



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Producción y aplicación de películas de proteína-almidón con actividad antioxidante y antimicrobiana

TESIS

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

PRESENTA:

M. en B. LUIS HUMBERTO LÓPEZ HERNÁNDEZ

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Edith Ponce Alquicira

ASESORES

Dr. Jorge Soriano Santos

Dra. Patricia Severiano Pérez

Ciudad de México

Junio, 2018

El Programa de Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001466”.

Esta tesis fue realizada con el apoyo de la beca No. 268032 otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT: Convocatoria Becas CONACYT Nacionales periodo Ago-Nov 2010 de septiembre 20, 2010 a septiembre 19, 2014.

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada:

“Producción y aplicación de películas de proteína-almidón con actividad antioxidante y antimicrobiana”

que presentó

M. en B. Luis Humberto López Hernández

El día 13 de Junio del año 2018

SINODALES

Dr. Jorge Soriano Santos
Departamento. Biotecnología, UAM

Dra. Patricia Severiano Pérez
Facultad de Química, UNAM

Dra. Isadora Martínez Arellano
Cátedra Conacyt-Hospital General
Dr. Manuel Gea González

Dr. Octavio Dublán García
Facultad de Química, UAEM

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

A mi esposa Esther e hijos Nathan y Nathalia, ya que por ellos los logros y sacrificios tienen sentido para el futuro, la mayor fuerza en la vida es el brillo de sus ojos y sonrisas. Los amo.

A mis padres y hermanos por su aliento a ser mejor y terminar esta etapa más de mi formación y vida.

Mis agradecimientos:

- A la Dra. Edith Ponce por darme la oportunidad de trabajar con ella para lograr esta meta, por su paciencia en este largo proceso y por su aporte para formar mi juicio profesional.
- A mi comité de asesores de la tesis, Dr. Soriano y Dra. Severiano por su excelente aporte de conocimientos para terminar este tema.
- A la Dra. Mariel Calderón por el optimismo para publicar la parte final del trabajo y por compartir su experiencia en la investigación: “La vida da vueltas y los estudiantes terminan siendo los maestros”.
- A los Dres. Hector Escalona, Isadora Arellano y Octavio Dublán por sus revisiones, consejos y apoyo.
- A la Universidad Autónoma Metropolitana, por aceptarme en su posgrado y darme la oportunidad de salir antes al ámbito profesional.
- A todos mis familiares, amigos, colegas y estudiantes que estuvieron en este largo proceso, en las buenas y en las malas, en el trabajo y en el descanso. Nombres son muchos, por ello, y para evitar “romper jarritos” a TODOS, tanto de la UNAM, de la UNAM-UAM, de la UAM, del CENID FYMA, del Laboratorio de Carnes del INIFAP, en verdad gracias por su paciencia, apoyo y ánimo... mil disculpas si me los llevé en el estrés.

CONTENIDO

CAPÍTULO		PÁGINA
	RESUMEN	VII
	ABSTRACT	X
I	INTRODUCCIÓN	1
II	HIPÓTESIS Y OBJETIVO GENERAL	3
III	DESARROLLO Y ESTABILIDAD ANTIOXIDANTE DE PELÍCULAS COMESTIBLES INCORPORADAS CON UN EXTRACTO DE LAS SEMILLAS DE TAMARINDO	4
IV	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE PELÍCULAS COMESTIBLES INCORPORADAS CON UN EXTRACTO DE LAS SEMILLAS DE TAMARINDO	27
V	PROTECCIÓN DE PELÍCULAS COMESTIBLES INCORPORADAS CON UN EXTRACTO DE LAS SEMILLAS DE TAMARINDO EN CARNE MOLIDA DE CERDO	36
VI	CONCLUSIONES GENERALES	50
VII	PERSPECTIVAS	51
VIII	REFERENCIAS	51

CUADROS		PÁGINA
1.	Propiedades mecánicas para las combinaciones experimentales en la producción de películas proteína-almidón por modelos de superficie de respuesta.	18
2.	Coefficientes de regresión de los modelos de superficie de respuesta en la elaboración de películas optimizadas proteína-almidón.	20
3.	Espesor, propiedades mecánicas, materia soluble, y actividad antioxidante de películas optimizadas de WPI-NPS añadidas con diferentes cantidades de TSE.	22
4.	Estabilidad del color y propiedades mecánicas y antioxidantes de películas optimizadas WPI-NPS añadidas con diferentes cantidades de TSE.	25
5.	Actividad antimicrobiana del extracto de semilla de tamarindo en la obtención de películas comestibles WPI-NPS en cepas microbianas de importancia en la industria cárnica.	34
6.	Estabilidad oxidativa a diferentes profundidades en carne de cerdo molida con 2% de NaCl protegida por las películas WPI-NPS.	44
7.	Efecto protector de las películas WPI-NPS adicionadas con un extracto de las semillas de tamarindo (TSE) en la superficie de carne de cerdo molida con 2% de NaCl.	46

FIGURAS	PÁGINA
1. Superficies de respuesta para: (A) fuerza a la tensión a PDT 70 °C; (B) fuerza a la tensión con Gly 6.0 g/100 mL de FFS; (C) elongación a PDT 70 °C; (D) elongación con Gly 6.0 g/100 mL de FFS; (E) Módulo de Young's a PDT 70 °C; (F) Módulo de Young's con Gly 6.0 g/100 mL de FFS; (G) Condiciones optimizadas en películas WPI-NPS a PDT 70 °C y (H) Condiciones optimizadas en películas WPI-NPS con Gly 6.0 g/mL de FFS.	19
2. Análisis de componentes principales de los datos durante el almacenamiento de películas optimizadas de WPI-NPS incorporadas con un extracto de las semillas de tamarindo (TSE). Vectores en rojo muestran la respuesta de las variables: L* = luminosidad, a* = escala de azul-rojos, b* = escala de amarillo-verdes, actividades antioxidantes ABTS+• y DPPH•, E = Módulo de Young's, σ = fuerza a la tensión y $\% \epsilon$ = elongación. En azul son las muestras durante la vida de anaquel; la primeras letras significan "F" = película control, "LT" = película incorporada con 1.26 g/100mL y "HT" = película incorporada con 12.6 g/100mL; y el número corresponde al día de almacenamiento.	24
3. Prototipo de cilindro en PVC (A) usado en la pruebas de aplicación de la película con opción para colocar películas en ambos extremos del cilindro, las películas se colocan entre el extremo del cilindro y el anillo exterior mediante presión, los anillos se sujetan al cilindro mediante tornillos en los orificios de extremo a extremo. Diseño usado para el prototipo del cilindro (B).	40
4. Cambios en el color ($p < 0.0002$) de la carne a nivel superficial (Barras = Luminosidad y Líneas = tonos amarillos) durante el almacenamiento de carne molida de cerdo con 2% de NaCl cubierta con las películas comestibles WPI-NPS incorporadas o no con TSE.	47
5. Cambios en la oxidación lipídica (Barras, $p < 0.0001$) respecto a la actividad FRAP (Líneas, $p < 0.0008$) durante el almacenamiento de carne molida de cerdo con 2% de NaCl cubierta con las películas comestibles WPI-NPS incorporadas o no con TSE.	48
6. Cambios en la oxidación proteica (Barras, $p < 0.0001$) respecto a la actividad FRAP (Líneas, $p < 0.0008$) durante el almacenamiento de carne molida de cerdo con 2% de NaCl cubierta con las películas comestibles WPI-NPS incorporadas o no con TSE.	48

RESUMEN

La demanda creciente de alimentos más nutritivos y de mayor vida de anaquel ha fomentado el desarrollo de nuevos empaques, pero es indispensable que en la fabricación se incluyan materiales biodegradables para reducir la contaminación ambiental. Por lo tanto, el desarrollo de películas y recubrimientos comestibles para los alimentos requiere de la incorporación de compuestos bioactivos para aumentar su funcionalidad y capacidad protectora. El aislado proteico de suero de leche (WPI) y el almidón nativo de papa (NPS) en combinación generarán películas con propiedades complementarias entre sí. Por otro lado, recursos naturales de bajo costo como los desechos agroindustriales, como las semillas del fruto de tamarindo, ofrecen una alternativa más en la obtención de compuestos bioactivos que pueden ser incorporados a las matrices de películas. En este trabajo se evaluó el uso de un extracto polifenólico de las semillas de tamarindo (TSE) en la formación de películas comestibles a partir del WPI y NPS, por lo que se determinaron los cambios en sus propiedades mecánicas, antioxidantes y antimicrobianas. Así como la estabilidad de sus propiedades en el almacenamiento y su aplicación bajo condiciones de laboratorio en carne de cerdo molida con la adición de 2% de NaCl. Lo anterior se realizó en tres etapas: 1) Optimización de las condiciones de elaboración de la matriz base para las películas de WPI-NPS mediante la metodología de superficies de respuesta, matriz en la que posteriormente se incorporó el TSE. Por lo que se evaluó la variación inducida sobre las propiedades mecánicas, color y antioxidantes durante el almacenamiento de las películas hasta por 35 días. 2) Evaluación de la actividad antimicrobiana de las películas WPI-NPS incorporadas con TSE sobre sepas microbianas de interés en el sector cárnico. La posible sinergia del TSE con otro antimicrobiano como la nisina también fue evaluada. 3) Aplicación de las películas WPI-NPS sobre carne de cerdo molida frente a un factor pro-oxidante como es el cloruro de sodio al 2%. Un sistema de evaluación a partir de cilindros se usó para aplicar las películas y determinar los cambios en el color, estabilidad oxidativa y antioxidante en la carne. Los resultados fueron los siguientes: 1) Para optimizar la producción de películas WPI-NPS se obtuvieron las siguientes condiciones de elaboración a partir de un diseño rotatorio central 2³: 6.2 g/100 mL de glicerol en la solución formadora de películas (FFS), a pH de 7.9 y temperatura de desnaturalización proteica (PDT) de 76 °C, que predijeron las siguientes propiedades mecánicas: E (Módulo de Young's) = 0.07 MPa, σ (Fuerza a la tensión) = 1.94 MPa y $\% \epsilon$

(Porcentaje de elongación) = 83.6 %, con una deseabilidad máxima del modelo de 0.86. La optimización fue constatada, produciendo películas control (sin la incorporación de TSE) y películas con dos diferentes niveles de TSE adicionado (1.26 y 12.6 mg/100 mL de FFS). Una vez secas las películas, se evaluaron nuevamente sus propiedades, encontrando una mejora ($p < 0.0001$) en las propiedades mecánicas al incrementar en 8% el $\% \epsilon$, y disminuir en 14% y 50% los parámetros de σ y E, respectivamente. Las películas con TSE tuvieron una coloración rojiza persistente ($p < 0.0007$) durante el almacenamiento. Respecto a la actividad antioxidante inducida por el TSE, esta aumentó hasta 2.7 veces. Cabe señalar, que el TSE por sí solo, tuvo un contenido de polifenoles (187.0 ± 0.11 mg GAE/g) y actividad antioxidante ($62.5 \pm 0.04\%$ para DPPH* y $45.6 \pm 0.14\%$ para ABTS⁺) alta comparada con otras fuentes de antioxidantes. Todas las características de las películas adicionadas con TSE permanecieron estables, aún después de 35 días de almacenamiento. 2) Se determinó la actividad antimicrobiana por la técnica de difusión en pozos. El TSE tuvo actividad ($p < 0.04$) frente a *E. coli*, *L. innocua* y *B. thermosphacta*, cepas microbianas de relevancia por su relación con la salud del consumidor y resistencia al procesado de los productos cárnicos (temperaturas de refrigeración, sales y largos periodos de almacenamiento). Dicha actividad se redujo durante el proceso de formación de las películas ($p < 0.02$), específicamente en la FFS y después del secado en la fracción soluble de la película. Sin embargo, en la prueba para encontrar una posible sinergia del TSE con nisina, el resultado fue negativo, posiblemente, la actividad de la bacteriocina se redujo en presencia de los polifenoles del extracto. 3) Previamente se implementó un sistema de cilindros de PVC para colocar las películas u otro recubrimiento sobre el alimento, bajo condiciones de refrigeración (4 °C). Una funda de papel encerado (WPS) se usó como control en la evaluación. La carne de cerdo (animales de una misma genética y alimentación) con composición constante (4% de grasa) con 2% de NaCl añadido como factor pro-oxidante, se usó para evaluar la actividad protectora por el uso de las películas. Cambios en la apariencia y en la estabilidad oxidativa hasta por 14 días de almacenamiento fueron evaluados. Adicionalmente, se generó información de la posible liberación y difusividad del TSE hacia la carne, al analizar la respuesta a nivel superficial (primeros 5 mm de profundidad) e interna (entre 5 y 20 mm de profundidad) en el sistema cilíndrico con carne. Respecto al TSE, resultó ser un compuesto sin difusividad de la película hacia el alimento, actuando principalmente a nivel superficial por contacto

induciendo una menor ($P < 0.0001$) oxidación lipídica y proteica; mientras que al interior de la carne se observó una mayor ($P < 0.02$) luminosidad y actividad antioxidante. En la comparación de las diferentes películas a los 14 días de almacenamiento, en la carne cubierta con las películas de 12.6 mg de TSE se redujo la luminosidad y los tonos amarillos ($p < 0.003$), mientras que los tonos rojos fueron constantes ($p > 0.5$). La actividad antioxidante por FRAP arrojó las mayores diferencias, manteniéndose constante cuando se usaron películas con 1.26 mg de TSE. La oxidación de la fracción proteica y lipídica a los 7 días de almacenamiento fue inversamente proporcional a la concentración de TSE usada en las películas. A los 14 días de almacenamiento, la oxidación en la carne protegida con películas al bajo nivel de TSE fue baja, contrario a lo observado con el nivel alto que incrementó la oxidación al actuar como pro-oxidante. En general, la elaboración de películas comestibles a partir de WPI y NPS incorporadas con un TSE, permitió la generación de películas estables, con propiedades mecánicas optimizadas, y actividad antioxidante y antimicrobiana extra, que lograron reducir los cambios oxidativos a nivel superficial en un alimento susceptible a la oxidación como es la carne, siendo 1.26 mg de TSE la concentración adecuada para aportar una protección extra a la carne de cerdo.

ABSTRACT

The growing demand of nutritive foods with a longer shelf life, has increased the development of new packages; but it is indispensable that biodegradable materials are included in order to decrease pollution. Therefore, the development of edible films and coats for food require the incorporation of bioactive compounds to enhance its functionality and protector capacity. The way protein isolate (WPI) in combination with native potato starch (NPS) will generate films with complementary properties inwardly. Otherwise, the low cost natural resources such as agroindustrial wastes, like tamarind seeds, offer other alternative for the obtaining of bioactive compounds which can be incorporated to the films matrices. In this project changes in mechanical, antioxidants, and antimicrobial properties by the use of a polyphenolic tamarind seeds extract (TSE) in the elaboration of WPI-NPS edible films were evaluated. Also, the storage stability of properties and the application under laboratory conditions in ground meat added with 2% of NaCl were evaluated. All of the above, was done in three stages: 1) Elaboration conditions optimization of WPI-NPS films matrix through response surface methodology, after, in the same matrix the TSE was added. So that, the induced variation over the mechanical, color, and antioxidants properties was measured during 35 days of storage. 2) Evaluation of the antimicrobial activity in WPI-NPS films added with TSE against microbial strains of interest for meat industry. The possible synergy between TSE with nisin was also evaluated. 3) Application of WPI-NPS films over ground pork in the face of a pro-oxidant factor such as 2% of sodium chloride, in an evaluation system of cylinders was used to determine changes in the color, oxidation and antioxidant activity in the meat. The results were the following: 1) For the manufacturing of the WPI-NPS films a central rotatory design 2^3 was used, and the following conditions were obtained: 6.2 g/100 mL of glycerol in the film-forming solution (FFS), at pH 7.9, and a protein denaturalization temperature (PDT) of 76 °C, that predict the following mechanical properties: E (Young's modulus) = 0.07 MPa, σ (Tensile strength) = 1.94 MPa, and $\% \epsilon$ (elongation percentage) = 83.6%, with a maximum model desirability of 0.86. The optimization with a control film and WPI-NPS edible films with two different levels of TSE (1.26 y 12.6 mg/100 ml of FFS) was verified. Once the films were dry, its properties were evaluated again, finding an improvement ($p < 0.0001$) in the mechanical properties by the increase of 8% of $\% \epsilon$, and the decrease of 50% and 14% of σ and E, respectively. The TSE films

had a persistence reddish coloration ($p < 0.05$) during storage. In regard to, the antioxidant activity induced by TSE was increased up to 2.7 times. It should be noted, that TSE by itself, had a high polyphenol content (187.0 ± 0.11 mg GAE/g) and an antioxidant activity ($62.5 \pm 0.04\%$ for DPPH[•] and $45.6 \pm 0.14\%$ for ABTS^{•+}) compared with other antioxidant sources. All the characteristics of films added with TSE stay stable, even after 35 days of storage. 2) The antimicrobial activity evaluated by the wells diffusion technic. The TSE had activity ($p < 0.05$) against *E. coli*, *L. innocua* and *B. thermosphacta*, these strains are relevant for the consumer health because their resistance to the processing of meat products (refrigeration temperatures, salts and a long storage periods). This activity decreased during the films formation process ($p < 0.02$), specifically in the FFS and after drying process, in the film soluble fraction. However, in the test made to find a possible synergy between TSE and nisin, the result was negative, possibly, the bacteriocin activity was reduced in presence of the extract polyphenols. 3) Previously was implemented a system of PVC cylinders to place the edible films or other coat in contact with meat, under refrigeration conditions (4 °C). A wax-paper sheath (WPS) was included as a control. The pork meat (from animals with the same genetic and feed) with a constant composition (4% fat), with 2% of NaCl added (as a pro-oxidant factor) was used to evaluate the protective activity by the used of the films. Appearance changes and oxidative stability over 14 days of storage were evaluated. Additionally, information about the possible release and diffusivity of TSE to the meat was generated by analyzing the response in a superficial level (first 5 mm depth) and internally (between 5 to 20 mm depth) in meat cylinders system. Regarding TSE, compound have not diffusivity from the film to the meat, acting mainly at the surface level by contact inducing a lower ($p < 0.0001$) lipid and protein oxidations; meanwhile in the interior of the meat a higher luminosity and antioxidant activity was measurement ($p < 0.02$). In the comparison of the different films at 14 days of storage, the films with 12.6 mg of TSE in the meat reduced ($p < 0.003$) the luminosity (L) and yellow tones (a*), but red tones were constant ($p > 0.5$). The antioxidant activity by FRAP showed major differences, staying constant when films with 1.26 mg TSE were used. The protein and lipid oxidation fraction, at the 7 days of storage was inversely proportional to the TSE concentration added in the films. At 14 days of storage, the oxidation remains low, only with the low TSE addition level, contrary to the high level that increase oxidation to act as a pro-oxidant. In

general, the elaboration of WPI-NPS edible films added with TSE, stable films were generated with optimized mechanical properties, and extra antioxidant and microbial activity, which achieved to reduce oxidative changes at superficial level of food susceptible to oxidation just like meat, been 1.26 mg of TSE the adequate concentration to provide extra protection to the pork.

I. INTRODUCCIÓN

Dos de los principales problemas en la conservación de alimentos es el deterioro de origen microbiano y las reacciones de oxidación de lípidos y proteínas, que se reflejan en una reducción de la aceptación por el consumidor, funcionalidad y calidad nutricional de los alimentos. Por lo anterior, se han desarrollado diversas estrategias para reducir el deterioro de los alimentos, dentro de ellas está el uso de empaques que consisten en una parte importante de los sistemas de conservación de alimentos (Han, 2000b; Quintavalla y Vicini, 2002; Suppakul *et al.*, 2003; Yam *et al.*, 2005; Ouatarra *et al.*, 2000).

A través de los años, los empaques han evolucionado para mejorar principalmente las propiedades de barrera; actualmente, el desarrollo tecnológico de estos materiales se enfrenta a un mayor número de retos; ya que el empaque además de actuar como una barrera estática de protección también debería brindar información al consumidor acerca de su estado de composición, poseer un diseño atractivo para lograr la diferenciación del producto sobre otros productos similares al captar el interés del consumidor y proveer protección activa al producto. Sin embargo, el impacto ambiental por la industria productora de empaques sintéticos cobra día a día mayor relevancia. Se estima que hasta el 2015 se generaron cerca 6,300 millones de toneladas de residuos plásticos en el mundo y se prevé que esta cifra crecerá a 12,000 millones de toneladas para el 2050, contaminando principalmente a vertederos y océanos, debido a su larga vida de más de 500 años en degradarse (Jambeck *et al.*, 2015; Geyer *et al.*, 2017). Por lo que, el desarrollo de películas y recubrimientos biodegradables son la mejor alternativa en la industria de los empaques para una gran variedad de alimentos, considerando que existen matrices que pueden llegar ser comestibles por el consumidor.

Los materiales que conforman la matriz de las películas comestibles incluyen a las proteínas, los polisacáridos y algunos lípidos, que pueden usarse de forma individual, en mezclas o en emulsiones múltiples. Los polisacáridos más comunes son almidones nativos y modificados, quitina, quitosano, alginato, dextrinas, pectinas y la celulosa o sus derivados. En el caso de proteínas destacan por su funcionalidad y transparencia las proteínas de suero de leche, además de otras como la caseína, colágeno, gelatina, gluten, zeína y soya. En general, las películas

obtenidas de proteínas o polisacáridos tienen buenas propiedades de barrera pero tienden a deshidratarse, por lo que se recomienda el uso de películas compuestas entre sí, además de la incorporación de agentes plastificantes como el glicerol para mejorar las propiedades mecánicas (Cao *et al.*, 2007; Khwaldia *et al.*, 2004; Kim y Ustunol, 2001; Tharanathan, 2003 y Wu *et al.*, 2002). Una ventaja adicional de las películas comestibles es el hecho de que pueden actuar como acarreadores de compuestos activos como los antioxidantes y los antimicrobianos, los cuales potenciarán la función protectora hacia el alimento, asegurando la calidad e inocuidad, con el incremento de la vida de anaquel del producto. Las funciones protectoras serán directamente contra los agentes responsables de alteraciones como la rancidez, decoloración y desarrollo microbiano. La adición de agentes bioactivos como los antimicrobianos y antioxidantes en materiales biodegradables para la fabricación de películas y recubrimientos en la industria de empaques para alimentos es un área en desarrollo, diversos grupos de investigación en todo el mundo realizan trabajos en este rubro (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.*, 2008 y Pranoto *et al.*, 2005).

Por otra parte, la obtención de compuestos activos es un área de muchos avances, llegando a usar hasta desechos agroindustriales con el fin de reducir costos y tener productos de actividad múltiple. Una alternativa son los agrorresiduos de la cosecha del fruto del tamarindo (*Tamarindus indica*), donde México es de los principales productores a nivel mundial. Estos residuos poseen un alto contenido de compuestos fenólicos que podrían actuar como antioxidantes y antimicrobianos (Amarowicz *et al.*, 1995 y 2008; Kroll y Rawel, 2001; Kumar y Vaithyanathan, 1990; Young *et al.*, 1993).

El reto en el desarrollo de empaques activos como las películas comestibles, es incrementar su actividad protectora con la inclusión de compuestos activos, sin disminuir sus características mecánicas, fisicoquímicas y de barrera. Las películas bi-componente son la mejor opción por su complementación, sin embargo, la incorporación de compuestos polifenólicos con actividad antioxidante y antimicrobiana podrían modificar sus características. Por lo anterior, es necesario evaluar las películas comestibles incorporadas con compuestos bio-activos, específicamente

compuestos de fácil producción pero de gran complejidad en composición, que serían parte de un sistema para prevenir las reacciones de oxidación y deterioro microbiano en alimentos debido a sus posibles propiedades de barrera, antioxidantes y antimicrobianas. Cabe mencionar que el uso de las semillas de tamarindo constituye una alternativa de bajo costo para la extracción de antioxidantes naturales al ser consideradas las semillas como un residuo agroindustrial.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVO GENERAL

Hipótesis

Las propiedades de una película comestible como empaque pueden modificarse por el proceso y los compuestos usados en su producción. Los polifenoles en las semillas de tamarindo son compuestos muy variados en estructura y actividad que pueden reaccionar con otras moléculas como proteínas y polisacáridos, aportando según el grado de interacción con los polímeros actividad antioxidante y antimicrobiana. Por lo tanto, el uso de un extracto polifenólico de las semillas de tamarindo en la producción de películas proteína-almidón podría modificar las características de la película y aportar actividad protectora frente a la oxidación y el desarrollo de microorganismos.

Objetivo general

Evaluar los cambios y estabilidad de las propiedades fisicoquímicas, mecánicas y actividad de películas bi-componente proteína-almidón producidas con la incorporación de un extracto de las semillas de tamarindo como fuente de compuestos polifenólicos con actividad antioxidante y antimicrobiana; así como su respuesta protectora al ser aplicadas en carne molida de cerdo.

III. DESARROLLO Y ESTABILIDAD ANTIOXIDANTE DE PELÍCULAS COMESTIBLES INCORPORADAS CON UN EXTRACTO DE LAS SEMILLAS DE TAMARINDO

1. Introducción

La oxidación de lípidos y proteínas es uno de los cambios nocivos más comunes en los alimentos debido a la formación de olores y sabores indeseables, cambios en la textura, pérdida de color y nutrientes que disminuyen la vida útil. La oxidación de los lípidos también induce la acumulación de metabolitos tóxicos que pueden poner en riesgo la salud humana, ya que están relacionados con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, cáncer, síndrome metabólico, entre otros (Skibsted, 2010). El uso de antioxidantes naturales presentes en frutas y verduras podría prevenir la oxidación debido a su contenido de polifenoles, que también disminuyen la absorción de productos finales dañinos de la oxidación de los lípidos dietarios (Kanner, 2007). Desde este punto de vista, las semillas de tamarindo consideradas como residuos vegetales no comestibles, incluidas las cáscaras, representan una fuente eficiente y económica de antioxidantes naturales en función de su contenido de polifenoles como la epicatequina, diferentes formas de procianidinas y taninos (Sudjaroen *et al.*, 2005, Tsuda *et al.*, 1994), entre muchos otros compuestos, que tienen la habilidad de reducir o capturar agentes generados por las especies reactivas al oxígeno y nitrógeno. De acuerdo a Soong y Barlow (2004), la actividad antioxidante evaluada por la técnica de FRAP (2486 $\mu\text{mol/g}$) y el contenido fenólico (94.5 mg EAG/g) en las semillas de tamarindo son más altas que otras frutas, como el aguacate (1484 $\mu\text{mol/g}$ y 88.2 EAG/g), la jackfruit (3 $\mu\text{mol/g}$ y 27.7 mg EAG/g) y el longan (1388 $\mu\text{mol/g}$ y 62.6 mg EAG/g). En adición, el almidón de la semilla de tamarindo posee actividad antioxidante y antimicrobiana (Chandra *et al.*, 2016). Las semillas del tamarindo representan del 33 al 40% de toda la fruta y la producción mundial del fruto es de aproximadamente 500,000 toneladas anuales (CropIndex, 2016). Por lo tanto, las 200,000 toneladas de semillas anualmente pueden ser usadas como una fuente de antioxidantes naturales.

Otra estrategia para reducir la oxidación en los alimentos es el uso de empaques o barreras naturales que actúan como protección contra el oxígeno, la luz y la humedad, con la inclusión de compuestos bioactivos (antioxidantes y antimicrobianos) dentro de la matriz formadora para extender la vida de anaquel de los productos donde son aplicados (Gómez-Estaca *et al.*, 2014; Piñeros-Hernández *et al.*, 2017). Por lo que, los extractos polifenólicos pueden ser fácilmente incorporados en películas y recubrimientos comestibles, que están elaborados de capas de polímeros como las proteínas y polisacáridos (Alvarado-González *et al.*, 2012; Falguera *et al.*, 2011; Siracusa *et al.*, 2008; Villagómez-Zavala *et al.*, 2008). Sin embargo, la incorporación de compuestos como los polifenoles u otros compuestos bioactivos podrían inducir cambios en el color, en las propiedades mecánicas y en la permeabilidad al agua/oxígeno de las películas (Flores-Martínez *et al.*, 2017; Piñeros-Hernandez *et al.*, 2017; Silva.Weiss *et al.*, 2013; Talón *et al.*, 2017; Trezza y Krochta, 2000). Además estos compuestos podrían actuar como un ligante cuando interactúan con los grupos funcionales de las proteínas y los polisacáridos que forman la matriz de película para mejorar las propiedades mecánicas, flexibilidad, resistencia al agua y estabilidad térmica dependiendo de su naturaleza y concentración (Damodaran *et al.*, 2008; von Staszewski *et al.*, 2011). No obstante, hay pocos estudios en los cuales los antioxidantes de residuos agro-industriales son adicionados a películas comestibles (Hernández-Carrillo *et al.*, 2015). Una de las ventajas del uso de los residuos agroindustriales es que el costo como materia prima para obtener los extractos antioxidantes es bajo, mientras se incrementa la diversidad de compuestos y actividades que pueden ser obtenidas por la adición de los polifenoles. Aún los mismos compuestos antioxidantes presentan diferentes actividades, dependiendo de los polímeros o materiales que conforman a la película comestible, los procesos y condiciones bajo las que se elaboran, y la concentración a la que son incorporados (Mayachiew y Devahastin, 2010; Martins *et al.*, 2012).

2. Antecedentes

Debido a los posibles cambios en el alimento después del procesado y la logística de manejo surgen una gama de empaques especializados (Suppakul *et al.*, 2003 y Yam *et al.*, 2005), entre los que destacan: los “empaques inteligentes” que permiten el monitoreo de las condiciones de los alimentos (Ahvenainen, 2000; Yam *et al.*, 2005) y los “empaques activos” donde el empaque

a partir de su composición y la interacción con el alimento puede prolongar la vida de anaquel, mejorar la seguridad microbiológica y preservar las propiedades sensoriales del producto (Han y Krochta, 2007; Min *et al.*, 2005; Min y Krochta, 2005; Oussalah *et al.*, 2004; Rojas-Graü *et al.*, 2006; Suppakul *et al.*, 2003; Tapia *et al.*, 2007). De manera general, los empaques tienen diversas funciones (Yam *et al.*, 2005): 1) Protección contra manejo, factores ambientales y contaminación, 2) Presentar o informar al consumidor sobre el estado del alimento, 3) Conveniencia por las necesidades de la empresa y del consumidor, y 4) Control sobre las características fisicoquímicas del alimento.

2.1. Los empaques activos

Estos empaques puedan acarrearse compuestos con actividad biológica que serán liberados de forma controlada en la interfase con el alimento (Han, 2000a; Choi *et al.*, 2001; Khwaldia *et al.*, 2004; Suppakul *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2002). Los compuestos con actividad biológica pueden tener una o varias actividades (antioxidante, antimicrobiano y quelante de metales) y de acuerdo a su modo de acción se pueden clasificar en: 1) los que el compuesto activo migra hacia la superficie del alimento y 2) los que actúan sólo en la superficie del alimento sin que el compuesto migre (Suppakul *et al.*, 2003). Kim *et al.* (2000) sugieren que la actividad del compuesto activo (CA) contenido en un empaque no depende solamente del grado de migración sino también de la naturaleza del medio en el cual se generó y liberó.

2.2. Películas y recubrimientos biodegradables y/o comestibles

Las películas y recubrimientos, tanto comestibles como biodegradables pueden ser considerados como empaques activos al ser adicionadas de compuestos bioactivos que pueden proteger al alimento de cambios fisicoquímicos. La aplicación de películas a los alimentos por sí solas ofrecen las siguientes ventajas: reducir la pérdida de humedad, prevenir la formación de exudado, retardar la oxidación de lípidos y reducir la absorción de compuestos volátiles que deterioran el sabor (McHugh *et al.*, 1993; Murillo-Martínez, 2008). La funcionalidad y desempeño de las películas depende de la composición de la matriz polimérica que las conforma, de su proceso de elaboración y para el caso de recubrimientos del método de aplicación (Arvanitoyannis *et al.*, 1999; Choi y Han, 2002; Gontard *et al.*, 1992; Mali *et al.*, 2005;

Rodríguez *et al.*, 2006; Rojas-Graü *et al.*, 2006). La composición de la matriz polimérica puede tener su origen de proteínas y polisacáridos, en algunos casos se pueden incorporar lípidos.

En las películas producidas a partir de proteínas, los cambios inducidos por la elaboración sobre la fracción proteínica pueden alterar sus propiedades mecánicas (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 proteínico son una barrera pobre frente a la humedad (Pérez-Gago y Krochta, 2000), pero con buena impermeabilidad a gases (Gontard *et al.*, 1992; Han *et al.*, 2000b). El proceso para la generación de una película a partir de proteínas, involucra la desnaturalización y la formación de enlaces cruzados, que pueden ser covalentes, puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, interacciones electrostáticas o fuerzas de Van der Waals. Un incremento en la temperatura alterará los enlaces disulfuro, en tanto que las interacciones electrostáticas se podrían favorecer con valores de pH alejados del punto isoeléctrico (Guckian *et al.*, 2005). La formación de películas está fuertemente relacionada con la concentración de proteína, temperatura de proceso, pH, fuerza iónica y composición química (Maté y Krochta, 1995; Nagano *et al.*, 1994; Renkema y Van Vliet, 2004).

Las fuentes de proteínas de mayor uso en la elaboración de películas y recubrimientos son el maíz (zeína), el suero de leche (aislado proteínico de suero de leche), la soya (aislado proteínico de soya) y el trigo (gluten y gluteína), que al ser combinadas con agentes plastificantes (glicerol o sorbitol) en solución (Krochta y De Mulder-Johnson, 1997) favorecerán las propiedades plásticas. El polímero proteínico más usado es el aislado de suero de leche (WPI), en el que las películas formadas son insolubles (Smith, 1994). El WPI tiene una composición aproximada de 90% de proteínas propias del suero, fraccionada en cuatro proteínas y componentes minoritarios como lípidos, lactosa y minerales. La fracción proteica contiene 20.5 % de α -lactoalbúminas y 49.5 % de β -lactoglobulinas (Kontopidis *et al.*, 2004).

Las α -lactoalbúminas de masa molecular entre 15-16 kDa contienen residuos de ácido glutámico y leucina en posiciones terminales, con un alto contenido de triptófano y cisteína; así

como cuatro enlaces disulfuro. Las β -lactoglobulinas de masa molecular de 18.4 kDa contienen 162 residuos de aminoácidos en su estructura, con un grupo –tiol entre los residuos 119 y 121, más dos enlaces disulfuro (Kontopidis *et al.*, 2004). Este tipo de lactoglobulinas se pueden asociar y disociar según el pH del medio, a pH > 8.0 se generan monómeros, a pH entre 5.0 a 8.0 proliferarán los dímeros que pueden llegar a formar octámeros cuando el pH baja a 3.5 (Gálvez *et al.*, 2006). Cuando el contenido de grupos hidrofílicos disminuye, las interacciones puente de hidrógeno/hidrofóbicas se incrementan, dando como resultado las altas propiedades mecánicas y de resistencia al agua (Kumar *et al.*, 2008). El tratamiento térmico (50-70 °C) de las proteínas conduce al desdoblamiento y la exposición de las estructuras hidrofóbicas (grupos –SH y aminoácidos hidrofóbicos) seguidas del rearrreglo y las interacciones moleculares entre proteínas adyacentes, volviéndose insolubles y formando agregados (Onwulata *et al.*, 2005 y Towned y Gyuricsek, 1973).

Respecto al uso de carbohidratos, la mayor fuente son los almidones (Bello-Pérez *et al.*, 2000) conformado por cadenas de polisacáridos lineales (amilosa 30%) y ramificados (amilopectina 70%) de unidades de D-glucopiranosil. Los polisacáridos son polioles por tener muchos -OH libres que pueden generar puentes de hidrógeno con el agua (Jansson, 2004; Mali *et al.*, 2005; Zobel, 1994). Las unidades de D-glucopiranosil en la amilosa forman una hélice con enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$ de carácter lipofílico en el centro e hidrofílico en el exterior. La naturaleza hidrofílica del almidón es una de sus mayores limitaciones en el desarrollo de películas (Arvanitoyannis *et al.*, 1998; García *et al.*, 2000; Krochta y De Mulder-Johnston, 1997; Huijbrechts *et al.*, 2008; Pagella *et al.*, 2002), una alternativa es el uso de almidones modificados (Fringant *et al.*, 1998; Huijbrechts *et al.*, 2008; Lafargue *et al.*, 2007; López *et al.*, 2008; Shogren *et al.*, 1993). 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; Soares *et al.*, 2005). Si los polímeros de una película son termodinámicamente incompatibles puede haber separación de fases. Las películas pueden ser afectadas por la estructura y masa molecular, temperatura de gelificación, plastificante, pH y fuerza iónica (Narchi *et al.*, 2009; Tolstoguzov, 1994).

2.3. Películas bi-componente y su interacción con los plastificantes

La producción de películas bi-componente tiene la ventaja de reducir costos en la materia prima usada, pero requiere de la investigación para modificar y adecuar los procesos de elaboración (Avérous *et al.*, 2001; Gennadios *et al.*, 2002; Krochta y Miller, 1997). Las proteínas y polisacáridos son los más utilizados en películas bi-componente por su gran habilidad de establecer interacciones poliméricas y crear una red continua responsable de sus propiedades funcionales (Gennadios *et al.*, 1997; Giancone *et al.*, 2008; Krochta y De Mulder-Johnson, 1997). Impresindiblemente, se recurre al uso de plastificantes para aumentar la flexibilidad y disminuir la permeabilidad al vapor de agua, por la reducción de las atracciones intermoleculares entre las cadenas poliméricas adyacentes de proteínas y carbohidratos. Los plastificantes más importantes son el agua, el glicerol y el sorbitol (Donhowe y Fennema, 1993; Galdeano *et al.*, 2008; García *et al.*, 2000; Gontard *et al.*, 1993; Müller *et al.*, 2007; Romero-Bastida *et al.*, 2005).

Arvanitoyannis *et al.* (1998) encontraron que a mayor cantidad de glicerol (15, 20 y 25 g/100 mL) en películas almidón-proteína, la fuerza de tensión disminuía, pero la deformación aumentaba, comportamiento contrario se observó a bajas concentraciones de glicerol (2, 5, 8 y 10 g/100 mL). Para películas a base de almidones, se han utilizado 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; Soares *et al.*, 2005), sin exceder el contenido total de plastificante en un 25% (Bazuin y Eisenberg, 1986). El uso de surfactantes a la solución formadora de la película también podría ayudar a disminuir la permeabilidad al vapor de agua, ya que se incorporan moléculas con características hidrofóbicas. Al respecto, Rodríguez *et al.* (2006) adicionaron glicerol y Tween 20 (como surfactante) en la generación de películas a partir de almidón de papa (2% p/p) encontrando un efecto sinérgico; a 20% de glicerol y 5% de Tween 20, reflejado en un aumento de la elongación y disminución de la fuerza de tensión.

Por otro lado, Romero-Bastida *et al.* (2005) reportaron que en la elaboración de películas comestibles con almidón de mango y plátano (al 0.03%) más glicerol (0.015%) y dos formas de

preparación de las soluciones formadoras de películas (en frío con NaOH y sólo con calor); la gelatinización en caliente arrojó los mejores resultados para las propiedades mecánicas (fuerza a la tensión, elasticidad y elongación), permeabilidad al vapor de agua y solubilidad. El WPI adicionado con agentes plastificantes (glicerol y sorbitol) forma películas insolubles en agua, transparentes, de aroma y sabor suave, flexibles y blandas, biodegradables y con excelentes propiedades mecánicas (Jiancai y Hongda, 2000; Mate y Krochta, 1996; Miller *et al.*, 1998). Los metabolitos secundarios de plantas, frutas, semillas y verduras, como son los compuestos fenólicos, incluidos ácidos orgánicos, flavonoides, antocianinas y taninos, podrían tener propiedades plastificantes, además de la ya conocida actividad antioxidante y antimicrobiana. 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 7.0; además de que los taninos libres pueden reaccionar con otras proteínas, carbohidratos, minerales y enzimas digestivas, dando lugar a nuevos complejos (López *et al.*, 2004; McNabb *et al.*, 1993).

2.4. La semilla de tamarindo como fuente de compuestos polifenólicos

El fruto del tamarindo se encuentra dentro de la familia de las leguminosas (*Caesalpinaceae*) y se compone de: semillas en un 33.9%, de pulpa con un 55.0% y 11.1% de fibra-cáscara; además de ser un producto rico en azúcares, ácidos orgánicos, pectinas, vitaminas (tiamina y niacina) y minerales (fósforo y potasio); de alto uso en la cocina oriental (Carasek y Pawliszyn, 2006; Gunasena y Hughes, 2000). El fruto contiene varias semillas (3-10) envueltas por una pulpa fibrosa de color café oscuro y los estrechamientos parciales de la vaina corresponden al número de semillas (Salunkhe y Desai, 1984). El polvo obtenido de los núcleos de las semillas, puede ser usado en bebidas, panificación, películas y geles (Bhattacharya *et al.*, 1991 y 1994); y como reemplazó del almidón de algodón y su uso en la industria papelera (Goyal *et al.*, 2007).

Algunos estudios indican que el extracto del fruto de tamarindo es rico en compuestos polifenólicos, reduce la arterioesclerosis progresiva y el estrés oxidativo en animales de laboratorio (Martinello *et al.*, 2006). Komutarin *et al.* (2004) reportaron que los flavonoides son

los mayores constituyentes en el extracto del recubrimiento de las semillas del tamarindo. Kanashiro *et al.* (2007) y Tsuda *et al.* (1993, 1994 y 1995) encontraron rutina, un compuesto glicosilado del flavonoide quercetina, además de otros compuestos como 2-hidroxi-3',4'-dihidroxiacetofenona, metil 3,4-dihidroxibenzoato, 3,4-dihidroxifenilacetato y (-)-epicatequina, en adición a proantocianidinas oligoméricas. Debido a la gran variabilidad de compuestos polifenólicos presentes en las semillas de tamarindo, un extracto crudo obtenido de las semillas podría modificar las características plásticas en películas bi-componente, induciendo cambios en las propiedades mecánicas y características fisicoquímicas con el aporte extra de actividad antioxidante, manteniéndose aún bajo condiciones prolongadas de almacenamiento.

3. Objetivo

Evaluar los cambios en las características físicas, antioxidantes y propiedades mecánicas de películas proteína-almidón incorporadas con un extracto de las semillas de tamarindo; así como su estabilidad durante el almacenamiento.

4. Materiales y métodos

4.1. Reactivos

El aislado proteínico de suero de leche (WPI) de Davisco Foods International, Inc (Le Sueur, MN, USA) y almidón nativo de papa (NPS) de FABPSA® (México) se usaron para la elaboración de las películas. Las semillas de tamarindo se recolectaron en el estado de Guerrero (México), las cuales se secaron a 40°C por 24 h en un horno de convección natural (FE291-AD, Felisa, México) y molieron en un molino de granos (Thomas Wiley® Mill Model 4, Arthur H. Thomas Company, Philadelphia, PA, USA). Las semillas molidas fueron tamizadas (U.S. Standard Sieve Series, No. 100, Dual Manufacturing Co. Chicago, USA) y el contenido de humedad final fue de 9.5%. Los reactivos de Folin-Ciocalteu's, 2,2-difenilpicrilhidrazil (DPPH*), 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS⁺) fueron grado analítico de Sigma Aldrich (Steinheim, Alemania).

4.2. Caracterización del extracto polifenólico de la semilla de tamarindo

4.2.1. Extracción

La extracción se realizó según lo reportado por Siddhuraju (2007). El extracto de semilla de tamarindo (TSE) fue obtenido mediante una extracción en etanol de las semillas molidas (1:10) a 25 °C y agitación constante (Laboratory Stirrer/hot plate, Corning PC-420D, México) a 400 rpm por 24 h para ser filtrada (Papel Whatman® No. 4). El solvente fue evaporado en un rotavapor al vacío (RV0551, Janke & Kunlel, Staufen, Alemania) a 40 ± 0.08 °C. El TSE seco final fue almacenado en frascos ambar a -20 °C hasta su análisis.

4.2.2. Caracterización del TSE

4.2.2.1. Contenido de polifenoles y flavonoides

El contenido total de polifenoles fue determinado según Singleton y Rossi (1965). Una alícuota de 100 μ L (1 g/100 mL de etanol) del TSE fue mezclada con 600 μ L del reactivo de Folin (2N) y 2 mL de Na₂CO₃ (20% p/v). Después de 40 min de incubación a temperatura ambiente, la absorbancia fue medida a 725 nm en un espectrofotómetro (Varian Cary 50 Bio UV/Vis, Varian Inc. Agilent, CA, USA). El contenido de polifenoles se reportó como mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/g de TSE seco. El contenido de flavonoides fue determinado siguiendo la metodología de Miliuskas *et al.* (2004) y modificaciones de Kim *et al.* (2003) y Skerget *et al.* (2005). Se tomaron 1.25 mL de agua destilada, 0.25 mL del extracto en solución y se adicionaron 75 μ L de NaNO₂ (5%) para dejar reposar durante 6 min. Posteriormente, se adicionaron 0.15 mL de tricloruro de aluminio en etanol (20 g/L) para reposar 5 min más; finalmente se agregaron 0.5 mL de NaOH 1M y se completó el volumen a 2.5 mL. La absorbancia se leyó a los 25 min a una longitud de onda de 510 nm. Los resultados fueron expresados como mg equivalente de catequina/g de TSE seco.

4.2.2.2. Actividad antioxidante

La actividad antioxidante (AnA) del TSE fue medida por el método de secuestro del radical DPPH[•] (Brand-Williams *et al.*, 1995) a 515 nm, y el método de inhibición del radical ABTS^{•+} (Re *et al.*, 1999) a 734 nm. El reactivo DPPH[•] fue preparado en etanol (0.025 g/L) y el ABTS^{•+} fue formado por la mezcla de ABTS (7mM) con persulfato de potasio (2.45 mM), en este último

después de 16 h la absorbancia se ajustó a 0.70. La reacción se llevó a cabo con 10 μL de TSE y 990 μL de la solución de $\text{ABTS}^{+\cdot}$ o DPPH^{\cdot} e incubadas a temperatura ambiente; ambas reacciones fueron reportadas como el % de inhibición después de 7 y 30 min de incubación, respectivamente.

4.2.3. Formación de las películas bi-componente

Las películas fueron elaboradas como previamente se describió por McHugh y Krochta (1994). El aislado de proteína de suero de leche (WPI, 6.96 g) y el glicerol fueron disueltos en 80 mL de agua destilada y homogenizados a 12,000 rpm durante 1 min (Ultra Turrax IK-T18, Staufen, Alemania). Posteriormente el pH fue ajustado usando un pH-metro (Hanna HI 3222 pH (ORP/ISE meter y electrodo de vidrio HI 1131, Hanna Ins, Rumania) y soluciones de HCl (0.1M) o NaOH (0.1M) segundo las necesidades del cuadro 1. La solución fue colocada en un baño María por 25 min con agitación (400 rpm) a las diferentes temperaturas de desnaturalización proteínica (PDT). Las soluciones de almidón nativo de papa (10.44 g) fueron disueltas en 20 mL de agua destilada a 65°C y agitadas durante 3 min (Romero-Bastida *et al.*, 2005) con previo ajuste del pH a los diferentes valores de estudio. Ambas soluciones fueron mezcladas, y la mezcla resultante se llamó “solución formadora de películas” (FFS). Treinta mililitros de cada FFS fueron vertidos en superficies de vidrio de 225 cm^2 y colocadas en un gabinete de humedad y temperatura controladas (25 ± 0.8 °C y $32 \pm 1.0\%$ de humedad relativa) por 48 h para su secado.

4.2.4. Propiedades mecánicas de las películas comestibles

Las propiedades mecánicas (porcentaje de elongación = $\% \epsilon$, fuerza a la tensión antes de la ruptura = σ y el módulo de Young = E) de las películas fueron evaluadas después de ser acondicionadas a $50 \pm 3\%$ de humedad relativa con una solución saturada de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ a 20 °C por 24 h. Se usó un analizador de textura (CT3 Texture Analyzer, y TexturePro v1.2 Build-9-CT software, Brookfield Eng. Lab, Inc., Massachussetts, USA) con pinzas para tensión separadas 50 mm, a una velocidad de estiramiento de 10 mm/min, con una capacidad de carga de 1 Newton y una sensibilidad de 0.5 Newtons (Perez-Gago y Krochta, 2001). Las propiedades mecánicas fueron obtenidas directamente por el software.

4.2.5. Optimización de las películas por la metodología de superficies de respuesta

La optimización de la película se basó en la variación de la cantidad de plastificante, el pH de la solución WPI-NPS y la temperatura de desnaturalización de las proteínas (PDT), factores que pueden regular la formación de la red de película. El contenido de glicerol (Gly) varió de 2.3 a 6.3 g/100 mL de solución, la PDT de 75 a 95 °C y el pH de la solución WPI de 5 a 9. La metodología incluyó un diseño rotatorio central con tres factores para generar superficies de respuesta y obtener una película con un alto %ε, y valores bajos en σ y E (McHugh y Krochta, 1994) que son propiedades que caracterizan a las películas sintéticas.

El arreglo experimental incluyó ocho combinaciones de un diseño básico 2^3 , seis puntos axiales y un punto central (replicado 6 veces), para obtener 15 corridas experimentales (Cuadro 1). El modelo evaluado fue $Y = A + Bx + Cy + Dz + Ex^2 + Fy^2 + Gz^2 + Hxy + Ixz + Jyz$, donde las letras mayúsculas son los coeficientes de regresión lineal, cuadráticos y de la interacción, y “A” el término constante. Las letras minúsculas son los factores optimizados (x = Gly, y = pH y z = PDT). Posteriormente, las películas se elaboraron con la combinación final seleccionada de estos factores, y fueron agregadas con el extracto de semillas de tamarindo.

4.2.6. Películas bi-componente con extracto de semillas de tamarindo y su caracterización

4.2.6.1. Elaboración de las películas comestibles

La incorporación del TSE en las películas comestibles fue estudiado a dos concentraciones: 1.26 y 12.6 g/100 mL y una película control (sin la incorporación de TSE). El extracto de semilla de tamarindo fue adicionado a la FFS de la película optimizada (mediante la metodología de superficies de respuesta) después de ser enfriadas a 20 ± 0.8 °C siguiendo los procedimientos descritos en la sección “Formación de las películas bi-componente”.

4.2.6.2. Caracterización y estabilidad de las películas con TSE durante el almacenamiento

El color, las propiedades mecánicas y antioxidantes de las películas fueron determinados después de 72 h (48 h de formación de la película más 24 h de acondicionamiento). Doce

películas de cada nivel de TSE fueron usadas. Las muestras fueron enrolladas para tener un diámetro interno de 1 cm, colocadas en bolsas resellables de 18 x 20 cm, y almacenadas en una cámara con temperatura y humedad controladas (25 °C y 32% de HR) durante 1, 15, 25 y 35 días. En cada tiempo se realizaron las siguientes determinaciones: las propiedades mecánicas fueron medidas como se describió en la sección 4.2.4. “Propiedades mecánicas de las películas comestibles”. El color (L^* , a^* y b^*) de las películas fue medido según Siripatrawan y Harte (2010) con un colorímetro Minolta (Minolta CM-3600d; Tokio, Japón) a 1.5 cm de apertura e iluminante D-65/2°. El espesor de las películas fue medido con un micrómetro digital (293-811/MDC-1, Mitutoyo, Japón) y el porcentaje de material soluble (%SM, después de solubilizar las películas en agua destilada a 25 °C) fue determinado por la diferencia de pesos antes y después de solubilizar (Romero-Bastida *et al.*, 2005). La fracción soluble en agua (WSF) fue separada de las películas no solubilizadas mediante filtración; la WSF se almacenó a -20 °C para la determinación de la AnA. La AnA de las películas se midió en la WSF y en la FFS por los métodos de DPPH[•] y ABTS^{•+}. Ambos ensayos fueron adaptados como métodos para evaluar indirectamente la AnA de las películas (Arcan y Yemenicioğlu, 2014).

4.2.7. Análisis estadístico

Para la optimización, los modelos de superficie de respuesta fueron analizados usando el software STATGRAPHICS® Centurion XV, V.15.2.05 (StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA). Los datos de las propiedades físicas y mecánicas, de color y AnA fueron expresados como la media \pm desviación estándar o la raíz del cuadrado medio del error. Un ANDEVA de dos vías y una prueba de comparación múltiple de Dunca fueron aplicados mediante el software SPSS® 10.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA). La estabilidad de las películas durante el almacenamieno fue analizada por un Análisis de Componentes Principales (Software XLSTAT 2015.4, Addinsoft, NY, USA).

5. Resultados y discusión

5.1. Optimización de las películas comestibles WPI-NPS

En la figura 1 se muestran las superficies de respuesta de cada propiedad mecánica (A a F) analizada en las películas y los modelos finales de la optimización (G y H). Pocas investigaciones realizan procesos de optimización en las películas, aunque es una herramienta efectiva para evaluar sus propiedades (Perez-Gago y Krochta, 2001). Las gráficas de superficies de respuesta son el resultado de los datos presentados en el cuadro 1, donde los contornos representan el área de la respuesta proyectada en dos ejes y las superficies cuadrículadas la respuesta tridimensional. El cuadro 2 muestra los coeficientes para cada variable respuesta ($p < 0.05$).

La fuerza a la tensión (σ) se refiere a la máxima resistencia a una tensión que una película puede soportar mientras se estira antes de romperse, y depende de las condiciones de elaboración de la misma. Los cuadros 1 y 2 muestran que los valores de σ fueron de 2.5 a 14.0 MPa y que solo los términos cuadráticos afectaron la respuesta ($p < 0.001$). La figura 1A muestra la superficie de respuesta de σ a 70 °C, donde el valor más bajo fue obtenido con valores de Gly > 4.9 g/100 mL de FFS. Pero, si el Gly se incrementa a 6.0 g, independientemente de las condiciones de pH (6-8) y de las condiciones de PDT (80-90 °C), la σ puede ser > 5.0 MPa (Figura 1B). Esta respuesta podría ser afectada con bajas concentraciones de Gly, preservando las interacciones entre cadenas de proteínas, reduciendo la flexibilidad. Las mejores propiedades en películas con WPI se han encontrado a pH > 7.0 , y resultados similares han sido reportados (Anker *et al.*, 2000; McHugh y Krochta, 1994).

La figura 1C y 1D muestran las respuestas para $\% \epsilon$, en las cuales el valor más alto ($\approx 105\%$, según lo predicho por el modelo) fue observado a 70 °C de PDT en el intervalo de pH de 7.0 a 8.0 con diferentes concentraciones de Gly (3.3 a 5.3 g/100 mL de FFS). Varios reportes indican que cuando la temperatura del proceso es > 75 °C, la formación de polímeros y copolímeros de proteínas globulares es inducida, formando una red compleja menos resistente (Floris *et al.*, 2008; von Staszewski *et al.*, 2011). Este fenómeno fue observado en las películas formadas a

PDT > 80.0 °C con bajos valores de pH (6.0 a 7.0), que presentaron valores de elongación < 80%.

El cuadro 2 muestra los coeficientes de regresión, donde el factor pH afectó positivamente el %ε, y negativamente la PDT en los términos lineales, mientras que los términos cuadráticos fueron significativos para Gly y pH ($p < 0.001$). Altos valores de pH favorecen los enlaces S-S, pero a bajos valores, los grupos -SH son protonados y pierden reactividad, disminuyendo las propiedades elásticas en las películas (Shimada y Cheftel, 1988).

El módulo de Young (E) es un cálculo de la rigidez, en el cual altos valores sugieren la mejor estabilidad de la red (Perez-Gago y Krochta, 2001). La superficie generada se afectó por el pH y la PDT (Cuadro 2), quienes ejercieron un efecto lineal ($p < 0.01$) y cuadrático ($p < 0.03$), y que además la interacción pH*Gly fue significativa ($p < 0.02$). A 70 °C de PDT, el uso de Gly (4.5 a 5.3 g/100 mL de FFS) y pH (7.0 a 8.0) generaron valores bajos de E (< 0.15 MPa) como se muestra en la Figura 1E. La figura 1F muestra la superficie de respuesta para E a 6.0 g de Gly/100 mL de FFS; donde el módulo de Young's decreció de 0.35 a 0.05 MPa en función de la PDT < 80 °C a altos valores de pH (> 6.8).

Resultados similares fueron reportados para películas desarrolladas con WPI y condiciones similares (Anker *et al.*, 2000; Gounga *et al.*, 2007). Las películas con pH ácidos (5-6) mostraron deficiencias en sus propiedades mecánicas, como se indicó por la generación de complejos insolubles que precipitaron durante el proceso de secado y que comprometieron la integridad física de las películas (Anker *et al.*, 2000).

Las figuras 1G y 1H muestran la conveniencia para Gly y pH a PDT constante de 70 °C; y a pH y PDT a Gly constante de 6.2 g/100 mL, respectivamente. Las condiciones óptimas de elaboración fueron 6.2 g/100 mL de Gly en la FFS a pH de 7.9, y una PDT de 76 °C, las cuales predijeron los siguientes valores mecánicos: $E = 0.07$ MPa, $\sigma = 1.94$ MPa y $\% \epsilon = 83.6\%$, con una deseabilidad máxima de 0.86. Estas condiciones fueron usadas en la siguiente etapa que consistió en la incorporación del TSE.

Cuadro 1. Propiedades mecánicas para las combinaciones experimentales en la producción de películas proteína-almidón por modelos de superficie de respuesta. ^a

Combinación			Fuerza a la tensión (σ , MPa)	Elongación (% ϵ)	Módulo de Young's (E, MPa)
Glicerol, g/100 mL	pH	Temperatura, °C			
3.3	6	80	12.15 ± 1.236	58.51 ± 3.505	0.31 ± 0.010
3.3	6	90	14.01 ± 0.903	46.91 ± 6.624	0.42 ± 0.035
3.3	8	80	11.60 ± 0.659	70.48 ± 1.931	0.36 ± 0.013
3.3	8	90	13.58 ± 1.419	60.27 ± 3.550	0.47 ± 0.026
5.3	6	80	8.09 ± 0.132	53.08 ± 4.357	0.37 ± 0.027
5.3	6	90	8.69 ± 0.469	49.66 ± 5.155	0.36 ± 0.017
5.3	8	80	4.74 ± 0.160	70.65 ± 8.090	0.21 ± 0.022
5.3	8	90	5.81 ± 0.385	75.40 ± 5.820	0.23 ± 0.028
2.3	7	85	2.47 ± 0.514	82.01 ± 4.058	0.04 ± 0.020
4.3	5	85	3.94 ± 0.796	6.80 ± 1.024	0.48 ± 0.027
4.3	7	95	7.82 ± 0.093	68.02 ± 5.118	0.26 ± 0.018
4.3	7	75	8.83 ± 0.488	111.68 ± 4.154	0.08 ± 0.011
4.3	9	85	7.02 ± 0.663	72.05 ± 4.284	0.13 ± 0.041
6.3	7	85	9.51 ± 0.173	73.42 ± 3.183	0.14 ± 0.028
4.3	7	85 ^b	12.54 ± 1.246	89.17 ± 6.043	0.13 ± 0.018

^a Los resultados son expresados como la media ± desviación estándar (n=3). ^b Media ± desviación estándar (n=6).

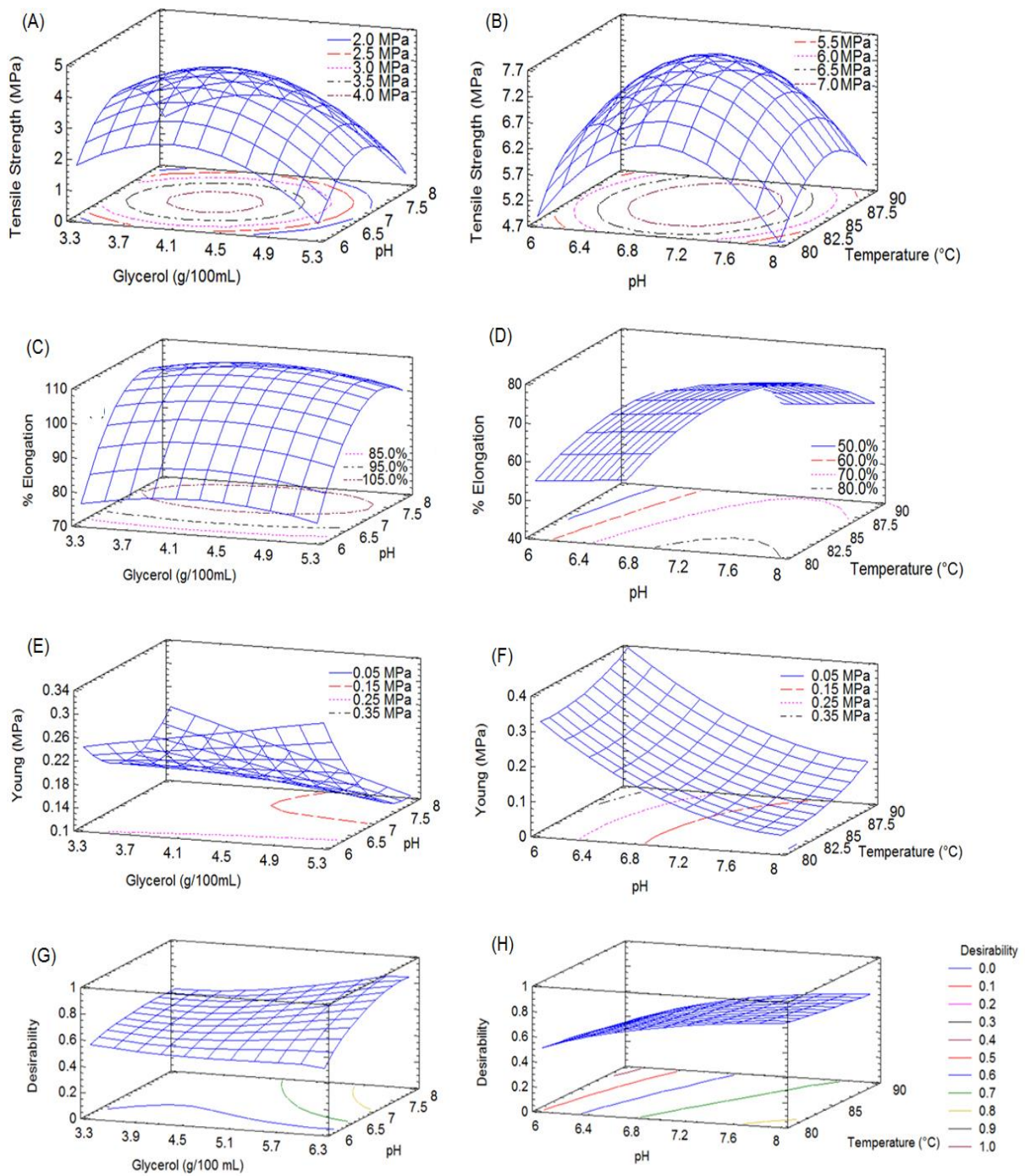


Figura 1. Superficies de respuesta para: **(A)** fuerza a la tensión a PDT 70 °C; **(B)** fuerza a la tensión con Gly 6.0 g/100 mL de FFS; **(C)** elongación a PDT 70 °C; **(D)** elongación con Gly 6.0 g/100 mL de FFS; **(E)** Módulo de Young's a PDT 70 °C; **(F)** Módulo de Young's con Gly 6.0 g/100 mL de FFS; **(G)** Condiciones optimizadas en películas WPI-NPS a PDT 70 °C y **(H)** Condiciones optimizadas en películas WPI-NPS con Gly 6.0 g/mL de FFS.

Cuadro 2. Coeficientes de regresión de los modelos de superficie de respuesta en la elaboración de películas optimizadas proteína-almidón.

Coeficiente	Fuerza a la tensión (σ , MPa)			Elongación (ϵ , %)			Módulo de Young's (E, MPa)		
	RC	SE	P	RC	SE	P	RC	SE	P
A	-351.99			-616.27			8.61		
Bx	12.09	0.81	N.S.	-32.90	2.98	N.S.	0.32	0.03	N.S.
Cy	22.42	0.81	N.S.	200.48	2.98	0.001	-0.66	0.03	0.001
Dz	6.12	0.81	N.S.	-1.35	2.98	0.001	-0.16	0.03	0.010
Ex ²	-1.48	0.65	0.001	-3.86	2.38	0.001	-	-	-
Fy ²	-1.61	0.65	0.001	-13.43	2.38	0.001	0.06	0.02	0.001
Gz ²	-0.04	0.65	0.010	-	-	-	0.001	0.02	0.030
Hxy	-	-	-	-	-	-	-0.05	0.04	0.020
R ²	0.55			0.81			0.62		

Los términos Lineales, cuadráticos e interacciones se muestran para cada propiedad mecánica. Letras mayúsculas corresponden a los coeficientes de regression; x, y & z corresponden al contenido de glicerol, pH y temperatura de desnaturalización proteica, respectivamente. RC = valor del coeficiente de regression. SE = error estándar. P = valor de probabilidad. R² = coeficiente de determinación. N.S. = no significativo ($p > 0.05$). Valores ausentes (-), no fueron considerados por el paquete estadístico.

5.2. Variación de las películas optimizadas WPI-NPS por la incorporación del TSE

En esta sección, las propiedades mecánicas predichas de las películas (películas control sin TSE) fueron experimentalmente verificadas, los cambios inducidos por la inclusión del TSE (1.26 y 12.6 g/100 mL de FFS) fueron analizados y los resultados se muestran en el cuadro 3.

5.2.1. Propiedades físicas y mecánicas

Las películas sin TSE se comportaron de acuerdo a la variación de las propiedades predichas por el modelo optimizado de superficie de respuesta. La incorporación de TSE disminuyó el espesor en las películas ($p < 0.004$). Estas diferencias podrían ser atribuidas a la interacción entre polifenoles y los polímeros de la matriz de película, ya que podría existir una interacción polifenol-aminoácido más fuerte que la del glicerol-aminoácido (Sothornvit y Krochta, 2005).

Adicionalmente, cuando se incrementan la proporción de WPI, el espesor y la permeabilidad al oxígeno se incrementan (Gounga *et al.*, 2007). Se ha demostrado que el espesor depende del

contenido de Gly, ya que podría competir por sitios con el agua dentro del polímero de WPI (Sothornvit y Krochta, 2005; Gounga *et al.*, 2007). Es posible que los polifenoles disminuyeran la presencia de agua en el polímero e incrementaran las interacciones entre polímeros adyacentes, reflejado en una disminución del espesor. La adición de compuestos con grupos –OH pueden actuar como plastificantes, que es el caso de los polifenoles del TSE. En películas de agar con catequina, el espesor disminuye con altas cantidades del antioxidante, donde $\% \epsilon$ y σ no fueron diferentes (Ku *et al.*, 2008). Las interacciones proteína-polifenol incluyen enlaces hidrofóbicos entre los aminoácidos aromáticos y los polifenoles, así como puentes de hidrógeno con los grupos carbonilo de las proteínas (Damodaran *et al.*, 2008; von Staszewski *et al.*, 2011).

En este estudio, σ y E disminuyeron con la adición de los polifenoles del TSE ($p < 0.001$) únicamente a la alta concentración. Estos resultados tuvieron un comportamiento similar a las películas con quitosano y altos niveles de extracto de té verde (5-20 %), donde σ y $\% \epsilon$ disminuyeron (Siripatrawan y Harte, 2010). En otro estudio, la incorporación de polifenoles en películas de zeína redujeron los valores de E de 4.7 a 0.1 MPa (Arcan y Yemenicioğlu, 2011).

Por otro lado, la solubilidad puede incrementarse por la intensidad del tratamiento térmico (a altas temperaturas por cortos tiempos) y pH's cercanos a la neutralidad (Perez-Gago y Krochta, 2001). El tiempo y PDT para este estudio fueron considerados de intensidad media. La adición de TSE incrementó en 7 a 9 unidades el %SM ($p < 0.004$), sugiriendo que mayor cantidad de compuestos hidrofóbicos podrían liberarse al medio (Perez-Gago y Krochta, 2001).

5.2.2. Polifenoles, flavonoides y actividad antioxidante del TSE

El contenido de polifenoles en el TSE fue de 187.0 ± 0.11 mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto seco, y el contenido de flavonoides fue de 30.3 ± 1.01 mg equivalentes de catequina/g de extracto seco. Las actividades antioxidante del TSE fueron de $62.5 \pm 0.04\%$ de inhibición para DPPH^{*} y $45.6 \pm 0.14\%$ para ABTS⁺⁺. Varios estudios han reportado contenidos de polifenoles de 26.6 ± 13.6 mg GAE/g, de inhibición del radical ABTS⁺⁺ de 0.77 ± 0.01 y 0.98 mmol Trolox/g para DPPH^{*} (Razali *et al.*, 2012). Adicionalmente, Siddhuraju (2007) reportó la presencia de taninos en las semillas de tamarindo.

Cuadro 3. Espesor, propiedades mecánicas, materia soluble, y actividad antioxidante de películas optimizadas de WPI-NPS añadidas con diferentes cantidades de TSE.

	Extracto de las semillas de tamarindo (g/100mL de FFS)			RMSE
	Control	1.26	12.6	
Espesor (mm)	0.20 ^a	0.17 ^b	0.17 ^b	0.012
Propiedades mecánicas				
Fuerza a la tensión (σ ; MPa)	4.69 ^a	4.41 ^a	4.04 ^b	0.261
Elongación (ϵ ; %)	83.04 ^c	92.56 ^a	90.31 ^b	1.593
Módulo de Young's (E; MPa)	0.04 ^a	0.03 ^b	0.02 ^b	0.005
Material soluble (%SM)	13.48 ^b	20.72 ^a	22.90 ^a	4.150
Actividad antioxidante en la solución formadora de películas (FFS)				
DPPH [*] , % Inhibición	19.11 ^c	35.95 ^b	55.19 ^a	2.163
ABTS ⁺⁺ , % Inhibición	12.81 ^c	19.30 ^b	32.67 ^a	1.435
Actividad antioxidante en la fracción soluble de las películas (WSF)				
DPPH [*] , % Inhibición	10.48 ^c	14.56 ^b	21.80 ^a	1.714
ABTS ⁺⁺ , % Inhibición	9.26 ^c	11.46 ^b	15.97 ^a	1.091

Los datos son expresados como la media de mínimos cuadrados (n=6); RMSE = raíz del cuadrado medio del error; FFS = solución formadora de películas; WSF = fracción soluble de las películas. ^{a,b,c} Diferentes letras en el mismo renglón indican diferencias significativas ($p < 0.004$).

5.2.3. Actividad antioxidante de las películas con TSE

La adición de TSE a la FFS incrementó la AnA, dependiendo de la concentración ($p < 0.05$): aproximadamente 2.8× en la inhibición del DPPH^{*} y 2.5× para ABTS⁺⁺ con la más alta cantidad de TSE añadido (Cuadro 3). Las películas control (sin TSE) tuvieron AnA debido a que poseen aminoácidos aromáticos libres del WPI y grupos hidroxilo del glicerol. En películas de zeína incorporadas con un extracto rojo de ginseng, la AnA se incrementó hasta 33.6% para la inhibición de DPPH^{*} (Norajit *et al.*, 2010). Adicionalmente, los polifenoles de un extracto de tomillo incrementaron la AnA de películas de quitosano y almidón (Talón *et al.*, 2017). La AnA después de la solubilización de la película, también fue alta con la concentración menor del TSE; esto sugiere que los polifenoles dispersos en la WSF durante el proceso de secado se pudieron orientar hacia la superficie de la película debido a su polaridad. Después de la

solubilización, un cierto número de polifenoles se libera de la película. Por lo tanto, la AnA de la película aplicada a algún alimento podría ser suficiente para reducir parte de las reacciones de oxidación a nivel superficial.

5.3. Estabilidad de las películas durante el almacenamiento

La integridad de una película comestible durante el almacenamiento es esencial para mantener sus funciones. Los materiales de película y los compuestos bioactivos están involucrados en la estabilidad durante el almacenamiento (Rodríguez-Marín *et al.*, 2016). El cuadro 4 muestra los resultados de las propiedades mecánicas, color y AnA de las películas con o sin TSE durante el almacenamiento. Estos datos fueron presentados en un gráfico PCA (Figura 2), el cual correlaciona las muestras de acuerdo al tiempo y las variables respuesta en 93.64%.

Las películas con TSE fueron principalmente caracterizadas en base a su luminosidad y elongación, que se perdió durante el almacenamiento ($p < 0.05$). Las películas con alto contenido de TSE fueron caracterizadas durante los primeros días de almacenamiento por su respuesta antioxidante ($p < 0.05$) y en los últimos días por su color rojo ($p < 0.05$) y opacidad (baja luminosidad). Estas dos respuestas (opacidad y color rojo) son muy importantes en sistemas alimenticios para disminuir la velocidad de las reacciones de oxidación. La magnitud del cambio de color rojo es determinado por el origen y densidad del extracto; mientras que los cambios en la transparencia (mayor opacidad) mejorarían la barrera a la luz (Siripatrawan y Harte, 2010). Los polifenoles del TSE podrían interactuar con una gran cantidad de moléculas de agua, fomentando una superficie menos húmeda y brillante. La estabilidad de los pigmentos rojos en las películas fue baja a altas concentraciones del TSE, posiblemente debida a las reacciones de oscurecimiento de estos compuestos por la luz. Los valores de b^* (tonos amarillos) también se incrementaron con la incorporación de TSE (Cuadro 4).

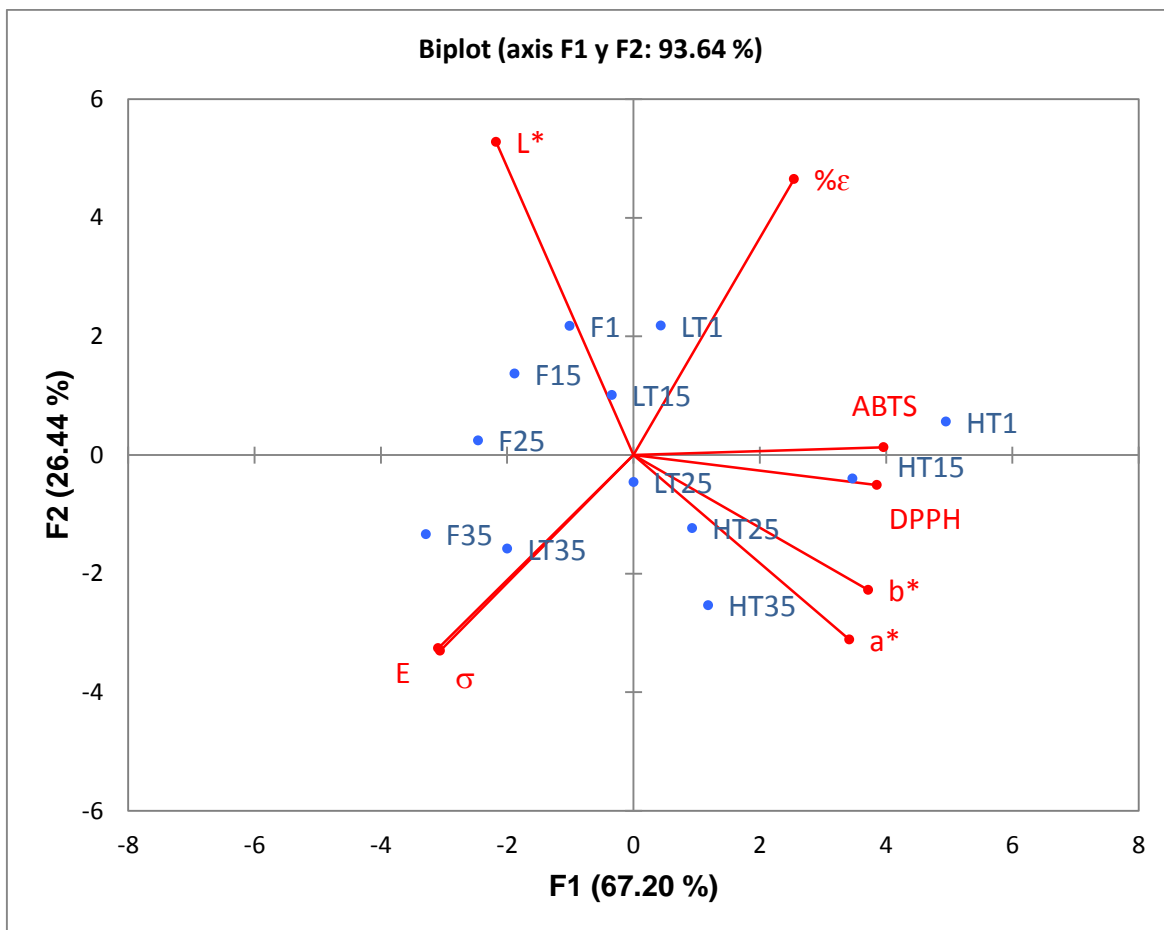


Figura 2. Análisis de componentes principales de los datos durante el almacenamiento de películas optimizadas de WPI-NPS incorporadas con un extracto de las semillas de tamarindo (TSE). Vectores en rojo muestran la respuesta de las variables: L* = luminosidad, a* = escala de azul-rojos, b* = escala de amarillo-verdes, actividades antioxidantes ABTS⁺ y DPPH⁺, E = Módulo de Young's, σ = fuerza a la tensión y % ϵ = elongación. En azul son las muestras durante la vida de anaquel; la primeras letras significan "F" = película control, "LT" = película incorporada con 1.26 g/100mL y "HT" = película incorporada con 12.6 g/100mL; y el número corresponde al día de almacenamiento.

Las películas con bajos niveles de TSE presentaron un comportamiento similar a las películas sin TSE, pero tuvieron una mayor elongación y AnA (Figura 2). La AnA es una de las actividades más importantes para conservar en el tiempo y fue representativa de las películas elaboradas con TSE. La adición de altas concentraciones de TSE puede ayudar a mantener la estabilidad de las propiedades mecánicas durante el almacenamiento, sin cambios significativos en la fuerza a la tensión (σ), la elongación (% ϵ) y el módulo de Young (E).

Cuadro 4. Estabilidad del color y propiedades mecánicas y antioxidantes de películas optimizadas WPI-NPS añadidas con diferentes cantidades de TSE.*

TSE (g/100mL FFS)	Tiempo (días)					Tiempo (días)				
	1	15	25	35	RMSE	1	15	25	35	RMSE
	Luminosidad (L)					Escala rojos-verdes (a*)				
0	96.44±1.32	94.91±0.22	90.71±1.53	85.91±1.64	0.706	-0.79±0.02	-0.72±0.02	-0.66±0.02	-0.62±0.03	0.018
1.26	91.86±1.15	88.57±1.36	85.86±6.48	80.91±1.41		2.40±0.03	2.48±0.03	2.54±1.28	2.60±0.03	
12.26	80.18±2.37	78.36±1.89	76.54±3.59	75.16±2.31		11.43±0.05	12.50±0.04	12.83±1.32	13.22±0.10	
	Escala Amarillos-azules (b*)					Fuerza a la tensión (MPa)				
0	3.29±0.06	3.04±0.04	2.82±0.03	2.71±0.05	0.029	4.53±0.16	4.67±0.15	4.82±0.17	4.99±0.16	0.057
1.26	7.43±0.05	7.18±0.06	6.60±1.67	6.49±0.05		4.19±0.19	4.33±0.15	4.54±0.12	4.68±0.20	
12.26	17.43±0.06	17.06±0.06	15.66±1.69	14.88±0.05		4.04±0.05	4.28±0.04	4.47±0.11	4.82±0.09	
	Elongación (%)					Módulo de Young's [†]				
0	86.07±1.33	81.16±3.83	72.54±2.46	59.94±1.11	1.780	0.04±0.005	0.06±0.008	0.08±0.015	0.10±0.010	0.006
1.26	97.55±1.51	88.41±4.00	80.62±4.10	66.56±4.82		0.06±0.024	0.08±0.015	0.09±0.012	0.11±0.017	
12.26	93.49±3.81	88.32±2.52	75.47±5.77	72.37±2.31		0.02±0.011	0.04±0.008	0.06±0.031	0.07±0.015	
	DPPH* (% inhibición)					ABTS ⁺⁺ (% inhibición)				
0	11.46±0.46	9.79±0.11	9.35±0.17	9.01±0.13	0.473	8.77±1.23	5.42±0.47	3.90±0.26	2.55±0.42	0.223
1.26	12.17±0.46	11.56±0.53	10.63±2.27	9.25±0.24		10.96±0.49	8.73±0.54	6.48±2.10	5.09±0.19	
12.26	28.72±1.36	22.68±2.57	18.48±2.41	16.45±1.92		24.47±0.60	17.37±0.88	14.79±2.42	13.51±0.38	

Los resultados se muestran como la media ± desviación estándar (n=6) y significancias por tipo de película (p < 0.003), en el tiempo (p < 0.0001) e interacción (p < 0.0007); RMSE = Raíz del cuadrado medio del error. TSE = extracto de las semillas de tamarindo. La actividad DPPH* and ABTS⁺⁺ fueron determinadas en la fracción soluble en agua de la película (WSF). [†] No se encontraron diferencias para la película×tiempo (p > 0.564).

6. Conclusiones

La adición de un extracto de polifenoles de las semillas del tamarindo en la elaboración de las películas bi-componente WPI-NPS indujo efectos plastificantes, resultando en un incremento en la elongación y reducción de la fuerza a la tensión y por lo tanto, valores bajos del módulo de Young's. La presencia de los polifenoles del TSE en el proceso de elaboración de las películas aportó actividad antioxidante, misma que se redujo al obtener la película. La solubilidad y los tonos rojos en las películas se incrementaron a mayor dosis del TSE. Las propiedades mecánicas, color y antioxidantes de las películas se mantuvieron parcialmente estables al menos después de 35 días de almacenamiento.

IV. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE PELÍCULAS COMESTIBLES INCORPORADAS CON UN EXTRACTO DE LAS SEMILLAS DE TAMARINDO

7. Introducción

Al existir un crecimiento constante de la industria alimentaria, la demanda en la generación de tecnologías para preservar o incrementar la calidad de los productos es mayor, por lo tanto, la innovación de tecnologías de barrera, como son los sistemas de conservación y empaque de los productos, son de gran importancia. En la gran mayoría de los productos, sean de origen animal o vegetal, los dos principales problemas son la contaminación por bacterias patógenas y/o deteriorantes, y los asociados a la oxidación (Gray *et al.*, 1996) de la fracción lipídica y proteica (Faustman y Cassens, 1990). El ataque microbiano en productos de origen animal (productos con mayor inversión en su obtención), requiere especial interés debido a que los antibióticos no están permitidos, y los antimicrobianos sintéticos tienen cada vez mayor restricción de uso. Los extractos de origen vegetal, que en su composición pueden contener gran variabilidad de polifenoles, son una alternativa de compuestos antimicrobianos, ya que se ha documentado su potencial contra diversa microbiota. Sin embargo, la adición de estos, específicamente en películas y recubrimientos comestibles, necesita ser evaluada en las etapas críticas de la elaboración por sus posibles interacciones con la matriz del empaque que puedan inhibir su actividad.

8. Antecedentes

8.1. Microbiología de la carne

La microbiota de la carne está conformada de bacterias Gram positivas como micrococcos, bacterias lácticas, *Shewanella putrefaciens* y *Brochetrix thermosphacta*, de Gram negativas como *Pseudomonas* spp. y enterobacterias; y de otros grupos específicos como las bacterias saprófitas Gram positivas que incluyen *Kurthia* y algunos estafilococos no toxigénicos (Gill, 1998). Los microorganismos patógenos y toxigenos provienen por lo general del tracto gastrointestinal de los animales enfermos y faenados o bien de la contaminación cruzada por operarios y equipo. Algunos ejemplos de estos microorganismos son *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, estreptococos del grupo A y *Clostridium* spp. (*C. perfringens* A y C,

C. bifermentans, *C. botulinum* A, B, E y F, *C. novyi* y *C. sordellii*). La sola presencia de cualquiera de estos microorganismos constituye un riesgo para la salud, que se agrava por la gran capacidad de sobrevivencia, preservándose durante el almacenamiento del producto. El microorganismo que ofrece especial atención es *Listeria* ya que es tolerante a factores como el NaCl y valores de pH bajos, aún a temperaturas bajas (Doyle, 1999).

8.2. Agentes antimicrobianos

Un agente antimicrobiano, es aquel compuesto o conjunto de compuestos que tienen la capacidad de reducir o eliminar la proliferación de la microbiota, ya sean hongos/levaduras, bacterias y parásitos. Los sistemas antimicrobianos pueden ser purificados e incorporados dependiendo de su naturaleza e interacción con los componentes del empaque, esperando un prometedor control frente al crecimiento y recontaminación de microorganismos en los alimentos, incluyendo a *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* 0157:H7 y *Salmonella typhimurium* (Cagri *et al.*, 2003); sin embargo, su costo de fabricación puede ser muy alto.

8.2.1. Los empaques comestibles y su papel como acarreadores de antimicrobianos

Los empaques comestibles juegan un papel importante en el control del desarrollo microbiano. De acuerdo a Yam *et al.* (2005) se pueden clasificar por su función “*Protección*” contra manejo, factores ambientales y contaminación. Mientras que el modo de acción puede darse al: 1) migrar hacia la superficie del alimento y 2) actuar sólo en la superficie del alimento sin que el agente migre (Suppakul *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 2001).

8.2.2. Metabolitos bacterianos y agentes quelantes incorporados en películas y recubrimientos

La incorporación de sustancias antimicrobianas purificadas a películas y recubrimiento comestibles para carne y productos cárnicos ha sido ampliamente investigada, las principales sustancias son las bacteriocinas por su alta estabilidad y espectro de inhibición, y en algunos casos por su efecto sinérgico en combinación con ácidos orgánicos y sustancias quelantes (Eswaranandam *et al.*, 2004). Mauriello *et al.* (2004) incorporaron la bacteriocina producida por

Lactobacillus curvatus a recubrimientos de polietileno con la reducción de un orden de magnitud en la población de *L. monocytogenes* inoculada en carne de cerdo y vacuno. Siragusa *et al.* (1999) encontraron una disminución de dos órdenes de magnitud para *B. thermosphacta* en carnes empacadas al vacío cubiertas con una película adicionada de nisina, mientras que Kim *et al.* (2002) con el mismo agente en combiación con lacticina encontraron una reducción de los microorganismos aerobios totales y coliformes. 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 altamente hidrofóbicas 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 (Sivarooban *et al.*, 2008). Al respecto, Cha *et al.* (2002) elaboraron películas de alginato y κ -carragenina adicionadas con EDTA, lisozima, nisina y extracto de semilla de uva, que fueron activas contra *Micrococcus luteus*, *L. innocua*, *S. enteritidis*, *E. coli* y *S. aureus*. Los componentes fenólicos como: carvacrol, timol o eugenol combinados con nisina actúan sinérgicamente contra los microorganismos *B. cereus* y *L. monocytogenes*; mientras que la combinación de nisina con un extracto de canela actúan contra *S. thyphimurium* y *E. coli* O157:H7 (Ultee *et al.*, 2002).

8.2.3. Metabolitos de plantas, frutas y especias incorporados en películas y recubrimientos

Otro importante grupo de agentes antimicrobinos son los aceites esenciales, extractos de especias y semillas de leguminosas por sus altas concentraciones de compuestos fenólicos como son el carvacrol, eugenol y timol; además de taninos hidrolizables y condensados (Dadalioglu y Evrendilek, 2004; Lin *et al.*, 2004; Trosyńska *et al.*, 2002 y 2006). El papel de los polifenoles no está relacionado con alguna función metabólica de la fuente, pero sirven de protección para microorganismos, insectos y herbívoros mayores (López *et al.*; 2004), demostrando una gran variedad de actividades biológicas (Okuda, *et al.*, 1991 y Yokosawa, 1998). La actividad biológica de los polifenoles se debe a la habilidad de sus grupos hidroxilo y dobles enlaces conjugados (Ultee *et al.*, 2002), para alterar la membrana citoplasmática, interrumpir la fuerza motriz de protones y electrones, transporte activo y/o coagulación del contenido celular (Burt, 2004; McAllister *et al.*, 1994). Los compuestos fenólicos también están involucrados en la

adhesión por la unión a proteínas y pared celular, en la inactivación enzimática y en la inclusión en el DNA como modos de acción en la inactivación de patógenos (Davidson, 2001). Los compuestos fenólicos tienen una mayor actividad inhibitoria contra bacterias Gram-positivas que contra Gram- negativas (Beuchat y Golden, 1989).

Según Oussalah *et al.* (2004) en estudios de películas comestibles de proteínas adicionadas con extractos naturales de orégano, salvia, romero, ajo y pimienta morrón encontraron efectos antimicrobianos (contra *Salmonella* y *Pseudomonas*) y antioxidantes en carnes. Seydim *et al.* (2006) incorporaron aceites esenciales de carvacrol, timol y eugenol en películas de WPI a pH de 8.0 contra microorganismos patógenos, donde concentraciones del 4% del compuesto activo, específicamente carvacrol, mostraron una buena actividad antimicrobiana. Aún a niveles de 0.1% resulta efectivo contra *E. coli*, pero en películas preparadas a pH de 5.0 (Rojas-Graü *et al.*, 2007). Amarowicz *et al.*; (2008) evaluaron la actividad antibacteriana de taninos constituyentes de semillas de trigo, frijón rojo, avellanas y nuez fresca; teniendo el frijón rojo una mayor variedad de compuestos polifenólicos contra: *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli O157:H7*, *S. typhimurium*, *L. plantarum*, *B. thermosphacta* y *P. fragi*; con una concentración mínima inhibitoria (CMI) de las fracciones de taninos entre 62.5 - 500 µg/mL. Al respecto, las semillas de colores diferentes del blanco, son las de mayor contenido de taninos condensados (Troszyńska *et al.*, 2006), aunque los compuestos de menor peso molecular tienen más afinidad a precipitar proteínas (Melencic *et al.*, 2008). Por otro lado, los extractos de semillas de uva tienen una efectiva actividad antimicrobiana y antioxidante en alimentos (Ahn *et al.*, 2004; Theivendran *et al.*, 2006), ya que al 1% de adición en combinación con nisina (10000 IU/g) en películas de aislado de soya (a pH 6.0) se incrementó el efecto contra *L. monocytogenes* (Sivaroban *et al.*, 2008).

8.2.3.1. Las semillas de tamarindo como fuente de antimicrobianos

En muchos países asiáticos, el tamarindo se usa en la medicina tradicional como antimicrobiano, digestivo, laxante, expectorante, antidiabético e inmunomodulador (Al-Fatimi *et al.*, 2007; Komutarin *et al.*, 2004; 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). 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). Los estudios como antimicrobiano son escasos, siendo una excelente opción como fuente de compuestos con actividad biológica para ser incorporados en películas y recubrimientos comestibles. Sin embargo, es necesario considerar que la interacción de los polifenoles de un TSE con los componentes de una matriz de película en base a WPI-NPS, podría alterar la actividad antimicrobiana en microorganismo de importancia durante el proceso de obtención de las películas.

9. Objetivo

Evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro*, inducida por la incorporación de un extracto polifenólico de las semillas del tamarindo en el proceso de obtención de películas comestibles proteína-almidón contra cepas microbianas de relevancia en la industria cárnica.

10. Material y métodos

10.1. Reactivos

Se usó medio MRS marca DIBICO®, caldo soya-tripticosa (CST) y agar bacteriológico Bixon® (México). La nisina fue Nisaplin® (DuPont Danisco). El cloruro de bario y H₂SO₄ fueron grado reactivo marca JT-Baker. Por otra parte, se preparó el extracto de las semillas de tamarindo (TSE), disolviendo un gramo de TSE en agua destilada estéril, y esterilizando posteriormente la solución por filtración (membranas estériles Millipore, Durapore® Membrane Filters, GV, Irlanda, con tamaño de poro de 0.22 µm).

10.2. Activación de cepas sensibles

El medio de cultivo para activar las cepas sensibles fue CST previamente esterilizado, e incubadas a 37 °C durante 24 horas. Las cepas fueron *Brochothrix thermosphacta* (NCIB-10018, Gram +), *Escherichia coli* (JMP101, Gram -) y *Listeria innocua* (ATCC33090, Gram +).

10.3. Actividad antimicrobiana del extracto de semillas de tamarindo durante el proceso de obtención de las películas comestibles

Para determinar la actividad antimicrobiana, se usó la técnica de difusión en placas de agar (Bhunja *et al.*, 1998) con ligeras modificaciones de Quintero-Salazar (2001) y Alvarez-Cisneros (2008). Se usaron 10 mL del medio MRS con 1.5 % de agar en cajas Petri desechables, parcialmente solidificadas se agregaron 8 mL del medio MRS pero con 0.8 % de agar. El medio fue previamente inoculado con 70 μ L de un inóculo de las cepas sensibles ajustado a 0.5 del estándar de McFarland (0.5 mL de BaCl₂ a 0.048 M y 99.5 mL de H₂SO₄ a 0.18M) con agua destilada estéril (Andrews, 2001). Las placas se solidificaron a 2 °C durante 12 horas, para posteriormente hacer los pozos en la capa superior del medio de cultivo. Cada pozo fue inoculado con 25 μ L de las diferentes concentraciones del extracto de semillas de tamarindo (TSE) o de la solución formadora de películas (FFS), para posteriormente las cajas Petri ser incubadas durante 24 h a 37 °C.

Se usó como control positivo Nisina® a 30 μ g de proteína por mililitro y cada concentración de TSE en las dos etapas de obtención de películas (FFS y secado) fueron inoculadas por quintuplicado para cada microorganismo. Las películas fueron cortadas en círculos de 6 mm de diámetro, mismos que fueron puestos en cajas Petri estériles a Luz UV durante 12 horas. Transcurrido el tiempo, los discos fueron colocados sobre los medios de cultivo antes descritos para ser medidos y evaluados de la misma forma antes mencionada. Todas las películas se evaluaron por quintuplicado.

El halo de inhibición producido por las diferentes diluciones del extracto de tamarindo, de la solución formadora de películas + TSE y de las películas con TSE se usaron para determinar la actividad antimicrobiana. Además, se identificó la concentración mínima inhibitoria, definida como la concentración más baja de un posible agente antimicrobiano en la cual no se observará un crecimiento visible del organismo después de 24 h de incubación (Andrews, 2001).

10.4. Análisis estadístico

Las áreas del halo de inhibición se muestran como las medias de mínimos cuadrados y el error estándar de la media. Las medias se analizaron por un análisis de varianzas por el método GLM a un nivel de significancia $\alpha = 0.05$ (SAS® 9.3 TS Level 1M2, V. 6.2.9200, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Para encontrar diferencias significativas entre tratamientos se usó la prueba de comparación múltiple Tukey a una $p < 0.05$.

11. Resultados

11.1. Actividad antimicrobiana del extracto de semillas de tamarindo durante el proceso de elaboración de películas comestibles

Como se observa en el cuadro 5, el extracto de semilla de tamarindo (TSE) tuvo actividad antimicrobiana ($p < 0.05$) contra las tres cepas evaluadas (*B. thermosphacta*, *E. coli* y *L. innocua*). Para todas las bacterias, la actividad de Nisina® fue mayor (aproximadamente 25% más) comparado con el TSE. Respecto a *Listeria*, que es un microorganismo de alta observación, principalmente en productos de exportación. Los reportes indican que los productos de origen animal son altamente contaminados con *Listeria*, debido a la alta resistencia a las condiciones de refrigeración, de sales y tiempos prolongados de almacenamiento (Zu *et al.*, 2005). En este ensayo, se observó que la actividad del TSE contra *L. innocua* generó un halo con < 10 mm de diámetro (\emptyset) con 15.8 mg/mL (menor concentración con actividad antimicrobina), que al incorporarse una cantidad cercana (12.6 mg/mL) en la solución formadora de películas (FFS) el halo fue < 5 mm \emptyset , que después de solidificarse y formar la película apenas fue < 4 mm \emptyset . Por otro lado, al usar 126 mg/mL (10 \times) del TSE en la FFS, el halo alcanzó un $\emptyset > 10$ mm y en la película el \emptyset fue prácticamente igual. Los problemas de salud asociados a *E. coli* son comunes en nuestro país, además de ser principal indicador de contaminación fecal y malas prácticas de higiene. La menor actividad se alcanzó con 7.9 mg/mL de TSE, mientras que con 12.6 mg/mL de TSE añadido a la FFS se alcanzó un \emptyset de halo de inhibición < 6 mm, que al evaluar la actividad antimicrobiana en la película esta descendió a < 5 mm. Pero al aumentar 10 \times el compuesto antimicrobiano la actividad en la película disminuyó 0.76 mm el \emptyset del halo de inhibición comparado cuando solo se tenía el TSE en la FFS. La bacteria *B. thermosphacta* es un microorganismo que actúa principalmente como deteriorante de productos cárnicos. El TSE

alcanzó una mínima inhibición contra *Brochotrix* a 15.8 mg/mL con un halo de $\phi = 9$ mm. En el proceso de obtención de películas comestibles con 12.6 mg/mL, existe una reducción del 37% de actividad antimicrobiana al comparar los halos de inhibición por TSE+ FFS y de la Película con TSE. Sin embargo, al usar 126 mg/mL de TSE, la reducción en la actividad solo es del 12.9%. Posteriormente, se realizaron pruebas para una posible interacción del TSE con Nisina® (30 μ g de proteína/mL) con 126 mg de TSE/mL) en cultivos líquidos inoculados con las tres cepas anteriores; no existió inhibición del crecimiento microbiano, lo que lleva a pensar que la cantidad de polifenoles inhibió la actividad de la bacteriocina. Por lo que se descartó alguna otra proporción del TSE y Nisina® para asegurar la actividad inhibitoria.

Cuadro 5. Actividad antimicrobiana del extracto de semilla de tamarindo en la obtención de películas comestibles WPI-NPS en cepas microbianas de importancia en la industria cárnica.[†]

	Antimicrobiano	Área del halo de inhibición (mm ²)		
	(mg/mL)	<i>B. thermosphacta</i>	<i>E. coli</i>	<i>L. innocua</i>
Extracto de las semillas de tamarindo (TSE) [‡]	126.0	155.2 ^b	141.4 ^b	135.2 ^b
	63.0	138.1 ^b	124.5 ^{bc}	108.7 ^c
	31.5	88.4 ^c	111.7 ^c	87.6 ^d
	15.8	63.7 ^{d+}	73.3 ^d	35.9 ^{e+}
	7.9	N.D	46.2 ^{e+}	N.D
	Nisina	201.4 ^a	180.7 ^a	189.5 ^a
	SEM	8.35	8.63	7.91
P	0.03	0.04	0.03	
TSE en la solución formadora de películas*	0.0	N.D	N.D	N.D
	126.0	125.6	116.6	89.1
	12.6	33.8	22.6	17.5
	SEM	5.76	6.32	8.71
	P	0.01	0.02	0.02
Películas con TSE**	0.0	N.D	N.D	N.D
	126.0	95.3	102.5	79.7
	12.6	13.6	17.8	11.4
	SEM	6.98	7.32	7.93
	P	0.01	0.02	0.02

[†] Medias de mínimos cuadros y error estándar de la media (SEM). [‡] Superíndices ^{a,b,c,d,e} diferentes en la misma columna para actividad del TSE indican las diferencias. ⁺ Concentración mínima inhibitoria.

12. Conclusiones

La actividad antimicrobiana del TSE fue comprobada, sin embargo, no se encontró una respuesta sinérgica con otro tipo de antimicrobiano. Las películas WPI-NPS incorporadas con TSE mostraron actividad antimicrobiana in vitro contra *B. thermosphacta*, *E. coli* y *L. innocua* proporcional a la concentración del extracto en la película, aunque la actividad antimicrobiana del extracto se redujo conforme se elaboraban las películas. Lo anterior sugiere que al menos un tipo de compuesto fenólico del extracto tuvo interacciones aparentemente débiles con los polímeros de la matriz de película, lo que favoreció su liberación y difusión hacia el medio de cultivo para ejercer su actividad.

V. PROTECCIÓN DE PELÍCULAS COMESTIBLES INCORPORADAS CON UN EXTRACTO DE LAS SEMILLAS DE TAMARINDO EN CARNE MOLIDA DE CERDO

13. Introducción

Actualmente México es el séptimo país a nivel mundial en producción de proteína animal y productos cárnicos (SAGARPA, 2016), principalmente carne de ave, de cerdo y de bovino. Al tener un crecimiento constante la industria demanda la generación de tecnologías que permitan preservar o incrementar la vida útil de sus productos. Esta demanda se ha atacado desde diversos escenarios, como es la producción con mejores genéticas, el uso de aditivos (vitaminas, minerales y antioxidantes) en el alimento, manejo y bienestar animal que podrían mejorar y preservar la calidad de la carne (Mitsumoto *et al.*, 1991). Por otro lado, la innovación en la generación de tecnologías de barrera, como son los sistemas de empaque, se inclina por desarrollos sostenibles y sustentables con el ambiente sin comprometer la función primordial de un empaque que es contener.

Los dos principales problemas en los productos de origen animal son la contaminación por bacterias patógenas y/o deteriorantes, y los asociados a la oxidación de la fracción lipídica y proteica (Gray *et al.*, 1996). En la oxidación proteica se encuentran los cambios de color, siendo la molécula de mioglobina la de mayor repercusión; mientras que en la fracción lipídica de la carne, la oxidación de los fosfolípidos de las membranas miofibrilares (Faustman y Cassens, 1990) puede causar detrimento de las propiedades funcionales y calidad. Se ha reportado el uso de antioxidantes, con mayor preferencia por los de origen natural para contrarrestar la oxidación en los alimentos (Nakatani, 1992). Hoy en día, el uso de antioxidantes derivados de especias, plantas y semillas es una tendencia (Aaby *et al.*, 2001; Gil *et al.*, 2001; McCarthy *et al.*, 2001, Zheng y Wang, 2001) con la gran oportunidad de ser usados como compuestos activos en empaques biodegradables para preservar la calidad sensorial, nutricional y microbiológica del producto (Cha y Chinnan, 2004; Han, 2000b; Ouatarra *et al.*, 2000).

14. Antecedentes

El hombre antes de ser sedentario perdió gran cantidad de sus alimentos en los largos viajes, por ello surgió la necesidad de conservar y/o movilizar sus productos cultivados, recolectados o de caza (Miller y Krochta, 1997). En las últimas décadas el auge de investigaciones sobre la producción de tecnologías de barrera tanto biodegradables como comestibles, en el que se encuentran las películas y recubrimientos elaborados con polímeros de origen natural ha tenido especial interés para ser aplicados en alimentos altamente perecederos como son los de origen animal. Se ha encontrado que películas y recubrimientos adicionados con compuestos con actividad antioxidante logran disminuir la oxidación de los alimentos; sin embargo, las fuentes de antioxidantes principalmente puros, siguen siendo una limitante de alto costo.

14.1. Agentes antioxidantes en películas y recubrimientos comestibles

Los antioxidantes son compuestos que pueden retrasar o reducir la velocidad de oxidación de las sustancias autooxidables (Enser, 1987). Los principales antioxidantes usados en los alimentos son liposolubles como los fenoles monihídricos o polihídricos con diversos sustituyentes en el anillo aromático. 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 cadena de autooxidación al inhibir la formación de radicales libres o interrumpir la cadena de propagación de radicales libres. Se ha postulado que los antioxidantes inhiben 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 fenólicos en sistemas bifásicos y multifásicos, por lo 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. Al respecto del uso de antioxidantes en la carne, la Meat Inspection Act permite adicionar entre 0.01-0.02% del peso fresco de estos antioxidantes en productos cárnicos.

En adición, las propiedades antioxidantes de los compuestos polifenólicos de plantas y vegetales ayudan en la salud humana (Yokozawa *et al.*, 1998). Los alimentos, bebidas y extractos de plantas ricos en compuestos polifenólicos, tales como el vino tinto, el extracto de semilla de uva, té verde y tamarindo, entre otros, tienen actividad: hipolipidémica, anti-arterioesclerosis, anti-inflamatoria, inmunomoduladores, antimicrobiana y antioxidante (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). Yokozawa *et al.* (1998) encontraron una gran variedad de taninos y flavonoides con elevada actividad antioxidante debido a los grupos orto-hidroxil, con fuerte actividad anti-radicalaria, en la que la acción de los taninos se incrementa a mayor número de grupos galloil. 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).

14.2. Las semillas de tamarindo como fuente de antioxidantes

Las semillas del tamarindo son de forma ovalada, comprimidas lateralmente, lisas, con la testa café lustrosa, de un centímetro de largo aproximadamente, carecen de endospermo y presentan un par de cotiledones gruesos (Salunke y Desai, 1984). Actualmente es de las frutas de mayor importancia a nivel mundial y puede llegar a cultivarse en más de 50 países tropicales y subtropicales (Kumar y Bhattacharya, 2008; Sudjaroen *et al.*, 2005). En México no se encuentra uso para los desechos agro-industriales generados durante el procesado del fruto; los estados de Colima, Guerrero, Oaxaca, Chiapas y Michoacán son los de mayor producción a nivel nacional. En algunas zonas rurales de la India se usa la pulpa seca del tamarindo junto con las semillas para prevenir la rancidez e incrementar la vida de anaquel del aceite de coco (Siddhuraju, 2007). Por lo que, la aplicación de películas comestibles WPI-NPS incorporadas con un extracto polifenólico de las semillas del tamarindo en carne de cerdo susceptible a reacciones de oxidación durante el almacenamiento, podría reducir los cambios en el color y en la oxidación

lipídica y proteica, al modificar la actividad antioxidante en la porción del alimento más cercano a la superficie de la película.

15. Objetivo

Evaluar la actividad protectora de películas comestibles WIPI-NPS incorporadas con un extracto de las semillas de tamarindo sobre el color y la oxidación en carne molida de cerdo durante su almacenamiento.

16. Material y métodos

16.1. Reactivos

Se usó ácido tricloroacético, 1,1,3,3-tetraetoxipropano, albúmina de huevo, reactivo DNPH y Guanidina de SIGMA Aldrich. El cloruro de sodio, ácido clorhídrico, fosfato monobásico y dibásico, acetato de etilo fueron grado reactivo de JT-Baker.

16.2. Preparación de las películas comestibles

Se usó la formulación y técnica de elaboración de las películas comestibles a partir de WPI-NPS reportadas en el capítulo III, con la incorporación de dos niveles del extracto de semillas de tamarindo (TSE): 1.26 y 12.6 mg/100 mL de solución formadora de películas (FFS). Las soluciones de películas después de 48 h originaron las películas que fueron acondicionadas en humedad y temperatura. Se incluyó la elaboración de películas sin la adición de TSE y el uso de una funda de papel encerado (WPS) para preparar productos secos fermentados.

16.3. Sistema contenedor de carne y películas para el ensayo

El sistema propuesto para desarrollar la evaluación de la aplicación de las películas consistió de un tubo de PVC, en la Figura 3 se observa un cilindro de 5 cm de longitud \times 10 cm de diámetro, y 5 mm de espesor, cerrado por un extremo y en el otro, un anillo de sujeción por tornillos para colocar la película posterior al llenado con el alimento.

16.4. Preparación de la carne y aplicación de las películas

La carne con 4.3 ± 0.04 % de grasa se obtuvo de la región dorsal (lomo) de 15 cerdos de la misma edad y peso (168d de edad con 120 ± 2.6 kg) de la craza Duroc \times L.White, alimentados con 30 mg de vitamina E/kg de alimento en dietas a base de grano de sorgo y pasta de soya durante los últimos 42 días de engorda. Las muestras de carne por cerdo (aproximadamente 500g) se obtuvieron entre la costilla 10ª y última, que posteriormente fue molida en un molino para carne (Chefmate, Modelo CC 12, 1HP, y cedazo de 6 mm de apertura). La masa cárnica total (≈ 14 kg) fue añadida con 2% de NaCl.

Cada cilindro fue llenado con aproximadamente 500 g de carne molida, procurando eliminar la mayor proporción de oxígeno mediante golpes suaves en la pared y fondo del contenedor, para colocar finalmente en el extremo abierto la película correspondiente. Todos los cilindros con carne y películas fueron colocados en una cámara de refrigeración a 2 ± 0.7 °C sin iluminación durante 14 días, los muestreos se realizaron cada 7 días.

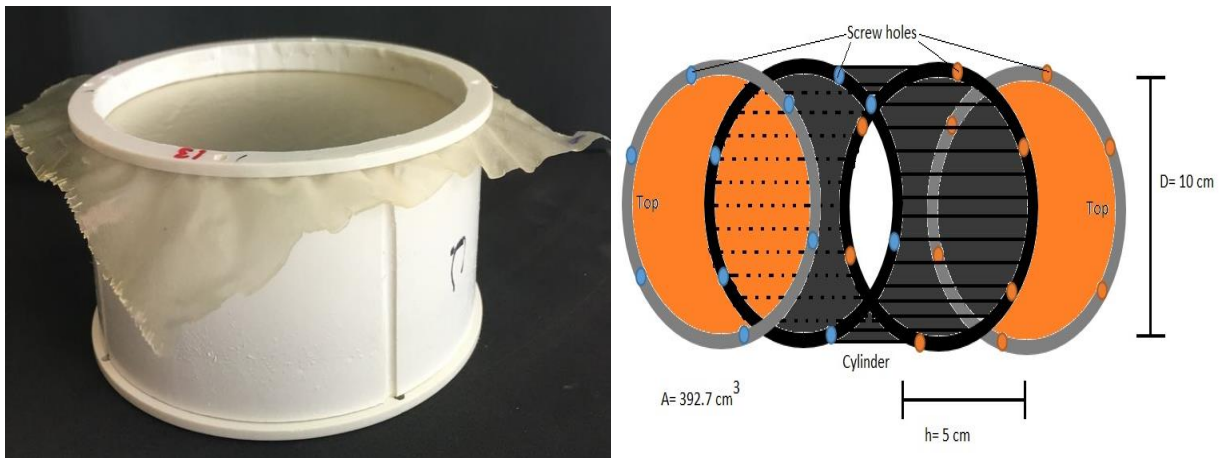


Figura 3. Prototipo de cilindro en PVC (A) usado en la pruebas de aplicación de la película con opción para colocar películas en ambos extremos del cilindro, las películas se colocan entre el extremo del cilindro y el anillo exterior mediante presión, los anillos se sujetan al cilindro mediante tornillos en los orificios de extremo a extremo. Diseño usado para el prototipo del cilindro (B).

16.5. Toma de muestras y análisis de la carne

Con la carne sobrante después de llenar los cilindros, se evaluaron las características iniciales por sextuplicado. Una vez cerrados los cilindros se estableció la zona para la toma de muestras según la profundidad de la carne en el contenedor: 1) superficial, en los primeros 5 milímetros inmediatos a la superficie de la carne, y 2) interna, posterior a la remoción de los primeros 5 milímetros hasta llegar a una profundidad de 20 mm. El contenido de cada cilindro se dividió en dos partes iguales, cada mitad fue removida a los 7 y 14 días empezando por la zona superficial y terminando con la zona interna. El espacio vacío al día 7 fue llenado con carne de cerdo molida fresca sin la adición de NaCl, para controlar la presencia de oxígeno.

Una vez removidas las películas y antes de extraer la zona superficial, se determinó el color (L, a* y b*) con un colorímetro portátil Hunter MiniScan (iluminante D65, 10° Observador) después de 30 min de oxigenación por triplicado. Posteriormente se removió la zona superficial en la que se analizó el pH (potenciómetro Hanna con electrodo de punción calibrado en tres puntos: 4, 7 y 10) al homogenizar (Homogeneizador UltraTurrax) 10 g de muestra en 90 mL de agua destilada. El grado de oxidación mediante la técnica de TBARS (especies reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico), la oxidación proteica por la técnica del DNPH y la actividad antioxidante FRAP (potencial antioxidante reductor del hierro) también fueron determinados. Inmediatamente se continuó con la remoción de la zona interna para repetir el procedimiento de evaluación que en la zona superficial.

16.5.1. Oxidación lipídica por TBARS

Para la técnica de TBARS, se pesaron 5 g de carne que se homogenizó con 20 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 5% (p/v) durante 1 min. El homogenizado se centrifugó (Centrifuga 5810R Eppendorf, Hamburgo Alemania) a 10,000 rpm durante 20 min a 4 °C. La solución se filtró con papel Whatman No. 4 y el filtrado se colectó. Se tomaron 2 mL del filtrado y se adicionarán 2 mL de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) 80 mM, aplicando un tratamiento térmico de 94 °C durante 30 min, se dejó enfriar la solución y se leyó la absorbencia a 530 nm en un espectrofotómetro Thermo® Scientific, Genesys (Raharjo Sri *et al.*, 1992). Los resultados se reportaron en mg de malonaldehído (MDA)/kg de carne, utilizando el coeficiente de extinción

molar de $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Además se generó una curva estándar con 1,1,3,3-tetraetoxipropano en concentraciones de 2×10^{-8} hasta $4 \times 10^{-10} \text{ M}$.

16.5.2. Oxidación proteica por el método DNPH

A partir de 3 g de carne y 30 mL de un buffer de pirofosfato (2 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 10 mM Tris-maleato, 100 mM KCl, 2 mM MgCl_2 y 2 mM EGTA a pH 7.4) se obtuvo un homogeneizado después de 30 min (Armenteros *et al.*, 2009). De cada homogeneizado se generaron dos alícuotas de 0.1 mL que fueron tratadas de la siguiente manera: a cada alícuota se le adicionó 1 mL de TCA al 10% y se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min para obtener el pellet (un pellet se etiquetó como A y el otro como B). Al pellet A se adicionó 1 mL de HCl 2N y al B se adicionó 1 mL de DNPH (2% en HCl 2N). Ambos tubos fueron incubados a temperatura ambiente con agitación cada 15 min. Transcurrida 1 hora se adicionó 1 mL de TCA al 10% a B y se centrifugó nuevamente. El precipitado se lavó con etanol/acetato de etilo (1:1) y se suspendió en 1.5 mL de buffer de fosfatos 20 mM a pH 6.5 con hidrocloreuro de guanidina 6 M. El pellet A se leyó a 280 nm y el B a 370 nm. Con la absorbencia de A se calculó el contenido de proteína (curva estándar de albúmina de huevo) y con la de B se determinó el contenido de carbonilos con el coeficiente de extinción molar para las hidrazonas ($21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Los resultados se expresaron en nmol de carbonilos por mg de proteína.

16.5.3. Poder antioxidante reductor del hierro (FRAP)

Se usó la metodología de Descalzo *et al.* (2007). A partir de 5 g de carne y 25 mL de buffer de fosfatos 50 mM a pH 7 se obtuvo un homogeneizado que se centrifugó a 10,000 rpm durante 30 min. La suspensión se filtró en papel Whatman® #4 y los extractos se mantuvieron en baño de hielo. A 32 μL del extracto se le adicionaron 968 μL de una solución FRAP (2.5 mL de TPTZ 10 mM en HCl 40 mM, 2.5 mL de FeCl_3 20 mM y 25 mL del buffer de acetatos 0.3 mM a pH 3.6). Las absorbencias se leyeron a 593 nm a los 7 min de iniciar la reacción. La curva estándar se realizó con Trolox y los resultados se expresaron como equivalentes mM de Trolox por 100 g de carne.

16.5.4. Actividad antioxidante ABTS•+

A partir del extracto anterior en buffer de fosfatos se realizó el siguiente ensayo (Re *et al.*, 1999). Se preparó una solución 7 mM de ABTS y persulfato de potasio 2.4 mM que se incubaron en la oscuridad por 16 h para generar el radical ABTS^{•+}. La absorbencia de la solución se ajustó a 0.70 con solución PBS (pH 7.4) a 734 nm. La reacción se realizó con 10 µL de extracto y 990 µL del ABTS^{•+}, después de 7 min se registró la absorbencia. Se realizó una curva estándar con Trolox y los resultados se expresaron como equivalentes mM de Trolox por 100 g de carne.

16.6. Análisis estadístico

A partir de un diseño completamente al azar con arreglo factorial de 4 tipos de películas x 2 profundidades de muestreo, se analizaron durante el tiempo las variables respuesta. Los resultados se muestran como las medias de mínimos cuadrados y el error estándar de la media. El análisis durante el tiempo se realizó con el procedimiento MIXED, del paquete estadístico SAS® (9.3 TS Level 1M2, V. 6.2.9200, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Para encontrar diferencias significativas entre los factores principales e interacción se usó la prueba de comparación múltiple Tukey a una $p < 0.05$.

17. Resultados

17.1. Evaluación de la estabilidad oxidativa a diferentes profundidades de la carne de cerdo molida con 2% de NaCl protegida con películas WPI-NPS

Con esta prueba se observa que la actividad oxidativa es diferente a medida que se alcanza mayor profundidad en el producto ($p < 0.007$), además de sugerir que en caso de haber migración del extracto antioxidante de las películas al alimento, esta podría ser muy baja. Es necesario considerar que los fenómenos físicos en el alimento como la pérdida de agua por evaporación y la misma gravedad, normalmente modifican el contenido de agua en los productos en un gradiente, lo que podría estar confundiendo algunos de los resultados, por ejemplo, los asociados al color en el que se observó una menor luminosidad y contenido de pigmentos rojos superficialmente en todas los cilindros con carne; mientras que al interior se retuvo agua y se concentraron los pigmentos rojos posiblemente por gravedad (Cuadro 6). Contrario a lo

sucedido en los pigmentos amarillos, que posiblemente por su concentración y polaridad no se detectaron cambios entre las profundidades de muestreo.

La oxidación lipídica y proteica que fue mayor a nivel superficial, de 25 a 50% más respectivamente; en ambos casos los valores son altos comparados con los que se podrían encontrar en carne fresca de cerdo. Al estar el sistema cárnico (carne molida) bajo condiciones oxidantes por la adición de NaCl, aparentemente demandó mayor actividad antioxidante, lo que se refleja en una menor actividad superficial por las técnicas de FRAP y ABTS⁺⁺. Es necesario recalcar, que la superficie muestreada solo correspondió a 0.5 cm, longitud similar a las costras formadas en productos cárnicos embutidos-madurados; lo que sugiere, que la aplicación de estas películas podría ayudar a controlar los cambios superficiales en productos madurados. Con estos resultados, en el siguiente análisis (Cuadro 7) solo se analizan los resultados a nivel superficial, que son los directamente relacionados con la aplicación de las películas WPI-NPS adicionadas de un TSE.

Cuadro 6. Estabilidad oxidativa a diferentes profundidades en carne de cerdo molida con 2% de NaCl protegida por las películas WPI-NPS.[†]

	Superficial	Interna	EEM	P
L	50.74	56.54	0.173	0.001
a*	8.85	10.48	0.115	0.001
b*	19.36	19.07	0.109	0.072
FRAP, mM Trolox/100 g	0.25	0.26	0.003	0.017
ABTS ⁺⁺ , mM Trolox/100 g	1.11	1.50	0.019	0.001
TBARS, mg MDA/kg	5.19	3.94	0.073	0.001
DNPH, nmol carbonilos/mg proteína	8.38	4.17	0.172	0.001

[†] Medias de mínimos cuadrados y error estándar de la media (EEM) corresponden a la respuesta generada por las películas comestibles WPI-NPS con o sin el uso del TSE. ^{a,b,c...} literales diferentes en el mismo renglón indica diferencias para el efecto de la profundidad.

17.2. Evaluación del tipo de empaque (películas de WPI-NPS dionadas con TSE vs funda encerada) en la estabilidad oxidativa superficial de la carne de cerdo molida con 2% de NaCl

En el cuadro 7, se observa el efecto protector por parte de las películas incorporadas con TSE ($p < 0.008$) sobre la superficie de la carne molida de cerdo en los cilindros. Para el efecto del tipo de película en el ensayo, se observa que conforme se incrementa el nivel de TSE en las películas se puede llegar a perder luminosidad ($p < 0.0001$), así como los tonos amarillos ($p < 0.002$), estos resultados podrían tener interferencia por el fenómeno de evaporación del agua a nivel superficial o el desjugado de la carne. Mientras que no existen cambios en el valor de los tonos rojos ($p > 0.5$), lo que indica que no existió difusión de los compuestos del extracto (TSE es de color rojo) hacia el alimento. Aún así, la funda sintética tiene la mayor pérdida de luminosidad y tonos amarillos, a valores de rojos similares a los otros cilindros; lo que constata que la funda sintética es más permeable al agua.

La oxidación en carne fresca oscila entre 0.8 a 1.2 mg MDA/kg. En la carne empacada con funda sintética se observó la mayor oxidación ($p < 0.008$), mientras que al incorporar el TSE se observó una tendencia a reducir la formación de malondialdehído. Haciendo uso de una comparación planeada (uso de TSE en películas WPI-NPS vs. películas WPI-NPS sin TSE), se observó que la incorporación del TSE redujo 0.14 mgMDA/kg (de 5.28 a 5.14 mg MDA/kg) la oxidación, que comparado con la oxidación en fundas sintéticas es una reducción de 0.59 mg MDA/kg. Comportamiento contrario por el nivel del TSE se observó en la oxidación proteica, donde la película WPI-NPS por sí sola redujo ($p < 0.0001$) a la mitad la oxidación alcanzada por usar una funda sintética, pero que al incorporar el mayor nivel de TSE, se indujo una ligera oxidación para subir 2.25 nmol de carbonilos generados por miligramo de proteína cárnica. En adición, la actividad antioxidante por la técnica del radical ABTS^{•+}, se incrementó por la presencia del mayor nivel del TSE ($p < 0.008$) suficiente para reducir oxidación lipídica, la carne por sí sola tuvo una baja actividad antiradicalaria, lo que sugiere que algún compuesto del material de película está aportando actividad a nivel superficial. Mientras que por la técnica de FRAP, se observa que el TSE no aportó actividad de este tipo a la matriz de carne, ya que

posiblemente, la poca actividad basal disminuyó ($p < 0.003$) al tratar de reducir las reacciones de oxidación proteica.

Cuadro 7. Efecto protector de las películas WPI-NPS adicionadas con un extracto de las semillas de tamarindo (TSE) en la superficie de carne de cerdo molida con 2% de NaCl.[†]

	g TSE/100 mL de FFS			WPS	EEM	P
	0	1.26	12.6			
L	51.76 ^a	50.63 ^a	49.82 ^{ab}	49.40 ^b	0.304	0.001
a*	8.66	9.01	8.89	8.86	0.178	0.580
b*	19.59 ^a	19.48 ^a	19.01 ^{ab}	18.58 ^b	0.174	0.002
FRAP, mM Trolox/100 g	0.27 ^a	0.25 ^b	0.24 ^b	0.27 ^a	0.006	0.003
ABTS ⁺⁺ , mM Trolox/100 g	0.98 ^a	1.16 ^{ab}	1.19 ^b	1.13 ^{ab}	0.031	0.001
TBARS, mg MDA/kg	5.28 ^b	5.09 ^a	5.19 ^{ab}	5.73 ^c	0.125	0.008
DNPH, nmol carb/mg prot	7.60 ^a	7.70 ^{ab}	9.85 ^b	14.19 ^c	0.334	0.001

[†] Medias de mínimos cuadrados y error estándar de la media (EEM). WPS= funda de papel encerado. a,b,c... literales diferentes en el mismo renglón indica las diferencias entre medias para el efecto tipo de película.

En lo que respecta a los resultados a nivel superficial de la carne en cilindros cubiertos con los empaques (películas y funda), la interacción en el tiempo y el tipo de película se encontraron diferencias en L, b*, TBARS, DNPH y FRAP ($p < 0.0008$). En el tiempo, los valores de L disminuyen considerablemente (Figura 4, Barras), con el menor valor para la película con alto contenido de TSE y la funda sintética. Mientras que b* (Figura 4, Líneas) por efecto de las películas WPI aumenta ligeramente y en la carne cubierta con la funda sintética decae considerablemente a los 14 días de almacenamiento. La oxidación lipídica (Figura 5, Barras) al día 7 es menor cuando se usó la mayor concentración de TSE en las películas WPI-NPS; sin embargo, al día 14 el solo usar películas WPI-NPS aún con el menor valor de TSe fue suficiente para reducir la oxidación comparada con la máxima que se alcanzó con la funda sintética o con las películas de la mayor dosis de TSE, probablemente a este nivel de extracto, el compuesto tendió a ser pro-oxidante. Por el contrario, la oxidación (Figura 6, Barras) proteica a los 7 días de almacenamiento se redujo a mayor concentración de extracto en las películas WPI-NPS, mientras que con la funda sintética se alcanzó la mayor oxidación (3× más), aún mayor que a los 14 días. A los 14 días de almacenamiento, el usar películas WPI-NPS es suficiente y similar

a usar el menor nivel de TSE en las películas para mantener la oxidación proteica aún baja, aunque no es posible determinar si transcurrido ese tiempo se alcanzó la máxima oxidación. A pesar de haber cuantificado actividad antioxidante por la técnica de FRAP comparando con la oxidación (Figura 5 y 6, Líneas), se puede observar, que la carne empacada con película o funda sin TSE tuvo la misma actividad, pero con diferentes resultados en la oxidación; mientras que aparentemente al día 7 se tiene la misma actividad FRAP en las películas con algún contenido de TSE, los resultados en reducir la oxidación son mejores a mayor concentración del extracto; sin embargo, la actividad con el valor bajo de TSE a los 14 días aún es constante, mientras que por las películas con alto contenido de TSE disminuye propiciado una mayor oxidación.

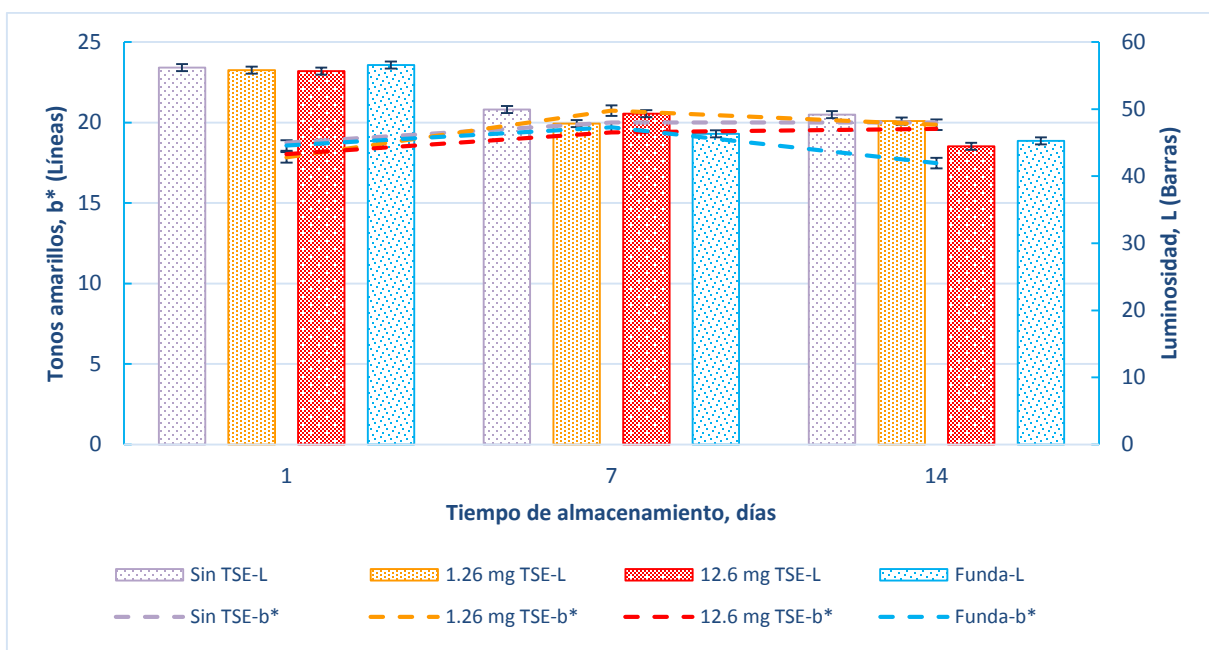


Figura 4. Cambios en el color ($p < 0.0002$) de la carne a nivel superficial (Barras = Luminosidad y Líneas = tonos amarillos) durante el almacenamiento de carne molida de cerdo con 2% de NaCl cubierta con las películas comestibles WPI-NPS incorporadas o no con TSE.

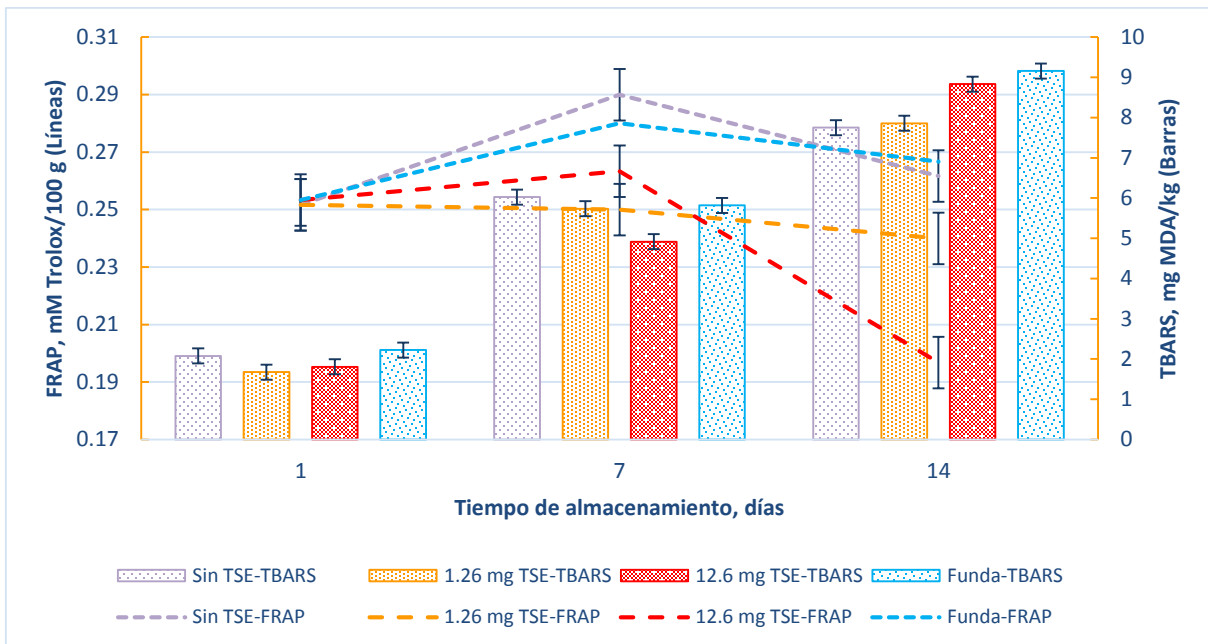


Figura 5. Cambios en la oxidación lipídica (Barras, $p < 0.0001$) respecto a la actividad FRAP (Líneas, $p < 0.0008$) durante el almacenamiento de carne molida de cerdo con 2% de NaCl cubierta con las películas comestibles WPI-NPS incorporadas o no con TSE.

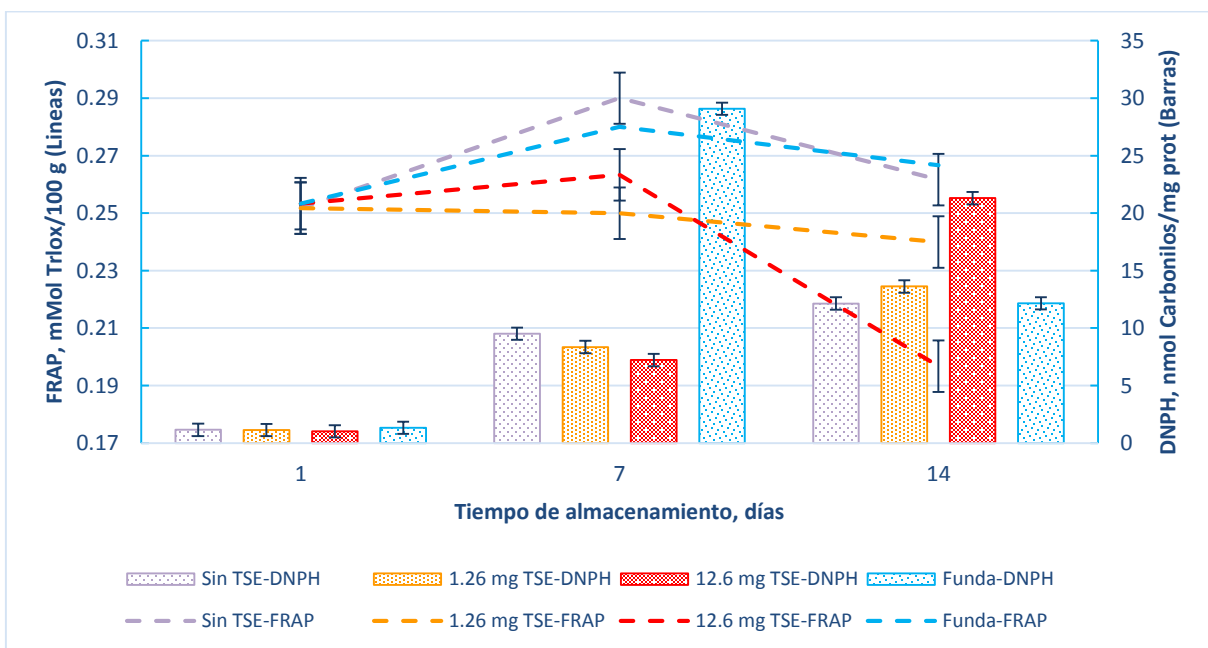


Figura 6. Cambios en la oxidación proteica (Barras, $p < 0.0001$) respecto a la actividad FRAP (Líneas, $p < 0.0008$) durante el almacenamiento de carne molida de cerdo con 2% de NaCl cubierta con las películas comestibles WPI-NPS incorporadas o no con TSE.

18. Conclusiones

La aplicación de películas comestibles WPI-NPS incorporadas con 1.26 mg de TSE durante 14 días en carne molida de cerdo bajo condiciones pro-oxidantes (2% de NaCl) aportó la mayor inhibición de las reacciones de oxidación proteica y lipídica a nivel superficial, con aparentemente una baja permeabilidad al agua, que se reflejó en una mayor preservación de la luminosidad y los valores de amarillos. La falta de cambios en los tonos rojos de la carne, hace suponer que el extracto no fue liberado al alimento sino que la actividad fue en la zona de contacto.

VI. CONCLUSIONES GENERALES

El uso de TSE en la producción de películas proteína-almidón mejoró las propiedades mecánicas, incrementó el color y por lo tanto la opacidad, además de aumentar la solubilidad. Los cambios inducidos en las propiedades mecánicas, antioxidantes y de color de las películas fueron estables aún después del almacenamiento. La composición polifenólica del TSE incrementó la actividad protectora de las películas comestibles bi-componente, a base de aislado proteico de suero de leche y almidón nativo de papa. Al respecto, se observó actividad antimicrobiana contra *L. innocua*, *E. coli* y *B. thermosphacta* in vitro, aunque el halo de inhibición apenas fue lo suficientemente grande para alcanzar diferencias, lo que lleva a suponer que los compuestos activos de las películas son de baja difusividad. En adición, la aplicación de las películas con TSE en carne molida de cerdo en presencia de un factor pro-oxidante, redujo la oxidación proteica, lipídica y los cambios en algunos parámetros del color como la luminosidad y los tonos amarillos. Aparentemente, el TSE (de coloración rojiza) tiene actividad por contacto con el alimento, puesto que los tonos en los rojos no se alteraron después del almacenamiento, descartando que al tener las películas mayor solubilidad, la actividad liberada sea la adecuada para trabajar frente a una situación de estrés oxidativo acelerado. Usar un 1.26 mg de TSE/100 mL de solución formadora de película, resultó como adecuado para producir películas WPI-NPS, aumentar su protección y evitar caer en situaciones pro-oxidantes.

VII. PERSPECTIVAS

Es necesario profundizar en la interacción del TSE y los polímeros WPI y NPS durante la formación de las películas, y realizar combinaciones con otros materiales para tener un empaque con características más cercanas a los empaques sintéticos. Por otro lado, la actividad antioxidante aportada por el extracto de un residuo agro-industrial, como fueron las semillas de tamarindo logró producir películas activas, que aún en largos periodos de almacenamiento logró mantener sus propiedades, sin embargo, si las películas fueran aplicadas a un producto más complejo en composición, sería necesario indagar en los posibles cambios sensoriales al alimento. Es necesario, volver a estudiar la actividad microbiana en combinación con otro tipo de antimicrobianos, para evitar inhibición de la actividad de los compuestos. Finalmente, es necesario hacer uso de todas las tecnologías previas al procesado de la carne, para tener un mejor control y preservación de las reacciones de deterioro en los alimentos, el uso de carne enriquecida en antioxidantes desde la granja, podría incrementar el éxito por tecnologías más amigables con el ambiente, como son las películas comestibles.

VIII. REFERENCIAS

- Aaby, K; Skrvten, A. G; Skrede, G; Mielnik, M. 2001. Antioxidant effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis*), sage (*Salvia officinalis* L.) and oregano (*Origanum vulgare*) extracts during frozen storage of turkey meat. Paper 30C. IFT Annual Meeting Proceedings. New Orleans, LA, USA.
- 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.
- Alvarado-González, J. S., Chanona-Pérez, J. J., Welti-Chanes, J. S., Calderón-Domínguez, G., Arzate-Vázquez, I., Pacheco-Alcalá, S. U., Gutiérrez-López, G. F. 2012. Optical,

- microstructural, functional and nanomechanical properties of Aloe vera gel/gellan gum edible films. *Revista Mexicana de Ingeniera Química*, 11(2), 193–202.
- Anker, M., Stading, M., & Hermansson, A.-M. 2000. Relationship between the Microstructure and the Mechanical and Barrier Properties of Whey Protein Films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), 3806–3816. <https://doi.org/10.1021/jf000040m>
- 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.
- Arcan, I., & Yemenicioğlu, A. 2011. Incorporating phenolic compounds opens a new perspective to use zein films as flexible bioactive packaging materials. *Food Research International*, 44(2). <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.11.034>
- Arcan, I., & Yemenicioğlu, A. 2014. Controlled release properties of zein-fatty acid blend films for multiple bioactive compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(32). <https://doi.org/10.1021/jf500666w>
- 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.
- 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 of Agriculture and Food Chemistry*. 53: 2015–2021.
- 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. *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.
- 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.
- Cao, N; Fu, Y; He, J. 2007. Mechanical properties of gelatine films cross-linked, respectively, by ferulic 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) fibers and internally cooled SPME fiber. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 54: 8688–8696.

- 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. *International 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.
- Chandra, M. C., Rakhavan, K. R., Sudharsan, K., Radha, K. K., Babuskin, S., & Sukumar, M. 2016. Design and characterization of spice fused tamarind starch edible packaging films. *LWT - Food Science and Technology*, 68, 642–652. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.01.004>
- 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.
- CropIndex. 2016. Horticulture and Landscape Architecture/Tamarindus indica. Retrieved from <https://hort.purdue.edu/newcrop/default.html>
- 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.
- Damodaran, S., Parkin, K., & Fennema, O. 2008. *Fennema's Food Chemistry* (4th ed). Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis.
- 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.

- Enser, M. 1987. What is lipid oxidation. *Food Science and Technology Today*, 1:172-173.
- 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.
- Falguera, V., Quintero, J. P., Jiménez, A., Muñoz, J. A., & Ibarz, A. 2011. Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use. *Trends in Food Science & Technology*, 22(6), 292–303. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.02.004>
- 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.
- Faustman, C; Cassens, R. G. 1990. The biochemical basis for discoloration in fresh meat: a review. *Journal of Muscle Foods*, 1:217-243.
- 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-Martínez, N. L., Valdez-Fragoso, A., Jiménez-Islas, H., & Pérez-Pérez, M. C. 2017. Propiedades físicas, de barrera, mecánicas y microestructurales de películas comestibles a base de gel de Aloe vera, grenetina y glicerol incorporados con aceite esencial de Pimenta dioica L. Merrill. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 16(1), 109–119.
- Floris, R., Bodnár, I., Weinbreck, F., & Altling, A. C. 2008. Dynamic rearrangement of disulfide bridges influences solubility of whey protein coatings. *International Dairy Journal*, 18(5). <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.10.013>
- 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.

- 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.
- Geyer, R; Jambeck, J. R., Law, K. L. 2017. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*, 3:e1700782. DOI: 10.1126/sciadv.1700782
- Giancone, T; Torrieri, E.; Masi, P; Michon, C. 2008. Protein-polysaccharide interactions: Phase behaviour of pectin-soy flour mixture. *Food Hydrocolloids*. Paginación en trámite.
- Gil, M. D; Bañón, S. J; Cayuela, J. M; Laencina, J; Garrido, M. D. 2001. Utilización de extractos de plantas como antioxidantes naturales en carne y productos cárnicos: revisión. *Eurocarne*, 101:29-41.
- Gómez-Estaca, J., López-de-Dicastillo, C., Hernández-Muñoz, P., Catalá, R., & Gavara, R. 2014. Advances in antioxidant active food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, 35(1), 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.10.008>
- 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.
- Gounga, M. E., Xu, S.-Y., & Wang, Z. 2007. Whey protein isolate-based edible films as affected by protein concentration, glycerol ratio and pullulan addition in film formation. *Journal of Food Engineering*, 83(4). <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.04.008>
- Goyal, P; Kumar, V; Sharma, P. 2007. Carboxymethylation of Tamarind kernel powder. *Carbohydrate Polymers*. 69: 251–255.
- Gray, J. I; Gomma, E. A; Buckley, D. J. 1996. Oxidative quality and shelf-life of meats. *Meat science*, 43:S111-S123.

- 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*. 22(3): 91-95.
- 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.
- Hernández-Carrillo, J. G., Valdez Fragoso, A., Welti-Chanes, J., & Mujica Paz, H. 2015. Tracing Phenolic Compounds Through Manufacturing of Edible Films From Orange and Grapefruit Peels. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 14(3), 567–578.
- 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.
- Kanner, J. 2007. Dietary advanced lipid oxidation endproducts are risk factors to human health. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51(9), 1094–1101.
<https://doi.org/10.1002/mnfr.200600303>
- 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, esturcture 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.
- Ku, K.-J., Hong, Y.-H., & Song, K. B. 2008. Mechanical properties of a *Gelidium corneum* edible film containing catechin and its application in sausages. *Journal of Food Science*, 73(3). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00700.x>
- Kubow, S. 1992. Routes of formation and toxic consequences of lipid oxidation products in foods. *Free Radical Biology and Medicine*, 12(1), 63–81. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(92\)90059-P](https://doi.org/10.1016/0891-5849(92)90059-P)
- Kumar, R; Vaithiyanathan, S. 1990. Occurrence, nutricional 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.
- 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.
- Lin, H. C; Chen, P. C; Cheng, T. J; Chen, R. L. C. 2004. Formation of tannin– albumin nanoparticles at neutral pH as measured by light scattering techniques. *Analytical Biochemistry*. 325(1): 117–120.
- 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.
- 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.
- 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.
- Martins, J. T., Cerqueira, M. A., & Vicente, A. A. 2012. Influence of α -tocopherol on physicochemical properties of chitosan-based films. *Food Hydrocolloids*, 27(1).
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.06.011>

- Mate, J. I; Krochta, J. M. 1996. Comparasion of oxygen and water vapor permeabilities of whey protein isolate and lactoglobulin edible films. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 44:3001-3004.
- Mayachiew, P., & Devahastin, S. 2010. Effects of drying methods and conditions on release characteristics of edible chitosan films enriched with Indian gooseberry extract. *Food Chemistry*, 118(3). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.027>
- 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.
- McCarthy, T. L; Kerry, J. P; Kerry, J. F; Lynch, P. B; Buckley, D. J. 2001. Evaluation of the antioxidant potential of natural/plant extracts as compared with synthetic antioxidants and vitamin E in raw and cooked pork patties. *Meat Science*. 57:45-52.
- 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.
- McHugh, T. H., & Krochta, J. M. 1994. Sorbitol- vs glycerol-plasticized whey protein edible films: Integrated oxygen permeability and tensile property evaluation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(4).
- 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. Pholyphenol 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. Oxigen 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.
- Mitsumoto, M; Faustman, C; Cassens, R. G; Arnold, R. N; Schaefer, D. M; Scheller, K. K. 1991. Vitamin E and C improve pigment and lipid stability in ground beef. *Journal of Food Science*. 56(1):194-197.
- 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.
- 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 glycinin and β -conglycinin gels from soybeans. *Biopolymers*. 34: 1303-1309.
- Nakatani, N. 1992. Natural antioxidants from spices. En *Phenolic Compounds in Food and their Effects on Health. II. Antioxidants and Cancer Prevention*. Huang, M. T; Ho, C. T; Lee, C. Y. (eds). Washington, DC: ACS Symposium Series 507, American Chemical Society, pp. 72-86.
- 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.
- Norajit, K., Kim, K. M., & Ryu, G. H. 2010. Comparative studies on the characterization and antioxidant properties of biodegradable alginate films containing ginseng extract. *Journal of Food Engineering*, 98(3). <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.01.015>
- Okuda, T., Yoshida, T. y Hatano, T. 1991. *Plants and traditional 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.
- 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.
- 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.
- Pagella, C; Spigno, G; De Faveri, D. M. 2002. Characterization of starch based edible coatings. *Food and Bioproducts Processing*. 80: 193–198.
- 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. 2001. Denaturation Time and Temperature Effects on Solubility, Tensile Properties, and Oxygen Permeability of Whey Protein Edible Films. *Journal of Food Science*, 66(5), 705–710. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb04625.x>
- Piñeros-Hernandez, D., Medina-Jaramillo, C., López-Córdoba, A., & Goyanes, S. 2017. Edible cassava starch films carrying rosemary antioxidant extracts for potential use as active food packaging. *Food Hydrocolloids*, 63. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.09.034>
- 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.
- 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.

- Quintavalla, S; Vicini, L. 2002. Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Science*. 62: 373-380.
- Quintero-Salazar, 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 hydrofobicity. *Journal of Food Science*. 70: 398-403.
- Razali, N., Mat-Junit, S., Abdul-Muthalib, A. F., Subramaniam, S., & Abdul-Aziz, A. 2012. Effects of various solvents on the extraction of antioxidant phenolics from the leaves, seeds, veins and skins of *Tamarindus indica* L. *Food Chemistry*, 131(2).
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.001>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231–1237.
[https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- 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.
- Rodríguez-Marín, M. L., Alvarez-Ramírez, J., & Bello-Perez, L. A. 2016. Influence of storage time on mechanical properties of films made with montmorillonite/flour (unripe banana and rice) blends | Influencia del tiempo de almacenamiento en las propiedades mecánicas de películas de harinas (plátano y arroz)/ montmorillonita d. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 15(2), 433–439.
- 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>.
- 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.
- Shimada, K., & Cheftel, J. C. 1988. Texture characteristics, protein solubility, and sulfhydryl group/disulfide bond contents of heat-induced gels of whey protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36(5).
- 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.
- Sivarooban, 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.
- Silva-Weiss, A., Ihl, M., Sobral, P. J. A., Gómez-Guillén, M. C., & Bifani, V. 2013. Natural Additives in Bioactive Edible Films and Coatings: Functionality and Applications in

- Foods. *Food Engineering Reviews*, 5(4). <https://doi.org/10.1007/s12393-013-9072-5>
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144 LP-158.
- Siracusa, V., Rocculi, P., Romani, S., & Rosa, M. D. 2008. Biodegradable polymers for food packaging: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 19(12). <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.07.003>
- Siripatrawan, U., & Harte, B. R. 2010. Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids*, 24(8), 770–775. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.04.003>
- Skibsted, L. H. 2010. Understanding oxidation processes in foods. In *Oxidation in Foods and Beverages and Antioxidant Applications* (pp. 3–35). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9780857090447.1.3>
- 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, 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.
- Sothornvit, R., & Krochta, J. M. 2005. *Plasticizers in edible films and coatings. Innovations in Food Packaging*. <https://doi.org/10.1016/B978-012311632-1/50055-3>
- 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.
- Talón, E., Trifkovic, K. T., Nedovic, V. A., Bugarski, B. M., Vargas, M., Chiralt, A., & González-Martínez, C. 2017. Antioxidant edible films based on chitosan and starch containing polyphenols from thyme extracts. *Carbohydrate Polymers*, 157. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.10.080>
- 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. Philips, P.A. Williams & D.J. Wedlock (Eds.). *Gums and Stabilizers for the Food Industry*. 7: 115-154.
- Trezza, T. A; Krochta, J. M. 2000. Color stability of edible coatings during prolonged storage. *Journal of Food Science*. 65, 1166-1169.
- 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. Antioxidant pigments isolated from the seed of Tamarind (*Tamarindus indica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 42(12): 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.
- Villagómez-Zavala, D. L., Gómez-Corona, C., San Martín Martínez, E., Pérez-Orozco, J. P., Vernon-Carter, E. J., & Pedroza-Islas, R. 2008. Comparative study of the mechanical properties of edible films made from single and blended hydrophilic biopolymer matrices | Estudio comparativo de las propiedades mecánicas de películas comestibles elaboradas a partir de matrices poliméricas hidrofílicas. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 7(3), 263–273.
- Vinson, J. A; Teufel, K; Wu, N. 2004. Green and black teas inhibit atherosclerosis by lipid, antioxidant, and fibrinolytic mechanisms. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 52: 3661–3665.
- von Staszewski, M., Jagus, R. J., & Pilosof, A. M. R. 2011. Influence of green tea polyphenols on the colloidal stability and gelation of WPC. *Food Hydrocolloids*, 25(5).
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.10.004>
- 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.
- 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; Takhidov, 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.
- Zheng, W; Wang, S. Y. 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agroculture and Food Chemistry*. 49:5165-5170.



PRODUCCIÓN Y APLICACIÓN DE
PELÍCULAS DE
PROTEÍNA-ALMIDÓN CON
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y
ANTIMICROBIANA

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas del día 13 del mes de junio del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. JORGE SORIANO SANTOS
DR. OCTAVIO DUBLAN GARCIA
DRA. ISADORA MARTINEZ ARELLANO
DRA. GABRIELA MARIANA RODRIGUEZ SERRANO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA

DE: LUIS HUMBERTO LOPEZ HERNANDEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



LUIS HUMBERTO LOPEZ HERNANDEZ
ALUMNO

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. JORGE SORIANO SANTOS

VOCAL

DR. OCTAVIO DUBLAN GARCIA

VOCAL

DRA. ISADORA MARTINEZ ARELLANO

SECRETARIA

DRA. GABRIELA MARIANA RODRIGUEZ SERRANO