Entre grupos	474931.176	4	118732.794	4736494.548	.000
Dentro de grupos	.251	10	.025		
Total	474931.427	14			
t300 Entre grupos	490705.565	4	122676.391	5122632.904	.000
Dentro de grupos	.239	10	.024		
Total	490705.805	14			

t0

Duncan^a

Extracto	N	Subconjunto de $\alpha = 0.05$				
		1	2	3	4	5
Sm1	3	394.62244				
Se2	3		448.57845			
Ee2	3			564.65000		
Em1	3				594.34753	
Em3	3					700.44592
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

a. Usa media armónica para tamaño de muestra = 3.000.

t300

Duncan^a

Extracto	N	Subconjunto de $\alpha = 0.05$				
		1	2	3	4	5
Em3	3	122.75641				
Sm1	3		138.82587			
Se2	3			203.27945		
Ee2	3				481.56300	
Em1	3					552.69803
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

a. Usa media armónica para tamaño de muestra = 3.000.

Pruebas estadísticas para ensayo de DPPH en los extractos de tamarindo.

Prueba de homogeneidad de varianzas

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
t10	.996	4	10	.454
t20	2.191	4	10	.143
t30	1.958	4	10	.177
t40	2.075	4	10	.159
t50	1.068	4	10	.422
t60	.847	4	10	.527

Prueba de igualdad de medias

	Estadístico de Welch	gl1	gl2	Sig.
t10	299.325	4	4.740	.000
t20	280.276	4	4.768	.000
t30	227.017	4	4.817	.000
t40	385.843	4	4.805	.000
t50	206.471	4	4.810	.000
t60	245.850	4	4.771	.000

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	F	Sig.
t10 Entre grupos	2692.751	4	673.188	256.912	.000
Dentro de grupos	26.203	10	2.620		
Total	2718.954	14			
t20 Entre grupos	4759.739	4	1189.935	124.372	.000
Dentro de grupos	95.675	10	9.568		
Total	4855.414	14			
t30 Entre grupos	6147.735	4	1536.934	181.343	.000
Dentro de grupos	84.753	10	8.475		
Total	6232.487	14			
t40 Entre grupos	6662.706	4	1665.676	278.601	.000
Dentro de grupos	59.787	10	5.979		
Total	6722.493	14			
t50 Entre grupos	7079.743	4	1769.936	311.132	.000
Dentro de grupos	56.887	10	5.689		
Total	7136.630	14			
t60 Entre grupos	7005.541	4	1751.385	407.325	.000
Dentro de grupos	42.997	10	4.300		
Total	7048.539	14			

t10Duncan^a

Extracto	N	Subconjunto de $\alpha = 0.05$				
		1	2	3	4	5
Sm1	3	47.69967				
Se2	3		52.21267			
Ee2	3			56.02600		
Em3	3				75.18600	
Em1	3					81.73233
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

a. Usa media armónica para tamaño de muestra = 3.000.

t20Duncan^a

Extracto	N	Subconjunto de $\alpha = 0.05$			
		1	2	3	4
Ee2	3	29.48900			
Sm1	3		46.97433		
Se2	3		49.59100		
Em3	3			72.38567	
Em1	3				78.24667
Sig.		1.000	.325	1.000	1.000

a. Usa media armónica para tamaño de muestra = 3.000.

t30Duncan^a

Extracto	N	Subconjunto de $\alpha = 0.05$			
		1	2	3	4
Ee2	3	20.17833			
Se2	3		44.98733		
Sm1	3		46.19767		
Em3	3			70.92633	
Em1	3				76.41133
Sig.		1.000	.622	1.000	1.000

a. Usa media armónica para tamaño de muestra = 3.000.

t40Duncan^a

Extracto	N	Subconjunto de $\alpha = 0.05$		
		1	2	3
Ee2	3	14.89767		
Se2	3		41.03300	
Sm1	3		44.98033	
Em3	3			69.81467
Em1	3			72.36200
Sig.		1.000	.076	.231

a. Usa media armónica para tamaño de muestra = 3.000.

t50Duncan^a

Extracto	N	Subconjunto de $\alpha = 0.05$			
		1	2	3	4
Ee2	3	11.50667			
Se2	3		39.22900		
Sm1	3			44.32933	
Em3	3				69.18133
Em1	3				70.25200
Sig.		1.000	1.000	1.000	.595

a. Usa media armónica para tamaño de muestra = 3.000.

t60Duncan^a

Extracto	N	Subconjunto de $\alpha = 0.05$			
		1	2	3	4
Ee2	3	9.69000			
Se2	3		38.72200		
Sm1	3			44.01467	
Em3	3				67.89000
Em1	3				67.93833
Sig.		1.000	1.000	1.000	.978

a. Usa media armónica para tamaño de muestra = 3.000.

Pruebas estadísticas para actividad antioxidante de las SFP.

Prueba de homogeneidad de varianzas

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
t15SFP	1.818	27	56	.030
t30SFP	1.645	27	56	.058
t45SFP	1.409	27	56	.139

Prueba de igualdad de medias

	Estadístico de Welch	gl1	gl2	Sig.
t15SFP	396.904	27	20.030	.000
t30SFP	473.034	27	20.012	.000
t45SFP	570.847	27	19.978	.000

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	F	Sig.
t15SFP Entre grupos	36018.825	27	1334.031	274.533	.000
Dentro de grupos	272.119	56	4.859		
Total	36290.944	83			
t30SFP Entre grupos	36878.006	27	1365.852	354.732	.000
Dentro de grupos	215.621	56	3.850		
Total	37093.627	83			
t45SFP Entre grupos	40131.039	27	1486.335	481.910	.000
Dentro de grupos	172.719	56	3.084		
Total	40303.758	83			

t15SFP

Duncan^a

Formulación	N	Subconjunto de $\alpha = 0.05$													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1.00	3	5.1400													
5.00	3	6.4767	6.4767												
2.20	3		9.3400	9.3400											
1.10	3			11.0033	11.0033										
2.30	3			11.2867	11.2867	11.2867									
1.20	3			11.9633	11.9633	11.9633	11.9633								
2.00	3			12.9700	12.9700	12.9700	12.9700								
1.30	3				13.7633	13.7633	13.7633								
2.10	3				14.9000	14.9000	14.9000								
3.30	3					15.1833	15.1833								
6.00	3						15.9533								
4.00	3							29.0900							
5.10	3							31.2367							
5.20	3								38.3400						
5.30	3								38.5467						
6.10	3								38.8967						
3.10	3								41.0533	41.0533					
6.20	3								41.6600	41.6600					
3.20	3									43.9400					
4.30	3									44.3567	44.3567				
4.10	3										47.9500	47.9500			
4.20	3											48.1600			
3.00	3											48.9200			
6.30	3												55.9667		
7.10	3													64.8867	
7.00	3													65.4000	
7.20	3														71.1533
7.30	3														73.3800
Sig.		.461	.117	.076	.061	.061	.055	.238	.105	.099	.051	.616	1.000	.777	.221

a. Usa media armónica para tamaño de muestra = 3.000.

t30SFP

Duncan^a

Formulación	N	Subconjunto de $\alpha = 0.05$													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1.00	3	6.0433													
5.00	3	8.9033	8.9033												
1.10	3		10.6833	10.6833											
1.20	3		11.7400	11.7400	11.7400										
2.20	3			12.9233	12.9233										
2.00	3			13.5267	13.5267										
1.30	3			13.9033	13.9033										
2.30	3				15.2733	15.2733									
6.00	3					18.1100	18.1100								
3.30	3					18.2167	18.2167								
2.10	3						19.4033								
4.00	3							30.4300							
5.10	3								35.9367						
5.20	3									40.3000					
5.30	3									41.3433					
4.30	3										46.4000				
4.20	3										48.4867	48.4867			
6.10	3										49.5133	49.5133			
4.10	3											51.1300			
6.20	3											51.6333			
3.00	3											51.9933			
3.10	3												56.0100		
3.20	3													59.9767	
7.10	3														63.9133
7.30	3														65.1100
7.20	3														65.4300
6.30	3														66.0800
7.00	3														67.2000
Sig.		.080	.099	.077	.052	.087	.452	1.000	1.000	.518	.071	.054	1.000	1.000	.071

a. Usa media armónica para tamaño de muestra = 3.000.

t45SFP

Duncan^a

Formulación	N	Subconjunto de $\alpha = 0.05.05$															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1.00	3	7.140															
5.00	3	9.063	9.063														
1.10	3		10.587	10.587													
2.20	3		12.113	12.113	12.113												
1.20	3		12.180	12.180	12.180												
2.00	3			13.010	13.010												
2.30	3				13.837												
1.30	3				14.507												
6.00	3				14.663												
2.10	3					18.790											
3.30	3					19.793											
5.30	3						24.720										
5.20	3							29.097									
4.00	3								33.900								
5.10	3								33.960								
6.10	3									43.037							
3.10	3									44.253							
3.20	3										47.743						
3.00	3										49.267	49.267					
4.30	3										49.353	49.353					
4.20	3										50.783	50.783	50.783				
6.20	3											51.633	51.633				
4.10	3												52.637				
6.30	3													61.913			
7.10	3														69.113		
7.30	3														71.880	71.880	
7.20	3															73.743	73.743
7.00	3																75.063
Sig.		.185	.050	.129	.125	.487	1.000	1.000	.967	.400	.056	.138	.229	1.000	.059	.199	.361

a. Usa media armónica para tamaño de muestra = 3.000.

Pruebas estadísticas para contenido de polifenoles en SFP.**Prueba de homogeneidad de varianzas**

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
SFP	3.466	20	42	.000

Prueba de igualdad de medias

	Estadístico de Welch	gl1	gl2	Sig.
SFP

Prueba de igualdad de medias no se puede realizar en SFP, porque al menos un grupo tiene varianza 0.

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	F	Sig.
SFP Entre grupos	.000	20	.000	405.050	.000
Dentro de grupos	.000	42	.000		
Total	.000	62			

SFP

Duncan^a

Formulación	N	Subconjunto de $\alpha = 0.05$							
		1	2	3	4	5	6	7	8
2.20	3	.000000							
2.30	3	.000000							
3.20	3	.000000							
4.10	3	.000000							
6.20	3	.000000							
6.30	3	.000000							
7.20	3	.000000							
7.30	3	.000000							
5.20	3	.000167	.000167						
4.20	3		.000367	.000367					
2.10	3			.000633	.000633				
5.10	3			.000667	.000667				
7.10	3			.000667	.000667				
4.30	3				.000767				
5.30	3				.000933				
1.10	3					.002867			
1.30	3						.003233		
3.30	3						.003400		
1.20	3							.004367	
3.10	3								.005800
6.10	3								.005800
Sig.		.314	.156	.052	.058	1.000	.235	1.000	1.000

a. Usa media armónica para tamaño de muestra = 3.000.

Pruebas estadísticas para espesores en películas proteína-almidón.

Prueba de homogeneidad de varianzas

Espesor

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
9.208	27	644	.000

Prueba de igualdad de medias

Espesor

Estadístico de Welch	gl1	gl2	Sig.
43.192	27	230.324	.000

ANOVA

Espesor

	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	F	Sig.
Entre grupos	.226	27	.008	17.972	.000
Dentro de grupos	.299	644	.000		
Total	.525	671			

Espesor

Duncan^a

Formulación	N	Subconjunto de $\alpha = 0.05$										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
5.00	24	.10446										
6.20	24	.11508	.11508									
5.20	24	.11625	.11625	.11625								
4.30	24	.11633	.11633	.11633								
5.10	24	.11675	.11675	.11675	.11675							
4.10	24	.11700	.11700	.11700	.11700							
4.20	24		.11925	.11925	.11925							
5.30	24		.12129	.12129	.12129	.12129						
3.30	24		.12171	.12171	.12171	.12171						
2.10	24		.12446	.12446	.12446	.12446						
3.10	24		.12508	.12508	.12508	.12508	.12508					
4.00	24		.12604	.12604	.12604	.12604	.12604					
3.00	24		.12821	.12821	.12821	.12821	.12821	.12821				
2.30	24		.12862	.12862	.12862	.12862	.12862	.12862				
2.20	24		.12925	.12925	.12925	.12925	.12925	.12925				
6.00	24			.13013	.13013	.13013	.13013	.13013				
6.10	24				.13125	.13125	.13125	.13125				
3.20	24					.13454	.13454	.13454				
6.30	24						.13900	.13900	.13900			
1.10	24						.13925	.13925	.13925			
2.00	24							.14067	.14067			
1.20	24								.14879	.14879		
1.00	24									.15521	.15521	
1.30	24									.15913	.15913	
7.00	24									.16142	.16142	
7.10	24										.16467	
7.20	24										.16621	.16621
7.30	24											.17829
Sig.		.078	.063	.070	.056	.078	.056	.093	.154	.064	.118	.053

a. Usa media armónica para tamaño de muestra = 3.000.

Pruebas estadísticas para propiedades fisicoquímicas de la película solubilizada.

Prueba de homogeneidad de varianzas

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
PeliSoluble	1.872	27	56	.024
ProtSoluble	5.114	27	56	.000
PoliSoluble	5.115	27	56	.000

Prueba de igualdad de medias

	Estadístico de Welch	gl1	gl2	Sig.
PeliSoluble	114.189	27	19.882	.000
ProtSoluble
PoliSoluble

Pruebas de igualdad de medias no se pueden realizar en ProtSoluble y PoliSoluble, porque al menos algún grupo tiene varianza 0.

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	F	Sig.
PeliSoluble Entre grupos	15811.333	27	585.605	96.460	.000
Dentro de grupos	339.973	56	6.071		
Total	16151.307	83			
ProtSoluble Entre grupos	4.973	27	.184	200.899	.000
Dentro de grupos	.051	56	.001		
Total	5.024	83			
PoliSoluble Entre grupos	.397	27	.015	1303.773	.000
Dentro de grupos	.001	56	.000		
Total	.397	83			

PeliSoluble

Duncan^a

Formulación	N	Subconjunto de $\alpha = 0.05$										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1.20	3	5.2667										
1.30	3	5.4333										
5.00	3		10.3333									
2.20	3			21.1333								
2.30	3			21.2667								
4.00	3			21.4000								
5.10	3			23.1333								
6.20	3				28.7333							
1.10	3				29.1000	29.1000						
5.20	3				30.3667	30.3667	30.3667					
3.00	3				31.0667	31.0667	31.0667					
3.20	3				31.3000	31.3000	31.3000					
1.00	3					33.3333	33.3333					
4.10	3						34.5333					
6.10	3						34.5667					
4.20	3						34.7333					
2.00	3							39.4333				
4.30	3							39.8333				
5.30	3							40.0000				
6.00	3							40.3667	40.3667			
3.30	3							41.4000	41.4000	41.4000		
2.10	3							42.1333	42.1333	42.1333		
3.10	3								44.6000	44.6000		
6.30	3									45.5000		
7.00	3										52.5333	
7.10	3										53.8333	53.8333
7.30	3											57.7000
7.20	3											58.0333
Sig.		.934	1.000	.373	.264	.064	.064	.249	.058	.067	.521	.052

a. Usa media armónica para tamaño de muestra = 3.000.

ProtSoluble

Duncan^a

Formulación	N	Subconjunto de $\alpha = 0.05$											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
7.00	3	.000000											
7.10	3	.000000											
7.20	3	.000000											
7.30	3	.000000											
1.00	3		.116833										
1.10	3		.137100										
1.30	3		.153467										
1.20	3		.159133										
6.30	3			.338800									
6.20	3			.376167	.376167								
4.30	3			.384733	.384733								
2.10	3			.388767	.388767								
2.00	3			.412233	.412233								
6.00	3			.412733	.412733								
6.10	3				.461233	.461233							
4.10	3					.466267							
5.10	3					.505433							
3.10	3						.564700						
3.30	3						.572667						
2.20	3						.611700	.611700					
5.30	3							.627800	.627800				
5.00	3							.640700	.640700	.640700			
2.30	3							.650000	.650000	.650000			
4.20	3							.660833	.660833	.660833			
3.20	3								.673367	.673367	.673367		
3.00	3									.694633	.694633		
5.20	3										.717467	.717467	
4.00	3											.751700	
Sig.		1.000	.124	.069	.195	.065	.096	.077	.081	.106	.055	.097	.172

a. Usa media armónica para tamaño de muestra = 3.000.

PoliSoluble

Duncan^a

Formulación	N	Subconjunto de $\alpha = 0.05$														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1.00	3	.00000														
2.00	3	.00000														
3.00	3	.00000														
4.00	3	.00000														
5.00	3	.00000														
6.00	3	.00000														
7.00	3	.00000														
1.10	3	.00290														
2.20	3	.00617	.00617													
7.10	3		.01040													
7.30	3			.01933												
4.30	3			.02027	.02027											
3.20	3				.02557											
5.30	3					.03337										
3.30	3						.05263									
5.10	3							.06187								
7.20	3							.06467	.06467							
4.10	3							.06580	.06580	.06580						
4.20	3							.06690	.06690	.06690						
1.20	3								.06943	.06943	.06943					
5.20	3									.07170	.07170					
1.30	3										.07353					
6.10	3											.11133				
6.30	3												.15347			
2.30	3												.15677			
2.10	3													.18600		
6.20	3														.21947	
3.10	3															.23523
Sig.		.060	.128	.735	.058	1.000	1.000	.099	.118	.053	.164	1.000	.234	1.000	1.000	1.000

a. Usa media armónica para tamaño de muestra = 3.000.

Pruebas estadísticas para contenido de polifenoles en la solución solubilizadora de películas proteína-almidón.

Prueba de homogeneidad de varianzas

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Película	3.346	20	42	.000

Prueba de igualdad de medias

	Estadístico de Welch	gl1	gl2	Sig.
Película	3112.608	20	15.066	.000

Efecto de la incorporación de extracto de tamarindo (*Tamarindus indica*) con actividad antioxidante en la elaboración y funcionalidad de películas biodegradables proteína-almidón.

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	F	Sig.
Película Entre grupos	.160	20	.008	588.385	.000
Dentro de grupos	.001	42	.000		
Total	.161	62			

Película

Duncan^a

Formulación	N	Subconjunto de $\alpha = 0.05$													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1.10	3	.00290													
2.10	3	.00617	.00617												
7.10	3		.01040												
7.30	3			.01933											
4.30	3			.02027											
3.10	3			.02557											
5.30	3				.03337										
3.20	3					.05263									
3.30	3						.06103								
5.10	3						.06187								
7.20	3						.06467	.06467							
4.10	3						.06580	.06580	.06580						
4.20	3						.06690	.06690	.06690						
1.20	3							.06943	.06943	.06943					
5.20	3								.07170	.07170					
1.30	3									.07353	.07353				
6.10	3										.07833				
6.30	3											.12043			
2.20	3												.15677		
2.30	3													.16390	
6.20	3														.18647
Sig.		.284	.167	.056	1.000	1.000	.088	.156	.079	.206	.118	1.000	1.000	1.000	1.000

a. Usa media armónica para tamaño de muestra = 3.000.

Pruebas estadísticas para actividad antioxidante en la solución solubilizadora de películas proteína-almidón.

Prueba de homogeneidad de varianzas

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
t15Pel	2.183	27	56	.007
t30Pel	2.280	27	56	.005
t45Pel	2.222	27	56	.006

Prueba de igualdad de medias

	Estadístico de Welch	gl1	gl2	Sig.
t15Pel	51.226	27	20.008	.000
t30Pel	151.933	27	20.002	.000
t45Pel	403.955	27	20.005	.000

Efecto de la incorporación de extracto de tamarindo (*Tamarindus indica*) con actividad antioxidante en la elaboración y funcionalidad de películas biodegradables proteína-almidón.

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	F	Sig.
t15Pel Entre grupos	7091.648	27	262.654	53.945	.000
Dentro de grupos	272.659	56	4.869		
Total	7364.307	83			
t30Pel Entre grupos	11610.039	27	430.001	106.485	.000
Dentro de grupos	226.136	56	4.038		
Total	11836.175	83			
t45Pel Entre grupos	27399.776	27	1014.807	251.159	.000
Dentro de grupos	226.268	56	4.040		
Total	27626.043	83			

t15Pel

Duncan^a

Formulación	N	Subconjunto de $\alpha = 0.05$										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
5.10	3	.5600										
7.20	3	.8100										
2.00	3	1.1400										
1.20	3	1.3933	1.3933									
2.20	3	2.0200	2.0200	2.0200								
2.30	3	2.4533	2.4533	2.4533								
2.10	3	2.4833	2.4833	2.4833								
1.10	3	2.5100	2.5100	2.5100								
1.30	3	2.7800	2.7800	2.7800								
4.00	3	2.8900	2.8900	2.8900								
7.30	3	2.9600	2.9600	2.9600								
4.20	3	3.0233	3.0233	3.0233								
4.10	3	3.0600	3.0600	3.0600								
4.30	3	4.3567	4.3567	4.3567	4.3567							
1.00	3	4.3900	4.3900	4.3900	4.3900							
6.20	3		5.7167	5.7167	5.7167	5.7167						
7.00	3		5.7267	5.7267	5.7267	5.7267						
5.30	3			5.9100	5.9100	5.9100						
5.00	3				8.0333	8.0333						
5.20	3					8.8533	8.8533					
7.10	3						12.1700	12.1700				
6.30	3							12.7667				
6.10	3								13.5600			
6.00	3									18.6000		
3.00	3										23.5800	
3.30	3											27.7167
3.10	3											29.0433
3.20	3											32.9500
Sig.		.085	.050	.079	.078	.127	.071	.473	1.000	1.000	.465	1.000

a. Usa media armónica para tamaño de muestra = 3.000.

t30Pel

Duncan^a

Formulación	N	Subconjunto de $\alpha = 0.05$										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
2.00	3	1.5333										
2.30	3	1.6533										
7.20	3	1.7267	1.7267									
1.20	3	2.4467	2.4467	2.4467								
7.30	3	2.6800	2.6800	2.6800	2.6800							
2.20	3	2.8467	2.8467	2.8467	2.8467							
1.10	3	3.6667	3.6667	3.6667	3.6667							
4.10	3	3.8567	3.8567	3.8567	3.8567	3.8567						
2.10	3	4.4500	4.4500	4.4500	4.4500	4.4500						
1.30	3	4.5600	4.5600	4.5600	4.5600	4.5600						
1.00	3	5.0500	5.0500	5.0500	5.0500	5.0500						
7.00	3		5.5533	5.5533	5.5533	5.5533						
4.20	3			5.6433	5.6433	5.6433						
4.00	3			6.1933	6.1933	6.1933	6.1933					
6.20	3			6.2733	6.2733	6.2733	6.2733					
5.10	3			6.4433	6.4433	6.4433	6.4433					
5.30	3			6.5900	6.5900	6.5900	6.5900					
4.30	3				7.6600	7.6600	7.6600					
5.00	3					9.8033	9.8033					
6.30	3						14.3567					
6.10	3						15.0567					
7.10	3						15.1200					
5.20	3						15.3367					
3.00	3							20.7333				
3.20	3							21.5333	21.5333			
6.00	3								24.5833			
3.30	3									29.6700		
3.10	3										58.0700	
Sig.		.077	.053	.056	.052	.056	.057	.593	.628	.068	1.000	1.000

a. Usa media armónica para tamaño de muestra = 3.000.

t45Pel

Duncan^a

Formulación	N	Subconjunto de $\alpha = 0.05$													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
2.00	3	2.2233													
7.30	3	2.8300													
7.20	3	2.9200													
2.30	3	2.9533													
1.20	3	3.3067													
2.20	3	3.4133													
4.10	3	3.4833													
2.10	3	4.1500	4.1500												
1.30	3	4.9833	4.9833	4.9833											
1.00	3	5.2667	5.2667	5.2667											
4.00	3	5.6567	5.6567	5.6567											
4.20	3	6.1167	6.1167	6.1167	6.1167										
1.10	3		7.5500	7.5500	7.5500										
6.20	3			7.9933	7.9933	7.9933									
4.30	3			8.3200	8.3200	8.3200									
5.10	3			8.6700	8.6700	8.6700	8.6700								
7.00	3			9.6067	9.6067	9.6067	9.6067								
5.30	3				11.3333	11.3333	11.3333								
5.00	3					12.1567	12.1567	12.1567							
3.00	3						12.8367	12.8367							
5.20	3							14.9233	14.9233						
6.30	3								16.6500						
7.10	3								16.9167						
6.10	3									23.9800					
3.20	3										27.7333				
6.00	3											33.0133			
3.10	3												67.2100		
3.30	3													79.1233	
Sig.		.051	.073	.058	.066	.073	.056	.076	.117	.258	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

a. Usa media armónica para tamaño de muestra = 3.000.

Pruebas estadísticas para propiedades mecánicas de películas proteína-almidón.**Prueba de homogeneidad de varianzas**

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Fuerza Tensión	3.344	26	54	.000
Elongación	2.935	26	54	.000
Young	9.312	26	54	.000
Ratio	5.738	26	54	.000

Prueba de igualdad de medias

	Estadístico de Welch	gl1	gl2	Sig.
Fuerza Tensión	1295.720	26	19.230	.000
Elongación	256.792	26	19.324	.000
Young	500.579	26	19.101	.000
σ/ε	202.965	26	19.112	.000

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	F	Sig.
Fuerza Tensión	Entre grupos	1249.988	26	48.076	169.649	.000
	Dentro de grupos	15.303	54	.283		
	Total	1265.291	80			
Elongación	Entre grupos	7582.700	26	291.642	30.622	.000
	Dentro de grupos	514.286	54	9.524		
	Total	8096.986	80			
Young	Entre grupos	1523.607	26	58.600	225.124	.000
	Dentro de grupos	14.056	54	.260		
	Total	1537.663	80			
σ/ε	Entre grupos	348.064	26	13.387	18.843	.000
	Dentro de grupos	38.364	54	.710		
	Total	386.429	80			

Fuerza a la tensión (σ)Duncan^a

Formulación	N	Subconjunto de $\alpha = 0.05$													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
5.000	3	.3857													
6.100	3	.8110	.8110												
7.000	3		1.3867												
6.200	3		1.5703												
4.000	3		1.6807												
5.100	3			3.1307											
4.200	3			3.3827											
6.300	3			3.7870	3.7870										
7.100	3			3.8007	3.8007										
5.300	3			3.9217	3.9217										
5.200	3			3.9333	3.9333										
4.300	3				4.5273	4.5273									
7.300	3				4.6077	4.6077									
3.100	3					5.2967	5.2967								
4.100	3						5.7953	5.7953							
3.200	3						5.8533	5.8533							
3.000	3							6.3150	6.3150						
7.200	3								6.8590						
1.000	3									8.0300					
3.300	3									8.6383	8.6383				
2.200	3									8.8460	8.8460				
2.300	3										9.0280				
2.000	3										9.1913				
2.100	3											10.1830			
1.100	3												12.1910		
1.300	3													13.7897	
1.200	3														16.2350
Sig.		.332	.072	.111	.103	.100	.233	.266	.216	.081	.254	1.000	1.000	1.000	1.000

a. Usa media armónica para tamaño de muestra = 3.000.

% de Elongación (ϵ)Duncan^a

Formulación	N	Subconjunto de $\alpha = 0.05$																				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14							
7.200	3	3.405																				
7.100	3	6.207	6.207																			
2.300	3	6.242	6.242																			
2.200	3	7.086	7.086	7.086																		
7.300	3	8.619	8.619	8.619	8.619																	
4.100	3	8.657	8.657	8.657	8.657																	
5.000	3	8.988	8.988	8.988	8.988																	
4.000	3		10.958	10.958	10.958	10.958																
3.000	3			12.580	12.580	12.580	12.580															
6.100	3				13.314	13.314	13.314	13.314														
1.100	3					15.128	15.128	15.1283	15.1283													
7.000	3						17.217	17.2167	17.2167	17.2167												
3.200	3							17.577	17.5777	17.5777	17.5777											
2.000	3								17.729	17.7290	17.7290	17.7290										
4.200	3									17.983	17.9827	17.9827	17.9827									
1.200	3										18.9223	18.9223	18.9223	18.9223								
3.300	3											19.2377	19.2377	19.2377								
1.000	3												20.8690	20.8690	20.8690							
3.100	3													21.9283	21.9283							
6.300	3														23.5260							
1.300	3															26.3140						
5.300	3																26.3293					
2.100	3																	26.5160				
4.300	3																		28.1750			
6.200	3																			30.5677		
5.200	3																				38.4667	
5.100	3																					42.6320
Sig.		.059	.109	.059	.108	.137	.068	.058	.054	.116	.057	.053	.105	.139	.104							

a. Usa media armónica para tamaño de muestra = 3.000.

Young (E)

Duncan^a

Formulación	N	Subconjunto de $\alpha = 0.05$															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12				
5.000	3	.06657															
7.000	3	.15413															
6.100	3	.22220	.22220														
4.000	3	.29240	.29240														
6.200	3	.29447	.29447														
5.100	3	.34613	.34613														
5.200	3	.50323	.50323	.50323													
5.300	3	.51890	.51890	.51890													
6.300	3	.53110	.53110	.53110													
4.200	3	.68000	.68000	.68000	.68000												
4.300	3	.79093	.79093	.79093	.79093												
7.100	3	.87243	.87243	.87243	.87243												
3.100	3		1.18603	1.18603	1.18603	1.18603											
3.000	3			1.33540	1.33540	1.33540	1.33540										
3.200	3			1.37327	1.37327	1.37327	1.37327										
7.300	3				1.62577	1.62577	1.62577										
3.300	3					1.93137	1.93137	1.93137									
1.000	3						1.94590	1.94590	1.94590								
4.100	3							2.22567	2.22567	2.22567							
2.200	3								2.77577	2.77577							
2.300	3									2.90593	2.90593						
1.100	3										3.00073	3.00073					
2.000	3											3.01707	3.01707				
1.300	3												3.74393				
1.200	3													3.74393			
7.200	3														4.44873		
2.100	3															5.53913	
2.100	3																23.36067
Sig.		.113	.056	.081	.053	.116	.065	.068	.095	.070	.096	1.000	1.000				

a. Usa media armónica para tamaño de muestra = 3.000.

Proporción σ/ϵ Duncan^a

Formulación	N	Subconjunto de $\alpha = 0.05$										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
2.100	3	.43808										
7.200	3	1.25098	1.25098									
4.100	3		2.60513	2.60513								
7.300	3			2.82683	2.82683							
2.000	3			3.07114	3.07114	3.07114						
2.300	3			3.11330	3.11330	3.11330						
2.200	3			3.18582	3.18582	3.18582						
1.200	3			3.65688	3.65688	3.65688	3.65688					
1.300	3			3.72779	3.72779	3.72779	3.72779					
6.100	3			3.85513	3.85513	3.85513	3.85513	3.85513				
1.100	3			4.07522	4.07522	4.07522	4.07522	4.07522				
1.000	3			4.16340	4.16340	4.16340	4.16340	4.16340	4.16340			
3.200	3			4.29634	4.29634	4.29634	4.29634	4.29634	4.29634	4.29634		
7.100	3			4.35877	4.35877	4.35877	4.35877	4.35877	4.35877	4.35877		
3.300	3				4.48200	4.48200	4.48200	4.48200	4.48200	4.48200		
3.100	3				4.54359	4.54359	4.54359	4.54359	4.54359	4.54359		
4.200	3					4.98110	4.98110	4.98110	4.98110	4.98110		
6.200	3						5.37115	5.37115	5.37115	5.37115		
3.000	3						5.43674	5.43674	5.43674	5.43674		
4.300	3							5.75108	5.75108	5.75108		
4.000	3							5.76016	5.76016	5.76016		
5.000	3								5.85200	5.85200		
6.300	3										7.31204	
5.300	3										7.56478	7.56478
5.200	3										7.92134	7.92134
5.100	3											8.98720
7.000	3											8.99261
Sig.		.243	.054	.060	.066	.080	.111	.056	.054	.061	.410	.062

a. Usa media armónica para tamaño de muestra = 3.000.

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la
Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**Efecto de la incorporación de extracto de Tamarindo (*Tamarindus indica*)
con actividad antioxidante en la elaboración y funcionalidad de películas
biodegradables proteína-almidón.**

Qué presentó

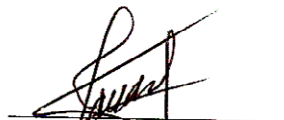
Q. A. Luis Humberto López Hernández

El día 25 de Agosto del 2010.

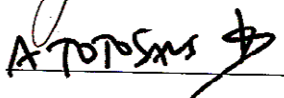
Director: Dra. Edith Ponce Alquicira
Universidad Autónoma Metropolitana



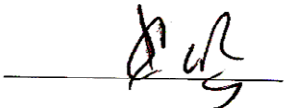
Jurado
Asesor: Dr. Jorge Soriano Santos
Universidad Autónoma Metropolitana



Asesor: Dr. Alfonso Totosaus Sánchez
Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec



Sinodal: Dr. Carlos Regalado González
Universidad Autónoma de Querétaro



Sinodal: Dra. Baciliza Quintero Salazar
Universidad Autónoma del Estado de México

