



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACTULTAD CIENCIAS BIOLÓGICAS

CARACTERIZACIÓN DE UNA PELÍCULA COMESTIBLE A BASE DE
EXTRACTO ACUOSO DE LA SEMILLA DE TAMARINDO (*TAMARINDUS
INDICA*) CON POSIBLE APLICACIÓN SOBRE BAYAS

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN BIOTECNOLOGIA

PRESENTA:

MARÍA JOSÉ CARACHEO ESPINOSA

DIRECTOR (A): DRA. FABIOLA AVELINO FLORES

ASESOR (ES): REYNA ZEFERINO DÍAZ

ANA LILIA SORIANO MORALES

MAYO 2021



INDICE

INDICE	2
INDICE DE FIGURAS	5
INDICE DE TABLAS	7
1. RESUMEN	9
2. ANTECEDENTES	10
2.1 Recubrimientos comestibles	10
2.2 <i>Tamarindus indica</i> L.	13
2.3 Bayas	16
2.4 <i>Cinnamomum zeylanicum</i>	17
3. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	19
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
5. JUSTIFICACIÓN	22
6. HIPOTESIS	23
7. OBJETIVOS	23
7.1 Objetivos Generales	23
7.2 Objetivos específicos	23
8. Metodología	24
8.1 Extracto de tamarindo	24
8.1.1 Extracción de la goma de tamarindo	24
8.1.2 Análisis de muestras mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)	25
8.1.3 Pruebas fisicoquímicas del extracto acuoso de semilla de tamarindo	25
8.1.4 Cuantificación de proteínas	26
8.1.5 Separación de proteínas por medio de electroforesis (SDS PAGE)	27
8.1.6 Determinación cualitativa de carbohidratos	29
8.1.7 Cenizas	30
8.1.8 Pruebas de susceptibilidad antibiótica por el método de Kirby Bauer.	30
8.2 Aceite esencial de corteza de <i>Cinnamomum zeylanicum</i>	31

8.2.1 Extracción de aceite esencial de corteza de canela por arrastre de vapor.	31
8.2.2 Análisis de muestras mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)	32
8.2.3 Resonancia Magnética nuclear de Protón de Aceite de corteza de canela.	32
8.2.4 Cromatografía en capa fina	32
8.2.4 Concentración de cinamaldehído y eugenol en aceite esencial de canela	33
8.2.5 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana	34
8.2.6 Concentración mínima inhibitoria	35
8.3 Biopelícula	35
8.3.1 Preparación de la biopelícula	35
8.3.2 Análisis de muestras mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)	35
8.3.3 Viscosidad cinemática	35
8.3.4 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana	36
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
9.1 Extracto de semilla de tamarindo	36
9.1.1. FTIR	37
9.1.2 Pruebas fisicoquímicas	40
9.1.3 Concentración de proteínas	43
9.1.4 Electroforesis SDS PAGE	45
9.1.5 Determinación cualitativa de carbohidratos	46
9.1.6 Cenizas	48
9.1.7 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana	48
9.2 Aceite Esencial De Canela	50
9.2.1 FTIR	50
9.2.2 Resonancia Magnética nuclear de Protón (RMN- ¹ H)	53
9.2.6 Concentración de cinamaldehído	55

9.2.7 Concentración del Eugenol	56
9.2.5 Cromatografía en capa fina	57
9.2.3 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana	59
9.2.4 Concentración mínima inhibitoria	63
9.3 Biopelícula	68
9.3.1 FTIR	68
9.3.2 Viscosidad	69
9.3.3 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana	70
10. CONCLUSIONES	72
11. ANEXOS	73
12. BIBLIOGRAFIA	75

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Gel cargado con las muestras 1, 2, 3 y 4 en centro, así como con los marcadores de peso en los extremos del gel.....	28
Figura 2. Equipo utilizado para llevar a cabo destilación por arrastre de vapor.....	31
Figura 3. Muestra 2 de extracto de semilla de tamarindo almacenado en frasco de vidrio para laboratorio de 50 ml autoclavable.....	36
Figura 4. Espectro de absorción FTIR del extracto de semilla de tamarindo (en negro) y la semilla de tamarindo (en azul) secada a temperatura ambiente. En los recuadros amarillo, verde y naranja se marcan las regiones que podrían ser atribuidas a carbohidratos, proteínas y lípidos respectivamente.	37
Figura 5. Espectros de absorción FTIR obtenido del extracto de semilla secada a 80° C a diferentes tiempos. En color azul se muestra el espectro del extracto producido con semilla secada por 9 días, en color rojo se muestra el espectro producido con semilla secada por 6 días y en negro el espectro con semilla secada por 4 días. En los recuadros amarillo, verde y naranja se marcan las regiones que podrían ser atribuidas a carbohidratos, proteínas y lípidos respectivamente.	38
Figura 6. Espectros de absorción FTIR del extracto de semilla de tamarindo obtenido. En los recuadros amarillo, verde y naranja se marcan las regiones que podrían ser atribuidas a carbohidratos, proteínas y lípidos respectivamente. Obtenido de: (Alpizar, y colaboradores, 2017)	40
Figura 7. Curva patrón obtenida a través del método de Bradford para obtener la concentración de proteínas presentes en el extracto de semilla de tamarindo.	44
Figura 8. Muestras de las pruebas cualitativas para la detección de carbohidratos. De izquierda a derecha el orden es el siguiente; Control, Molish, Benedict, Barfoed, Selivanoff y Fehling. ...	47
Figura 9. Gel de poliacrilamida en el que se muestra una banda de aproximadamente 35 kDa y una más delgada a los 18 kDa.	45
Figura 10. Crecimiento de E. coli en cajas Petri con un disco circular impregnado de extracto de tamarindo, según la técnica descrita anteriormente, este se encuentra marcado con un cuadro negro. En la misma placa se analizó el recubrimiento creado en base a este	49
Figura 11. Crecimiento de E. coli en cajas Petri con un disco circular impregnado de extracto de tamarindo, según la técnica descrita anteriormente, este se encuentra marcado con un cuadro negro. En la misma placa se analizó el recubrimiento creado en base a este	49
Figura 12. Crecimiento de Shigella sp.en cajas petri con un disco circular impregnado de extracto de tamarindo, según la técnica descrita anteriormente, este se encuentra marcado con un cuadro negro. En la misma placa se analizó el recubrimiento creado en base a este.....	50
Figura 13. Espectro de FTIR del aceite esencial de canela extraído por una destilación de arrastre de vapor. En azul se encuentran marcados las señales relacionadas al cinamaldehído,	

en rojo las señales relacionadas al eugenol y en morado las que pueden estar relacionadas a ambos compuestos.....	51
Figura 14. Espectro de FTIR del Aceite corteza de canela obtenido por extracción alcohólica.	51
Figura 15. Espectro de absorción FT/IR del aceite esencial de corteza de canela comercial. En azul se encuentran marcados las señales relacionadas al cinamaldehído, en rojo las señales relacionadas al eugenol y en morado las que pueden estar relacionadas a ambos compuestos.	52
Figura 16. Espectros de resonancia magnética nuclear de ¹ H de aceite de corteza de canela extraído por destilación por arrastre de vapor y aceite de corteza de canela comercial.....	54
Figura 17. En la imagen izquierda se muestra la placa con prueba de la sensibilidad del microorganismo a Amplicilina de 30 µg como control positivo y como control negativo DMSO al 10%. En las dos imágenes de la derecha se observa la sensibilidad de EPEC frente a diferentes concentraciones del aceite esencial de corteza de canela, siendo la concentración de 300 mg/mL	60
Figura 18. En la imagen izquierda se muestra la prueba de sensibilidad de Salmonella typhimurium a Trimetoprima/sulfametoxazol de 25 µg como control positivo y como control negativo DMSO al 10%. Mientras que en las dos imágenes de la derecha se muestra la prueba de sensibilidad a diferentes concentraciones del aceite esencial de corteza de canela para Salmonella typhimurium.....	60
Figura 19. En la imagen izquierda se muestra la placa con la prueba de la sensibilidad de Shigella sp a ceftriaxoma 30 µg como control positivo y como contro negativo DMSO al 10%. Mientras que en las dos imágenes de la derecha se observa la sensibilidad a diferentes concentraciones del aceite esencial de corteza de canela para Shigella sp.....	61
Figura 20. Sensibilidad a diferentes concentraciones del aceite esencial de corteza de canela para Botritis cinérea.	61
Figura 21. Sensibilidad a diferentes concentraciones del aceite esencial de corteza de canela para EPEC.	64
Figura 22 . Sensibilidad a diferentes concentraciones del aceite esencial de corteza de canela para Salmonella tiphymurium.....	64
Figura 23. Sensibilidad a diferentes concentraciones del aceite esencial de corteza de canela para Shigella sp.....	65
Figura 24. Sensibilidad a diferentes concentraciones del aceite esencial de corteza de canela para Botrytis cinerea.....	65
Figura 25. Cromatografía en capa fina del aceite esencial de corteza de canela. Se observan las diferentes huellas obtenidas usando los compuestos que se observan en la parte baja de la imagen, visualizados con luz UV 254 nm.....	57
Figura 26. Cromatografía en capa fina del aceite esencial de corteza de canela. Se observan las diferentes huellas obtenidas usando los compuestos que se observan en la parte baja de la imagen, visualizados con Iodo.....	57

Figura 27. Cromatografía en capa fina del aceite esencial de corteza de canela. Se observan las diferentes huellas obtenidas usando los compuestos que se observan en la parte baja de la imagen, visualización con Ácido.....	58
Figura 28. Cromatografía en capa fina del aceite esencial de corteza de canela usando tolueno/acetato de etilo 93:7. Línea A, aceite esencial de corteza de canela. Obtenido de: (Utchariyakiat, Surassmo, Jaturanpinyo, Khuntayaporn, & Chomnawang, 2016).....	58
Figura 29. Curva de calibración del cinamaldehído usada para calcular la concentración de este compuesto en el aceite esencial de canela.	55
Figura 30. Curva de calibración del eugenol usada para calcular la concentración de este compuesto en el aceite esencial de canela.	56
Figura 31. Espectros de FTIR de la comparación de dos biopelículas. En color rojo se muestra el espectro de la biopelícula generada con semilla de tamarindo secada a 80 °C por 6 días. Mientras que en color negro se observa el espectro de la biopelícula producida con semilla de tamarindo secado a temperatura ambiente. El cuadro azul se señala lo que podría ser la fracción líquida de la biopelícula, en morado se señalan los picos asociados al glicerol.....	68
Figura 32. Espectros de FTIR de componentes de la biopelícula; glicerol y carboximetilcelulosa.	68
Figura 33. Cajas Petri sembradas con E coli con discos circulares impregnado de el recubrimiento comestible creado a base de semilla de tamarindo. Impregnados 2 diferentes cantidades de este (30 µl y 60 µl) estos se encuentran marcados con amarillo y verde. En la misma placa se analizó extracto de tamarindo.	73
Figura 34. Cajas Petri sembradas con Salmonella typhimurium con discos circulares impregnado de el recubrimiento comestible creado a base de semilla de tamarindo. Impregnados 2 diferentes cantidades de este (30 µl y 60 µl) estos se encuentran marcados con amarillo y verde. En la misma placa se analizó el extracto de tamarindo.....	74
Figura 35. Cajas Petri sembradas con Shigella sp. con discos circulares impregnado de el recubrimiento comestible creado a base de semilla de tamarindo. Impregnados 2 diferentes cantidades de este (30 µl y 60 µl) estos se encuentran marcados con amarillo y verde. En la misma placa se analizó el extracto de tamarindo	74

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Aceites esenciales usados en recubrimientos comestibles y su efectividad contra ciertos microorganismos.....	11
Tabla 2. Distribución química de componentes presentes en semilla de tamarindo.	14
Tabla 3. Contenido de aminoácidos en la semilla de tamarindo (mg/g).....	15
Tabla 4. Composición del aceite esencial de canela.	18
Tabla 5. Componentes del gel separador	27

Tabla 6. Componentes del gel concentrador	27
Tabla 7. Componentes para el buffer de corrimiento	28
Tabla 8. Coeficientes de Copa Zahn.....	40
Tabla 9. Resultados obtenidos de viscosidad cinemática (cSt).	41
Tabla 10. Datos obtenidos de análisis de pH para los lotes 1, 2, 3 y 4.....	42
Tabla 11. Porcentaje de humedad de cuatro muestras de extracto de semilla de tamarindo	43
Tabla 12. Datos de la desviación óptica y concentración obtenidos de los lotes 1, 2, 3 y 4.	44
Tabla 13. Resultados de pruebas cualitativas del extracto de semilla de tamarindo.	46
Tabla 14. Porcentaje de cenizas.....	48
Tabla 15. Datos obtenidos al analizar el aceite esencial de canela en espectrofotómetro, así como cálculos necesarios para obtener la concentración de cinamaldehído.....	55
Tabla 16. Datos obtenidos al analizar el aceite esencial de canela en Espectrofotómetro, así como cálculos necesarios para obtener la concentración del eugenol.	56
Tabla 17. Sensibilidad a diferentes concentraciones para los microorganismos seleccionados.....	59
Tabla 18. Concentración mínima inhibitoria para los microorganismos seleccionados.....	63
Tabla 19. Resultados de viscosidad cinemática de recubrimiento comestible hecho a base de extracto de semilla de tamarindo.....	70

1. RESUMEN

La búsqueda de alternativas para la conservación de alimentos ha tomado gran relevancia en los últimos años debido a los problemas cada vez más apremiantes que enfrenta nuestra sociedad. Algunas tecnologías emergentes buscan participar en la solución de estos problemas aprovechando y alargando el tiempo de vida de algunos alimentos altamente perecederos evitando procesos con un alto impacto ambiental para lograr su máximo aprovechamiento y así evitar pérdidas económicas y daños ambientales.

Un ejemplo de estos son los recubrimientos comestibles, estos se refieren a una delgada película capaz de impartirle propiedades funcionales específicas al alimento. La semilla de tamarindo es un subproducto ideal y poco explorado en el área de los recubrimientos comestibles sin embargo podría ofrecer soluciones para resolver algunos de los problemas mencionados y además puede resultar en un producto seguro, conveniente, de buena calidad y atractivo para el consumidor. En esta tesis se busca caracterizar un recubrimiento comestible hecho a partir de semilla de tamarindo y adicionado con aceite esencial de canela, para lo cual se analizaron propiedades fisicoquímicas y antimicrobianas, así como la concentración de algunos de los compuestos más importantes del extracto de la semilla de tamarindo, del aceite esencial de canela y del recubrimiento generado a partir de estas dos sustancias.

Se probó que el extracto de semilla de tamarindo cuenta con características favorables para la formación de un recubrimiento comestible gracias a sus resultados en las pruebas fisicoquímicas, además se observó la posible presencia de los carbohidratos y proteínas importantes en la formación de la goma. Por otra parte, el aceite esencial de canela resultó tener buenas propiedades antimicrobianas contra algunas bacterias de importancia alimentaria, además de ser una sustancia segura para su uso en alimentos. El recubrimiento comestible de igual manera demostró tener buenas propiedades para su uso en alimentos sin embargo se requieren más análisis para probar si el aceite esencial tiene efecto a esas concentraciones.

2. ANTECEDENTES

2.1 Recubrimientos comestibles

El uso de tecnologías emergentes como los recubrimientos comestibles hechos a partir de desechos naturales representan una mejor alternativa para el ambiente que puede sustituir hasta cierta medida el uso de empaques plásticos tradicionales. Además, satisfacen la necesidad de un consumidor cada vez más enfocado en el consumo de alimentos que cuenten con un mínimo procesamiento y que a su vez mantengan o mejoren sus propiedades nutricionales y organolépticas (Miramont, 2012)

Un recubrimiento comestible se refiere a una delgada película que se les añade a los alimentos y que se consume como parte de estos, es capaz de impartirle propiedades funcionales específicas al alimento ya que puede servir de soporte de aditivos como emulsificantes, antimicrobianos, antioxidantes, nutraceuticos, saborizantes, colorantes o algunos nutrientes como vitaminas. Algunas de estas características pueden mejorar la calidad y la seguridad del alimento. (Miramont, 2012) (Han, 2014). En particular, el uso de aceites esenciales le otorga al recubrimiento estabilidad microbiológica, permitiendo prolongar la vida de anaquel de un producto y a reducir el riesgo de contar con bacterias patógenas y deterioradoras de alimentos satisfaciendo así a los consumidores al utilizar productos menos procesados. (Sosa, Palou, & Malo, 2016)

Existen diversos estudios enfocados en la aplicación de aceites esenciales en la formulación de recubrimientos comestibles para mejorar las propiedades de estos, algunos ejemplos se muestran en la Tabla 1.

Por otra parte, los recubrimientos comestibles en frutas dan brillo, retardan el envejecimiento, conservan el color otorgándole una mayor calidad al producto por más tiempo. Existen diferentes formas para aplicar un recubrimiento comestible, siendo la inmersión la más utilizada, principalmente para recubrir alimentos de forma irregular. En algunos tipos de recubrimientos se emplea la aplicación por

atomización, o coberturas que puedan ser aplicadas con pinceles, cepillos o aplicarse directamente en el producto (Miramont, 2012)

Los recubrimientos comestibles cuentan con diversas características dadas por sus componentes que le permiten proteger al producto de daños físicos, químicos y microbiológicos (Moreira & Beltran, 2014). Algunos ejemplos de estos son la pérdida de humedad, disminuir la velocidad de algunas reacciones químicas, actuar como barreras para intercambio de gases y mejorar la estabilidad microbiológica de los alimentos (Osorio, Molina, Matiacevich, Enrione, & Skurtys, 2011).

Tabla 1. Aceites esenciales usados en recubrimientos comestibles y su efectividad contra ciertos microorganismos.

Aceites Esenciales	Recubrimientos comestibles	Microorganismos inhibidos
<i>Anís, albacá, y orégano</i>	Quitosano	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 y <i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Canela, limoncillo y orégano.</i>	Alginato - pure de manzana	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 y <i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Limoncillo</i>	Almidón	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 y <i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Orégano mexicano</i>	Amaranto, quitosano y almidón.	<i>Aspergillus niger</i> y <i>Penicillium</i> spp.
<i>Zataria multiflora Boiss</i>	Caseína	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> O157:H7 y <i>Salmonella thyphimurium</i>
<i>Bergamota, limón, árbol de té.</i>	Quitosano y hidroxipropilmetilcelulosa	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , y <i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Bergamota y limoncillo.</i>	Gelatina	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , y <i>Salmonella thyphimurium</i>
<i>Orégano.</i>	Proteína de triticale	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

<i>Citronela, cilantro, estragón y tomillo.</i>	Proteína de merluza	<i>Shewanella putrefaciens, Pseudomonas putida, y Brochotrix thermosphacta</i>
<i>Canela</i>	Almidón de yuca	<i>Penicillium commune y Eurotium amstelodami</i>

Obtenida de: (Sosa, Palou, & Malo, 2016)

Otro beneficio que pueden otorgarle a los alimentos es mejorar las propiedades mecánicas con las que esta cuenta, ya que la estructura de la biopelícula le aporta un soporte adicional al ser procesado, manipulado o distribuido. (Miramont, 2012)

Los recubrimientos comestibles están constituidos de manera general por polisacáridos, proteínas y lípidos o mezclas de estos (De Ancos Begoña, 2015). Los recubrimientos comestibles a base de polisacáridos son hidrofílicos y facilitan la unión a aditivos, suelen ser usados para el recubrimiento de frutas debido a su adherencia y flexibilidad (García, y colaboradores, 2010). Gracias a sus características químicas tienen propiedades de barrera que regulan el intercambio de oxígeno entre el producto y el ambiente mediando la transpiración y controlando la pérdida de peso, sin embargo, estas mismas características lo hacen deficiente para el control de humedad (Moreira & Beltran, 2014) (Onias, y colaboradores, 2019). Algunos de los polisacáridos usados generalmente son la celulosa y sus derivados como el almidón, pectinas y algunas gomas (Miramont, 2012).

Los recubrimientos comestibles a base de lípidos cuentan con una naturaleza hidrofóbica que debido a escasa permeabilidad al vapor de agua evita su deshidratación sin embargo posee escasas propiedades mecánicas (Moreira & Beltran, 2014). Siendo que la pérdida de humedad causa daños en el producto como pérdida de firmeza y de peso, las mezclas con otras sustancias pueden mejorar las propiedades de la biopelícula (García, y colaboradores, 2010).

Por último, las proteínas cuentan con una buena resistencia mecánica y tienen buenas propiedades barrera contra los gases (García, y colaboradores, 2010). Al igual que los polisacáridos son de naturaleza hidrofílica dándole una alta permeabilidad al agua. Sus atributos mecánicos y de barrera contra gases hacen a

estas sustancias ideales para su uso en frutas y ayudan a su protección durante el transporte (Moreira & Beltran, 2014). Para mejorar las propiedades de la biopelícula se pueden adicionar plastificantes, surfactantes o emulsificantes que con ayuda de la mezcla correcta de sustancias permite obtener una biopelícula ideal para la protección de alimentos (Osorio, Molina, Matiacevich, Enrione, & Skurtys, 2011). Las proteínas son obtenidas de fuentes vegetales o animales y pueden ser gluten de trigo, proteína de soya, zaina o proteínas de leche, entre otros (Miramont, 2012).

El estudio de nuevas fuentes que ofrezcan algunos de estos componentes presentados anteriormente, con buenas propiedades de conservación y que además sea una fuente barata, renovable y que se encuentra ampliamente disponible resulta importante en el área de los alimentos ya que podría ser una alternativa viable. La semilla de tamarindo es un subproducto poco explorado en el área de alimentos, que cuenta con una mezcla de compuestos atractiva para la formación de un recubrimiento que cumple con los requisitos anteriormente descritos.

2.2 *Tamarindus indica* L.

El tamarindo es un fruto originario de África, está presente en 4 continentes y es cultivado en 54 países, entre los cuales se encuentra México que es un importante productor con 49 mil toneladas anualmente, algunos de los estados productores son Jalisco, Colima, Michoacán y Nayarit entre muchos otros, siendo en el 2009 Jalisco el principal estado productor con 33.1% de la superficie y Colima el segundo principal productor con 25.8% de la superficie plantada (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2019) (Viveros G., y colaboradores, 2012). El 70% de la producción se comercializa en forma de fruto entero y el 30% se destina a la industria de la confitería (Gonzales Palomar, 2009).

El tamarindo es un árbol longevo, tropical, perteneciente a las dicotiledóneas, familia Fabaceae (leguminosas) se produce de manera estacional sin embargo se puede encontrar durante todo el año en el país, este puede crecer en suelos pobres gracias

a su capacidad de fijar nitrógeno además de su habilidad de soportar sequías. (Zhang, y colaboradores, 2020) Del fruto se aprovecha principalmente la pulpa; importante en la gastronomía mexicana, sin embargo, la semilla; un subproducto derivado de la obtención de esta, ha demostrado tener múltiples actividades biológicas de utilidad por lo que es utilizada en algunos países en áreas como la industria de los alimentos, textiles, en el área farmacéutica, médica, ambiental y cosmética (Isidro, 2018) (Choi, Kim, & Srinivasan, 2009)

Es comúnmente utilizado como material para textiles, entre otros. Específicamente en la industria alimentaria puede usarse como fuente de proteínas y aminoácidos y de polisacáridos gelificantes llamados "poliosas" además cuenta con una amplia gama de aplicaciones como espesante, estabilizador, agente gelificante, estabilizador de cristales, modificador de almidones para la formación de películas (Isidro, 2018).

La pulpa de este fruto representa el 55% del peso, otro 11% está dado por la cáscara y el 34% restante se encuentra en la semilla (Zhang, y colaboradores, 2020). El tamarindo es fuente de múltiples nutrientes importantes en la dieta, aunque no todo está dado en la pulpa como se podría pensar, las semillas del tamarindo también se pueden usar como alimento, pero generalmente es desechado debido a la dificultad de su consumo (Martín, 2014).

Tabla 2. Distribución química de componentes presentes en semilla de tamarindo.

Constituyentes	Semilla completa (%)	Núcleo de semilla (%)	de Testa (%)
<i>Humedad</i>	9.4-11.3	11.4-22.7	11.0
<i>Proteínas</i>	13.3-26.9	15.0-20.9	
<i>Grasa/Aceite</i>	4.5-16.2	3.9-16.2	
<i>Fibra cruda</i>	7.4-8.8	2.5-8.2	21.6
<i>Carbohidratos</i>	50.0-57.0	65.1-72.2	
<i>Cenizas</i>	2.4-4.2		

Obtenida de: (Bagul & Sonawane, 2015)

La proteína de la semilla es rica en ácido glutámico 18%, ácido aspártico 11.6%, glicina 9.1% y leucina 8.2% pero deficiente en metionina, treonina, valina y cisteína (Martín, 2014).

Tabla 3. Contenido de aminoácidos en la semilla de tamarindo (mg/g).

<i>Aminoácidos</i>	<i>Tamarindo</i>
<i>Isoleucina</i>	313
<i>Leucina</i>	531
<i>Lisina</i>	475
<i>Metionina</i>	113
<i>Cisteína</i>	106
<i>Fenilalanina</i>	318
<i>Tirosina</i>	287
<i>Treonina</i>	200
<i>Triptófano</i>	-
<i>Valina</i>	306
<i>Arginina</i>	450
<i>Histidina</i>	143
<i>Alanina</i>	312
<i>Ácido Aspártico</i>	768
<i>Ácido Glutámico</i>	1056
<i>Glicina</i>	331
<i>Prolina</i>	287
<i>Serina</i>	350

Obtenida de: (Bagul & Sonawane, 2015)

De igual manera la CONABIO plantea la composición de la semilla como 63% de almidón, 16% proteína y 5.5% aceite semisecante, su mezcla con goma arábica

permite la creación de un adhesivo, sin embargo, es dependiendo al método de extracción y purificación a los cuales se someta a la semilla que se podrán obtener los componentes en diversas concentraciones (Isidro, 2018).

El contenido de “poliosas” o polisacáridos gelificantes resultan atractivos para la formación de recubrimientos comestibles, al ser un subproducto de la industria de la confitería su utilización podría disminuir costos y reducir la contaminación ambiental. Además, la mezcla de otros compuestos presentes en la semilla podría resultar favorecedora para la conservación de alimentos altamente perecederos como lo son las bayas.

2.3 Bayas

Las bayas son consideradas un alimento importante en la dieta debido a su alto contenido de compuestos fenólicos, conocidos por su excelente actividad antioxidante relacionada al combate de enfermedades crónicas (Ezzahra, 2018).

México es el cuarto país exportador de bayas a nivel mundial, exportando alrededor de un 90% de la producción nacional, trayendo consigo una alta derrama económica a los principales estados productores y favoreciendo la inversión para la producción de bayas de alta calidad, invirtiendo en el desarrollo de tecnologías para mejorar la producción agrícola. Por desgracia debido a la importancia económica que representa la exportación, el mercado nacional se queda con un muy pequeño porcentaje de la producción de estos alimentos. (Ezzahra, 2018).

Algunos de los obstáculos que hacen importante el desarrollo de tecnologías que permitan que las bayas lleguen a su destino es la degradación del fruto por agentes biológicos. Uno de los más importantes es *Botrytis cinérea*; un hongo fitopatógeno de distribución global con más de 30 especies descritas y con una amplia gama de huéspedes, entre ellos frutas y bayas como zarzamoras, arándanos, grosellas, frambuesas y fresas. Este afecta hojas, tallos, flores y frutos y junto a otros factores como su rápida adaptación dificultan su control por los métodos comúnmente

utilizados contra hongos fitopatógenos (Bing Duan, 2018) (Terrones Salgado, Angel, Díaz, & Ortiz, 2019).

La infección en el fruto causa un progresivo crecimiento de una mancha grisácea hasta provocar la total momificación de la baya, este proceso junto con otros agentes deteriorativos tanto físicos como biológicos, generan pérdidas económicas importantes (Terrones Salgado, Angel, Díaz, & Ortiz, 2019).

Algunos otros organismos de importancia en las bayas son aquellos relacionados a la salud humana. A pesar de que las bayas son consideradas alimentos seguros, debido a su bajo pH, es inevitable que existan casos de enfermedades relacionadas a estas, gracias a muchas prácticas que pueden derivar en la contaminación del fruto (Viñas, 2020). Algunas de las bacterias más comunes presentes en frutas son *Salmonella sp.*, *Escherichia coli* patógena, *Shigella sp.* (Zuñiga & J., 2017)

Algunos aceites esenciales han sido usados como antibióticos en contra de estos y otros microorganismos con buenos resultados en contra de estos, por otra parte su uso como aditivo en recubrimientos ha tenido buenos resultados para apoyar en la conservación de alimentos altamente perecederos como los son las bayas.

2.4 *Cinnamomum zeylanicum*

Como se mencionó anteriormente, los aditivos que se colocan en el recubrimiento permiten en cierta manera mejorar las propiedades con las que esta cuenta ante situaciones como el ataque de microorganismos. Es por eso por lo que la adición de antimicrobianos como aceites esenciales está en relación con el alimento que se plantea recubrir.

La canela es conocida por tener actividad antimicrobiana, los aceites esenciales extraídos de la corteza contienen fenoles como eugenol en una proporción de 4-10% y aldehídos como el cinamaldehído de un 60-75%. Este compuesto le otorga sabor y olor a la canela y es conocido por tener propiedades como agente antidiabético y al igual que el eugenol tienen acción antimicrobiana (Miranda, 2013).

Tabla 4. Composición del aceite esencial de canela.

Compuesto	%		
<i>α-pireno</i>	0.07	<i>B-Cariofileno</i>	1
<i>Camfeno</i>	0.04	<i>α-Humeleno</i>	0.20
<i>Δ-3-Careno</i>	0.01	<i>A-Terpinol</i>	0.35
<i>Limoneno</i>	0.09	<i>Hidrocinaldehido</i>	10
<i>B-Felandreno</i>	0.40	<i>Cinamaldehido</i>	72
<i>p-Cumeno</i>	0.35	<i>Eugenol</i>	13.30
<i>Linalol</i>	0.70	<i>Benzil Benzoato</i>	1.0

Obtenida de: (Miranda, 2013)

Los compuestos presentes en la corteza presentan potencial antifúngico contra *Artenaria solani* y *C. lunata*. Además, se ha observado actividad contra *Listeria monocytogenes* y *Salmonella choleraesuis* entre otros (Miranda, 2013).

El cinamaldehido se encuentra categorizado como GRAS, esta sustancia no solo se presenta como antimicrobiano y antifúngica sino también es conocida por su actividad antiinflamatoria y antioxidante. Sin embargo, los estudios realizados al analizar el mecanismo de acción del cinamaldehido son poco concluyentes y cuenta con un fuerte olor que podría dificultar su pase desapercibido en un alimento al usarse en una biopelícula, además de ser un compuesto muy volátil. Algunos estudios sobre su actividad antimicrobiana indican que se debe principalmente a la reactividad de los grupos aldehídos, estos tienen la capacidad de entrecruzarse de forma covalente con el DNA y las proteínas a través de los grupos amino y así interferir con su funcionamiento normal. Se establecen 3 mecanismos de acción. 1) a bajas concentraciones podría inhibir enzimas que participan en acciones celulares, 2) A concentraciones más altas podría actuar como inhibidor de ATPasa y 3) A altas concentraciones podría causar perturbaciones en la membrana citoplasmática de la célula (Quesada, 2016).

3. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

Los carbohidratos presentes en la semilla de tamarindo han sido ampliamente aprovechados en la industria de los alimentos debido a su variedad de aplicaciones antes mencionadas. Algunas investigaciones se han encamidado en su uso para la conservación de alimentos específicamente bayas.

Lima Santos Figueredo, y colaboradores , en el artículo “Application of tamarind seed starch as edible coating in the post-harvest quality of grapes ‘Isabel’ (*Vitis labrusca* × *Vitis vinifera* L.)” aprovecharon el almidón presente en la semilla del tamarindo para crear un recubrimiento comestible en uvas “Isabel”. El estudio se basó en diseñar tratamientos hechos en base a diferentes concentraciones del almidón de la semilla de tamarindo y su posterior aplicación en la uva vía inmersión, observándose que las uvas con el recubrimiento fueron conservadas mayor tiempo comparándose con el control. Por otra parte, la concentración más alta del almidón obtuvo los mejores resultados. Representando así una alternativa viable para la conservación de uvas “Isabel”.

Un estudio conducido por Onias Elny A, y colaboradores, llamado “Coating Guava Postharvest With the Use of Starch of Tamarind Seed and Pomegranate Seed Oil”, analizó la capacidad del extracto de almidón de semilla tamarindo (TSS) para generar un recubrimiento comestible sobre guayabas que contribuyera a evitar su rápido deterioro, este se adicionó con aceite esencial de semilla de granada (PSO) para mejorar las propiedades del alimento. Los resultados obtenidos demostraron que el recubrimiento formado con una concentración más alta de TSS y adicionado con PSO tenía mejores resultados en términos de conservación de alimentos al finalizar el periodo de tiempo comparado con el control.

En otro estudio realizado por López H., y colaboradores, llamado “Development and antioxidant stability of edible films supplemented with a tamarind seed extract” se evaluaron las propiedades mecánicas, antioxidantes y de color del recubrimiento hecho a base de almidón nativo de papa y aislado de proteína de leche, adicionada con extracto de semilla de tamarindo, utilizado como antioxidante. La extracción fue

llevada a cabo por extracción alcohólica. El estudio se llevó a través de 6 pruebas, en las cuales se aplicó el recubrimiento en manzanas y peras, para su posterior almacenamiento en 3 condiciones diferentes; temperatura ambiente, refrigeración y en oscuridad. Al finalizar el estudio se observó que mejoraron las propiedades mecánicas de la biopelícula, generó una coloración rojiza e incremento la actividad antioxidante, estas propiedades se mantuvieron durante todo el estudio. Por lo que el extracto de la semilla de tamarindo demuestra tener múltiples propiedades a favor de la formación de recubrimientos comestibles además de las propiedades antioxidantes planteadas.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las bayas son un alimento altamente perecedero que se da en épocas específicas del año y que cuentan con una alta importancia económica en México. Sus componentes las hacen una adición rica a la dieta gracias a su cantidad de compuestos bioactivos y antioxidantes. Sin embargo, los métodos de conservación de estas recaen únicamente en la refrigeración (0-2°C) y el control de la humedad relativa (90-98%). La vida de anaquel de algunas bayas puede ser tan corta como 2-5 días en condiciones óptimas de almacenamiento. (Huynh, Wilson, Eyles, & Stanley, 2019).

Uno de los principales agentes causantes del deterioro de bayas es *Botrytis cinerea* un hongo extremadamente agresivo que puede crecer a temperaturas muy bajas (-1°C), siendo este uno de los múltiples obstáculos que enfrentan las bayas antes de llegar a su destino, por lo que resulta necesaria la exploración de métodos nuevos capaces de apoyar a la temperatura en términos de conservación (Luchsinger, 2017).

Por otro lado, en México la industria de la confitería cuenta con una gran producción de dulces hechos en base a la pulpa del tamarindo, produciendo 49 mil toneladas anualmente, de los cuales la pulpa representa el 55% dejando como residuos a la cascara y a la semilla de este fruto (Viveros G., y colaboradores, 2012) (Zhang, y colaboradores, 2020). A su vez, la semilla de tamarindo tiene componentes que han demostrado tener algunos buenos resultados para la formación de películas eficientes en la conservación de algunas frutas, haciendo de este residuo un subproducto prometedor en la industria de los alimentos. Sin embargo, su análisis y aplicación en alimentos altamente perecederos como las bayas ha sido poco explorado. Un recubrimiento comestible hecho a partir de este subproducto y adicionado con un antimicrobiano natural podría representar una solución amigable con el medio ambiente capaz de contrarrestar algunos de los problemas que surgen al conservar a las bayas, ofreciendo alimentos seguros, convenientes, de buena calidad y atractivos para el consumidor.

5. JUSTIFICACIÓN

Actualmente el aprovechamiento de todos los subproductos en una cadena productiva ha cobrado importancia debido al impacto ambiental que tienen las industrias a nivel mundial, además de que estos representan alternativas económicas para el desarrollo de nuevas tecnologías. Para este estudio se analiza la semilla de Tamarindo, un subproducto derivado de la obtención de la pulpa de la industria de la confitería en México, para elaborar una película comestible que permita alargar la vida útil de algunas bayas de importancia nacional, brindándoles protección ante el deterioro biológico, físico y químico (Han, 2014)

La semilla de tamarindo cuenta con un gran potencial biotecnológico en diversas áreas de interés como la médica, la farmacéutica, cosmética, la industria textil y la alimentaria, siendo esta última la más analizada en otros países ya que la semilla al ser sometida a diferentes tratamientos genera una goma que ha demostrado ser de utilidad como agente gelificante, espesante, entre otros (Isidro, 2018). Sin embargo, debido a los diferentes procesos de extracción a los que puede ser sometida, se generan diferentes mezclas de componentes que resultan no útiles si se desea generar un producto como un recubrimiento comestible, es por eso que resulta necesario estandarizar un proceso de extracción y caracterizar el producto para aplicarlo de manera confiable sobre un alimento.

De igual manera se analiza el uso de un aditivo para mejorar las cualidades del recubrimiento comestible. El aceite esencial de canela ha demostrado tener propiedades antimicrobianas contra algunos microorganismos específicos sin embargo resulta importante analizar sus efectos contra los principales organismos responsables de deterioro de bayas en México, así como de aquellos microorganismos patógenos comúnmente relacionados a las bayas. Siendo una parte importante comprobar la inocuidad de este para la salud humana.

6. HIPOTESIS

El extracto de la semilla de tamarindo obtenido mediante extracción acuosa tendrá características que lo harán un buen candidato para la formulación de un recubrimiento comestible

7. OBJETIVOS

7.1 Objetivos Generales

Caracterizar un recubrimiento comestible generado a partir de la semilla de tamarindo adicionado con aceite esencial de canela diseñado para aplicar sobre bayas.

7.2 Objetivos específicos

- Estandarizar el método de la extracción acuosa de una goma a partir de la semilla de tamarindo.
- Conocer las características fisicoquímicas y la composición del extracto acuoso obtenido de la semilla de tamarindo.
- Caracterizar el aceite extraído de la canela *Cinnamomum zeylanicum* y determinar su actividad antimicrobiana contra los patógenos más comunes en alimentos; *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* patogénica, *Shigella sp* y el deteriorador principal de las bayas *Botrytis cinérea*.
- Conocer las características fisicoquímicas y antimicrobianas del recubrimiento comestible formado a partir del extracto acuoso de la semilla de tamarindo y del aceite esencial de canela.

8. METODOLOGIA

La caracterización de la biopelícula se dividió en 3 partes principales; el análisis del extracto acuoso de la semilla de tamarindo secando la semilla a diferentes temperaturas y obteniendo la goma a partir de extracción acuosa, el análisis de aceite esencial de canela (corteza) obtenido a partir de una destilación por arrastre de vapor y la comparación de este con un aceite comercial (*Cynamomun zelanium* 11 mL) y por último el análisis de la biopelícula como producto final.

8.1 Extracto de tamarindo

8.1.1 Extracción de la goma de tamarindo

La semilla de tamarindo se secó a 2 temperaturas diferentes con variaciones en el tiempo de secado. Por una parte, se secaron 500 g de semilla a temperatura ambiente por 15 días, de igual manera, se secaron 250 g de semilla a 80 °C por 4, 6 y 9 días. Posteriormente se molió la semilla hasta obtener un polvo fino, que se almacenó a temperatura ambiente.

Para la extracción acuosa se tomaron 250 mL de agua y se llevó a 80 °C, una vez caliente el agua se agregó la semilla molida y se dejó por 15 min sin dejar de mezclar.

El producto obtenido se dejó enfriar y con una malla fina (manta cielo) se separó el líquido de los restos de semilla presentes en la mezcla. Una vez recuperado, se colocó en refrigeración para su posterior análisis por espectroscopia infrarroja.

Este proceso se repitió para todas semillas expuestas a diferentes temperaturas y tiempos de secado. A partir de los resultados obtenidos se seleccionó a la semilla de tamarindo con las mejores características y se llevaron a cabo las pruebas mencionadas a continuación; análisis fisicoquímicos, concentración de proteínas, separación de proteínas por medio de electroforesis (SDS PAGE), determinación cualitativa de carbohidratos, cenizas y pruebas de susceptibilidad antibiótica por el método de Kirby Bauer. Estos análisis fueron hechos a 3 lotes del extracto acuoso de la semilla de tamarindo por triplicado.

8.1.2 Análisis de muestras mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

Se utilizó esta técnica para analizar los 3 diferentes extractos de la semilla de tamarindo, el aceite esencial obtenido por destilación por arrastre de vapor, el comercial, y la biopelícula.

Para los análisis realizados mediante la técnica FT-IR, se utilizó el modo ATR (Reflectancia Total Atenuada por sus siglas en inglés) en el infrarrojo medio (4000-400 cm^{-1}) en un equipo FT-IR Bruker Vertex 70, se colocó 1 μl de la muestra sobre el cristal de diamante y se realizaron 120 barridos por muestra con una resolución de 4 cm^{-1} .

8.1.3 Pruebas fisicoquímicas del extracto acuoso de semilla de tamarindo

Una vez seleccionado aquel extracto con las mejores características mediante FT-IR se procedió a analizar. Todas las pruebas se realizaron por triplicado en el primer día del extracto:

- *Viscosidad cinemática*

Esta prueba se llevó a cabo siguiendo lo indicado en el manual de instrumentos de medición de la copa Zahn BL-BGD126. Se utilizó la copa Zahn de inmersión de diámetro 2 (utilizada para mezclas muy viscosas) a 20°C a un pH promedio de 5.98. Se comenzó colando 150 mL del extracto de tamarindo en un vaso de precipitado de 200 mL, en el cual se sumergió la copa Zahn hasta observar que se encontraba llena, se retiró la copa del vaso de precipitado y se empezó a contar el tiempo de vaciado

- *pH*

Esta prueba se llevó a cabo como lo indica la Norma Mexicana NMX-F-317-S-1978. DETERMINACIÓN DE pH EN ALIMENTOS. DETERMINACIÓN OF pH IN FOODS. NORMAS MEXICANAS. DIRECCION GENERAL DE NORMAS. Se determinó el valor de pH del extracto acuoso de semilla de tamarindo utilizando un potenciómetro PH-016 PH METER. Se colocaron 15 mL del extracto en un tubo falcón de 15 mL a temperatura ambiente, se

realizó la medición introduciendo el electrodo en la muestra y registrando los datos obtenidos por el equipo, después de la calibración del equipo.

- *Húmedad*

Esta prueba se realizó según lo indicado por norma NMX-F-428-1982. ALIMENTOS. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD (MÉTODO RÁPIDO DE LA TERMOBALANZA). FOODS DETERMINATION OF MOISTURE (THERMOBALANCE RAPID METHOD). NORMAS MEXICANAS. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS) realizando modificaciones en la metodología y utilizando la termobalanza High-performance Moisture Analyzer (Witeg Labortechnik GmbH) a 120°C. Se colocó el plato en el equipo asegurándose de que este se encontrara completamente limpio y seco, se pesaron 5 g de muestra, los cuales se distribuyeron cuidadosamente sobre el plato, se bajó la tapa y se puso a funcionar el equipo. Este cuenta con una alarma que se activa cuando se alcanzó un peso constante por 2 minutos. Al terminar se registran los datos proporcionados por el equipo.

8.1.4 Cuantificación de proteínas

Esta prueba se basó en el método estándar de la prueba de Bradford para la cuantificación de proteínas según lo indicando en el manual de instrucciones de Protein Bio- Rad.

Primero se llevó a cabo la curva de calibración de proteínas, para lo cual se preparó un stock de 1 mg/mL a partir del estándar de Albumina de suero Bovino (BSA) para lo cual se pesó 1 mg de BSA liofilizada y se resuspendió en 1 mL de agua destilada estéril. A partir de este se realizaron 4 diluciones seriadas, siendo las concentraciones analizadas 0.1mg/mL, 0.01 mg/mL, 0.001 mg/mL y 0.0001 mg/mL. Se utilizó el reactivo de Bradford ya preparado obtenido de manera comercial, Ensayo de proteínas (Thermo scientific), del cual se tomaron 1.5 mL para cada dilución por triplicado, se colocaron en un microtubo cónico Ependorff limpio y se agregaron 30 µl de la dilución del estándar correspondiente, se agito y se procedió a hacer las mediciones empleando el espectrofotómetro UV/Vis 6405 Jenway a 595

nm, los resultados obtenidos se graficaron para obtener la curva de calibración a utilizar.

Para el análisis de extracto de tamarindo se tomaron 30 μ L y se colocaron en 1.5 mL del reactivo de Bradford asegurándose de agitar la mezcla. Se procedió a hacer las mediciones de la misma manera que con el estándar. Los resultados se calcularon a partir de la curva obtenida anteriormente. Este proceso se realizó por triplicado para cada lote de muestra.

8.1.5 Separación de proteínas por medio de electroforesis (SDS PAGE)

Se siguió la metodología descrita por Bagul y Sonawane en el 2015 para separación de proteínas.

Se preparó el gel separador al 12% en condiciones de esterilidad, colocando en un matraz limpio cada uno de los componentes mostrados en la tabla 5 en el orden indicado, haciendo especial énfasis en colocar el APS y el TEMED al final. Después de aproximadamente 5 minutos se vertió el gel en la cámara antes preparada.

Tabla 5. Componentes del gel separador

<i>Acrilamida + bis acrilamida</i>	<i>16 mL</i>
<i>Buffer de separación</i>	10 mL
<i>SDS</i>	0.4 mL
<i>NaCl</i>	0.8 mL
<i>dH₂O</i>	12.57 mL
<i>APS</i>	0.400 mL
<i>TEMED</i>	0.070 mL

Obtenida de: (Biorad, 2020) con modificaciones

Se preparó el concentrador tras corroborar la polimerización del gel separador, colocando los componentes mostrados en la tabla 6. De igual manera estos se agregaron en el orden mostrado, adicionando el APS y el TEMED al final y vertiendo inmediatamente en la cámara de electroforesis.

Tabla 6. Componentes del gel concentrador

Acrilamida + bisacrilamida	1.5 mL
<i>Stacking buffer</i>	5 mL
<i>SDS 10%</i>	0.1 mL
<i>dH₂O</i>	3.35 mL
<i>APS</i>	0.070 mL
<i>TEMED</i>	0.060 mL

Obtenida de: (Biorad, 2020) con modificaciones

Una vez terminados los geles se agregó el buffer de corrimiento 1x el cual se preparó a partir del buffer con una concentración más alta.

Tabla 7. Componentes para el buffer de corrimiento

10x	
<i>Tris Base</i>	30.28 g
<i>Glicina</i>	144.14 g
<i>SDS</i>	10 g
<i>dH₂O</i>	1 L

Obtenida de: (Biorad, 2020) con modificaciones

La muestra se colocó en los pocillos del gel. Siendo el primero y el último pocillo destinados para el marcador de peso molecular mientras que los del centro fueron destinados para las muestras.

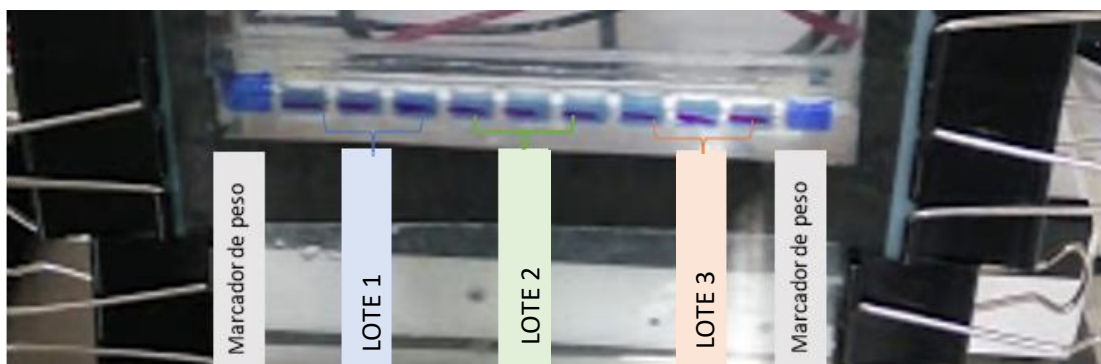


Figura 1. Gel cargado con los lotes 1, 2 y 3 en centro, así como con los marcadores de peso en los extremos del gel. Obtenido de: (Autoría propia).

Se corrió a 70 V por 8 horas. Una vez transcurrido el tiempo se retiró el gel de la cámara y se tiñó con tinción de Coomasie

por 8 horas, transcurrido el tiempo se destiñó con solución desteñidora (agua 800 mL, etanol 100 mL y ácido acético 100 mL), en agitación circular por 4 horas. Posteriormente se retiró la solución y se colocó más nueva, este proceso se repitió hasta lograr la eliminación de la tinción de las zonas no deseadas.

8.1.6 Determinación cualitativa de carbohidratos

Se realizaron pruebas colorimétricas para determinar la presencia de diferentes carbohidratos mediante análisis basados en la reacción específica de algunos compuestos con reactivos que generan derivados coloreados (Nieves, 2004)

Se colocaron 2 mL del extracto de tamarindo en un tubo de ensayo para cada prueba (exceptuando la prueba Seliwanoff) por triplicado.

Molish: Se agregaron 2 mL de α -naftol al 5%, se mezcló y se agregó cuidadosamente por las paredes del tubo ácido sulfúrico concentrado. Se observaron y se registraron los resultados.

Calentar en baño maría a 60°C por 10 minutos y observar resultados.

Barfoed: Se agregaron 2 ml del reactivo de Barfoed, se calentó en Baño maría a 60°C y se observó cualquier cambio en el color de la reacción hasta alcanzar los 12 minutos.

Fehling: Se agregaron 3 gotas del reactivo de Fehling, posteriormente se calentó a baño maría hasta los 60°C por 10 minutos. Y se observaron los resultados.

Benedict: Se agregó 0.1 mL del reactivo de Benedict. Se calentó a baño maría hasta alcanzar los 60° C, se observaron y registraron los resultados.

Seliwanoff: Se colocaron en el tubo de ensayo 3 mL del reactivo de Seliwanoff, se agregaron 100 μ L del extracto de tamarindo, se llevó baño maría a 60°C por 10 minutos, se observaron y se registraron los resultados.

8.1.7 Cenizas

Se siguió la norma mexicana para la determinación de cenizas en los alimentos NMX-F-066-S-1978. DETERMINACIÓN DE CENIZAS EN ALIMENTOS. FOODSTUFF DETERMINATION OF ASHES. NORMAS MEXICANAS. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS. Se pesaron en una balanza analítica aproximadamente 3 g de muestra en un crisol puesto previamente a masa constante y se colocó en una parrilla para quemar la muestra hasta que está ya no desprendiera humos. Se llevó el crisol a la mufla y se efectuó una calcinación completa. Posteriormente se dejó enfriar la mufla y junto con el crisol y se pesó este último en una balanza analítica.

8.1.8 Pruebas de susceptibilidad antibiótica por el método de Kirby Bauer.

Se siguió el protocolo creado por la American society for microbiology en 2009. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. Se prepararon los microorganismos a utilizar, sembrando *Shigella sp.*, *Salmonella tiphymurium*, *E.coli* enteropatógena en agar Mac Conkey y SS por 24 horas a 35°C. Una vez transcurrido el tiempo se resembraron las cepas tomando con asa bacteriológica de entre 4 a 5 colonias y resembrándose en caldo Muller Hinton estéril a 35°C por aproximadamente 3 horas para *E.coli* y de 4 para *Salmonella tiphymurium* y *Shigella sp.* Al pasar el tiempo indicado se midió la absorbancia de los cultivos en un espectrofotómetro UV/Vis a 600 nm buscando obtener un valor de 0.5.

Alternativamente se impregno un filtro de papel con 30 µL de extracto de tamarindo en condiciones de esterilidad. De igual manera se impregnaron 2 diferentes concentraciones de la película comestible en papel filtro.

Una vez alcanzado el valor de absorbancia buscado se resembraron los cultivos en agar Muller-Hinton con un hisopo estéril, sumergiéndolo en el caldo con el cultivo y retirando el exceso de líquido en las paredes del tubo, a continuación, se distribuyó en la placa de manera uniforme rayando 4 veces la placa y rotándola 90° cuatro veces. Posteriormente con asas estériles se colaron los círculos de papel filtro antes impregnados sobre la superficie el agar manteniendo una distancia equitativa entre

cada uno. Los resultados se observaron 24 horas después. Este proceso se realizó por duplicado.

Para el caso de *Botritis cinérea*, se agregaron 2 mL de caldo Muller Hinton al cultivo original y se raspo la superficie con un hisopo estéril, lo obtenido se sembró en agar PDA y se colocaron los círculos de papel filtro ya impregnados como se describió anteriormente. Los resultados se observaron después de 72 horas a temperatura ambiente, esta prueba se realizó por duplicado.

8.2 Aceite esencial de corteza de *Cinnamomum zelanicum*

8.2.1 Extracción de aceite esencial de corteza de canela por arrastre de vapor.

Se siguió la metodología descrita en Optimización de la extracción de aceites esenciales por destilación en corriente de vapor del 2018 adaptándola a las condiciones del laboratorio

Se montó el equipo para una destilación por arrastre de vapor como se observa en la figura 2.



Figura 2. Equipo utilizado para llevar a cabo destilación por arrastre de vapor. Obtenido de: (Autoría propia).

Se colocaron 50 g de canela molida en el matraz 2 y agua en el matraz 1, se llevó el matraz 1 a 80°C aproximadamente, manteniendo esa temperatura durante todo

el proceso, se dejó funcionar el sistema por 4 horas. Lo obtenido de la destilación se separó en un embudo de destilación con acetato de etilo y NaCl, esto posteriormente se llevó al rotavapor a 45°C por tiempo suficiente para realizar la separación. El aceite obtenido se almacenó en refrigeración hasta su análisis. El cual fue realizado por duplicado para las pruebas de susceptibilidad antibiótica y concentración mínima inhibitoria, mientras que por triplicado para la concentración de eugenol y cinamaldehído.

8.2.2 Análisis de muestras mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

El procedimiento se desarrolló exactamente como fue descrito en el apartado 8.1.2 para el extracto de tamarindo.

8.2.3 Resonancia Magnética nuclear de Protón de Aceite de corteza de canela.

Se disolvieron 20 mg de cada muestra orgánica seca en 0.5 ml de un disolvente deuterado.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H se obtuvieron en un equipo Bruker Avance III de 500 MHz, se utilizó cloroformo-*d* (CDCl_3), como disolvente con TMS como referencia interna. Los desplazamientos químicos se expresan en ppm (δ).

8.2.4 Cromatografía en capa fina

Se prepararon 6 sistemas de solventes con la finalidad de encontrar aquel que separara exitosamente los compuestos presentes en el aceite esencial de canela (fase móvil).

Los sistemas de solventes usados fueron:

- 5:5 Hexano: Acetato de etilo
- 7:3 Hexano: Acetato de etilo
- 9:1 Hexano: Acetato de etilo
- 95:5 Hexano: Acetato de etilo
- 95:5 Diclorometano: Metanol
- 9:1 Diclorometano: Metanol

En un vial se colocó con una pipeta una pequeña cantidad de una muestra disuelta en acetato de etilo.

Se prepararon placas de gel de sílice (SiO_2) (fase estacionaria) de 1.5 x 5 cm, trazando con un lápiz una línea a 0.5 cm de distancia del borde de la placa, se marcaron 3 puntos equidistantes en la línea y se colocó la muestra por capilaridad a 1 vez en el primer punto, 3 veces en el segundo y 9 veces en el tercero para aumentar la concentración de la muestra, se sumergió la placa en primer sistema solventes y se repitió el mismo proceso por sistema.

Las placas se revelaron usando luz UV 254 nm, Iodo y una mezcla de Ácidos utilizada en el laboratorio en el que se llevo a cabo la prueba.

8.2.4 Concentración de cinamaldehído y eugenol en aceite esencial de canela

Para llevar a cabo este proceso se obtuvieron de manera comercial el cinamaldehído (trans-cinamaldehyde Sigma Aldrich) y el eugenol (Densell) y se hicieron diluciones por triplicado de estos usando etanol al 97% para el cinamaldehído y DMSO al 50% para el eugenol (los solventes fueron seleccionados de acuerdo con la capacidad de los aceites de disolverse en estos). Las diluciones realizadas para el cinamaldehído fueron de 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000 y para el eugenol fueron de 1:10, 1:100, 1:1000, 1:5000, 1:10000, 1:50000.

Cada dilución se mezcló por 1 minuto, se colocó en una celda y se analizó empleando el mismo espectrofotómetro usado anteriormente, UV/Vis 6405 Jenway a 297 nm para eugenol y a 376 nm para cinamaldehído.

Se realizó una curva de calibración en Excel con los datos obtenidos para ambos compuestos.

Posteriormente se analizó el extracto de canela. Se utilizó el extracto puro sin embargo la concentración era muy alta por lo que se realizó 1 dilución para el cinamaldehído (1:10) con etanol al 97% y 3 diluciones para eugenol (1:10, 1:100, 1:1000) con DMSO al 50%. Ambos se mezclaron por 1 minuto, se colocaron en una celda y se midió su absorbancia, la cual fue registrada (Dosal & Marzo, 2008).

8.2.5 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana

Se prepararon los microorganismos a utilizar basándose en la técnica de difusión en disco descrita en el apartado 8.1.8.

El aceite se usó a una concentración de 300 mg/mL y se realizaron diluciones para alcanzar 30 µg/mL, esta última concentración se eligió en función de las concentraciones de los antibióticos usados en el control positivo. Para la preparación del stock de 300 mg/mL se llevó un tubo Eppendorf a peso constante para lo cual se pesó el tubo y se colocó en una incubadora a 50°C por 20 minutos, se pesó nuevamente y se colocó una vez más en la incubadora con las mismas condiciones. Este proceso se repitió por lo menos 2 veces más o hasta alcanzar un peso constante.

Posteriormente se pesaron 300 mg del aceite extraído y se colocó 1 mL del DMSO al 10%. Una vez terminado el stock se hicieron diluciones seriadas en base 10 hasta alcanzar la concentración de 30 µg/mL.

Una vez preparado el aceite se impregno un filtro de papel por cada dilución con 30 µl en condiciones de esterilidad. Además, como control positivo se utilizó Ceftriaxona [30 µg] para *Shigella*, Trimetoprima/sulfametoxazol [25 µg] para *Salmonella typhimurium* y Ampicilina para EPEC.

A continuación, se sembraron los cultivos en agar Muller-Hinton con un hisopo estéril, sumergiéndolo en el caldo con el cultivo y retirando el exceso de líquido en las paredes del tubo, se distribuyó en la placa de manera uniforme rayando 4 veces la placa y rotándola 90° cuatro veces, con asas estériles se colaron los círculos de papel filtro antes impregnados sobre la superficie del agar manteniendo una distancia equitativa entre cada uno. Los resultados se observaron 24 horas después. Este proceso se realizó por duplicado.

Para el caso de *Botrytis cinérea*, se agregaron 2 mL de caldo Muller Hinton al cultivo original y se raspó la superficie con un hisopo estéril, lo obtenido se sembró en agar PDA y se colocaron los círculos de papel filtro ya impregnados como se describió

anteriormente. Los resultados se observaron después de 72 horas a temperatura ambiente, esta prueba se realizó por duplicado.

8.2.6 Concentración mínima inhibitoria

Para las pruebas de concentración mínima inhibitoria se trabajó con el aceite a 5 concentraciones diferentes; 250 mg/mL, 200 mg/mL, 150 mg/mL, 100 mg/mL, 50 mg/mL. Estas se obtuvieron a partir del stock de 300 mg/mL tomando 88.3 μ L, 66.7 μ L, 50 μ L, 33.3 μ L, 16.6 μ L respectivamente para cada una de las concentraciones, posteriormente se colocó lo restante de DMSO 10% para alcanzar 100 μ L.

Se prepararon los microorganismos a utilizar basándose en la técnica de difusión en disco descrita en el apartado 8.1.8.

8.3 Biopelícula

8.3.1 Preparación de la biopelícula

El extracto de tamarindo utilizado para la preparación de la biopelícula fue el obtenido de la semilla secada a 80°C durante 6 días, ya que presento las mejores características según lo analizado.

En un vaso de precipitado de 250 mL se mezclaron 178 g de agua con 2 g carboximetil celulosa, estos se colocaron en baño maría hasta que la mezcla estuviera totalmente homogenizada posteriormente se añadieron 16 g de glicerol y 4g del extracto de la semilla de tamarindo previamente preparado y se continuó mezclando para su total homogenización, finalmente se dejó enfriar y se agregó 1 gota de esencial de canela.

8.3.2 Análisis de muestras mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

Se llevó a cabo de manera simultanea y de la misma manera descrita en el apartado 8.1.2

8.3.3 Viscosidad cinemática

Se llevó a cabo de la misma manera descrita en el apartado 8.1.3 para viscosidad cinemática

8.3.4 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana

Se llevó a cabo de manera simultanea y de la misma manera descrita en el apartado 8.1.8. Colocando en los discos 30 μ L del recubrimiento comestible.

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1 Extracto de semilla de tamarindo

La semilla de tamarino se secó a 2 temperaturas diferentes con variaciones en el tiempo de secado. Siendo estas a temperatura ambiente por 15 días y a 80°C por 4, 6 y 9 días. De estas se obtuvo un extracto que fue analizado por FTIR, los resultados de esta prueba determinaron el extracto que sería usado tanto para realizar las pruebas siguientes como para formar parte del recubrimiento comestible. Los análisis fueron llevados a cabo por triplicado en 3 lotes del extracto. Los lotes se obtuvieron de la semilla de tamarindo que mostro las mejores características (FTIR) y el proceso de extracción fue el mismo para cada lote.



Figura 3. Lote 2 de extracto de semilla de tamarindo almacenado en frasco de vidrio para laboratorio de 50 ml autoclavable. Obtenido de: (Autoría propia)

9.1.1. FTIR

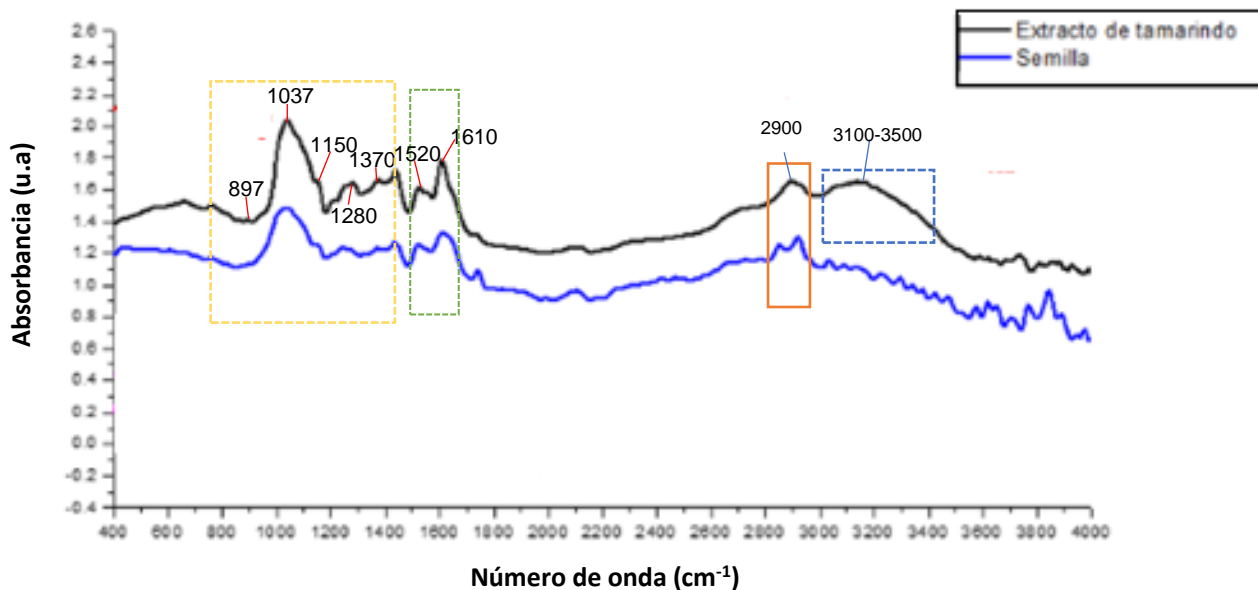


Figura 4. Espectro de absorción FTIR del extracto de semilla de tamarindo (en negro) y la semilla de tamarindo (en azul) secada a temperatura ambiente. En los recuadros amarillo, verde y naranja se marcan las regiones que podrían ser atribuidas a carbohidratos, proteínas y lípidos respectivamente. Obtenido de: (Autoría propia).

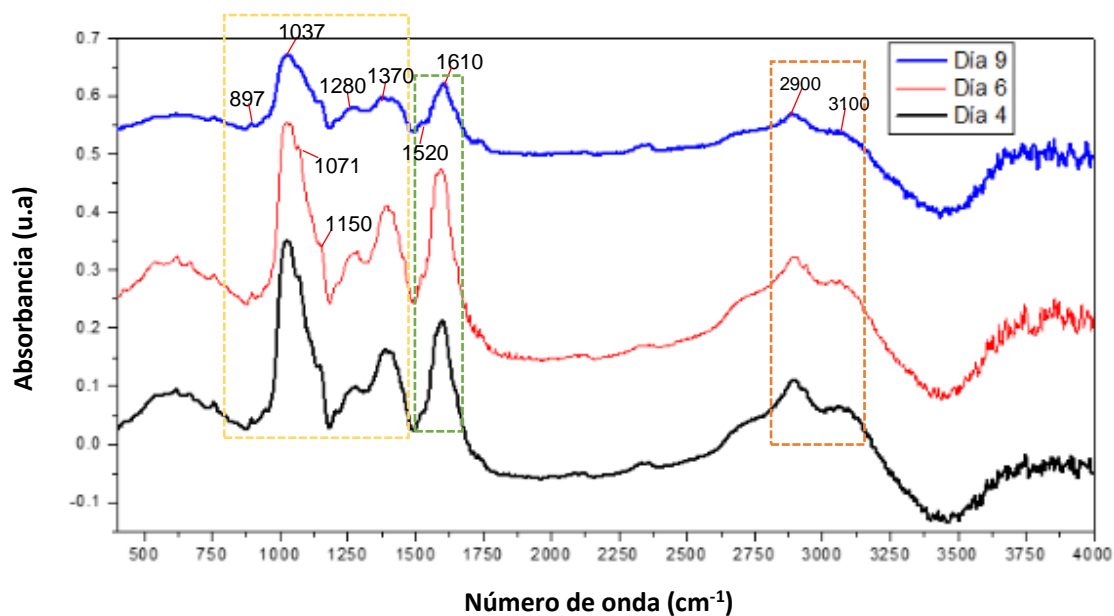


Figura 5. Espectros de absorción FTIR obtenido del extracto de semilla secada a 80° C a diferentes tiempos. En color azul se muestra el espectro del extracto producido con semilla secada por 9 días, en color rojo se muestra el espectro producido con semilla secada por 6 días y en negro el espectro con semilla secada por 4 días. En los recuadros amarillo, verde y naranja se marcan las regiones que podrían ser atribuidas a carbohidratos, proteínas y lípidos respectivamente. Obtenido de: (Autoría propia).

Los espectros presentados en las figuras 4 y 5 muestran algunas similitudes en las señales observadas. La banda presente a 2900 cm^{-1} aproximadamente se puede atribuir al estiramiento del enlace -C-H, la intensidad es mayor en extracto del día 4 y 6, esta señal puede ser atribuida a lípidos presentes en la muestra; estas alteraciones se pueden deber a que las altas temperaturas son las principales causantes de cambios lipídicos (Silva, 1998) . En la misma zona la banda ancha ubicada entre los 3100- 3600 cm^{-1} es atribuida al estiramiento del grupo O-H que puede estar relacionado a la presencia de agua, esta banda amplia se observa principalmente en el espectro del extracto de temperatura ambiente (TA) (figura 4), mientras que los espectros observados en la figura 5 presentan una señal aproximadamente a 3100 cm^{-1} relacionada al estiramiento del enlace =C-H que podría relacionarse a lípidos asociados al extracto de tamarindo (Thygesen, Løkkey, Micklander, & Engelsen., 2003).

Otra región en donde se observa actividad en los espectros es la que se encuentra entre los 800–1800 cm^{-1} . La banda a 1610 cm^{-1} se atribuye al estiramiento del enlace -C=O de la amida I perteneciente a proteínas, esta señal se encuentra en los 4 espectros siendo más intensa en los espectros de los días 4 y 6, por otro lado, la banda presente a 1520 cm^{-1} atribuida al doblamiento del enlace N-H de la amida II perteneciente a proteínas, se encuentra presente en los 4 espectros (Alpizar, y colaboradores, 2017) (Thygesen, Løkkey, Micklander, & Engelsen., 2003); estos resultados podrían concordar con los resultados obtenidos por Samadi & Yu en el 2011 para el caso de la soya ya que concluyó que el secado a 120°C por 1 hora aumenta la concentración de amida I y amida II, observando también cambios en el contenido nutricional y el contenido proteico al exponer las semillas a calor seco.

A 1280 cm^{-1} se encuentra una banda intensa presente en los 4 extractos, esta se puede atribuir al estiramiento del enlace C-O de lípidos o proteínas (Alpizar, y

colaboradores, 2017) (Thygesen, Løkkey, Micklander, & Engelsen., 2003). Las siguientes señales ubicadas aproximadamente a 1370, 1150, 1037, 1071 y 897 cm^{-1} podrían estar relacionadas a carbohidratos. Específicamente la banda a 1370 cm^{-1} se asocia al doblamiento del grupo CH_2 del xiloglucano, las bandas a 1037 y 1071 cm^{-1} son atribuidas al estiramiento de los grupos C-O y C-C del anillo de xiloglucano, estas señales se observan en los 4 extractos siendo más intensas en el día 6, particularmente la banda a 1037 cm^{-1} es muy intensa en todos los espectros incluyendo el de la semilla. La banda a 1150 cm^{-1} se atribuye al estiramiento asimétrico del C-O-C, a 897 cm^{-1} se observa una señal no tan intensa en los días 4 y 6 atribuida al estiramiento del C-H característico de la Xilosa y Glucosa (Alpizar, y colaboradores, 2017); estos resultados podrían coincidir con los obtenidos por Trugo, Donangelo, Trugo, & Knudsen en el 2000 quienes analizaron el contenido de semillas y observaron que los niveles de algunos azúcares aumentaron al doble después de ser tratados con calor. Estos cambios son diferentes dependiendo de la semilla analizada sin embargo se sabe que los tratamientos térmicos modifican la estructura de fibras solubles, modificando de igual manera sus propiedades.

Los espectros observados concuerdan en gran medida por lo obtenido por Alpizar y colaboradores en el 2017, al analizar las propiedades funcionales y características fisicoquímicas de la semilla de tamarindo como un nuevo hidrocoloide. Se puede observar un espectro similar a estos con ligeras diferencias en las señales y en la intensidad de estas, además de cambios importantes en la zona posterior a los 3000 cm^{-1} .

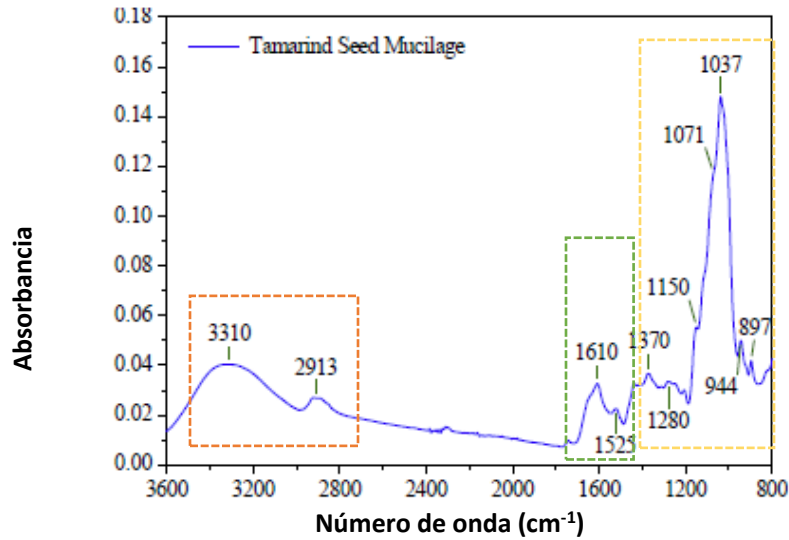


Figura 6. Espectros de absorción FTIR del extracto de semilla de tamarindo obtenido. En los recuadros amarillo, verde y naranja se marcan las regiones que podrían ser atribuidas a carbohidratos, proteínas y lípidos respectivamente. Obtenido de: (Alpizar, y colaboradores, 2017)

Por otro lado, a pesar de no haber cambios significativos en la composición química según lo observado entre los espectros, si se observan cambios en la concentración general. Debido a que los procesos de extracción fueron los mismo estos cambios se atribuyen al tiempo y temperatura de secado de la semilla.

De acuerdo con estos resultados se seleccionó a la semilla secada a 80°C por 6 días para realizar los análisis subsecuentes.

9.1.2 Pruebas fisicoquímicas

9.1.2.1 Viscosidad

Se utilizo la fórmula $V = K(t - c)$ donde V es la Viscosidad cinemática en cSt (1 cSt =1 mm²/s), t es el tiempo en segundos y k es un coeficiente específico para cada copa. En la tabla 8 se encuentran los valores a sustituir dependiendo de la copa usada, en este caso siendo la 2.

Tabla 8. Coeficientes de Copa Zahn.

No. copa	k	c
1	11	2.9

2	3.5	14
3	11.7	7.5
4	14.8	5

Obtenido de:

Como se observa en la tabla 9 los valores del triplicado de la muestra del extracto de la semilla de tamarindo se encuentran en un rango entre los 539-553 cSt, como se indica para líquidos muy viscosos usando la copa Zahn el valor de la viscosidad se encuentra entre 460-1860 cSt para cada lote analizado.

Tabla 9. Resultados obtenidos de viscosidad cinemática (cSt).

	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Promedio	Desviación estándar
<i>Viscosidad Cinemática (cSt)</i>	542.5	553	539	544.83	7.285832142

Obtenido de: (Autoría propia)

La comparación directa no pudo ser posible por diferencia de unidades entre los resultados obtenidos en esta tesis y los resultados en otras investigaciones, sin embargo, existe evidencia que los polisacáridos de la semilla de tamarindo poseen una alta viscosidad, como la mostrada en esta tesis, incluso a bajas concentraciones demostrando alteraciones mínimas en condiciones ácidas y altas temperaturas (Zhang, y colaboradores, 2020). Además, la extracción acuosa con agua a temperaturas medias logra formar un gel altamente viscoso (Chawanorasest, Saengtongdee, & Kaemchantuek, 2016). Los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con lo mencionado anteriormente, la viscosidad del extracto se encuentra en la categoría de viscosidad alta según lo que indica el manual de la copa Zanh BL-BGD126.

En el 2015 Alpizar R., y colaboradores, analizaron las propiedades reológicas del mucílago de la semilla de tamarindo a diferentes concentraciones, condiciones de

temperatura, pH y concentración de sales. Descubrieron que a mayor concentración (2%) del mucílago incrementaba la viscosidad (η), lo mismo sucedía con un aumento en el pH. Sin embargo con adiciones de sales disminuía la viscosidad aparente sugiriendo una carga negativa en la cadena del mucílago.

9.1.2.2 Ph

En la tabla 10 se muestran los resultados obtenidos de la evaluación del pH de 4 lotes de extracto de tamarindo.

Tabla 10. Datos obtenidos de análisis de pH para los lotes 1, 2, 3 y 4

Lotes	pH			Promedio	Desviación Estándar
Lote 1	5.88	5.90	5.81	5.86	0.03354102
Lote 2	6.60	6.54	6.53	6.55	0.027386128
Lote 3	5.64	5.62	5.61	5.62	0.01118034
Lote 4	5.93	5.92	5.88	5.91	0.018708287

Obtenido de: (Autoría propia)

El pH tiene una amplia influencia en las cualidades del extracto, entre ellas la viscosidad aparente y la viscoelasticidad de los recubrimientos, Shao y colaboradores probaron soluciones hechas a base de la semilla de tamarindo en niveles de pH que iban de 1-13 y observaron que estas propiedades se mantenían estables en niveles de pH entre 1-10 mientras que por arriba de 10 la viscosidad aparente disminuía significativamente. Concluyeron que esto se debe a las cargas negativas presentes en el mucílago que podían destruir las interacciones intra e intermoleculares.

En el pH de los cuatro lotes si bien hubo pequeñas variaciones dependiendo al lote analizado todos se mantuvieron en un rango en el que según lo mencionado anteriormente no se veían afectadas propiedades como la viscosidad aparente si no que se favorecía a la viscosidad.

9.1.2.3 Húmedad

Tabla 11. Porcentaje de humedad de cuatro lotes de extracto de semilla de tamarindo

	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Promedio	Desviación estándar
Humedad (m%)	97.40	97.64	97.97	97.15	97.54	0.349571166

Obtenida de: (Autoría propia)

Se llevo a cabo una extracción acuosa y se obtuvo un líquido altamente viscoso que se asume sucedió debido a unión del agua con los componentes de la semilla por lo que los porcentajes de humedad aquí reportados concuerdan con este proceso.

9.1.3 Concentración de proteínas

A partir de los valores de densidad óptica obtenidos de los análisis se generó una curva patrón con la cual se obtuvo la ecuación de la recta. A partir de esta se hizo el cálculo de la concentración de proteína del extracto acuoso de la semilla de tamarindo.

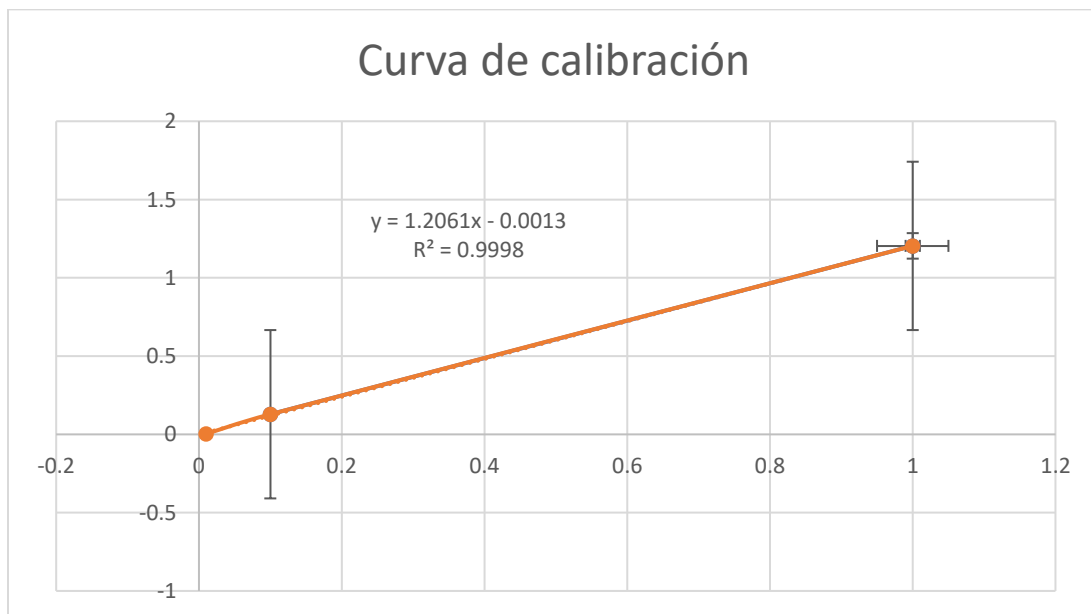


Figura 7. Curva de calibración obtenida a través del método de Bradford para obtener la concentración de proteínas presentes en el extracto de semilla de tamarindo. Obtenido de: (Autoría propia).

Tabla 12. Datos de la desviación óptica y concentración obtenidos de los 4 lotes

Lotes	Desviación Óptica			Promedio	Desviación Estandar	Concentración
Lote 1	.569	.686	.604	.620	0.042464691	X = .514 mg/mL
Lote 2	.569	.689	.604	.617	0.043752143	X = .514 mg/mL
Lote 3	.628	.581	.639	.616	0.021783021	X = .512 mg/mL
Lote 4	.563	.528	.518	.536	0.264375207	X = .499 mg/mL

Obtenido de: (Autoría propia).

Prospero y colaboradores en el 2006, analizaron por el método de Bradford la concentración de proteína de un recubrimiento comestible creado a partir de quitosano y suero de leche, obteniendo 2.7 mg/ml. Mientras que otro recubrimiento hecho a base de almidón de maíz obtuvo 2 mg/ml (Rawdkuen, 2019). Como se puede observar la concentración de proteína comparada con los ejemplos anteriores parece ser mucho menor sin embargo Khounvilay & Sittikijyothin en el 2012 observaron que la goma del núcleo de la semilla de tamarindo era rica no solo en polisacáridos sino también en proteínas. Expusieron sus resultados, al igual que muchos otros autores que llevaron a cabo diferentes extracciones, en porcentaje (13.51%) siendo difícil hacer una comparación directa con los resultados obtenidos en esta tesis. Otro ejemplo es lo obtenido por Mohamad, Akram, & Bero en el 2012, que a través de una extracción con PBS obtuvieron que el 40% de la composición del extracto era de proteína. En estos resultados podemos observar una amplia variación en los resultados, esto puede ser debido a que los métodos de extracción juegan un importante papel al determinar la concentración de proteína. Si bien el método de Bradford es una prueba rápida y de relativa facilidad para calcular la concentración de proteína el ensayo se basa en la unión del colorante de Coomassie con la proteína, este se une específicamente a los residuos de la arginina y la lisina

y no se une a aminoácidos libres lo cual puede causar diferente variación ante diferentes proteínas.

Por último, es importante recordar que la interacción entre los carbohidratos y las proteínas presentes permiten la formación de cadenas capaces de interactuar con la superficie del fruto cubierto (Lima Santos Figueiredo, y colaboradores, 2020).

9.1.4 Electroforesis SDS PAGE

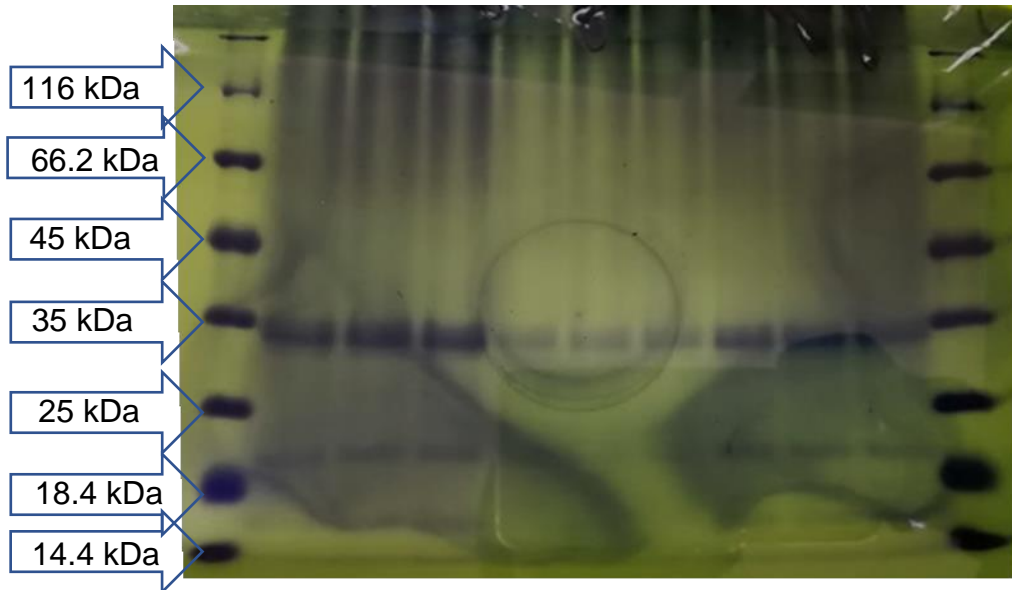


Figura 8. Gel de poliacrilamida en el que se muestra una banda de aproximadamente 35 kDa y una más delgada a los 18 kDa (Fuente: Autoría propia).

Bagul & Sonawane en el 2015 realizaron una extracción secuencial en la semilla de tamarindo de 4 etapas basada en la solubilidad de las proteínas presentes, los 4 grupos fueron; albumina, globulina, prolamina y gluteína. Obtuvieron que la semilla contaba con 15.31 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de albumina, con 6.68 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de globulina, 18.82 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de prolamina y gluteína 87.65 $\mu\text{g}/\text{mg}$.

De acuerdo a lo mencionado anteriormente se puede inferir cual podría ser la proteína de almacenamiento en semillas que se encuentra presente en mayor cantidad en el extracto obtenido en este trabajo. De acuerdo al gel mostrado en la figura 8 el peso de la proteína en mayor cantidad es de aproximadamente 35 kDa, la gluteína es una proteína con un amplio rango de peso molecular y que se encuentra también en mayor proporción en la semilla de tamarindo (Bagul &

Sonawane, 2015). Siendo posible que sea la proteína observada en el gel, a pesar de haber pasado por procesos muy diferentes para su extracción. Por otro lado la 2S albumina puede pesar entre 18-21 kDa y en muchas semillas se encuentra entre el 20 – 60% del contenido total de proteína, siendo abundantes en dicotiledóneas además la relativa facilidad de su extracción (soluble en agua) hacen que sea posible que la banda inferior en el gel mostrado en la figura 8 pertenezca a esta proteína (Moreno & Clemente, 2008) (Bagul & Sonawane, 2015). Las globulinas son consideradas las principales proteínas de almacenamiento en las plantas dicotiledóneas, a pesar de esto el peso reportado para algunos tipos de globulinas presentes en leguminosas va de entre los 300- 370 kDa lo cual hace menos probable que sea la aquí observada. Por último, las prolaminas son proteínas de almacenamiento principalmente en cereales y son muy solubles en etanol (Perez & Arellano, 2009).

Sin embargo, se necesitan más análisis para saber con seguridad cuál es la proteína presente en el gel presentado. Tener un mayor conocimiento de esto podría ayudar a determinar las interacciones que se dan en el extracto y como podría interactuar con un fruto en caso de ser utilizado para formar un recubrimiento.

9.1.5 Determinación cualitativa de carbohidratos

EL principal carbohidrato presente en semilla de tamarindo es el galactoxiglucano (65-72%); compuesto de D-xilosa, D-glucosa y D-galactosa y L-arabinosa en un rango de 8.4.2.1. Esta información varía dependiendo de factores como el origen de la semilla, estado fisiológico, tipo de extracción, etc. (Zhang, y colaboradores, 2020) (Khounvilay & Sittikijyothin, 2012). Los carbohidratos presentes en este compuesto deberían ser positivos a carbohidratos en la prueba de Molish, positivo para azúcar reductor en la prueba de Benedict, positiva para monosacárido reductor en la prueba de Bardfoed, negativa para aldohexosas en la prueba de Seliwanoff y positivo para azúcares reductores en la prueba de Fehling (Ashenurst, 2020) .

Tabla 13. Resultados de pruebas cualitativas del extracto de semilla de tamarindo.

Lotes	Molish			Benedict			Barfoed			Selivanoff			Fehling		
	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Lote 1	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Lote 2	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Lote 3	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Lote 4	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

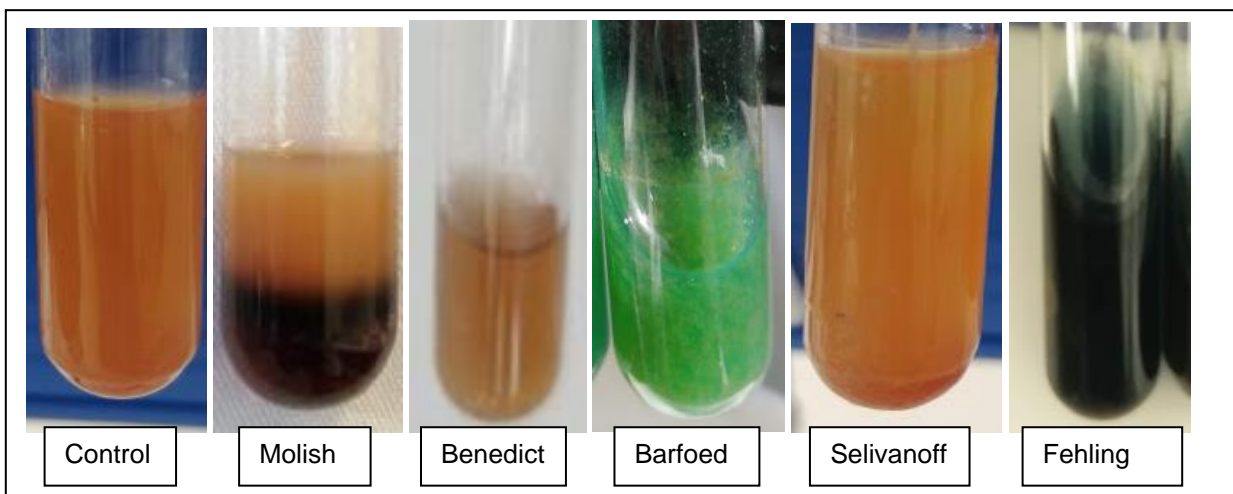


Figura 9. Muestras de las pruebas cualitativas para la detección de carbohidratos. De izquierda a derecha el orden es el siguiente; Control, Molish, Benedict, Barfoed, Selivanoff y Fehling. Obtenido de: (Autoría propia).

Como se muestra en la tabla 13 y en la figura 7 los resultados obtenidos para Molish y Selivanoff concuerdan con lo indicado para los carbohidratos que conforman a la molécula de Galactoxyloglucano, sin embargo, para el caso de Benedict y Barfoed la identificación de cambios de color resulta complicada debido al color natural del extracto de tamarindo. Para la prueba de Benedict no se observa la formación de un precipitado por lo que la prueba parece ser negativa, la razón de esto podría ser que la reacción se debe dar en condiciones alcalinas y el pH del extracto esta entre 5.65 a 6.55. La prueba de Barfoed por su parte muestra un cambio de color a verde lo cual podría ser un indicativo de la reducción de los azúcares, además esta prueba se da en condiciones ácidas lo que refuerza este resultado, la rapidez con la que se obtuvo el color una vez iniciado el calentamiento es indicativo de presencia de monosacáridos. En el caso de la prueba de Fehling no hubo cambios visibles al llevar a cabo la reacción, estos resultados podrían deberse a que la reacción de

Fehling no es específica para el caso aldehídos además de que también se debe dar en condiciones alcalinas (Ashenhurst, 2020).

9.1.6 Cenizas

A partir de los resultados obtenidos se utilizó la fórmula siguiente para obtener el % de cenizas, en la cual P es la masa del crisol con cenizas, p es masa del crisol vacío y M es la masa de la muestra.

$$\% \text{ cenizas} = \frac{(P - p)}{M} * 100$$

Tabla 14. Porcentaje de cenizas.

Lotes	Lote1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Promedio	Desviación estándar
<i>% cenizas</i>	0.0252	0.0397	0.0471	0.0373	0.037325	0.009095924

Obtenido de: (Autoría propia)

El contenido total de cenizas en este trabajo está entre los 0.02 y 0.04%, según lo reportado estos pueden ir de 0.07-3.30% (Khouvilay & Sittikijyothin, 2012) por lo que los resultados obtenidos parecen entrar en este rango.

9.1.7 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana

Las pruebas para determinar la sensibilidad de 3 microorganismos contra el extracto de tamarindo a través de la susceptibilidad antibiótica demostraron que en ningún caso hubo un efecto inhibitorio por parte del extracto contra las cepas usadas. En la figura 9, 10 y 11 se observa a *E. coli*, *Salmonella typhi* y a *Shigella sp* enfrentada al extracto de tamarindo sin diluir y sin la formación de un halo.

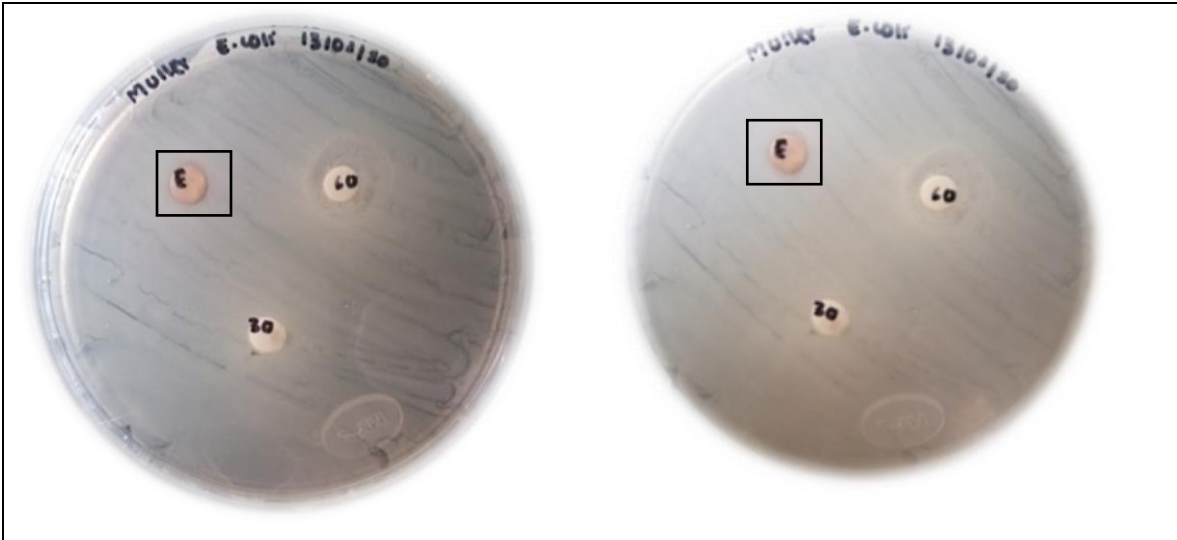


Figura 10. Crecimiento de *E. coli* en cajas Petri con un disco circular impregnado de extracto de tamarindo, según la técnica descrita anteriormente, este se encuentra marcado con un cuadro negro. En la misma placa se analizó el recubrimiento creado en base a este. Obtenido de: (Autoría propia)

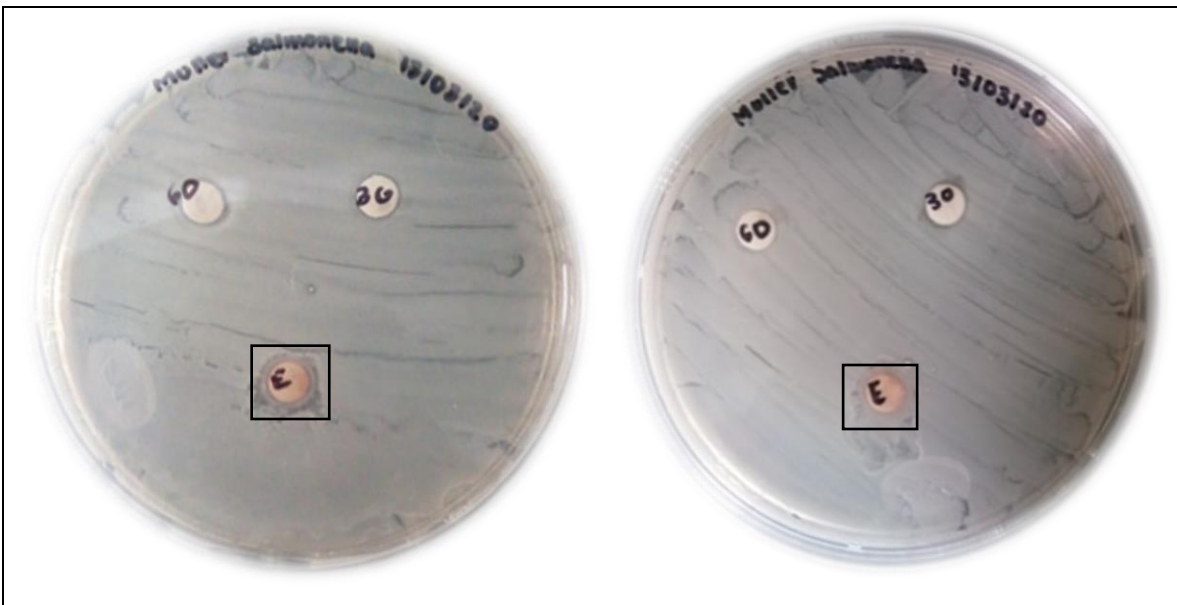


Figura 11. Crecimiento de *E. coli* en cajas Petri con un disco circular impregnado de extracto de tamarindo, según la técnica descrita anteriormente, este se encuentra marcado con un cuadro negro. En la misma placa se analizó el recubrimiento creado en base a este. Obtenido de: (Autoría propia)

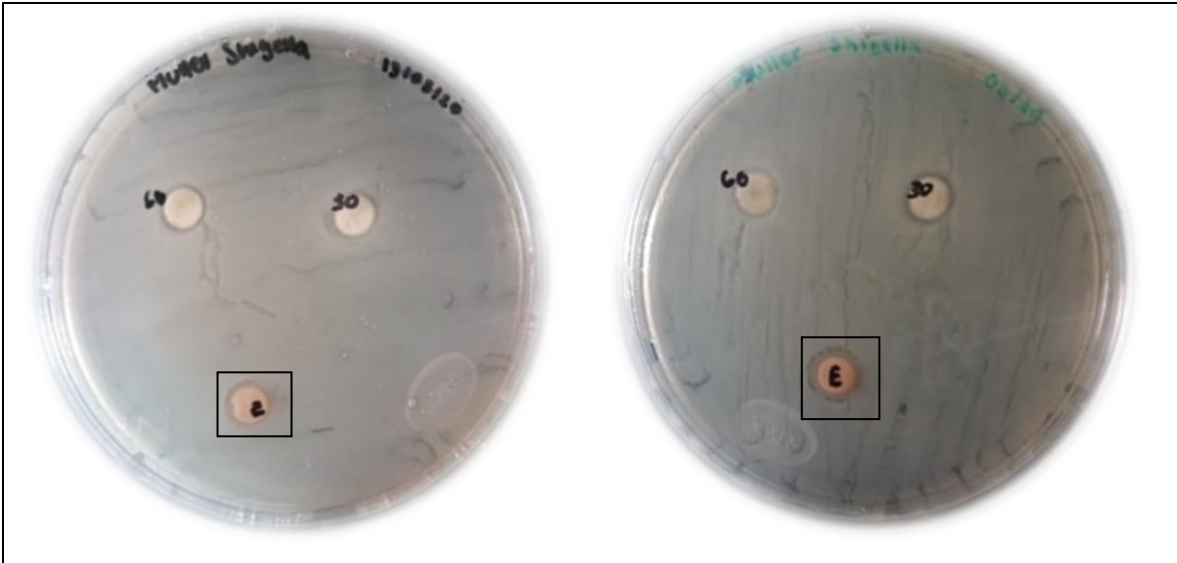


Figura 12. Crecimiento de *Shigella* sp. en cajas petri con un disco circular impregnado de extracto de tamarindo, según la técnica descrita anteriormente, este se encuentra marcado con un cuadro negro. En la misma placa se analizó el recubrimiento creado en base a este. Obtenido de: (Autoría propia)

Las pruebas para comprobar la sensibilidad de los microorganismos mencionados contra el extracto de tamarindo demostraron poca efectividad por parte de este para inhibirlos exitosamente. De momento no existe evidencia reportada que indique lo contrario.

9.2 Aceite Esencial De Canela

9.2.1 FTIR

Aceite corteza de canela extraído por destilación por arrastre de vapor

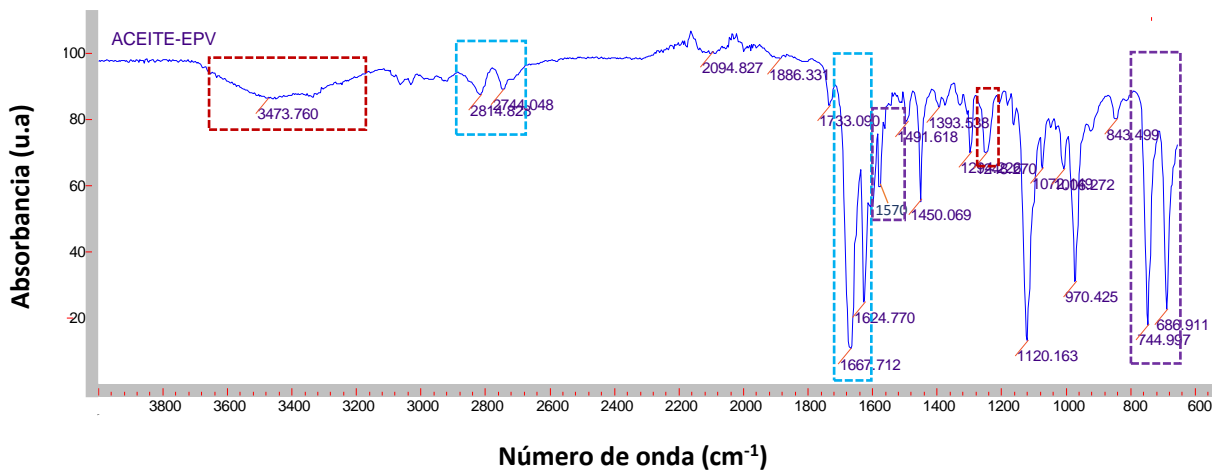


Figura 13. Espectro de FTIR del aceite esencial de canela extraído por una destilación de arrastre de vapor. En azul se encuentran marcados las señales relacionadas al cinamaldehído, en rojo las señales relacionadas al eugenol y en morado las que pueden estar relacionadas a ambos compuestos. Obtenido de: (Autoría propia)

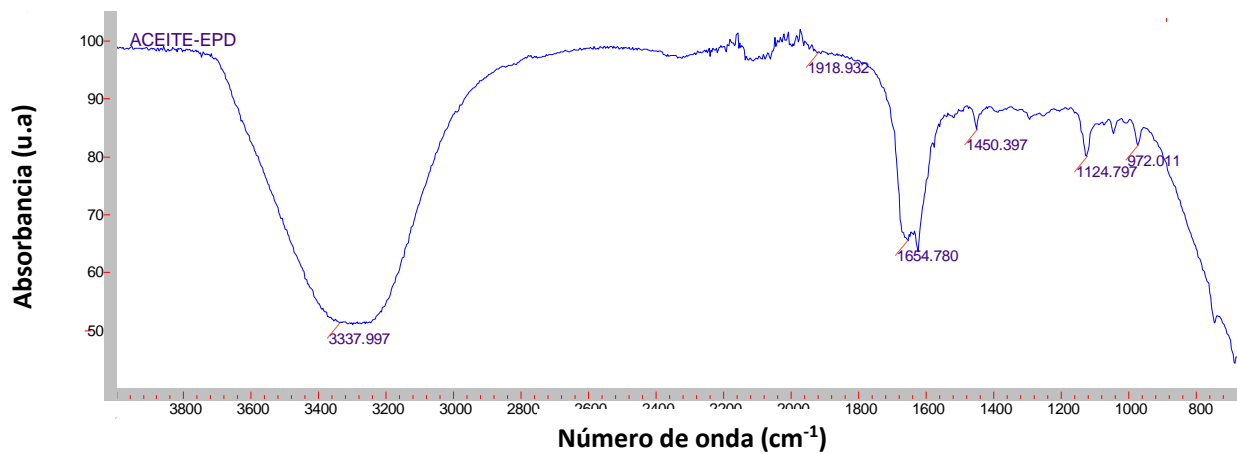


Figura 14. Espectro de FTIR del Aceite corteza de canela obtenido por extracción alcohólica. Obtenido de: (Autoría propia).

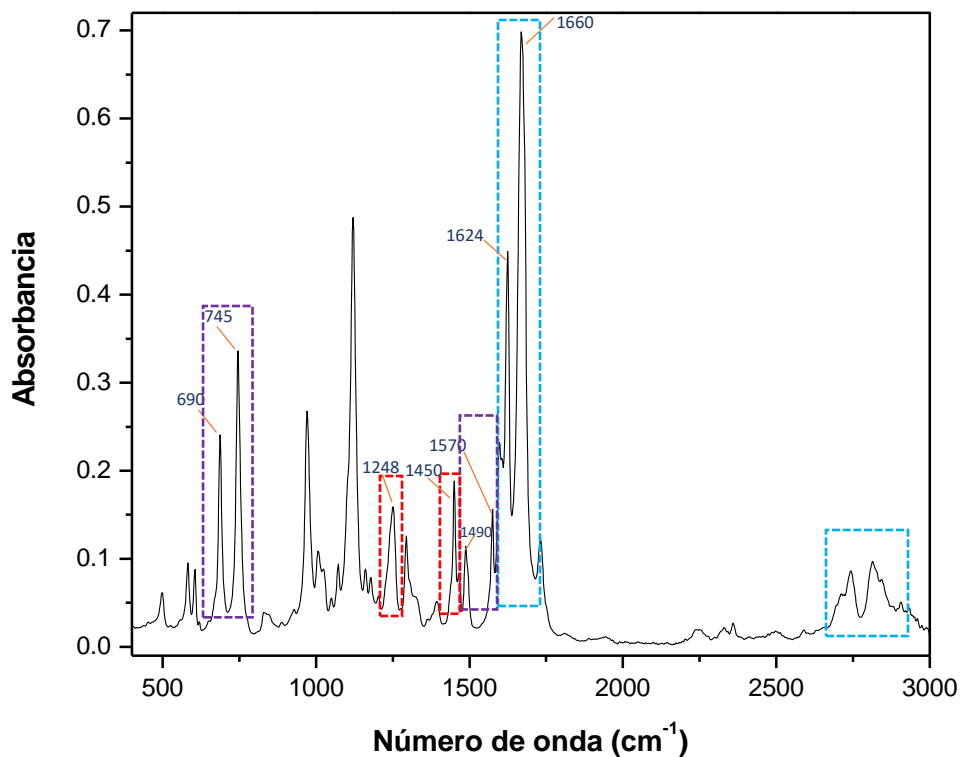


Figura 15. Espectro de absorción FT/IR del aceite esencial de corteza de canela comercial. En azul se encuentran marcados las señales relacionadas al cinamaldehído, en rojo las señales relacionadas al eugenol y en morado las que pueden estar relacionadas a ambos compuestos. Obtenido de: (Autoría propia).

Las bandas en la zona entre los 1800 y 600 cm^{-1} del espectro (figura 12) son similares a los resultados obtenidos por Jeyaratnam y colaboradores en el 2016, en los cuales las señales a 1668, 1624 cm^{-1} se pueden atribuir al estiramiento del enlace carbonilo C=O presente en aldehídos, de igual manera las bandas ubicadas a 2814 y 2744 cm^{-1} se asocian a este último grupo por la resonancia de Fermi, la intensidad de las bandas a 1668 y 1624 cm^{-1} puede indicar un alto contenido de aldehídos como el cinamaldehído (Dobado Jiménez, y colaboradores, 2002). Por otra parte, la señal a 1570 cm^{-1} podría corresponder a la vibración del enlace C=C del anillo aromático, mientras que la banda a 1450 cm^{-1} se puede asociar al doblamiento del enlace C-OH, de la misma manera la banda ancha ubicada entre los 3100 y 3600 cm^{-1} se puede atribuir a la vibración del grupo hidroxilo pertenecientes a la fracción alcohólica, a 1248 cm^{-1} se da la vibración asociada al estiramiento de la fracción alcohólica del aceite esencial como los fenoles,

relacionados al eugenol. A 1491 cm^{-1} se da la vibración de $-\text{CH}_2$ de alcanos y de $=\text{CH}$ de anillos aromáticos (Jeyaratnam, y colaboradores, 2016) (Thygesen, Løkkey, Micklander, & Engelsen., 2003). La banda a 970 cm^{-1} se asocia a la vibración del enlace C-H presente en alquenos, a 690 y 744 cm^{-1} se observa una señal relacionada a la vibración del enlace C-H de anillos bencénicos (Jeyaratnam, y colaboradores, 2016) (Dobado Jiménez, y colaboradores, 2002).

El espectro del aceite esencial comercial (figura 14) de manera general tiene muchas similitudes con el aceite extraído por arrastre de vapor haciendo difícil observar alguna diferencia significativa.

Por otro parte el aceite obtenido por extracción alcohólica observado en la figura 13 muestra una banda muy ancha e intensa entre los 3000 y los 3600 cm^{-1} asociada a la vibración del grupo hidroxilo que si bien puede estar relacionada a una fracción alcohólica también podría indicar la presencia de agua en el destilado, por otro lado presenta señales similares a las del extracto observado en la figura 12 como las señales a 1450 , 1120 cm^{-1} asociadas a la vibración del grupo hidroxilo y a 970 cm^{-1} asociada a alquenos (Jeyaratnam, y colaboradores, 2016).

9.2.2 Resonancia Magnética nuclear de Protón ($\text{RMN-}^1\text{H}$)

Los resultados obtenidos de la $\text{RMN-}^1\text{H}$ muestran espectros similares entre ellos (figura 16). Las señales observadas en 9.6 ppm se pueden atribuir a los protones del grupo aldehído que en el aceite se encuentra en el cinamaldehído, en el extracto de canela comercial la intensidad de la señal es menor que la observada en el extracto obtenido en el laboratorio por destilación de arrastre de vapor, indicando una posible diferencia de concentraciones entre los aceites analizados. Las señales a 6.7 y 7.5 ppm están relacionadas a la presencia de compuestos aromáticos, como el cinamaldehído y el eugenol. En este caso se observa también una diferencia en la intensidad de las señales siendo el aceite obtenido de manera comercial el que presenta una señal más intensa, de igual manera podría estar relacionado a las diferencias en la concentración de estos 2 compuestos, haciendo posible que la concentración de eugenol en el aceite comercial sea mayor a la del aceite obtenido

en el laboratorio (Trejo, Prada, Trejo, & Sánchez Arroyo, 2020) (Ma, Chen, Wang, & Liu, 2015).

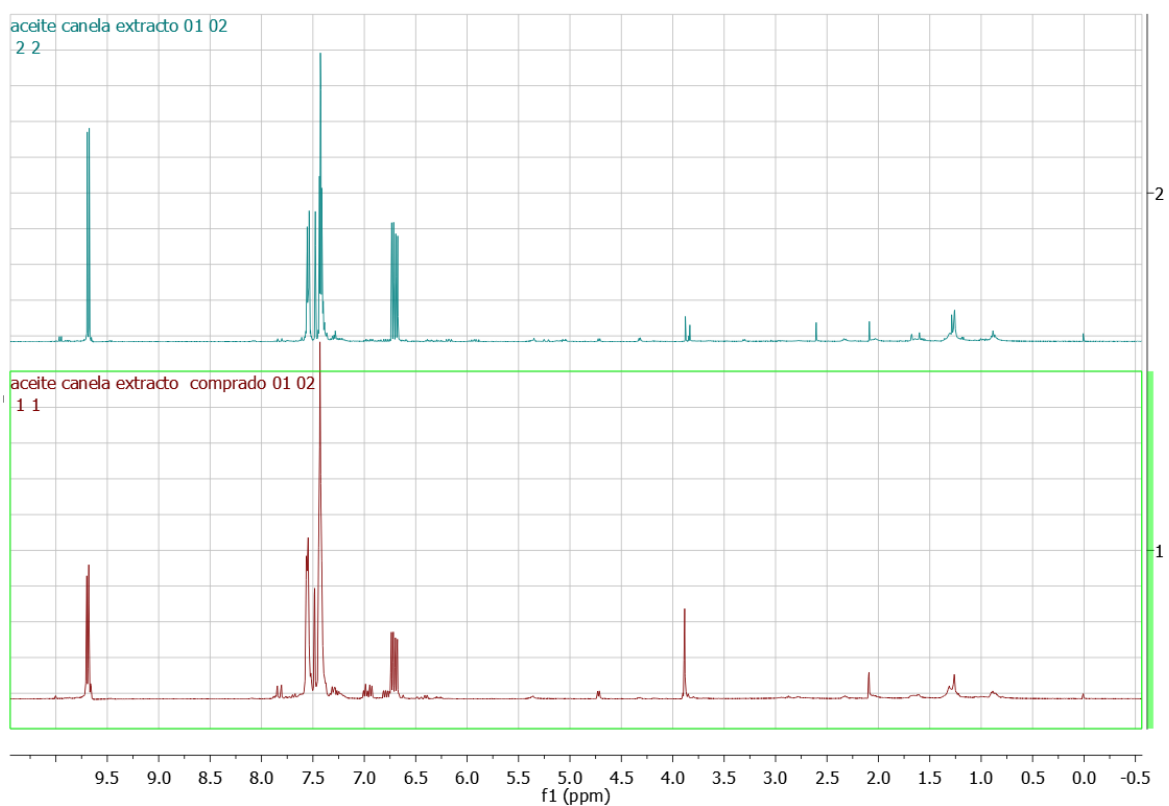


Figura 16. Espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H de aceite de corteza de canela extraído por destilación por arrastre de vapor y aceite de corteza de canela comercial. Obtenido de: (Autoría propia)

9.2.6 Concentración de cinamaldehído

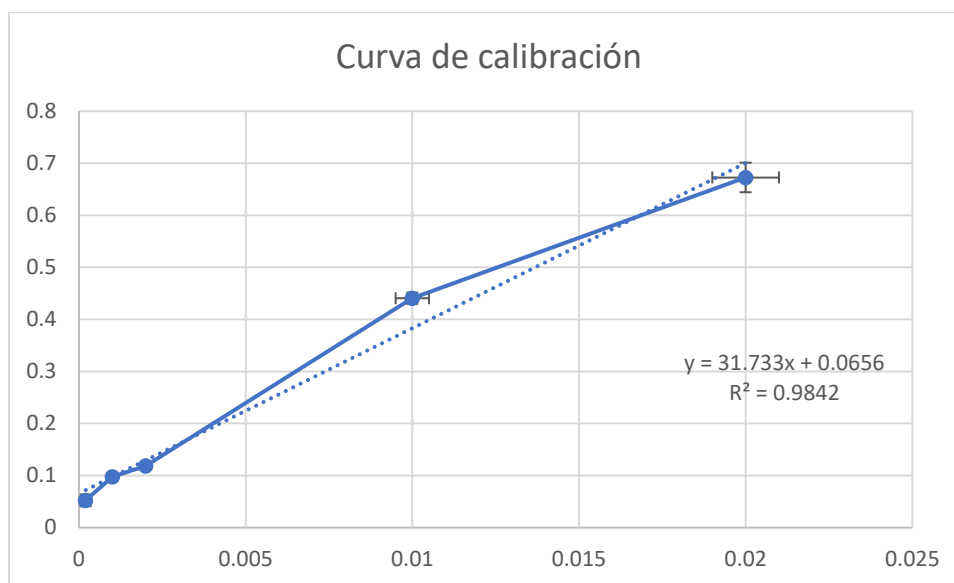


Figura 17. Curva de calibración del cinamaldehído usada para calcular la concentración de este compuesto en el aceite esencial de canela. Obtenido de: (Autoría propia)

Tabla 15. Datos obtenidos al analizar el aceite esencial de canela en espectrofotómetro, así como cálculos necesarios para obtener la concentración de cinamaldehído.

	Desviación Óptica			Promedio	Desviación estándar	Concentración
	.690	.724	.650			
Aceite [.25 mg]				.688	0.037040518	19.6 mg/mL

Obtenido de: (Autoría propia)

El cinamaldehído, componente principal del aceite esencial de canela, es una sustancia categorizada como GRAS (Generalmente reconocida como segura) por la FDA de los Estados Unidos (Casado Quesada, 2016). Sin embargo, es importante mencionar que existe una DL50 (Dosis letal 50) oral para ratas de 2220 mg/kg y DL50 cutáneo para conejos de 5000 mg/kg de la cual se obtuvo la DL 50 oral para humanos que va de entre 2000/5000 mg/kg, este dato es considerado, poco nocivo por ingestión (CHEM LAB, 2018). La concentración de cinamaldehído presente en el aceite es de 19.6 mg/mL que en comparación con la cantidad utilizada en la biopelícula no rebasa los límites establecidos por la DL50.

9.2.7 Concentración del Eugenol

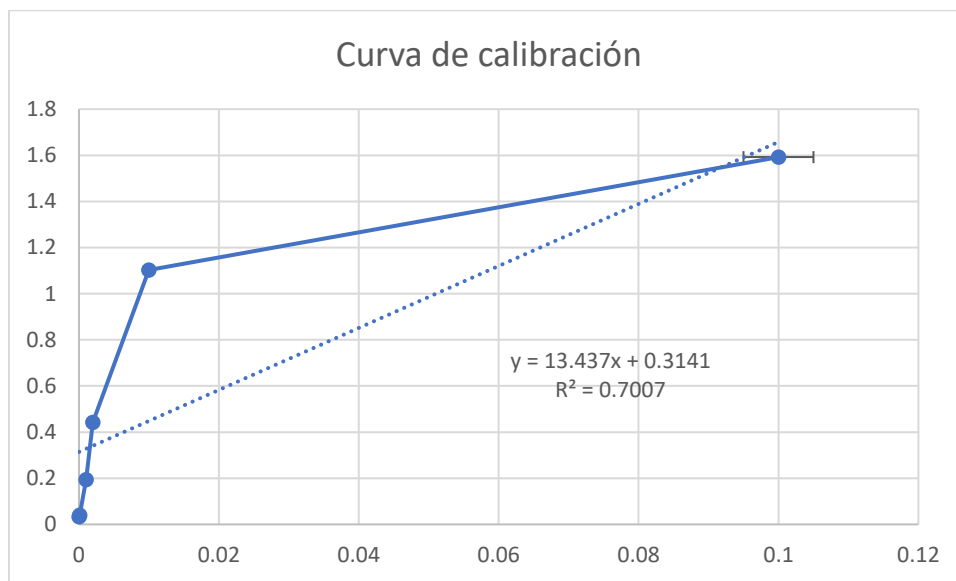


Figura 18. Curva de calibración del eugenol usada para calcular la concentración de este compuesto en el aceite esencial de canela. Obtenido de: (Autoría propia)

Tabla 16. Datos obtenidos al analizar el aceite esencial de canela en Espectrofotómetro, así como cálculos necesarios para obtener la concentración del eugenol.

	Desviación Óptica			Promedio	Desviación estandar	Concentración
	Aceite [.25 mg]	.492	.490	.495	.492	0.00254951

Obtenido de: (Autoría propia)

El eugenol es un compuesto importante presente en el esencial de canela que junto con el cinamaldehído son principales responsables de efecto antibacteriano con el que cuenta el aceite. Es reconocido como GRAS por la FDA cuando es consumido oralmente y se considera no tóxico en alimentos, pero tóxico al ser inhalado. Altas dosis de este compuesto pueden causar daño renal (Tripathi & Mishra, 2016). La DL50 oral para ratas es menos de 1930 mg/kg, para ratón 3000 mg/kg y para el conejillo de las indias es de 2130 mg/kg siendo considerado un efecto tóxico bajo para los humanos (Wexler, 2014). Por lo que al igual que en el caso del

cinamaldehído, la concentración presente de eugenol en el aceite es de 13.2 mg/mL que en comparación con la cantidad utilizada en la biopelícula no rebasa los límites establecidos por la DL50.

9.2.5 Cromatografía en capa fina

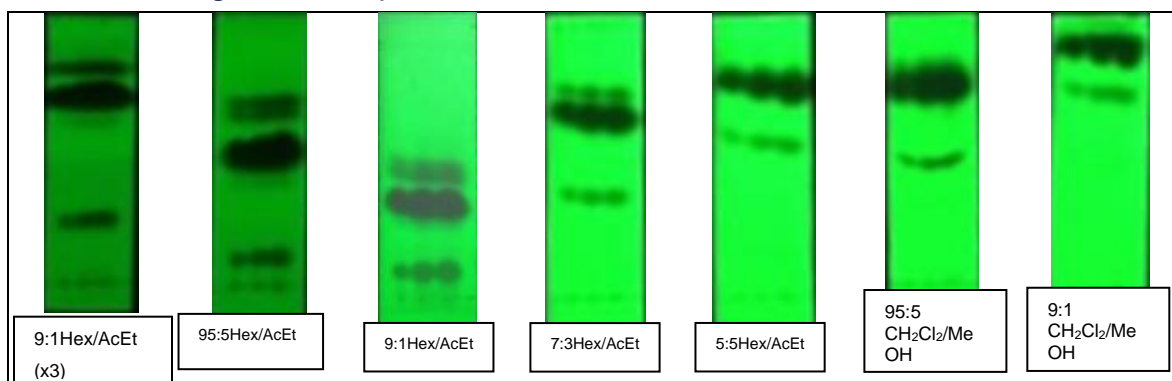


Figura 19. Cromatografía en capa fina del aceite esencial de corteza de canela. Se observan las diferentes huellas obtenidas usando los compuestos que se observan en la parte baja de la imagen, visualizados con luz UV 254 nm. Obtenido de: (Autoría propia)

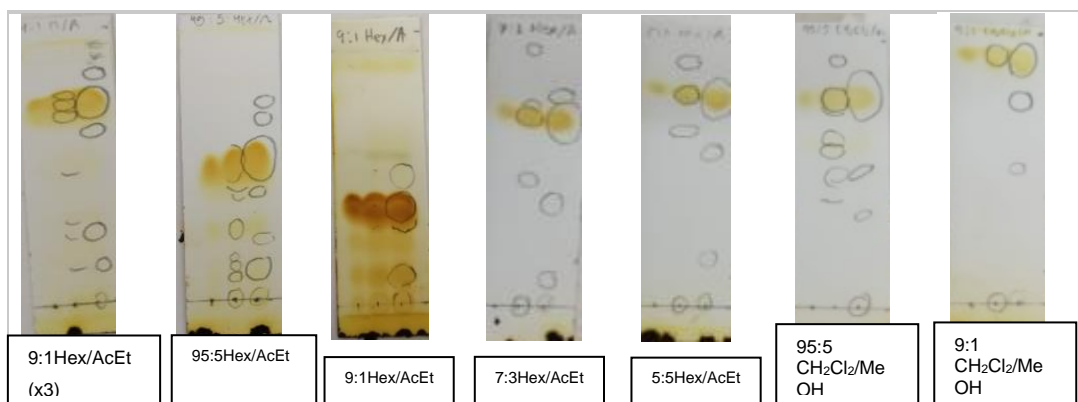


Figura 20. Cromatografía en capa fina del aceite esencial de corteza de canela. Se observan las diferentes huellas obtenidas usando los compuestos que se observan en la parte baja de la imagen, visualizados con Iodo. Obtenido de: (Autoría propia)

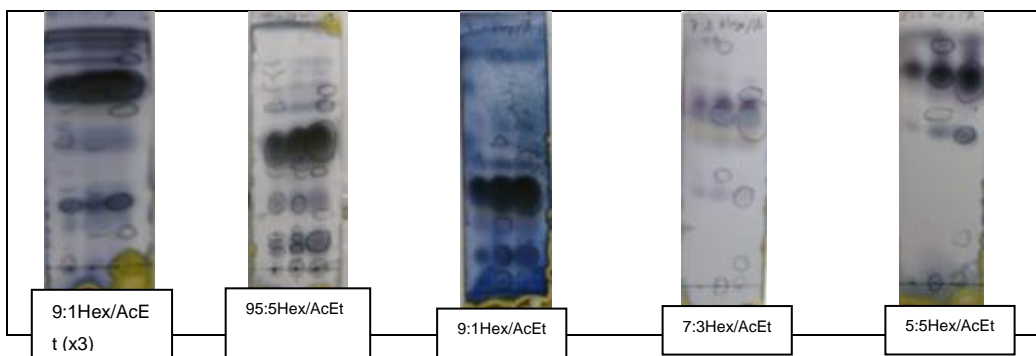


Figura 21. Cromatografía en capa fina del aceite esencial de corteza de canela. Se observan las diferentes huellas obtenidas usando los compuestos que se observan en la parte baja de la imagen, visualización con Ácido. Obtenido de: (Autoría propia)

Se utilizaron diferentes sistemas de solventes con la finalidad de encontrar al adecuado para separar a los compuestos presentes en el aceite esencial. Según lo observado el sistema compuesto de 95:5 hexano/acetato de etilo fue el que mejor realizó este trabajo. Además, se probaron 3 métodos para visualizar la separación. Utcharykiat y cols, en el 2016 utilizaron un sistema compuesto de 93:7 tolueno/acetato de etilo que actuó como la fase móvil y se visualizaron los resultados con luz UV 254 nm. De esto, al calcular los R_f observaron que los principales componentes del aceite esencial de corteza de canela que ellos analizaron eran el cinamaldehído y el eugenol, además, pudieron observar por lo menos a otros seis componentes.

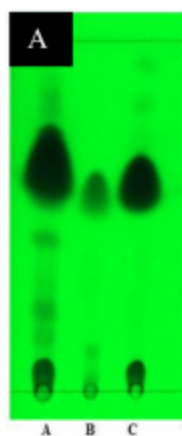


Figura 22. Cromatografía en capa fina del aceite esencial de corteza de canela usando tolueno/acetato de etilo 93:7. Línea A, aceite esencial de corteza de canela. Obtenido de: (Utcharykiat, Surassmo, Jaturanpinyo, Khuntayaporn, & Chomnawang, 2016).

De acuerdo con lo observado la separación de los compuestos presenta un comportamiento similar al de la bibliografía citada anteriormente, considerando que el desplazamiento se llevó a cabo con un sistema de disolventes de polaridad similar esto podría indicar que los compuestos observados son el cinamaldehído y el eugenol y que en efecto se encuentran en mayor proporción. Sin embargo, esto solo puede ser asegurado hasta llevar a cabo una purificación de compuestos, aunque esta suposición no debe ser descartada ya que, según la bibliografía consultada los principales compuestos del aceite esencial de corteza de canela son el cinamaldehído y el eugenol (Miranda, 2013).

9.2.3 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana

Las pruebas para determinar la sensibilidad de las cepas contra el aceite de corteza de canela mostraron que las 3 cepas se vieron afectadas en su crecimiento a la concentración de 300 mg/mL.

Tabla 17. Sensibilidad a diferentes concentraciones para los microorganismos seleccionados.

Cepas	Halo de inhibición (mm)					
	300 mg/mL		30 mg/mL (30,000 µg/mL)		3 mg/ml (3,000 µg/mL)	
<i>EPEC</i>	34	34	-	-	-	-
<i>Shigella sp</i>	40	40	5	-	-	-
<i>S. tiphymurium</i>	40	36	25	25	-	-
<i>Botrytis cinerea</i>	40	14	13	-	-	-

Obtenida de: (Autoria propia)

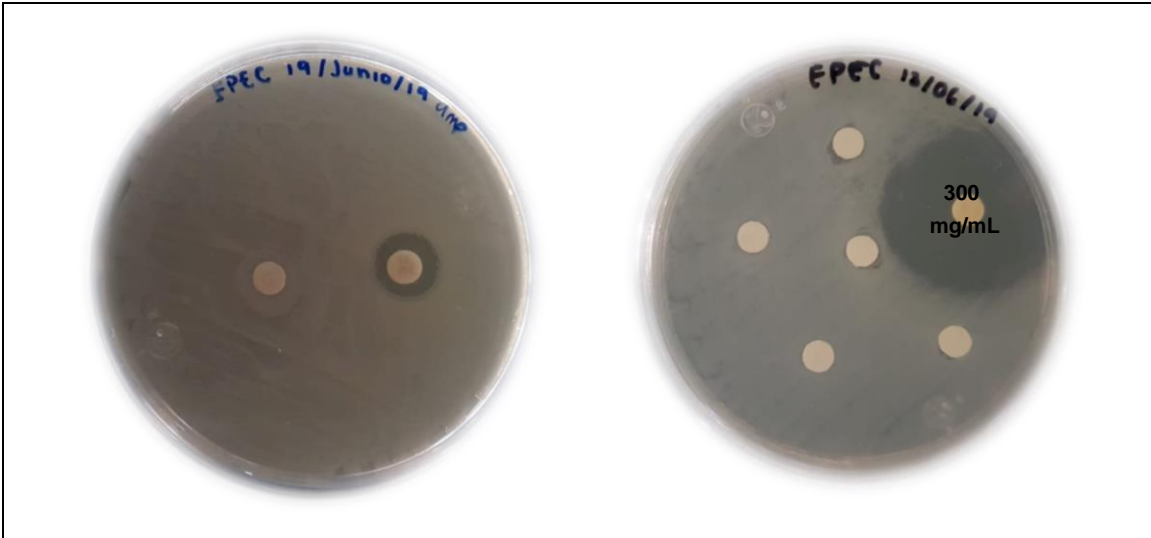


Figura 23. En la imagen izquierda se muestra la placa con prueba de la sensibilidad del microorganismo a Ampicilina de 30 μ g como control positivo y como control negativo DMSO al 10%. En las dos imágenes de la derecha se observa la sensibilidad de *EPEC* frente a diferentes concentraciones del aceite esencial de corteza de canela, siendo la concentración de 300 mg/mL. Obtenido de: (Autoría propia)

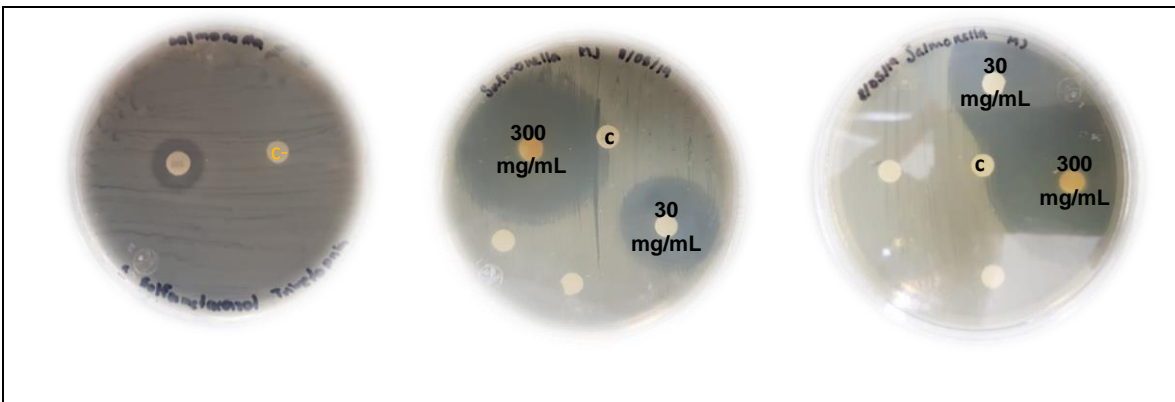


Figura 24. En la imagen izquierda se muestra la prueba de sensibilidad de *Salmonella typhimurium* a Trimetoprima/sulfametoxazol de 25 μ g como control positivo y como control negativo DMSO al 10%. Mientras que en las dos imágenes de la derecha se muestra la prueba de sensibilidad a diferentes concentraciones del aceite esencial de corteza de canela para *Salmonella typhimurium*. Obtenido de: (Autoría propia)

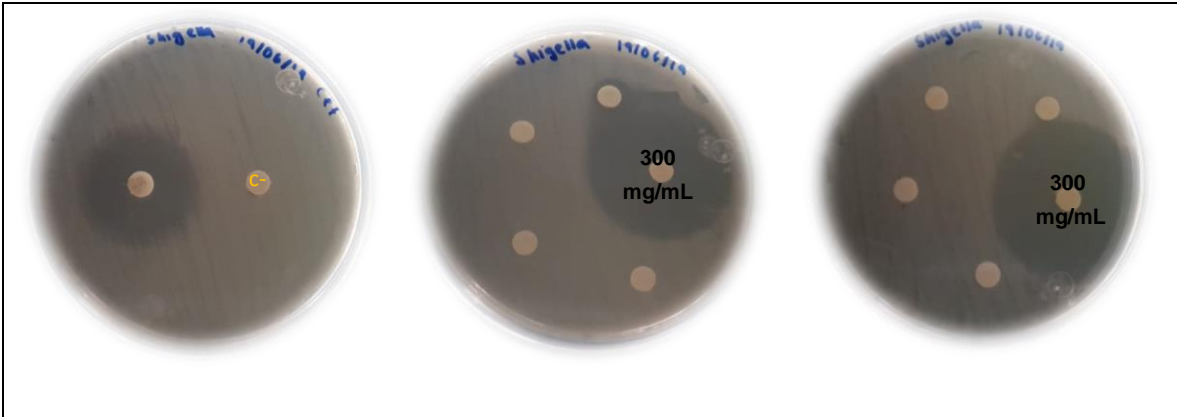


Figura 25. En la imagen izquierda se muestra la placa con la prueba de la sensibilidad de *Shigella sp* a ceftriaxoma 30 µg como control positivo y como contro negativo DMSO al 10%. Mientras que en las dos imágenes de la derecha se observa la sensibilidad a diferentes concentraciones del aceite esencial de corteza de canela *para Shigella sp*. Obtenido de: (Autoría propia)

- *Botritis cinérea*

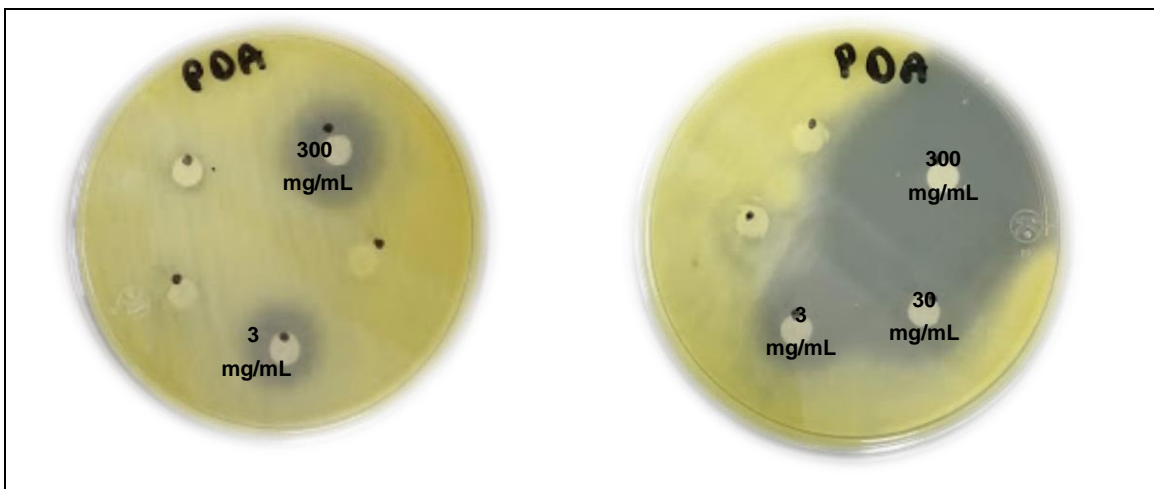


Figura 26. Sensibilidad a diferentes concentraciones del aceite esencial de corteza de canela para *Botritis cinérea*. Obtenido de: (Autoría propia)

El aceite esencial proveniente de la canela ha demostrado tener actividad contra bacterias responsables de enfermedades infecciosas, así como de bacterias degradadoras de alimentos, que son tanto Gram-positivas como Gram negativas (Pattnaik, Kanta Padhan, & Kumar Jana, 2010). Algunos estudios han demostrado que el cinamaldehido puede ser utilizado como antimicrobiano eficaz contra

Salmonella spp y algunas cepas de *E. coli* en diferentes matrices alimentarias (Casado Quesada, 2016).

Por otra parte, Pattnaik y colaboradores en el 2010 probaron el aceite esencial de corteza de canela puro y una dilución de 1/3 en *E.coli* y otros patógenos y observaron que *E. coli* demostraba ser muy sensible y moderadamente sensible a este respectivamente.

Las diluciones son un factor importante para determinar el grado de sensibilidad del microorganismo contra el antimicrobiano, en el presente estudio la concentración más alta (300 mg/mL) del aceite resulta efectiva para EPEC como se puede observar en la figura 16, sin embargo no se observa halo de inhibición en las concentraciones siguientes.

En el presente estudio se observó que *Salmonella typhimurium* mostró sensibilidad al aceite esencial de canela a dos de las concentraciones utilizadas, mostrando un halo de inhibición de 40 mm a la concentración de 300mg/mL, como se observa en la figura 17 y en la tabla 15. Resultados similares fueron obtenidos por Amin N., Murad A., Al-Nabulsi, Osaili, & Holley en el 2019, reportaron que *Salmonella typhimurium* al igual que otros serotipos de *Salmonella* demostraron sensibilidad contra el aceite esencial de canela puro originando un halo de inhibición de 32.3 mm de diámetro.

La efectividad de un aceite esencial depende de múltiples factores que pueden determinar su composición, algunos de ellos son el origen, las condiciones climáticas y de crecimiento de la planta así como la extracción usada y el almacenamiento del aceite (Huerta Lorenzo, 2011) es por eso que existen variaciones en los resultados obtenidos por medio de diferentes estudios siendo este el caso.

Para el caso de *Shigella sp.* el aceite esencial muestra tener efectividad contra este microorganismo en la concentración más alta, mientras que no muestra tener efecto en las concentraciones siguientes. Mohammed, Tafess y Dawit en el 2015 reportaron un halo de inhibición de 36.66 mm usando el aceite puro. Estos

resultados son similares a los obtenidos en este estudio usando una concentración de 300 mg/mL lo cual habla de una buena actividad por parte del aceite esencial usado, estas diferencias se pueden deber al método aplicado para extraer el aceite así como características particulares de los materiales.

Por último, los resultados obtenidos para *Botrytis cinerea* resultan difíciles de interpretar debido a la diferencia que existe en el duplicado de la prueba, a pesar de esto se observan halos de inhibición a diferentes concentraciones del aceite por lo que puede indicar que el hongo resulta afectado por este.

De igual manera el esencial de canela ha demostrado tener actividad contra *Botrytis cinerea* a diferentes concentraciones, según los resultados obtenidos por González Cabrera, Paredes Peralta, Erazo Rodríguez y Sánchez Herrera así como también se probó su efectividad por sobre otros 49 aceites esenciales contra este hongo de importancia en la agricultura (Wilson, Solar, Ghaouth, & Wisniewski, 1997).

Por lo que si bien la actividad es clara hace falta esclarecer las concentraciones apropiadas para su uso y motivos por los que no se obtuvieron resultados reproducibles, siendo posible que esto haya sucedido debido a una falla en el proceso al mezclar ambos elementos antes de su aplicación en la prueba, sin embargo este problema se puede observar en las pruebas siguientes por lo que es necesario analizarlo a profundidad.

9.2.4 Concentración mínima inhibitoria

Tabla 18. Concentración mínima inhibitoria para los microorganismos seleccionados

Cepas	Halo de inhibición (mm)							
	250 mg/ml		200 mg/ml		150 mg/ml		100 mg/ml	
<i>EPEC</i>	10	30	25	34	8	-	-	-
<i>S. typhimurium</i>	38	30	40	26	32	19	10	7
<i>Shigella sp</i>	30	34	26	26	24	20	-	-

<i>Botrytis Cinerea</i>	13	10	14	14	-	6	-	-
-------------------------	----	----	----	----	---	---	---	---

Obtenido de: (Autoría propia)

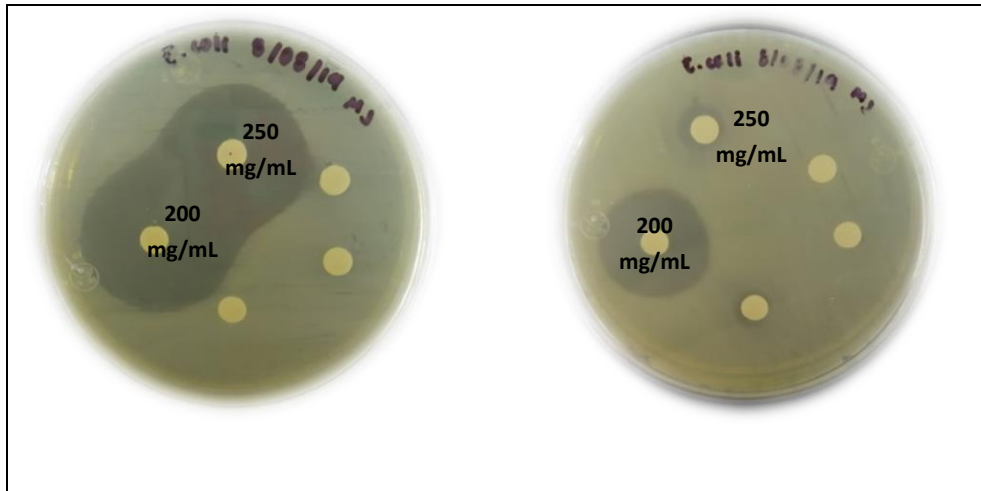


Figura 27. Sensibilidad a diferentes concentraciones del aceite esencial de corteza de canela para EPEC.

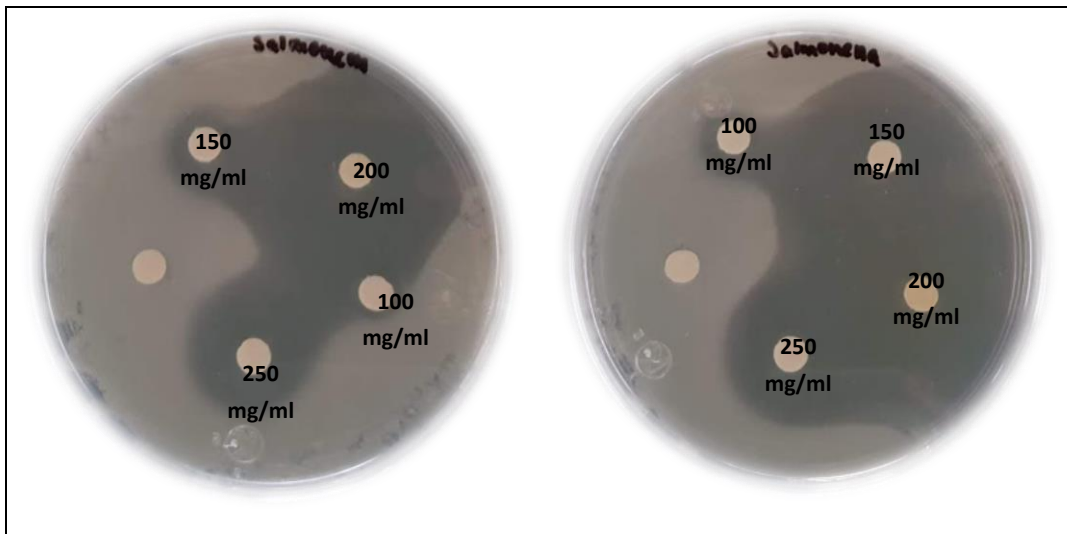


Figura 28 . Sensibilidad a diferentes concentraciones del aceite esencial de corteza de canela para *Salmonella typhimurium*. Obtenido de: (Autoría propia)

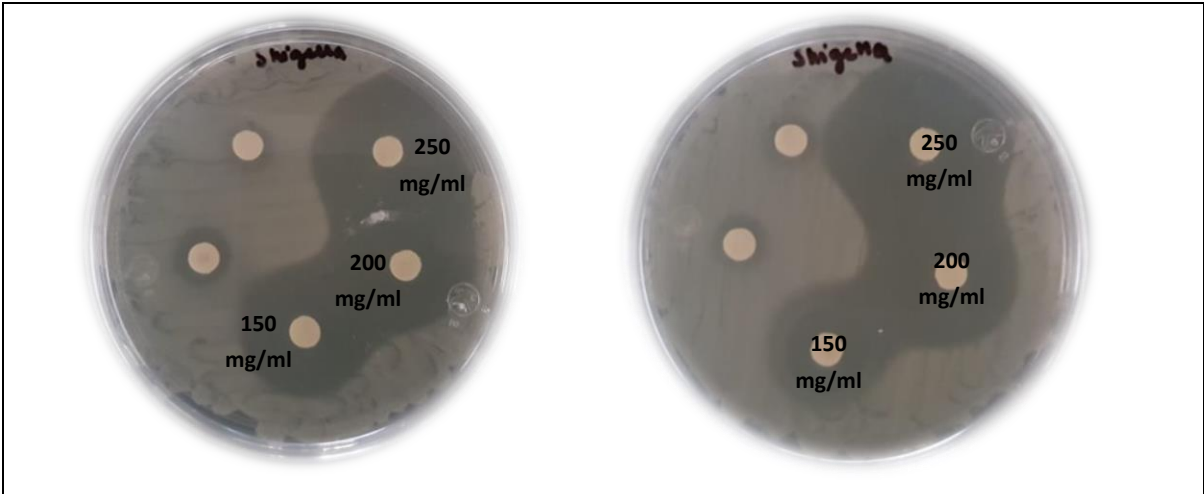


Figura 29. Sensibilidad a diferentes concentraciones del aceite esencial de corteza de canela para *Shigella* sp. Obtenido de: (Autoría propia).

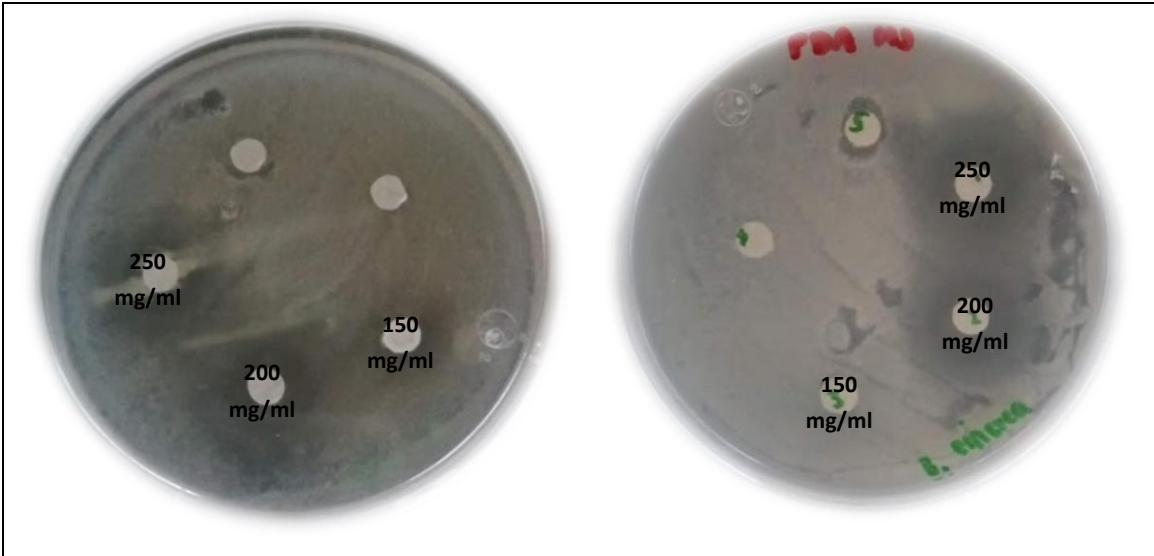


Figura 30. Sensibilidad a diferentes concentraciones del aceite esencial de corteza de canela para *Botrytis cinerea*. Obtenido de: (Autoría propia)

Las pruebas para determinar la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de corteza de canela, mostraron que EPEC y *S. tiphymurium* se vieron mayormente

afectadas a la concentración de 200 mg/mL mientras que *Shigella sp* a 250 mg/mL. Además, se pudo observar que la concentración mínima inhibitoria de *S. typhimurium* fue de 100 mg/mL siendo esta la que se vio afectada a concentraciones menores, mientras que para el caso de EPEC y *Shigella sp.* la concentración mínima inhibitoria fue de 150 mg/mL. *Botrytis cinerea* se observa inhibición hasta la concentración de 200 mg/mL para ambos casos sin embargo esta no es clara.

La efectividad del aceite a concentraciones menores se redujo en todos los casos como se puede observar en los halos de inhibición de las figuras 20, 21, 22 y 23.

Diferentes estudios han demostrado actividad a bajas concentraciones del aceite esencial de canela contra algunos microorganismos como los aquí estudiados. Kumara Swam, Sayeed Akhtar & Rani Sinniah en el 2016 observaron que el aceite esencial de canela, así como otros aceites, poseen una fuerte actividad antimicrobiana contra *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* mientras que algunos compuestos presentes en el aceite esencial de canela como el eugenol resultan efectivos contra patógenos como *E. coli* y *Salmonella typhimurium*, entre otros. Por su parte Adesiji, Alli, Shitu, & Adeolu observaron que el aceite presentaba mayor actividad en contra de *E. coli* que contra *Salmonella sp.* en las diferentes concentraciones analizadas, siendo 2.5% la mínima concentración capaz de inhibir a ambos microorganismos.

Contrariamente Montero Recalde y colaboradores en el 2017 observaron que específicamente *Salmonella typhimurium* mostro mayor sensibilidad al aceite que otras especies de *Salmonella*. Estos resultados podrían indicar la importancia de las diferencias entre los aceites esenciales de canela utilizados, así como características particulares de la cepa que se empleo para realizar los análisis. En general se observa que existe actividad inhibitoria por parte del aceite contra cepas de diferentes patógenos aunque las concentraciones y los efectos varían dependiendo de los materiales usados.

Por su parte Mohammed, Tafess y Dawit en el 2015 probaron diferentes aceites esenciales contra microorganismos como *Streptococci*, *Bacillus spp.*, *E.coli* y

Shigella spp. y al igual que con *Salmonella* el aceite esencial de canela mostró una efectividad superior a otros aceites para inhibir estos microorganismos solo siendo superado por el aceite esencial de tomillo. La concentración mínima para *Shigella spp.* y para *E.coli* fue de de 1.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y aunque la comparación directa con los resultados obtenidos en este estudio no resulta oportuna, se puede observar que al igual que en este caso ambos microorganismos comparten la concentración mínima inhibitoria.

El aceite esencial de corteza canela presentó actividad contra *Botrytis cinerea* en ambos casos hasta la concentración de 200 mg/mL sin embargo como se puede observar en la figura 23, la inhibición no se observa de manera clara en ninguno de los casos y difiere en la concentración de 150 mg/mL, este problema se presentó anteriormente para el mismo microorganismo. Wilson, Solar, Ghaouth y Wisniewski en el 1997 observaron que *Botrytis cinerea* presenta inhibición hasta la concentración de 1.56% del aceite esencial de canela por lo que existe una concentración mínima clara para la actividad antimicrobiana de este aceite. Como se mencionó anteriormente existen muchos factores que pudieran intervenir para la obtención de estos resultados, sin embargo errores al llevar a cabo el proceso no se pueden descartar. De igual manera el uso de otras técnicas para realizar la prueba pueden ser consideradas.

9.3 Biopelícula

9.3.1 FTIR

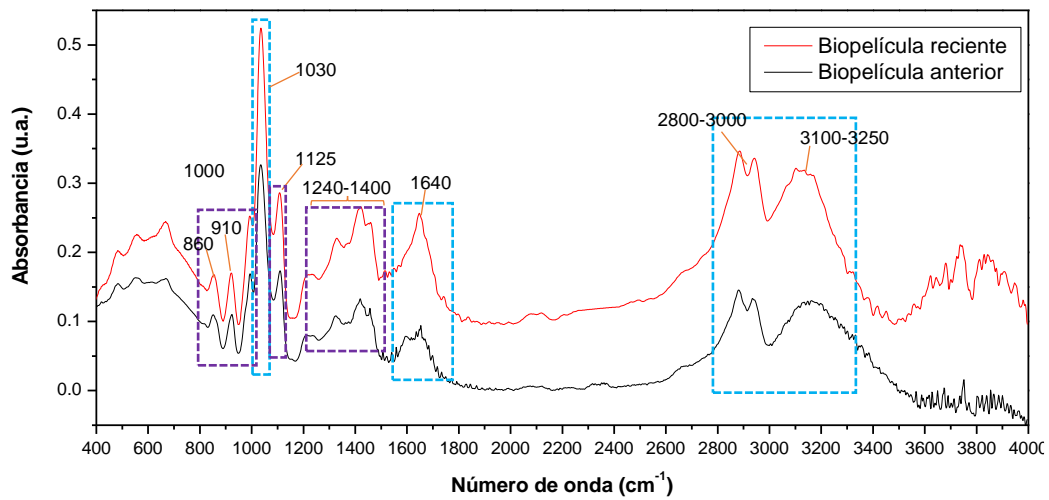


Figura 31. Espectros de FTIR de la comparación de dos biopelículas. En color rojo se muestra el espectro de la biopelícula generada con semilla de tamarindo secada a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 6 días. Mientras que en color negro se observa el espectro de la biopelícula producida con semilla de tamarindo secado a temperatura ambiente. El cuadro azul se señala lo que podrían ser señales asociadas a la biopelícula, en morado se señalan los picos asociados al glicerol. Obtenido de: (Autoría propia)

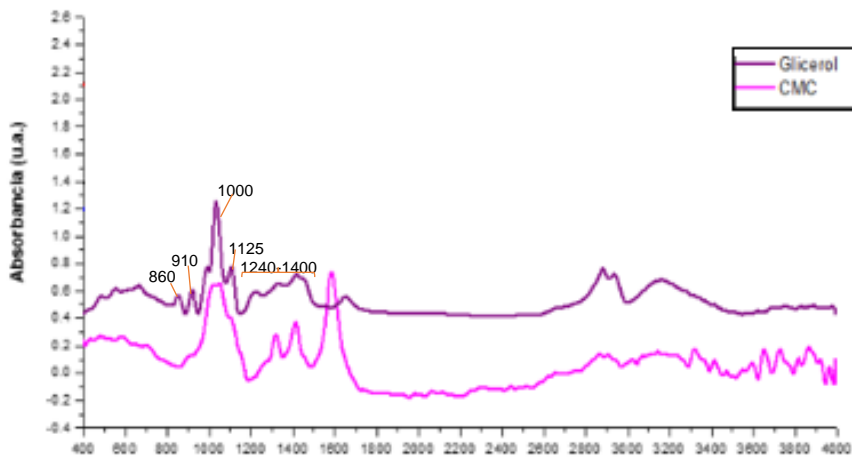


Figura 32. Espectros de FTIR de componentes de la biopelícula; glicerol y carboximetilcelulosa. Obtenido de: (Autoría propia)

Los espectros de las 2 biopelículas analizadas muestran señales similares a la de los espectros de sus componentes, principalmente existen muchas similitudes con el espectro del Glicerol.

La banda a 3100 cm^{-1} se puede observar también en el espectro de extracto de semilla de tamarindo y puede estar relacionada al estiramiento del grupo $=\text{C-H}$ que podría relacionarse a la fracción lipídica del extracto (Thygesen, Løkkey, Micklander, & Engelsen., 2003). La señal a 1640 cm^{-1} podría estar relacionada al estiramiento del grupo hidroxilo presente en muestras húmedas (Callejas, 2006). La señal entre $2800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ observada en 3 de los componentes de la biopelícula (ET, glicerol, CMC) esta relaciona al estiramiento del enlace C-H en alcanos (Dobado Jiménez, y colaboradores, 2002). Las bandas ubicadas entre $1200\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ son atribuidas a la deformación en el plano del enlace O-H presente en la estructura del glicerol. Las vibraciones en las bandas ubicadas a 1000 y 1125 cm^{-1} son atribuidas al estiramiento del grupo -OH presente tanto en el glicerol como en los espectros del aceite esencial de canela. La banda ubicada a 1030 aproximadamente es característica al estiramiento de los grupos C-O y C-C del anillo de xiloglucano que se presentó de manera muy intensa en los espectros (figura 4 y 5) del extracto de tamarindo (Alpizar, y colaboradores, 2017). Las bandas observadas en el espectro a 860 y 910 cm^{-1} aproximadamente son similares a las ubicadas en la misma zona en el espectro del glicerol, estas están asociadas al enlace C-C y C-O respectivamente (Lopez-Díaz, Ríos-Corripio, Ramírez-Corona, Lopez-Malo, & Palou, 2017).

9.3.2 Viscosidad

Se utilizo la fórmula $V = K(t - c)$ donde V es la Viscosidad cinemática en cSt ($1\text{ cSt} = 1\text{ mm}^2/\text{s}$), t es el tiempo en segundos y K es el coeficiente utilizado en función de la copa a usar. En la tabla 8 se encuentran los valores a sustituir dependiendo de la copa usada, siendo la 2 en este caso.

Tabla 19. Resultados de viscosidad cinemática de recubrimiento comestible hecho a base de extracto de semilla de tamarindo

	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Promedio	Desviación estandar
<i>Viscosidad cinemática (cSt)</i>	45 706	50 678	45 542	47 308	2919.080335

Cambio de muestra a lote en toda la tesis

De igual manera la comparación directa no pudo ser posible por la diferencia de unidades entre los resultados obtenidos en esta tesis y los resultados en otras investigaciones, sin embargo, es alta, los valores de los 3 lotes se encuentran en un rango entre los 45500 - 50700 cSt, como se indica para líquidos muy viscosos usando la copa Zahn el valor de la viscosidad se encuentra por arriba del rango 460-1860 cSt para cada lote analizado.

Las propiedades de barrera de las películas comestibles se dan en parte gracias al espesor del recubrimiento. Cisneros Z. & Krochta en el 2003 demostraron que la viscosidad tiene tanta importancia para determinar el espesor de la película como la concentración de sólidos, la densidad, la tensión superficial y la velocidad de secado en la aplicación por inmersión. De igual manera la viscosidad tiene influencia en la capacidad de los recubrimientos de formar una capa continua en la superficie del fruto en la etapa de aplicación, penetrando los poros del mismo. (Navarro Taragaza, 2007). Se ha observado que las películas superficiales se adhieren mejor conforme aumenta la viscosidad de las películas (Bósquez Molina, 2003).

9.3.3 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana

El recubrimiento comestible no mostró efectividad contra los microorganismos utilizados, a pesar de contar con aceite esencial de canela que si fue efectivo contra todos los microorganismos analizados. Esto se puede deber a que los aceites esenciales tienen a migrar hacia la superficie del fruto o pueden ser retenidos en la película. Esta migración puede suceder por muchos factores como; interacciones entre el aceite esencial y las cadenas de polímeros, cambios estructurales

producidos por el aceite, condiciones ambientales en las que se almacena el recubrimiento, etc. Para contrarrestar este efecto aumentar la concentración del aceite esencial en el recubrimiento podría ser una opción ya que se promueve una saturación en el sistema (Sosa, Palou, & Malo, 2016). Por otro lado debido a la situación generada por la pandemia no se pudieron realizar más análisis que comprobaran estos resultados por lo que se necesitaría más evidencia para llegar a una conclusión.

10. CONCLUSIONES

Se estandarizo el método de extracción más adecuado para obtener el extracto acuoso de la semilla de tamarindo el cual cuenta con características favorables para la formación de un recubrimiento comestible gracias a sus resultados en las pruebas fisicoquímicas, además se observó la posible presencia de los carbohidratos y proteínas importantes en la formación de la goma sin embargo no se observó actividad antimicrobiana por parte del extracto.

El aceite esencial de canela resulto tener propiedades antimicrobianas contra algunas bacterias de importancia alimentaria, además de ser una sustancia segura para su uso en alimentos según los análisis realizados para determinar la concentración de sustancias como cinamaldehído y eugenol, por otra parte, demostró tener una composición similar a otros aceites esenciales de canela según lo observado en el espectro IR.

El recubrimiento comestible demostró tener buenas propiedades para su uso en alimentos según los resultados obtenidos en las pruebas fisicoquímicas además algunas de las señales mostradas en el espectro FTIR se pueden asociar al extracto de tamarindo, así como a otros componentes del recubrimiento pudiendo relacionar los resultados positivos con la presencia de estos compuestos. Por otro lado, se requieren más análisis para probar si el aceite esencial tiene efecto a esas concentraciones además ya que si bien hay algunas señales del espectro que podría indicar su presencia los resultados de los antimicrobianos no fueron concluyentes.

11. ANEXOS

11.1 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de microorganismos (*EPEC*, *Shigella sp*, *S. typhimurium*, *Botrytis cinérea*) contra el recubrimiento comestible generado a partir del extracto acuoso de la semilla de tamarindo y del aceite esencial de canela.

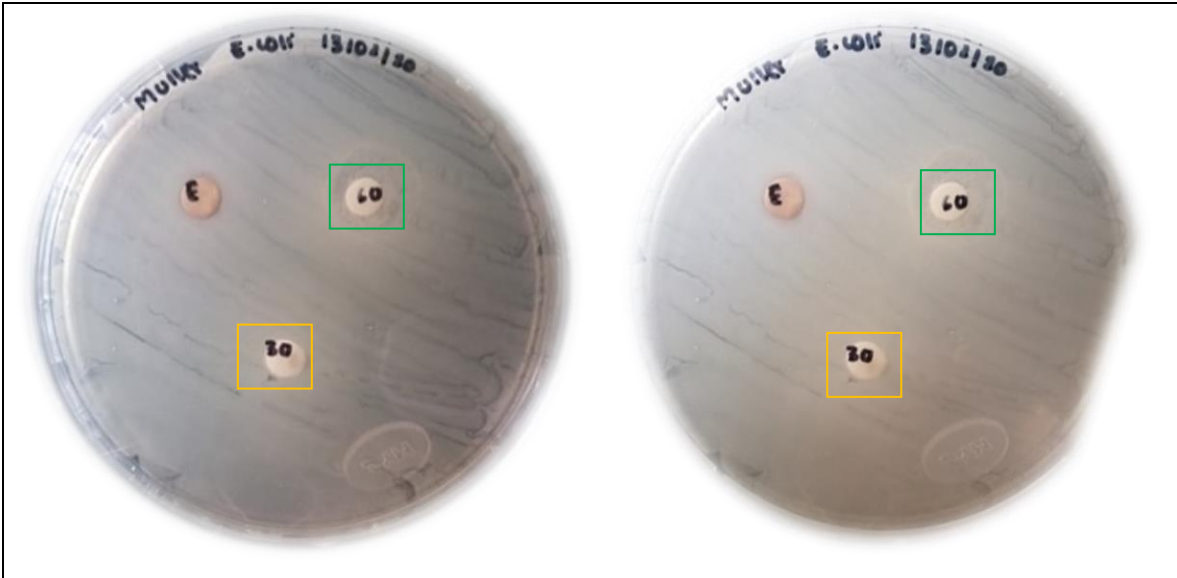


Figura 33. Cajas Petri sembradas con *E coli* con discos circulares impregnado de el recubrimiento comestible creado a base de semilla de tamarindo. Impregnados 2 diferentes cantidades de este (30 μ l y 60 μ l) estos se encuentran marcados con amarillo y verde. En la misma placa se analizó extracto de tamarindo.

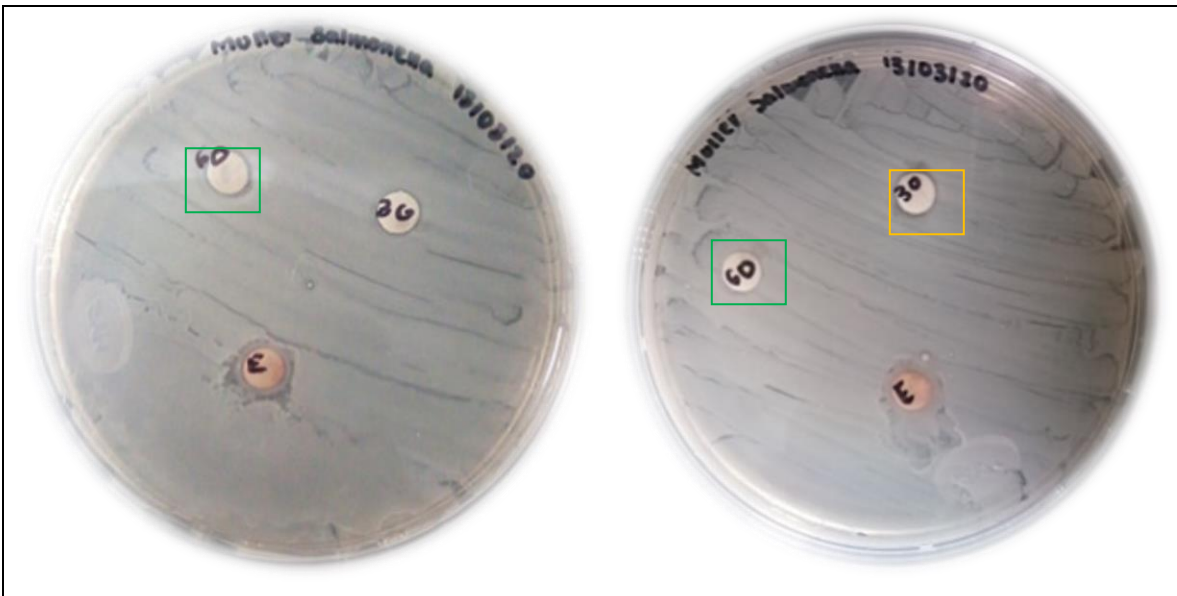


Figura 34. Cajas Petri sembradas con *Salmonella typhimurium* con discos circulares impregnado de el recubrimiento comestible creado a base de semilla de tamarindo. Impregnados 2 diferentes cantidades de este (30 μ l y 60 μ l) estos se encuentran marcados con amarillo y verde. En la misma placa se analizó el extracto de tamarindo

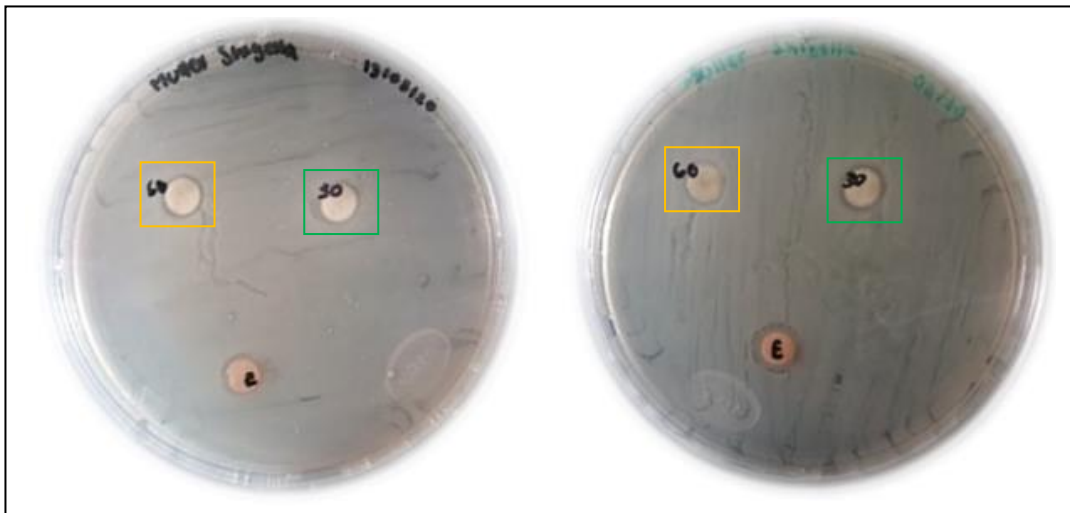


Figura 35. Cajas Petri sembradas con *Shigella sp.* con discos circulares impregnado de el recubrimiento comestible creado a base de semilla de tamarindo. Impregnados 2 diferentes cantidades de este (30 μ l y 60 μ l) estos se encuentran marcados con amarillo y verde. En la misma placa se analizo el extracto de tamarindo

12. BIBLIOGRAFIA

- Adesiji, Y. O., Alli, O. A., Shitu, A., & Adeolu, O. (2015). ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF CINNAMON AND CLOVE OIL ON DIFFERENT FOOD BORNE BACTERIAL ISOLATES. *Journal of pure and applied science*, 2610-2016.
- Alpizar R., E., Román G., A., Gallardo R., R., Varela G., V., Cruz O., J., & Pérez A., C. (2015). Rheological properties of tamarind (*Tamarindus indica* L.) seed. *Elsevier*, 8.
- Alpizar, R. E., Carrillo, N. H., Gallardo, R. R., Guerrero, V. V., Jose, A. R., & Perez, A. C. (2017). Functional properties and physicochemical characteristics of tamarind (*Tamarindus indica* L.) seed mucilage powder as a novel hydrocolloid. *Journal of Food Engineering*, 1-8.
- Amin N., O., Murad A., A.-H., Al-Nabulsi, A. A., Osaili, T. M., & Holley, R. A. (2019). Inhibitory effects of cinnamon and thyme essential oils against *Salmonella* spp. in hummus (chickpea dip). *Food procesing and preservation*, 1-10.
- Ashenhurst, J. (15 de June de 2020). *Reducing Sugars*. Obtenido de Master Organic Chemistry : <https://www.biologydiscussion.com/carbohydrates/test/qualitative-and-quantitative-tests-for-carbohydrates/13042>
- Bagul, M., & Sonawane, S. K. (2015). Tamarind seeds: chemistry, technology, applications and health benefits: A review. *Food Engineering and Technology Department, Institute of Chemical Technology*, Vol 34.
- Bing Duan, Y. (2018). Simultaneous Detection of Multiple Benzimidazole-Resistant β -Tubulin Variants of *Botrytis cinerea* using Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Plant Disease*.
- BL-BGD126, C. Z. (-). Instrumentos de medición industrial . *Twilight* , -.
- Bósquez Molina, E. (2003). *Elaboración de recubrimientos comestibles formulados con goma de mezquite y cera de candelilla para reducir la cinetica de deterioro en fresco del limon persa (Citrus latifolia Tanaka)*. Ciudad de Mexico: Universidad Autónoma Metropolitana.

- Callejas, F. R. (2006). *Tablas de Espectroscopía Infrarroja*. Obtenido de Facultad de química de la UNAM: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TablasIR_34338.pdf
- Casado Quesada, A. (2016). *PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS Y LIBERACIÓN DE CINAMALDEHÍDO EN FILMS DE PLA*. Valencia: Universidad Politecnica de Valencia .
- Chawanorasest, K. (2016). Extraction and Characterization of Tamarind (Tamarind indica L.) Seed Polysaccharides (TSP) from Three Different Sources. *MDPI*.
- Chawanorasest, K., Saengtongdee, P., & Kaemchantuek, P. (2016). Extraction and Characterization of Tamarind (Tamarind indica L.) Seed Polysaccharides (TSP) from three different sources. *molecules*.
- CHEM LAB. (31 de 10 de 2018). *Aldehído trans-cinámico p*. Belgium: CHEM LAB. Obtenido de <https://doc.chem-lab.be/MSDS?client=serviquimia&lang=SP&prodnr=CL002930>
- Choi, J.-i., Kim, J.-K., & Srinivasan, P. (2009). Comparison of gamma ray and electron beam irradiation on extraction yield, morphological and antioxidant properties of polysaccharides from tamarind seed. *elservier*.
- Cisneros Z., L., & Krochta, J. (2003). Dependence of Coating Thickness on Viscosity of Coating Solution Applied to Fruits and Vegetables by Dipping Method. *Journal of food science*, 503-510.
- De Ancos Begoña, G. P. (2015). USO DE PELÍCULAS/RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES EN LOS PRODUCTOS DE IV Y V GAMA. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 8-17.
- Dobado Jiménez, J. A., García Calvo-Flores, F., Portal Olea, D., Sánchez González, A., Isac García, J., Parra Sánchez, A., & Melchor Ferrer, S. (Agosto de 2002). *Recursos Educativos de Química Orgánica* . Obtenido de QUIORED: https://www.ugr.es/~quiorred/lab/tablas_espec/ir.htm
- Ezzahra, F. (2018). Impacto de la producción de berries sobre el comportamiento alimentario en una población de Jalisco, México. *Revista Mexicana de transtornos alimentarios*, 11-23.

- García, M. d., Baños, S. B., Necha, L. L., Molina, E. B., Tejacal, I. A., & Carrillo, M. E. (2010). Compuestos Antimicrobianos Adicionados en Recubrimientos Comestibles para Uso en Productos Hortofrutícolas. *Scielo*, Vol.28 no.1.
- Gonzales Palomar, S. (2009). Elaboración de licor de tamarindo (*Tamarindus indica* L.): análisis físico-químico, microbiológico y sensorial. *REVISTA ENLACE QUÍMICO, UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO* , Vol 2, No. 5.
- González Cabrera, M. V., Paredes Peralta, V., Erazo Rodríguez, F., & Sánchez Herrera, T. (2009). Evaluación “in vitro” de la Actividad Antifúngica del Aceite Esencial de Canela (*Cinnamomum zeynalicum*) Sobre *Botrytis* sp Aislado de Mora de Castilla (*Rubus glaucus*). *European Scientific Journal*, 15(12), 377.
- Han, J. H. (2014). Edible Films and Coatings: A review. En J. H. Han, *Innovations in food packaging* (pág. 624). Elsevier.
- Hudzicki, J. (8 de December de 2009). Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. *American society for microbiology*, págs. 1-23.
- Huerta Lorenzo, B. (2011). Los aceites esenciales: una alternativa a antibioticos. *Cunicultura* , 2-4.
- Huynh, N. K., Wilson, M. D., Eyles, A., & Stanley, R. A. (2019). Recent advances in postharvest technologies to extend the shelf life of blueberries (*Vaccinium* sp.), raspberries (*Rubus idaeus* L.) and blackberries (*Rubus* sp.). *Journal of Berry Research*, 687-707.
- Isidro, C. G. (2018). *Caracterización fisicoquímica de goma de semilla de tamridno y su funcionalidad como estabilizante en emulsiones*. Chapingo, Edo de México: Universidad Autónoma de Chapingo.
- Jeyaratnam, N., Nour, A. H., Kanthasamy, R., Nour, A. H., Yuvaraj, A., & J. O. (2016). Essential oil from *Cinnamomum cassia* bark through hydrodistillation and advanced microwave assisted hydrodistillation. *Industrial Crops and products* , 55-66.
- Khounvilay, K., & Sittikijyothin, W. (2012). Rheological behaviour of tamarind seed gum in aqueous solutions. *Food Hydrocolloids*, 334–338.
- Kumara Swam, M., Sayeed Akhtar, M., & Rani Sinniah, U. (2016). Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode

of Action: An Updated Review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 21 pages. doi:<https://doi.org/10.1155/2016/3012462>

Lima Santos Figueiredo, B. G., Teodosio M, A. E., Rocha A., R. H., Alves O., E., Forte de Oliveira, A. M., Santos D., E., . . . Lima Santos F., J. G. (2020). Application of tamarind seed starch as edible coating in the post-harvest quality of grapes 'Isabel' (*Vitis labrusca* × *Vitis vinifera* L.). *Australian Journal of Crop Science*, 953-958.

López H., L., Calderón O., M., Soriano S., J., Severiano P., P., Escalona B., H., & E., P. A. (2018). DEVELOPMENT AND ANTIOXIDANT STABILITY OF EDIBLE FILMS SUPPLEMENTED WITH A TAMARIND SEED EXTRACT. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 975-987.

Lopez-Díaz, A., Ríos-Corripio, M., Ramírez-Corona, N., Lopez-Malo, A., & Palou, E. (2017). Efecto de la radiación ultravioleta de onda corta sobre algunas propiedades de películas comestibles elaboradas con jugo de granada y quitosano . *Revista Mexicana de ingeniería química* , 63-73.

Luchsinger, L. (Noviembre de 2017). Impacto de la postcosecha en la calidad de frutas de exportación. *Redagrícola*.

Ma, J., Chen, Y., Wang, K., & Liu, S. (01 de December de 2015). Fingerprint analysis of essential oils by extraction with supercritical CO₂ and use of GC-MS, FT-IR and 1H-NMR: application to *Cinnamomum cassia*. *Zhejiang University*.

Martín, S. M. (2014). *Extracción y caracterización del aceite esencial de las semillas de Tamarindo (Tamarindus indica)*. Lambayeque: Universidad Señor de Sipán.

Miramont, S. (2012). *Recubrimientos elaborados a partir de biopolímeros para el soporte de sustancias con actividad antimicrobiana: carvacrol y sorbatos (tesis de maestría)*. Buenos aires: UTN, BA Escuela de Posgrados.

Miranda, L. S. (2013). Determinación de copuestos funcionales en canela (*Cinnamomum zeylanicum*). *Instituto Politécnico Nacional* .

Mohamad, M. Y., Akram, H. B., & Bero, D. N. (2012). Tamarind Seed Extract Enhances Epidermal Wound Healing. *International Journal of Biology* , 81-88.

- Mohammed, N., Tafess, K., & Dawit, A. (2015). Antimicrobial potential of the Ethiopian *Thymus schimperii* essential oil in comparison with others against certain fungal and bacterial species. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 260. doi:<https://doi.org/10.1186/s12906-015-0784-3>
- Montero Recalde, M., Revelo I., J., Avilés Esquivel, D., Valle V., E., & Guevara Freire, D. (2017). Efecto Antimicrobiano del Aceite Esencial de Canela (*Cinnamomum zeylanicum*) sobre Cepas de Salmonella. *Rev. Inv. Vet. Perú*, 987-993.
- Moreira, A. V., & Beltran, J. A. (2014). Algunas investigaciones recientes en recubrimientos comestibles aplicados sobre los alimentos. *UDLAP*.
- Moreno, J., & Clemente, A. (2008). 2S Albumin Storage Proteins: What Makes them Food Allergens? *The Open Biochemistry Journal*, 16-28.
- Navarro Taragaza, M. L. (2007). *Efecto de la composición de recubrimientos comestibles a base de hidroxipropilmetilcelulosa y cera de abeja en la calidad de ciruelas, naranjas y mandarinas*. Valencia: Universidad Politecnica de Valencia.
- Nieves, J. V. (2004). Reacciones coloreadas para la determinación cualitativa de azúcares. *Dep. de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Córdoba*.
- NORMAS, D. G. (23 de Mayo de 1978). NMX-F-317-S-1978. DETERMINACIÓN DE pH EN ALIMENTOS. DETERMINATION OF pH IN FOODS.
- NORMAS, N. M. (7 de Abril de 1961). NMX-F-066-S-1978. DETERMINACIÓN DE CENIZAS EN ALIMENTOS. FOODSTUFF DETERMINATION OF ASHES.
- NORMAS, N. M. (7 de Octubre de 1987). NMX-F-428-1982. ALIMENTOS. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD (MÉTODO RÁPIDO DE LA TERMOBALANZA). FOODS. DETERMINATION OF MOISTURE (THERMOBALANCE RAPID METHOD).
- Onias, E. A., Araújo, R. H., Queiroga, T. B., Teodosio, A. E., Onias, E. A., Ferreira, A. P., . . . Medeiros, M. L. (2019). Coating Guava Postharvest With the Use of Starch of Tamarind Seed and Pomegranate Seed Oil. *Journal of Agricultural Science*, Vol. 11.

- Osorio, F. A., Molina, P., Matiacevich, S., Enrione, J., & Skurtys, O. (2011). Characteristics of hydroxy propyl methyl cellulose (HPMC) based edible film developed for blueberry coatings. *Elsevier*, 287-293.
- Pattnaik, S., Kanta Padhan, D., & Kumar Jana, G. (2010). Evaluation of cinnamon oil, peppermint oil, cardamom oil & orange oil as antimicrobial agent. *Journal of Pharmacy Research*, Vol. 3.
- Perez, S. G., & Arellano, J. B. (2009). Vegetable protein isolates. En E. b. Williams, *Handbook of hydrocolloids* (págs. 383-419). Salamanca: Woodhead Publishing in Food Science.
- Prospero, D. P., Chico, B., Villalonga, R., Mariniello, L., Damiano, A. E., Masi, P., & Porta, R. (2006). Chitosan-Whey Protein Edible Films Produced in the Absence or Presence of Transglutaminase: Analysis of Their Mechanical and Barrier Properties. *Biomacromolecules* , 744-749.
- Quesada, A. C. (2016). Propiedades antimicrobianas y liberación de cinamaldehído en films de PLA. *Universidad politécnica de Valencia* .
- Rad, B. (-). Bradford method (Bio Rad protein assay). *Bio Rad*, 1-27.
- Rawdkuen, S. (2019). Edible Films Incorporated with Active Compounds: Their Properties and Application. En E. b. Var, *Active Antimicrobial Food Packaging*. Thailand : IntechOpen.
- Samadi, & Yu, P. (2011). Dry and moist heating-induced changes in protein molecular structure, protein subfraction, and nutrient profiles in soybeans. *American Dairy Association* , 6092-6102.
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (05 de Enero de 2019). El tamarindo en México. *El tamarindo es una leguminosa originaria de África que generalmente se usa con fines gastronómicos*.
- Shao, H., Zhang, H., Tian, Y., Song, Z., Lai, P. F., & Ai, L. (2019). Composition and Rheological Properties of Polysaccharide Extracted from Tamarind (Tamarindus indica L.) Seed. *molecules*.
- Silva, W. R. (1998). Seed performance after exposure to high temperatures. *SciELO*, Vol. 55.

- Sosa, R. A., Palou, E., & Malo, A. L. (2016). Essential Oils Added to Edible Films. En V. R Predy, *Essential oils in food preservation, Flavor and Safety* (págs. 149-154). Puebla: Academic Press.
- Terrones Salgado, J., Angel, D. N., Díaz, C. N., & Ortiz, D. T. (2019). Botrytis cinerea causing gray mold in blackberry fruit in Mexico. *Revista Mexicana de FITOPATOLOGÍA Mexican Journal of Phytopathology*, 365-382.
- Thomas, J. (2012). Handbook of herbs and spices, Cinnamon . *Woodhead*, 182-196.
- Thygesen, L. G., Løkkey, M. M., Micklander, E., & Engelsen., S. B. (2003). Vibrational microspectroscopy of food. Raman vs FT-IR. *Trends in Food Science & Technology*, 50-57.
- Trejo, B. R., Prada, H. Z., Trejo, L. R., & Sánchez Arroyo, H. (2020). Estudio de extractos bioactivos contra el mosquito del dengue (Aedes aegypti) procedentes de semillas de Annona purpurea por Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno. En E. A. Mandujano, C. A. Calderón, & J. R. Quiroz, *Mesa 4* (págs. 39-55). Estado de México: Universidad Autónoma de Chapingo.
- Tripathi, A. K., & Mishra, S. (2016). Chapter 16 - Plant Monoterpenoids (Prospective Pesticides). En E. Okmar, *Ecofriendly Pest Management for Food Security* (págs. 507-524). Lucknow, India: Academic Press.
- Trugo, L. C., Donangelo, C. M., Trugo, N. M., & Knudsen, K. E. (2000). Effect of Heat Treatment on Nutritional Quality of Germinated Legume Seeds. *American Chemical Society*, 2082-2086.
- Utchariyakiat, I., Surassmo, S., Jaturanpinyo, M., Khuntayaporn, P., & Chomnawang, M. T. (2016). Efficacy of cinnamon bark oil and cinnamaldehyde on anti-multidrug resistant Pseudomonas aeruginosa and the synergistic effects in combination with other antimicrobial agents. *BMC complementary and alternative medicine*, 16:158.
- Viñas, I. (10 de Marzo de 2020). *Control de patógenos de transmisión alimentaria en fresas congeladas y listas para el consumo*. Obtenido de ISUU: https://issuu.com/horticulturaposcosecha/docs/control_de_pat_genos_de_trasmisi_n_alimentaria_en

- Viveros G., J. C., Figueroa R., K. A., Gallardo L., F., García P., E., Ruiz R., O., & Hernandez R., F. (2012). Sistemas de manejo y comercialización de tamarindo (*Tamarindus indica* L.) en tres municipios de Veracruz*. *Scielo*, Vol. 3.
- Wexler, P. (2014). Eugenol . En R. Sellamuthu, *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)* (págs. 539-541). Indianapolis: Reference Module in Biomedical Science.
- Wilson, C. L., Solar, J. M., Ghaouth, A. E., & Wisniewski, M. E. (1997). Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Plant Disease*, 204-210.
- Zhang, A. I., Zhao, T., Wang, J., Xia, Y., ZiboSong, & Ai, L. (2020). An amendment to the fine structure of galactoxyloglucan from Tamarind (*Tamarindus indica* L.) seed. *Elsevier*, 1189-1197.
- Zuñiga, I. C., & J., C. L. (2017). Enfermedades transmitidas por los alimentos: una mirada puntual para el personal de salud. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 95-104.