

HUMANIDADES, CIENCIA, TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN EN PUEBLA

ACADEMIA JOURNALS



OPUS PRO SCIENTIA ET STUDIUM

ISSN 2644-0903 online

VOL. 2, NO. 1, 2020

WWW.ACADEMIAJOURNALS.COM

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN AUSPICIADO POR EL CONVENIO CONCYTEP-ACADEMIA JOURNALS



IARUBITZEL MENDIETA MORALES

INCREMENTO DE LA VIDA MEDIA DE FRESAS FRESCAS POR LA APLICACIÓN DE UNA
BIOPELÍCULA COMESTIBLE ELABORADA A BASE DEL EXTRACTO DE LA SEMILLA DE TAMARINDO
(TAMARINDUS INDICA L.): PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

PRESIDENTE: DRA. ELSA IRACENA CASTAÑEDA ROLDAN

SECRETARIO: DRA. FABIOLA AVELINO FLORES

VOCAL: M. C. ANA LILIA SORIANO MORALES

NÚMERO DE SECUENCIA 2-47



**“INCREMENTO DE LA VIDA MEDIA DE FRESAS
FRESCAS POR LA APLICACIÓN DE UNA BIOPELÍCULA
COMESTIBLE ELABORADA A BASE DEL EXTRACTO
DE LA SEMILLA DE TAMARINDO (*Tamarindus indica*
L.): PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS”**

COMITÉ SUPERVISOR:

PRESIDENTE: DRA. ELSA IRACENA CASTAÑEDA
ROLDAN

SECRETARIO: DRA. FABIOLA AVELINO FLORES

VOCAL: M. C. ANA LILIA SORIANO MORALES

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

FECHA DE APROBACIÓN: 09 DE DICIEMBRE DE 2019

**LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA
IARUBITZEL MENDIETA MORALES**

“INCREMENTO DE LA VIDA MEDIA DE FRESAS FRESCAS POR LA APLICACIÓN DE UNA BIOPELÍCULA COMESTIBLE ELABORADA A BASE DEL EXTRACTO DE LA SEMILLA DE TAMARINDO (*Tamarindus indica* L.): PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS”

IARUBITZEL MENDIETA MORALES

RESUMEN

La fresa es un cultivo importante en la economía de México, pero sufre deterioro rápidamente, por lo que se han buscado alternativas para aumentar su vida media. El objetivo general de este proyecto fue aplicar y analizar microbiológicamente una biopelícula comestible a base del extracto acuoso de semillas de tamarindo (*Tamarindus indica*) para prolongar la vida media de la fresa fresca.

Se obtuvo el extracto acuoso de semilla de tamarindo y se le realizaron las pruebas de determinación de ácido cianhídrico con un valor de 0.0432 mg de HCN, humedad de 86.93 %, actividad de agua de 0.963, sólidos solubles de 3.25 °Bx y pH de 5.47

Se obtuvo una formulación de una biopelícula compuesta por extracto acuoso de semilla de tamarindo, glicerol, carboximetilcelulosa, agua y aceite esencial de menta (*Mentha piperita*), este último con el fin de aprovechar su actividad antimicrobiana.

La actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Mentha piperita* se evaluó contra las bacterias *E. coli*, *Shigella* sp., *Salmonella montevideo* y el hongo *Botrytis cinerea*, presentándose esta actividad en todas las bacterias y principalmente en el hongo.

La formulación de la biopelícula se aplicó en fresas frescas, las cuales se analizaron microbiológicamente (bacterias mesófilas aerobias, coliformes fecales, mohos y levaduras, coliformes totales y *Salmonella*) junto con un control de fresas sin biopelícula, durante su almacenamiento; obteniendo recuentos menores para las fresas con biopelícula en comparación con las fresas control, en el caso de *Salmonella*, y coliformes fecales los resultados fueron negativos. La aplicación de la biopelícula incrementó la vida media de las fresas al doble en comparación con el control.

ÍNDICE

1. ANTECEDENTES GENERALES.....	1
2.1. Fresa: Características generales.	1
2.2 Importancia económica de la producción de fresa en México.....	2
2.3 Deterioro de la fresa.....	3
2.4 Película comestible	4
2.5 Películas y recubrimientos comestibles con efecto antimicrobiano.....	6
2.6 <i>Tamarindus indica</i>	8
2.7 <i>Mentha piperita</i>	8
3. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	10
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
5. JUSTIFICACIÓN	12
6. HIPÓTESIS	13
7. OBJETIVOS	13
7.1 OBJETIVO GENERAL	13
7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
8. MATERIALES Y MÉTODOS	14
8.1 MATERIALES.....	14
8.2 MÉTODOS	14
8.2.1 Pruebas de caracterización para el extracto acuoso de semilla de tamarindo.....	16
8.2.1.1 Determinación de la presencia de ácido cianhídrico en el extracto acuoso de semilla de tamarindo.	16
Se obtuvo el extracto acuoso de la semilla de tamarindo el mismo día de la realización de las pruebas siguientes:	16
8.2.1.2 Determinación de humedad.....	17
8.2.1.3 Determinación de actividad de agua.....	17
8.2.1.4 Determinación de sólidos solubles.....	17

8.2.1.5 Determinación de pH.	18
8.2.2 Caracterización del extracto acuoso de semilla de tamarindo, y de la biopelícula por Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier.	18
8.2.3 Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en disco por el método de Kirby-Bauer	18
8.2.4 Elaboración y aplicación de la biopelícula.....	19
8.2.4.1 Elaboración de la biopelícula.	19
8.2.4.2 Aplicación de la biopelícula.....	19
8.2.5 Pruebas microbiológicas	20
8.2.5.1 Preparación de la muestra.....	20
8.2.5.2 Determinación de bacterias mesófilas aerobias según la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-092-SSA1-1994.	20
8.2.5.3 Determinación de coliformes fecales, según la NORMA Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos. Apéndice H Normativo.	21
8.2.5.4 Determinación de mohos y levaduras según la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-111-SSA1-1994.	21
8.2.5.5 Determinación de bacterias coliformes totales según la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-113-SSA1-1994	21
8.2.5.6 Determinación de <i>Salmonella</i> según la NORMA Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, Productos y Servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos.....	22
8.2.6 Análisis estadístico.....	22
9. RESULTADOS	24
9.1 Determinación de la presencia de Ácido cianhídrico en el extracto acuoso de semilla de tamarindo.	24
9.2 Análisis fisicoquímicos del extracto acuoso de semilla de Tamarindo	24
9.3 Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) del extracto acuoso obtenido de la semilla de tamarindo	25
9.4 Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) de la biopelícula.....	26
9.5 Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en disco por el método de Kirby-Bauer	27
9.6 Calidad microbiológica de las fresas usando la norma oficial mexicana NOM-093-SSA1-1994	31

9.7 Cuantificación de los organismos coliformes fecales	33
9.8 Otros microorganismos indicadores de calidad microbiológicos utilizados: Mohos y Levaduras, Coliformes totales y <i>Salmonella spp.</i>	33
9.9 Análisis estadístico de resultados	37
10. DISCUSIÓN	38
11. CONCLUSIONES.....	43
12. PERSPECTIVAS.....	44
13. BIBLIOGRAFÍA	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Metodología general.....	15
Figura 2. Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier de mucilago de tamarindo secado por pulverización. (Alpizar et al., 2017).....	26
Figura 3. Espectro de absorción FTIR/ATR del extracto acuoso obtenido de la semilla de tamarindo.....	26
Figura 4. Espectro de absorción FTIR/ATR obtenido de la biopelícula.....	27
Figura 5. Diámetro de halos de inhibición con el aceite esencial de <i>Mentha piperita</i> sin diluir (disco 0 y disco 1) y agua estéril (disco 2 y disco 3) contra <i>Botrytis cinerea</i>	28
Figura 6. Biopelícula, formulación MIFAC.	30
Figura 7. Fresa con biopelícula (lado izquierdo), y fresa control (lado derecho).	30
Figura 8. Fresas con biopelícula (lado izquierdo), y fresas control (lado derecho) en el día 1.	31
Figura 9. Comportamiento de las BMA en las fresas control y fresas con biopelícula comestible aplicada, se observó una diferencia significativa a un valor de “p” < 0.001, usando la prueba de t-student.....	32
Figura 10. Crecimiento de BMA para las muestras de fresas con biopelícula (izquierda), control (derecha).	33
Figura 11. Comportamiento de los Mohos y levaduras en las fresas control y fresas con biopelícula comestible aplicada. Se observó diferencia significativa a un valor de “p” < 0.001, usando la prueba de t-student.....	34
Figura 12. Fresas control (lado izquierdo) y fresas con biopelícula (lado derecho), para el día 8 de almacenamiento.....	35
Figura 13. Comportamiento de los coliformes totales en las fresas control y fresas con biopelícula comestible aplicada. Se observó una diferencia significativa a un valor de “p” < 0.001, usando la prueba de t-student.....	36
Figura 14. Crecimiento de coliformes totales para las muestras de fresas con biopelícula (izquierda), control (derecha).	36

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Determinación de ácido cianhídrico en la muestra de extracto acuoso de semilla de tamarindo.	24
Tabla 2. Análisis fisicoquímico del extracto acuoso de semilla de tamarindo.....	25
Tabla 3. Diámetro de halos de inhibición con el aceite esencial de <i>Mentha piperita</i> sin diluir y a diferentes diluciones.	28
Tabla 4. Composición de las formulaciones para la elaboración de biopelículas comestibles.....	29
Tabla 5. Matriz de correlación fresas control, fresas con biopelícula.....	37

1. ANTECEDENTES GENERALES

La alimentación es un bien necesario para el ser humano, indispensable para subsistir, sin embargo, la mayoría de alimentos naturales tienen una vida media corta debido al deterioro natural que sufren, en el caso de las frutas todas son susceptibles de ser alteradas con respecto al tiempo, debido a su manejo, a la acción del clima y de microorganismos que las afectan, así como a reacciones enzimáticas propias, lo cual es una constante preocupación para productores, comerciantes y consumidores.

2.1. Fresa: Características generales.

La fresa cuyo nombre científico es *Fragaria vesca*, *F. viridis* o *F. moschata*, se define como una planta de la familia de las rosáceas, con tallos rastreros, nudosos y con estolones, hojas pecioladas, vellosas, blanquecinas por el envés, divididas en tres segmentos ovalados y con dientes gruesos en el margen; flores pedunculadas, blancas o amarillentas, fruto casi redondo, algo apuntado, de un centímetro de largo, rojo, succulento y fragante.

Los orígenes de la fresa no están bien definidos: algunas fuentes la consideran de origen Europeo, particularmente en la zona alpínica, mientras que otros la consideran de origen chileno, de donde un oficial francés, a principios del setecientos, importó a Europa las plantas madre utilizadas como base para la constitución del híbrido *Fragaria x ananassa*, al cual pertenecen todas las variedades de fresas difundidas actualmente. Históricamente la fresa ya estaba presente sobre las mesas de la antigua Roma: Éste fruto se consumía en las fiestas en honor de Adonis, a la muerte del cuál, como cuenta la leyenda, Venus lloró copiosas lágrimas, que llegadas a la tierra se transformaron en pequeños corazones rojos: las perfumadas fresas (Zipmec, 2013).

2.2 Importancia económica de la producción de fresa en México.

En un principio la producción se concretaba a cubrir las necesidades del mercado nacional. Fue hasta 1950 cuando su importancia fue en aumento, debido a la creciente demanda por parte de los Estados Unidos que veía mermada su producción en la temporada invernal.

Fue así como se presentó la oportunidad de exportar, por lo que el cultivo de fresa se extendió a once estados del país, y la instalación de congeladoras y empacadoras creció rápidamente en las diversas regiones freseras. Para finales de los años ochenta, se introdujeron al país mejores variedades de fresa, que son las que actualmente se cultivan y comercializan tanto en el mercado nacional como en el internacional, estas son la Festival, Sweet Charlie, Galexia, Camino Real, Albión, Camarosa, Aromas, Ventana y Diamante, variedades que han demostrado su eficiencia en los plantíos (México PRODUCE 2016).

Las fresas cultivadas en México cumplen con los más altos y rigurosos estándares de calidad y se caracterizan por su buen tamaño, color rojo profundo, delicioso aroma y especialmente por su sabor.

La fresa mexicana aporta el 5.2 por ciento de la producción mundial. En 2011, se cosecharon 229 mil toneladas, sembradas en 7 mil hectáreas, con estas cifras México se ubica como el sexto productor mundial de fresa. Michoacán, Baja California y Guanajuato son los estados que concentran la mayor parte de la producción. El periodo de cosecha de la fresa en México, varía de una entidad a otra, así tenemos que el estado de Baja California y Guanajuato, levantan su cosecha a partir del mes de enero, Guanajuato concluye en julio y Baja California en agosto. Michoacán y el Estado de México cosechan entre los meses de noviembre a junio. Sin embargo, con el uso de nuevas tecnologías es posible cosechar fresas prácticamente todo el año (México PRODUCE, 2016).

Algunas regiones productoras de fresa se han especializado en el mercado, ya sea nacional o internacional, dependiendo de la tecnología e infraestructura con que cuentan. Por ejemplo, en las regiones productoras del Valle de Zamora y de Baja

California, la mayor parte de su producción está destinada a la exportación, mientras que la región de Irapuato y parte de Michoacán vende casi toda su producción en el mercado interno. Al respecto, se estima que cada habitante consume 610 gramos de fresa al año (México PRODUCE, 2016).

Actualmente el 52.21 % de la producción nacional se destina al mercado externo, por lo que la fresa es un producto exitoso en el comercio internacional. México es el tercer proveedor de fresa fresca en el mercado internacional, con 14.83 % del valor de las exportaciones mundiales. En particular las exportaciones mexicanas representaron 87.79 % de las importaciones de Estados Unidos (Planeación Agrícola Nacional 2017-2030 SAGARPA).

2.3 Deterioro de la fresa.

La fresa se deteriora rápidamente, lo que genera pérdidas del fruto cosechado, daños producidos principalmente por incidencias de enfermedades causadas por hongos de diversos géneros, las que se traducen en pérdidas económicas. De acuerdo a la SAGARPA dura de 2 a 3 días después de haber sido cosechada. La fresa muestra una baja eficiencia de poscosecha y debe ser utilizada, consumida o procesada casi inmediatamente de que ha sido recolectada. Es así que bajo patrones muy buenos de almacenamiento difícilmente se logra mantenerse en buenas condiciones durante 5 días. El manejo (manipulación, empaque, transporte, y almacenamiento) del fruto desde la cosecha debe ser muy cuidadoso ya que durante la etapa de comercialización se pueden producir algunos daños importantes, entre ellos la reducción de la firmeza, daño mecánico, pudriciones y fermentaciones. Una de las enfermedades que ataca a la fresa es la pudrición del fruto, la cual es producida por el hongo *Botrytis cinerea*, el cual aumenta su incidencia con condiciones de humedad relativa alta. Las infecciones pueden causar pudrición en flores. Al inicio la lesión aparece de color café tornándose gris por la esporulación; millones de esporas se producen en una sola fruta y pueden ser arrastradas por el viento, las herramientas, el ser humano y el mismo material vegetal (Ávila, 2015).

Lo que ha forzado a los productores a buscar soluciones a este problema, siendo la primera solución la utilización de atmósferas modificadas, el uso de empaques como bolsas de polietileno de las cuales Ávila y González (2012) concluyen que es recomendable su utilización como empaque de conservación de las características de las fresas almacenada a 20 °C, y que este empaque representa una alternativa eficiente pues genera beneficios en costos en comparación a otros empaques comerciales; lo cual coincide con el estudio realizado por Campo *et al.*, (2016). También se ha utilizado actividad biocontroladora como es el uso de *Trichoderma harzianum* y *T. lignorum* en el control de *Botrytis* (Merchán *et al.*, 2014), algunos intentos de solucionar estos problemas han sido el empleo de ondas de ultrasonido y radiación, con las cuales se ha observado de manera general una reducción significativa de la carga microbiana inicial presente, evidenciando que el tratamiento empleando ondas de ultrasonido promueve una mayor eliminación de bacterias, principalmente coliformes (Duarte *et al.*, 2016), otra alternativa es la aplicación de películas y recubrimientos comestibles.

2.4 Película comestible

La aplicación de películas o recubrimientos comestibles (biopelículas) es una tecnología que está ganando importancia para prolongar la conservación de la calidad en fresco de frutas y hortalizas.

Una película comestible es una matriz preformada delgada que posteriormente será utilizada en forma de recubrimiento del alimento o estará ubicada entre los componentes del mismo (Quintero *et al.*, 2010).

Las biopelículas se han propuesto como una estrategia para proteger la superficie de los alimentos y ofrecer productos “casi frescos” o mínimamente transformados, las superficies de los frutos y hortalizas son las que tienen la mayor carga microbiana en la mayoría de los alimentos, están expuestas al medio ambiente y, por tanto, son las más susceptibles a cambios significativos, que luego, invaden el interior del alimento. Es de destacar que tanto el uso de recubrimientos comestibles como películas comestibles, puede agregar al alimento original, ingredientes que

mejoran su funcionalidad y calidad nutricional, así como su aroma, sabor, textura, entre otros atributos (Barbosa, 2012).

En los últimos años se ha producido un intenso trabajo en el desarrollo de recubrimientos comestibles para extender la vida útil de frutas y verduras. La habilidad de los recubrimientos de crear una atmósfera modificada en el fruto permite reducir la pérdida de peso y la respiración, así como la posibilidad de incorporar aditivos como antioxidantes, agentes antimicrobianos y compuestos bioactivos, lo que hace de esta tecnología un instrumento de interés para la industria alimentaria. Sin embargo, la naturaleza de las frutas y verduras, como tejidos vivos, en muchas ocasiones hace difícil poder predecir el comportamiento de los distintos recubrimientos en la calidad del producto recubierto. La efectividad de los distintos recubrimientos dependerá del tipo de fruto, del estado fisiológico del fruto, de la composición del recubrimiento y de las condiciones de almacenamiento (Olivas y Pérez, 2012).

Los materiales formadores de películas comestibles son principalmente proteínas, lípidos, tanto de origen animal como vegetal, y polisacáridos, de origen vegetal (Chiralt *et al.*, 2012).

Polisacáridos

Los polisacáridos derivados de celulosa (metilcelulosa MC, hidroximetilcelulosa HMC, hidroxipropil metilcelulosa HPMC y carboximetilcelulosa CMC), pectinas, derivados de almidón, alginatos, carragenina, quitosano y gomas, son capaces de constituir una matriz estructural, permitiendo obtener recubrimientos comestibles, transparentes y homogéneos, sin embargo están limitados por su solubilidad en agua y poca barrera a la humedad y propiedades mecánicas moderadas.

Lípidos

Los lípidos ofrecen una buena barrera a la humedad debido a su naturaleza hidrofóbica, lo que reduce la pérdida de agua en frutas recubiertas, además, mejoran el brillo de los frutos, y los protegen contra la oxidación.

Proteínas

Las proteínas forman recubrimientos con barreras más débiles que los polisacáridos al vapor de agua por su naturaleza hidrofílica, pero por otro lado, desarrollan muy buenas propiedades de barrera al oxígeno, lo que ayuda a controlar el intercambio de gases entre el fruto y el medio ambiente, así como propiedades mecánicas que son muy favorables para recubrir alimentos (Vázquez *et al.*, 2013).

Existen estudios en los cuales se han realizado películas comestibles a base de proteína utilizando subproductos industriales como el suero de leche, uno de ellos es el desarrollado por Galletta *et al.*, 2004, quienes estudiaron la vida útil, poscosecha de tomate (*Lycopersicon esculentum* L. Var. Coloso) aplicando una película comestible de proteína de suero de leche y monoestearato de glicerilo acetilado, comparando con frutos sin recubrir, obteniendo mejores resultados para los tomates recubiertos, ya que durante las cuatro semanas de almacenamiento, los tomates recubiertos exhibieron menor pérdida de peso, menor desarrollo de color rojo y menor pérdida de firmeza en comparación con los no recubiertos.

2.5 Películas y recubrimientos comestibles con efecto antimicrobiano

Las biopelículas pueden servir como vehículos para un amplio rango de aditivos, incluyendo compuestos antimicrobianos, con la finalidad de controlar el desarrollo microbiano característico. Entre los aditivos naturales están los aceites esenciales. Se tiene amplia evidencia que los aceites esenciales extraídos de diferentes plantas presentan inhibición contra hongos y bacterias (Ramos *et al.*, 2010), Khalifa *et al.*, (2016) realizaron un estudio incorporando extracto de aceite de oliva en películas de quitosano, para mejorar la estabilidad en el almacenamiento de manzana y fresa, demostrando que la incorporación de este aceite incrementa la actividad antifúngica contra *P. expansum* y *R. stolonifer*.

Existen estudios recientes como el realizado por Ruiz (2018) quien desarrolló un recubrimiento combinado de quitosano y aceites esenciales de *C. aurantifolia* “limón sutil” y *O. vulgare* “Orégano” como tratamiento poscosecha contra infecciones causadas por *B. cinerea*, en *L. esculentum* “tomate” obteniendo resultados favorables ya que se inhibió el crecimiento micelial.

Castillo *et al.*, (2018) desarrollaron un recubrimiento comestible a base de almidón, con aceite esencial de orégano y proteína aislada, aplicado en papayas, el cual también mostró buenos resultados retrasando el crecimiento del hongo *Fusarium solani*, además de retardar el desarrollo del color amarillo y rojo en las papayas frente al control.

Uribe (2019) realizó una cobertura comestible a base de *Aloe vera*, gelatina adicionada con aceite esencial de canela, aplicada en arándanos, con la cual se evidenció la acción antifúngica de este antimicrobiano natural en los arándanos con cobertura.

Dantas *et al.*, (2015) evaluaron la eficacia de los recubrimientos compuestos por quitosano, aceite esencial de *Mentha piperita L.* y *Mentha villosa Huds* aplicados en tomate cherry, sus resultados mostraron que la aplicación combinada de los aceites esenciales exhibió fuertes efectos antifúngicos contra *A. niger*, *B. cinerea*, *P. expansum* y *R. stolonifer*, con base en el crecimiento micelial radial y la inhibición de la germinación de esporas y en el 2016 realizaron otro estudio aplicando el mismo recubrimiento pero en uvas Isabella (*Vitis labrusca L.*) demostrando que los recubrimientos retrasan el crecimiento de moho y reducen la incidencia de infecciones causadas por los hongos *A. niger*, *B. cinerea*, *P. expansum* y *R. stolonifer* en estas uvas durante el almacenamiento a temperatura ambiente y a bajas temperaturas.

Tomando en cuenta la importancia de la utilización de los subproductos industriales como una fuente de recubrimientos comestibles, en el presente proyecto se decidió trabajar con un extracto acuoso de la semilla de tamarindo (*Tamarindus indica*) y utilizar un extracto de *Mentha piperita* para elaborar una biopelícula comestible y aplicarla sobre fresas frescas.

2.6 *Tamarindus indica*

El tamarindo es un árbol tropical perteneciente a la familia de las leguminosas. Es originario del continente africano y fue introducido al continente americano por los españoles. Es un frutal altamente rústico, ya que puede prosperar en suelos pobres o marginados, con poco o nada de riego y cuidados mínimos, con relación a otros frutales tropicales. Su fruto consiste en una vaina curvada de entre 12 a 15 cm, constituido por una cáscara de color café brillante y semillas ovaladas aplanadas, unidas entre sí por fibras. Está constituido del 30 al 55 % por pulpa, la cáscara y la fibra ocupan del 11 al 30 % y las semillas, del 33 al 44 %. La cosecha, se realiza cuando el fruto alcanza su madurez fisiológica, es decir, se deshidrata, pierde peso y adquiere un color gris pardo o marrón y un sonido hueco, cuando las semillas se chocan entre sí. Asimismo, la cáscara del fruto se torna quebradiza cuando se presiona ligeramente con los dedos.

El objetivo principal del cultivo del tamarindo es la obtención de su pulpa, para su uso en la elaboración de dulces, jugos, jaleas, pulpas edulcoradas, refrescos embotellados, helados y salsas (Tirado *et al.*, 2014).

En dichos procesos, las semillas generalmente resultan ser un subproducto sin utilidad y muchas veces desechado, presentando entonces una oportunidad para su utilización.

2.7 *Mentha piperita*

Es una planta herbácea plurianual, rústica, de tallos cuadrados y rojizos, florece de julio a septiembre, sus flores son de color lila o rosa. Suele ser estéril y generalmente no produce semillas. Requiere mucha humedad y mucha luz, además que resiste bien el frío (heladas de hasta -15 °C) pero no el viento, requiere suelos profundos, fértiles, muy frescos y bien drenados. Se extiende con facilidad, por lo que es recomendable podar regularmente los tallos para dar más vigor a la planta.

Las hojas tiernas se pueden recoger a lo largo de todo el año. Florece durante el verano o durante el otoño. Después de secarla a la sombra, se guarda en algún

recipiente hermético, seco y limpio, resguardado de la luz solar (DHF Informaciones 2013).

Es una planta cultivada por sus excelentes y valiosas propiedades terapéuticas, tomadas las hojas en infusión, como té o en grandes cantidades, estimula la digestión, el sistema nervioso y el organismo en general.

Es útil en los catarros, facilita la expectoración, fortifica el estómago, disuelve los gases, tonifica el organismo, calma los nervios y las palpitaciones del corazón, alivia el vómito y la náusea, ayuda a la menstruación y expulsa las lombrices en niños (Hoffman 2005).

Existen estudios en los que se ha evaluado la actividad antibacteriana del aceite de menta y diferentes extractos de *Mentha piperita* contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pyogenes* ATCC19615, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 (Singh *et al.*, 2015), lo que da pauta a su uso como un buen agente de conservación al inhibir algunos patógenos transmitidos por alimentos.

3. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

Debido a que la fresa sufre deterioro en un periodo de tiempo corto se han hecho diversos experimentos para la realización de recubrimientos y biopelículas comestibles y de diversos componentes, López *et al.*, (2012) realizaron un recubrimiento comestible a base de quitosano incorporando aceite esencial de canela el cual se aplicó en fresas, logrando prolongar la vida útil de la fresa hasta por 15 días, presentando una reducción de mesófilos aerobios, al igual que menor crecimiento de hongos y levaduras durante su almacenamiento.

Romo *et al.*, (2014) realizaron un recubrimiento comestible a base de quitosano obtenido de *Cherax quadricarinatus* incluyendo en su formulación ácido láctico, agua desionizada y glicerol, aplicándolo como recubrimiento comestible en fresas, obteniendo resultados en su vida útil de hasta 20 días manteniendo una buena calidad sensorial.

Castillo *et al.*, (2014) desarrollaron un empaque biodegradable comestible consistente en una biopelícula de mucílago de nopal, aceite de linaza y goma arábica para mantener la integridad y asegurar la estabilidad de la película, el cual fue aplicado en la fresa con la finalidad de conservar las características organolépticas y prolongar su vida de anaquel obteniendo resultados positivos ya que se prolongó la vida de anaquel de las fresas hasta por 3 semanas contra un control sin empaque, sin mostrar desarrollo de microorganismos en el alimento.

Ventura *et al.*, (2018) realizaron un recubrimiento comestible de quitosano adicionado con aceite esencial de canela y extracto acuoso de cálices de *Roselle* aplicados en fresas, evaluando el efecto antifúngico sobre el crecimiento de *Colletotrichum fragariae* llegando a la conclusión de que el recubrimiento es efectivo para el control de *C. fragariae*, durante un almacenamiento de 13 días como tratamiento preventivo.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La fresa se produce en México principalmente en los estados de: Baja California, Guanajuato, Estado de México y Michoacán, también en Puebla se ha iniciado su cultivo en la región de Grajales y en Tecamachalco.

La importación de fresas de los Estados Unidos de Norteamérica proviene casi en su totalidad de México (98 %), generando una derrama económica de más de seis mil millones de dólares, aunque también se exportan a Canadá.

El consumo a nivel nacional ha aumentado debido a que los hábitos de alimentación de las personas han cambiado y son cada vez más exigentes, lo que se atribuye al reconocimiento del papel que pueden tener los alimentos que pueden actuar como agentes nutritivos y como agentes protectores de la salud y a que se han divulgado las propiedades de las fresas como: nutritivas, refrescantes, diuréticas, antigotosas, y por su benéfica acción depurativa sobre la sangre, también por la comercialización de yogures y barras de cereales, así como el aumento en el consumo doméstico; pero su comercialización se dificulta, debido a su rápido deterioro, que es de dos a tres días después de haber sido cosechada, bajo patrones muy buenos de manejo y almacenamiento, difícilmente logra mantenerse en buenas condiciones durante cinco días, lo que ha propiciado que se desarrollen biopelículas que aumenten el tiempo de conservación de la fresa fresca.

5. JUSTIFICACIÓN

El presente proyecto de investigación se origina por la importancia que tiene la comercialización de la fresa y por el rápido deterioro de las mismas.

Más del 50 % de la producción nacional de nuestro país se destina al mercado externo.

La fresa es un producto altamente perecedero, de acuerdo a la SAGARPA, en condiciones normales, dura de 2 a 3 días después de haber sido cosechada; hasta un 23 por ciento se pierde debido a deterioros microbiológicos y fisiológicos, pérdida de agua, daño mecánico durante la cosecha, envasado y transporte, o a las inadecuadas condiciones de traslado. Estas pérdidas ascienden a más del 40 por ciento en las regiones tropicales y subtropicales, a pesar de los múltiples intentos por extender el tiempo de vida media, sigue siendo un problema incrementarlo.

La biopelícula que se aplicó a las fresas frescas, fue un producto acorde con las exigencias del mercado y sobre todo de los consumidores que prefieren productos naturales, esto es una innovación en lo que respecta a métodos de conservación de la fresa, se analizaron las ventajas de añadir un compuesto antimicrobiano a las fresas, al demostrar que la biopelícula con el aceite esencial de *Mentha piperita* es efectiva contra el hongo *Botrytis cinerea*, que es uno de los agentes deteriorativos principales de las fresas, además se utilizó para la elaboración de la biopelícula un producto de desecho industrial, la semilla de tamarindo. Los resultados esperados sirvieron para apoyar a disminuir el deterioro de las fresas, de los cuales los beneficiarios podrían ser los consumidores, los productores y los horticultores.

6. HIPÓTESIS

La biopelícula a base del extracto acuoso de semilla de tamarindo y aceite esencial de *Mentha piperita* prolonga la vida media de la fresa fresca.

7. OBJETIVOS

7.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar una biopelícula comestible a base del extracto acuoso de la semilla de tamarindo, adicionada con aceite esencial de *Mentha piperita*, para prolongar la vida media de la fresa fresca.

7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Mentha piperita* contra *Botrytis cinerea*, *E. coli*, *Shigella sp* y *Salmonella montevideo*.
- Obtener la formulación de la biopelícula a base del extracto acuoso de semilla de tamarindo, adicionada con aceite esencial de *Mentha piperita* y aplicarla sobre fresas frescas
- Comparar la vida media de las fresas sin y con tratamiento de la biopelícula comestible mediante parámetros microbiológicos.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 MATERIALES

La forma de obtener el extracto acuoso de semilla de tamarindo se llevó a cabo en un trabajo previo por lo que en esta tesis no se detalla.

Se realizaron pruebas fisicoquímicas al extracto acuoso de la semilla de tamarindo para su caracterización parcial y conocer si era candidato para formular la biopelícula. También se hicieron los retos antimicrobianos para el aceite esencial de la *Mentha piperita*, la menta se obtuvo del Jardín Etnobotánico Francisco Peláez Roldán Asociación Civil (Certificación SEMARNAT clave PUE-FLO-172-0405).

Para la formulación de la biopelícula el material principal fueron las fresas, carboximetil celulosa, glicerol y aceite esencial de menta.

Es importante destacar que todos los análisis se llevaron a cabo por triplicado en 4 tiempos diferentes para garantizar la confiabilidad y la reproducibilidad de los resultados aquí mostrados.

8.2 MÉTODOS

En la Figura 1 se presenta la metodología general de trabajo.

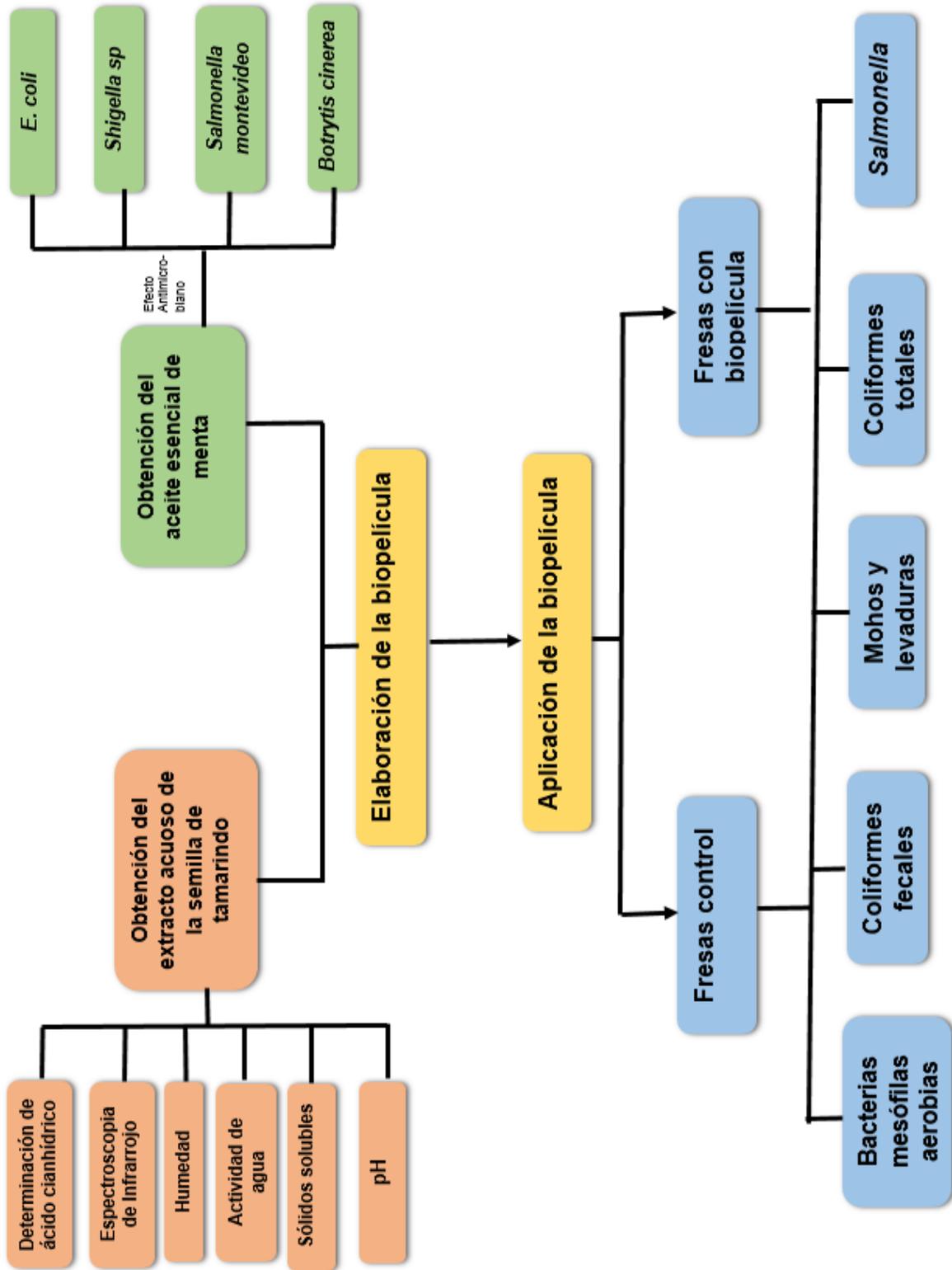


Figura 1. Metodología general.

8.2.1 Pruebas de caracterización para el extracto acuoso de semilla de tamarindo

Se obtuvo el extracto acuoso a partir de la semilla de tamarindo, y se procedió a hacer las pruebas necesarias para su caracterización tomando en cuenta que es para uso alimenticio, por lo cual, se determinó la presencia de ácido cianhídrico (HCN) ya que proviene de una semilla; se hizo la determinación cualitativa por el método de Grignard y la cuantificación por el método Denigés. Otros parámetros evaluados fueron:

Humedad

Actividad de agua

Sólidos solubles

pH

8.2.1.1 Determinación de la presencia de ácido cianhídrico en el extracto acuoso de semilla de tamarindo.

Se obtuvo el extracto acuoso de la semilla de tamarindo el mismo día de la realización de las pruebas siguientes:

En el método de Grignard (método cualitativo) se utilizaron tiras de papel filtro cortadas con las siguientes medidas 1 cm de ancho y 7 cm de largo, éstas se humedecieron dentro de un matraz de 250 mL que contenía una solución de ácido pícrico al 1 % y carbonato de sodio al 10 %, estas tiras se colocaron dentro de las tapas de plástico de los viales de vidrio a modo de que no tuvieran contacto directo con el extracto acuoso de semilla de tamarindo que se encontraba almacenada en dichos frascos, se cerraron, y se dejaron reposar por un día en un lugar oscuro hasta observar un color que va de naranja a rojo oscuro. Posteriormente se realizó el método Denigés (método cuantitativo). Se tomaron 10 mL del extracto acuoso de semilla de tamarindo preparado anteriormente y se vaciaron en un matraz de 500 mL, se agregaron 10 mL de amoníaco concentrado y 1 mL de KI al 10 %, enseguida se tituló con solución de nitrato de plata 0.01 N hasta que se observó turbidez permanente y se realizó el cálculo con la Fórmula 1 para conocer la cantidad de ácido cianhídrico que contenía el extracto acuoso de semilla de tamarindo.

$$\text{Fórmula 1. } (1\text{mL de AgNO}_3) = 5.410^{-4}\text{g HCN} = 0.54\text{ mg de HCN}$$

8.2.1.2 Determinación de humedad. Esta prueba se llevó a cabo aplicando una modificación a la Norma Mexicana 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, ya que se empleó la termobalanza High-performance Moisture Analyzer (Witeg Labortechnik GmbH), se pesaron 5 g de muestra en la misma termobalanza, distribuyéndose cuidadosa y uniformemente en el platillo, se bajó la tapa de la balanza. La termobalanza utilizada tiene una alarma que se activa en cuanto se mantiene el peso constante durante 2 minutos y al terminar el análisis (de 25 min) se tomaron las lecturas.

8.2.1.3 Determinación de actividad de agua. Esta prueba se realizó basándose en el apartado 978.18 A.O.A.C, se utilizó el equipo Aqualab series 3 TE, se depositó la muestra en la celda, la cual se colocó en el equipo y se esperaron las lecturas.

8.2.1.4 Determinación de sólidos solubles. La prueba se llevó a cabo basándose en la Norma Mexicana NMX-F-103-1982. ALIMENTOS. FRUTAS Y DERIVADOS. DETERMINACIÓN DE GRADOS BRIX. FOODS. FRUITS AND DERIVATIVES. DETERMINATION OF DEGREES BRIX. NORMAS MEXICANAS. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS. Se determinaron los sólidos solubles contenidos en el extracto acuoso de semilla de tamarindo utilizando un refractómetro Pocket ATAGO, para el uso del equipo, primero se calibró a cero, con agua destilada, se limpió con un pañuelo desechable suave, en seguida se colocó la muestra, y se obtuvieron las lecturas.

8.2.1.5 Determinación de pH. Esta prueba se llevó a cabo basándose en la Norma Mexicana NMX-F-317-S-1978. DETERMINACIÓN DE pH EN ALIMENTOS. DETERMINATION OF pH IN FOODS. NORMAS MEXICANAS. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS. Se determinó el valor de pH del extracto acuoso de semilla de tamarindo, utilizando un potenciómetro PH-016 PH METER, la muestra se depositó en un tubo cónico de 50 mL marca Falcon, y se procedió a tomar las lecturas.

8.2.2 Caracterización del extracto acuoso de semilla de tamarindo, y de la biopelícula por Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier.

La caracterización del extracto acuoso de la semilla de tamarindo y de la biopelícula se realizó mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR), se colocó una porción del extracto acuoso de la semilla de tamarindo usado de forma directa en el pozo del espectro para que éste tomara la lectura correspondiente de los grupos que se presentaban en el extracto, se realizó también la observación del agua para restar su interferencia.

8.2.3 Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en disco por el método de Kirby-Bauer

Las cepas de *E. coli*, *Shigella sp.* y *Salmonella montevideo* fueron activadas en agar EMB o *Salmonella-Shigella*, para verificar su pureza, se seleccionaron 5 colonias aisladas del mismo tipo y se transfirieron con asa a un tubo con 5 mL de caldo Mueller Hinton (MH), los tubos se incubaron a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta alcanzar la turbidez del estándar de 0.5 McFarland; 15 minutos después de ajustada la turbidez de la suspensión del inóculo, se sumergió un hisopo estéril en la suspensión y para remover el exceso de inóculo el hisopo fue rotado varias veces y presionado firmemente contra la pared interna del tubo sobre el nivel de líquido. Se inoculó la superficie de una placa de agar MH con el hisopo sobre toda la superficie. Este procedimiento se repitió rayando cuatro veces, rotando la placa aproximadamente 60° cada vez para asegurar una distribución constante del inóculo. La inoculación del hongo *Botrytis cinerea* se realizó tomando 2 mL de caldo MH los cuales se

colocaron junto al hongo, después se raspó, de esa solución se tomaron 100 µL los cuales se colocaron en el centro de una placa con medio agar papa dextrosa y se procedió a estriar.

Para determinar el efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Mentha piperita*, se colocaron discos de papel filtro impregnados con 20 µL del aceite esencial de *Mentha piperita* y sus diluciones con agua estéril, 1:100, 1:1000, tomando como control negativo agua estéril, posteriormente se incubaron por 24 horas a 37 °C para las cepas de *E. coli*, *Shigella sp.* y *Salmonella montevideo*, el hongo se dejó a temperatura ambiente 7 días, posteriormente se observó si existía halo de inhibición del crecimiento y en caso necesario se midieron los diámetros de los halos de inhibición utilizando una regla.

8.2.4 Elaboración y aplicación de la biopelícula

8.2.4.1 Elaboración de la biopelícula. La biopelícula se preparó con base de los siguientes ingredientes: carboximetilcelulosa, glicerol, aceite esencial de *Mentha piperita*, agua y extracto acuoso de semilla de tamarindo (como se menciona en el apartado de resultados), se evaluaron diferentes formulaciones variando las concentraciones de los ingredientes antes mencionados; estos se mezclaron en un vaso de precipitado de 250 mL, la mezcla se sometió a baño maría a temperaturas entre 38 °C-40 °C hasta observar la completa homogenización de los componentes y también proteger la integridad del extracto de semilla de tamarindo, se dejó enfriar y se adicionó el aceite esencial de *Mentha piperita*,. A cada una de las formulaciones se le determinaron los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos que se realizan a los frutos cubiertos por biopelículas.

8.2.4.2 Aplicación de la biopelícula. Se eligieron fresas de tamaño mediano, turgentes y de buen aspecto, se lavaron con agua de la llave para eliminar contaminantes físicos, este lavado se hizo tres veces para tener un fruto más limpio. Se desinfectaron las fresas lavadas en una solución de desinfectante a base de plata coloidal (Microdyn) en agua Gerber, según las indicaciones referidas por el

proveedor, se escurrieron y se les aplicó la biopelícula por el método de inmersión para que se obtuviera una fresa totalmente cubierta por la biopelícula, después se dejó escurrir el exceso de biopelícula en escurridores de plástico; todos los utensilios usados durante todo el proceso de aplicación fueron sometidos a desinfección por luz ultravioleta.

El proceso de aplicación de la biopelícula comestible se llevó a cabo en una campana de flujo laminar tipo II, las fresas se guardaron en contenedores de plástico y se sometieron a refrigeración, durante el periodo de vida media.

8.2.5 Pruebas microbiológicas

Las pruebas microbiológicas se llevaron a cabo durante un periodo de 15 días para las fresas con biopelícula y 7 días para las fresas control, la diferencia en el tiempo se debió al periodo de vida que presentaron.

8.2.5.1 Preparación de la muestra

La preparación de las muestras para la determinación de bacterias mesófilas aerobias, coliformes fecales, coliformes totales y mohos y levaduras, se llevaron a cabo según la NOM-110-SSA11994, se pesaron 10 g de la fresa, en 90 mL de diluyente de peptona y se molieron por 2 min en un vaso de licuadora, y posteriormente se prepararon diluciones decimales.

8.2.5.2 Determinación de bacterias mesófilas aerobias según la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-092-SSA1-1994.

Se inocularon 100 µL de las diluciones de las muestras preparadas en una caja Petri, posteriormente se realizó el vertido en placa del medio de cultivo Agar Cuenta Estándar en cámaras de flujo laminar, se homogenizó perfectamente y se dejaron solidificar, se incubaron las cajas en posición invertida a temperatura de 35 ± 2 °C durante 48 h, y se llevó a cabo el recuento de colonias desarrolladas de BMA (bacterias mesófilas aerobias) realizado por triplicado en tres tiempos diferentes.

8.2.5.3 Determinación de coliformes fecales, según la NORMA Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos. Apéndice H Normativo.

Las diluciones decimales se agitaron y se transfirieron volúmenes de 1 mL a tres tubos con 10 mL de caldo lauril triptosa, una vez inoculados se incubaron a $35 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Se examinaron los tubos a las 24 h y se observó si había formación de gas. Como no existió formación de gas se incubaron 24 h más.

8.2.5.4 Determinación de mohos y levaduras según la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-111-SSA1-1994.

Se colocó por duplicado en cajas Petri 100 μL de las diluciones 1:10 y 1:100, posteriormente se realizó el vertido de agar papa dextrosa acidificado fundido, con movimientos circulares ligeros se homogeneizaron las placas de Petri, estas se incubaron a temperatura ambiente, y se realizó el conteo (realizado por triplicado en tres tiempos diferentes), de las colonias de cada placa después de 3, 4 y 5 días de incubación.

8.2.5.5 Determinación de bacterias coliformes totales según la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-113-SSA1-1994

Para la prueba de CT (coliformes totales) de las diluciones seleccionadas (1:10, 1:100, 1:1000) se tomaron 100 μL y se depositaron en una placa de Petri, se adicionaron entre 15 y 20 mL de agar bilis rojo violeta fundido, se homogeneizó y se dejó solidificar, posteriormente se le colocó una sobrecapa para asegurar el ambiente anaerobio, se incubó de 24-48 h a $35 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, y se hizo el recuento de las colonias (realizado por triplicado en tres tiempos diferentes), pasado este tiempo de incubación, sólo se contaron las colonias características que estaban por debajo de la sobrecapa de medio.

8.2.5.6 Determinación de *Salmonella* según la NORMA Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, Productos y Servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos.

Se realizó haciendo una modificación a la norma. Se extrajeron 25 g de muestra y se agregaron 225 mL de caldo BHI enseguida se licuó a máxima velocidad durante 1 minuto, para poder liberar los microorganismos de las partículas más grandes de las fresas, enseguida se incubó a 37 °C por 24 h. Pasado este lapso de tiempo; se tomó 1 mL de este cultivo y se pasó en caldo Tetrionato que es un medio selectivo para *Salmonella* y fue incubado a 37 °C durante 24 h. Después de la incubación, este cultivo se sembró en 4 agares diferentes para el aislamiento de *Salmonella*, Verde Brillante, Sulfito de Bismuto, *Salmonella-Shigella* y Mac Conkey estos medios fueron incubados a 37 °C durante 24 h. Las colonias sospechosas de ser *Salmonella* se confirmaron mediante pruebas bioquímicas.

Para esto se tomaron colonias sospechosas de la placa agar sulfito de bismuto se sembraron en medio TSI, LIA, MIO, Urea y citrato con asa bacteriológica recta.

Las pruebas confirmatorias que se llevaron cabo fueron:

Para la prueba de RM-VP primero se tomó del medio TSI una colonia y se sembró en cada uno de los tubos con medio de cultivo con ayuda de un asa bacteriológica recta, se incubó a 35 °C por 48 h. Transcurrido el tiempo se añadieron unas gotas de rojo de metilo al 0.04 % en el medio RM y se observaron los resultados. Después a la prueba VP se le añadió 0.6 mL de alfa naftol al 5 % y 0.2 mL de hidróxido de potasio al 40 %, se agitó vigorosamente el tubo y se observaron los resultados.

8.2.6 Análisis estadístico

Se llevó a cabo una matriz de correlación utilizando el programa Excel 2013 para establecer posibles relaciones entre el crecimiento de bacterias mesófilas aerobias, coliformes totales, y mohos y levaduras, presentes en las fresas control y en las fresas con biopelícula, y una prueba t-student para determinar si existe diferencia significativa entre los recuentos obtenidos de las fresas control y de las fresas con biopelícula para cada grupo de microorganismos (bacterias mesofilicas aerobias,

coliformes totales, hongos y levaduras), los análisis se realizaron utilizando el programa estadístico Minitab a un nivel de significancia de 0.05 con un 95 % de confiabilidad.

9. RESULTADOS

9.1 Determinación de la presencia de Ácido cianhídrico en el extracto acuoso de semilla de tamarindo.

Determinación de ácido cianhídrico Método Denigés

El valor del titulante gastado para la muestra de 10 mL de extracto acuoso de semilla de tamarindo fue de 0.2 mL, este valor se sustituyó en la Fórmula 1 para determinar la cantidad de ácido cianhídrico presente, este procedimiento se realizó para cada una de las muestras de extracto acuso se semilla de tamarindo, los resultados se muestran en la Tabla 1.

$$\text{Fórmula 1. } (1\text{mL de Ag NO}_3) = 5.410^{-4}\text{g HCN} = 0.54\text{ mg de HCN}$$

Tabla 1. Determinación de ácido cianhídrico en la muestra de extracto acuso de semilla de tamarindo.

Muestra de extracto acuoso de semilla de tamarindo (mL)	Ácido cianhídrico (mg)
10	0.108
4	0.0432
1	0.000216

Finalmente se realizó el cálculo por kg de biopelícula obteniendo un valor de 0.216 mg/kg.

9.2 Análisis fisicoquímicos del extracto acuoso de semilla de Tamarindo

La Tabla 2 muestra las medias aritméticas de los resultados de los análisis fisicoquímicos del extracto acuoso de semilla de tamarindo.

Tabla 2. Análisis fisicoquímico del extracto acuoso de semilla de tamarindo.

Determinación de humedad. (Desviación estándar)	Actividad de agua (Desviación estándar)	Sólidos solubles (Desviación estándar)	Determinación de pH (Desviación estándar)
86.93 ± 0.02 %	0.963 ± 0.001	3.25 ± 0.129 °Bx.	5.47 ± 0.017

9.3 Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) del extracto acuoso obtenido de la semilla de tamarindo

Los resultados obtenidos del espectro de absorción FTIR son similares con los reportados por Alpizar *et al.*, 2017 (Figura 2), quienes realizaron un estudio de las propiedades funcionales y características fisicoquímicas del mucílago de semilla de tamarindo (*Tamarindus indica* L.), obteniendo un espectro del mucilago de tamarindo secado por pulverización, es por ello que se utilizó el espectro que dichos autores obtuvieron como referencia para este trabajo.

En la Figura 3 se muestra el espectro de absorción FTIR/ATR del extracto acuoso obtenido de la semilla de tamarindo, en donde se observa la parte del xiloglicano, la parte proteica y la parte lipídica.

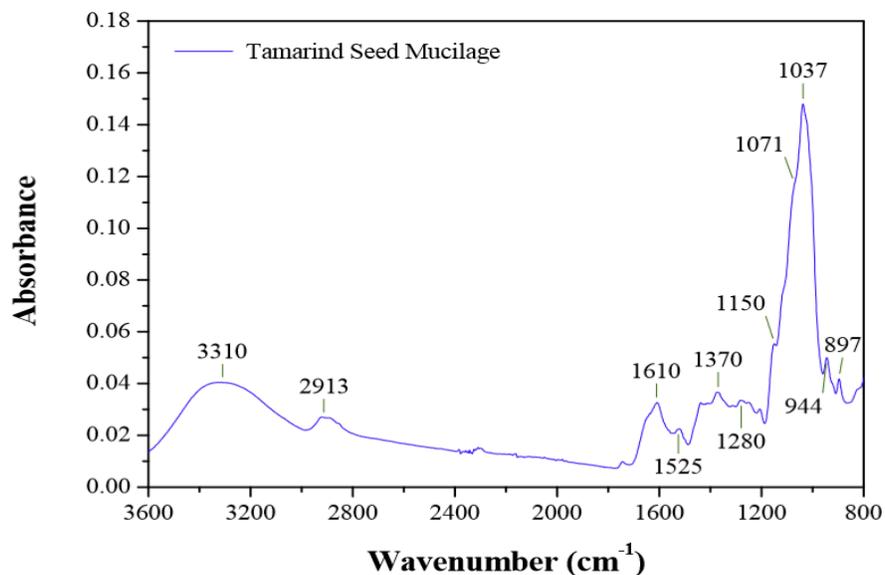


Figura 2. Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier de mucilago de tamarindo secado por pulverización. (Alpizar *et al.*, 2017).

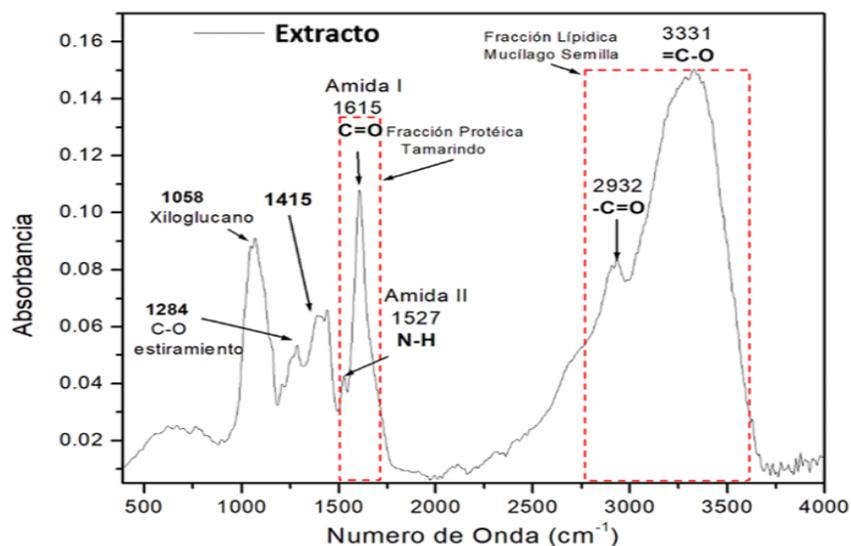


Figura 3. Espectro de absorción FTIR/ATR del extracto acuoso obtenido de la semilla de tamarindo.

9.4 Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) de la biopelícula

En la Figura 4 se muestra el espectro de absorción FTIR/ATR obtenido de la biopelícula seleccionada, en donde se observa un pico correspondiente al

xiloglucano, una región de ácidos grasos que corresponde al glicerol, una fracción lipídica y la región de OH correspondiente al agua.

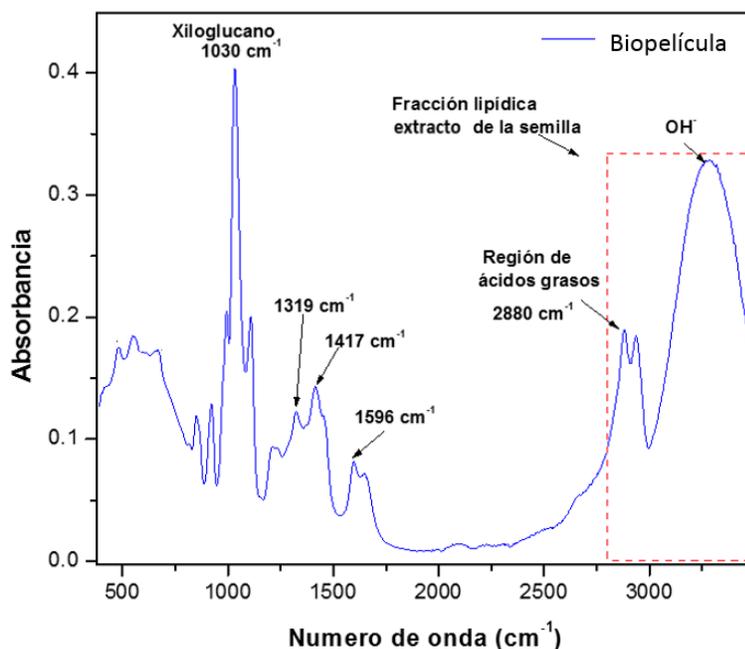


Figura 4. Espectro de absorción FTIR/ATR obtenido de la biopelícula.

9.5 Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en disco por el método de Kirby-Bauer

La Tabla 3 muestra las medias aritméticas del diámetro de los halos de inhibición y la desviación estándar, con el aceite esencial de *Mentha piperita* sin diluir, sus diluciones y el control (agua estéril) frente a las cepas de *E. coli*, *Shigella sp.*, *Salmonella montevideo* y *Botrytis cinérea*, observándose la mayor actividad ante *Botrytis cinerea*, (Figura 5), aunque el aceite sin diluir tuvo actividad ante las cuatro especies de microorganismos empleados.

Tabla 3. Diámetro de halos de inhibición con el aceite esencial de *Mentha piperita* sin diluir y a diferentes diluciones.

Cepa	Halos de inhibición del crecimiento del aceite esencial de <i>Mentha piperita</i> (cm ± desviación estándar)			
	Directo	1:100	1:1000	Agua estéril
<i>Salmonella montevideo</i>	1.7 (±0.1)	0.9 (±0.1)	0	0
<i>Shigella sp.</i>	1.6 (±0.1)	0	0	0
<i>E. coli</i>	1.4 (±0.1)	0	0	0
<i>Botrytis cinerea</i>	4 (±0.1)	1.2 (±0.1)	0	0



Figura 5. Diámetro de halos de inhibición con el aceite esencial de *Mentha piperita* sin diluir (disco 0 y disco 1) y agua estéril (disco 2 y disco 3) contra *Botrytis cinerea* (Fuente: Autoría propia).

Tabla 4. Composición de las formulaciones para la elaboración de biopelículas comestibles.

Formulación	EAST (g)	CMC (g)	Glicerol (g)	AEMP (µL)	Agua (mL)
1	4	1	8	30	186.973
2	4	1	16	30	178.973
3	4	2	8	30	185.973
MIFAC	4	2	16	30	177.973
Control	0	0	0	0	0

Nota: EAST Extracto acuoso de semilla de tamarindo

CMC Carboximetilcelulosa

AEMP Aceite esencial de *Mentha piperita*

El estudio indicó que según las características fisicoquímicas como firmeza y actividad de agua (datos no mostrados), y a que se presentó un mejor aspecto visual la mejor formulación fue la MIFAC (Figura 6), ya que mantenía a las fresas con las mejores características aceptables a comparación de las otras formulaciones.

Las Figuras 7 y 8 muestran las fresas a las cuales se les aplicó la biopelícula y las fresas control (sin biopelícula).

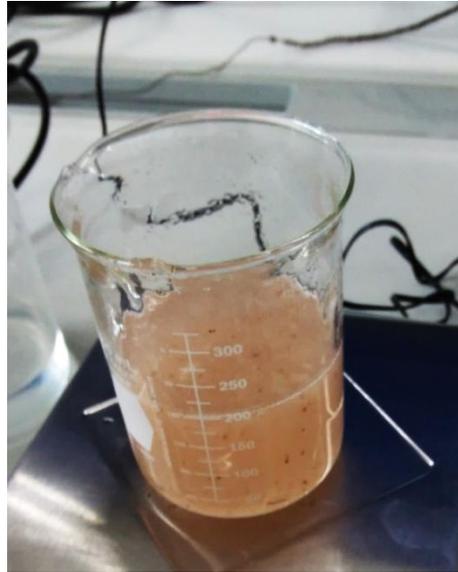


Figura 6. Biopelícula, formulación MIFAC (Fuente: Autoría propia).



Figura 7. Fresa con biopelícula (lado izquierdo), y fresa control (lado derecho) (Fuente: Autoría propia).



Figura 8. Fresas con biopelícula (lado izquierdo), y fresas control (lado derecho) en el día 1 (Fuente: Autoría propia).

9.6 Calidad microbiológica de las fresas usando la norma oficial mexicana NOM-093-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. PRACTICAS DE HIGIENE Y SANIDAD EN LA PREPARACION DE ALIMENTOS QUE SE OFRECEN EN ESTABLECIMIENTOS FIJOS.

La Norma 093 es la que se aplicó para el control de calidad microbiológico de las fresas, tanto las que sirvieron de control, como las que fueron tratadas con biopelícula, ya que no existe norma específica para fresas, esta norma refiere en el APENDICE INFORMATIVO B, la determinación de bacterias mesofílicas aerobias, con un valor límite de 150,000 UFC/g, y la determinación de organismos coliformes fecales, con un valor límite de 100 UFC/g.

La determinación de bacterias mesófilas aerobias se llevó a cabo según la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-092-SSA1-1994, la Figura 9 muestra las medias aritméticas y las desviaciones estándar, obtenidas para los recuentos de bacterias mesofílicas aerobias en las fresas control durante los días 0, 3 y 7, no se muestran más días debido a que presentaron deterioro después de los siete días, mientras que las fresas con tratamiento permanecieron en buen estado hasta el día 15, ya que hasta este día aún tenían un aspecto físico aceptable. Se observó a través de los días un incremento mayor de colonias en las fresas control, presentando un valor inicial de 9 UFC/mL y aumentando rápidamente hacia el día siete observándose un

valor de 162.5 UFC/mL, a diferencia de las fresas con biopelícula en las que se logró un menor incremento bacteriano incluso hasta el día 15, en el que se recuperó un promedio de 80 UFC/mL, se observó una diferencia significativa en la disminución del recuento de BMA de las fresas tratadas con la biopelícula con respecto a las que no tenían tratamiento y un incremento en la vida media de las fresas tratadas a un valor de “p” < 0.001, usando la prueba de t-student.

La Figura 10 muestra el crecimiento de BMA en placas de agar cuenta estándar, al día siete de almacenamiento, para la muestra de fresas con biopelícula (izquierda) y fresas control (derecha).

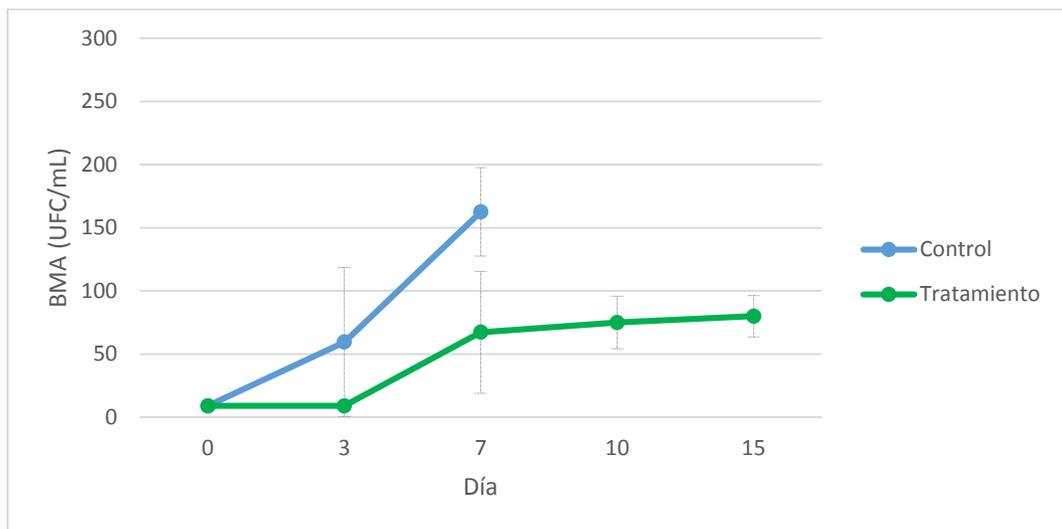


Figura 9. Comportamiento de las BMA en las fresas control y fresas con biopelícula comestible aplicada, se observó una diferencia significativa a un valor de “p” < 0.001, usando la prueba de t-student

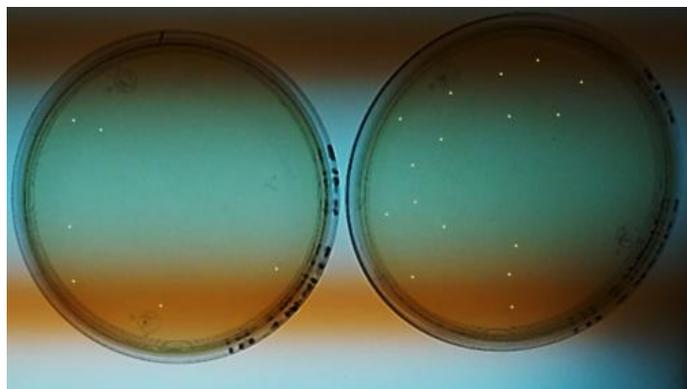


Figura 10. Crecimiento de BMA para las muestras de fresas con biopelícula (izquierda), control (derecha) (Fuente: Autoría propia).

9.7 Cuantificación de los organismos coliformes fecales

La cuantificación de los organismos coliformes fecales se llevó a cabo tomando como base la norma oficial mexicana NOM-210-SSA1-2014, específicamente el Apéndice H normativo que es por Número más Probable. Los tubos utilizados en los diferentes tiempos de muestreo, tanto para las fresas control, como para las fresas tratadas con la biopelícula fueron negativos a las diferentes diluciones por lo que el resultado obtenido para todos los tiempos es <3 NMP/g (datos no mostrados).

9.8 Otros microorganismos indicadores de calidad microbiológicos utilizados: Mohos y Levaduras, Coliformes totales y *Salmonella spp.*

La determinación de mohos y levaduras se llevó a cabo según la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-111-SSA1-1994. El comportamiento en el recuento de mohos y levaduras fue similar al de las BMA, ya que el grupo de fresas control mostró un rápido incremento iniciando en el día 0 con 990 UFC/mL y para el día 7, 10750 UFC/mL que contribuyeron al deterioro de las fresas a partir de este día; en cambio se observó un incremento paulatino de UFC en las fresas tratadas con la biopelícula, mostrando recuentos más bajos aún en el día 15, con un valor de 10750 UFC/mL (Figura 11), se observó diferencia significativa en la disminución del recuento de Mohos y levaduras de las fresas tratadas con la biopelícula con respecto a las que

no tenían tratamiento y un incremento en la vida media de las fresas tratadas a un valor de “p” < 0.001, usando la prueba de t-student

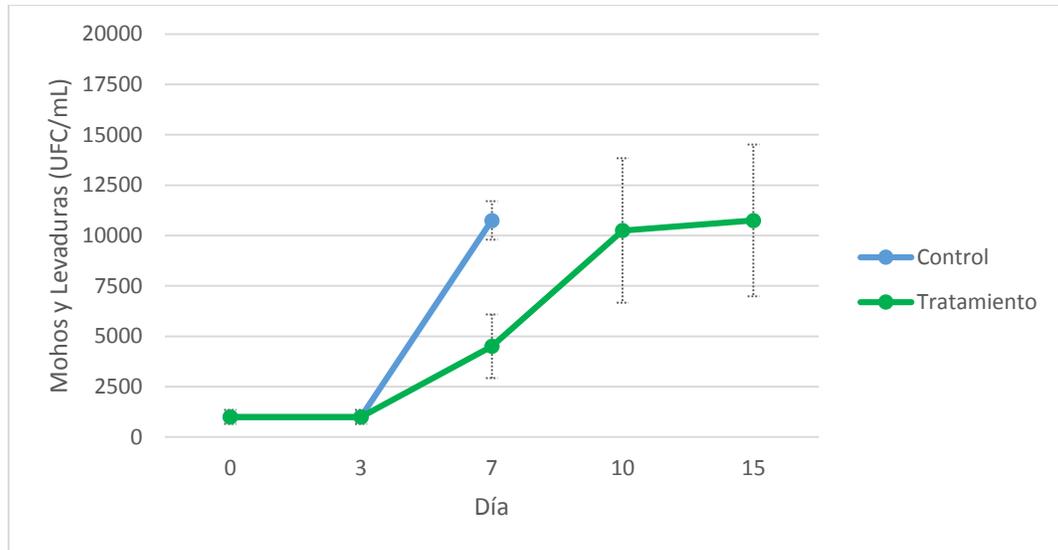


Figura 11. Comportamiento de los Mohos y levaduras en las fresas control y fresas con biopelícula comestible aplicada. Se observó diferencia significativa a un valor de “p” < 0.001, usando la prueba de t-student

La Figura 12 muestra las fresas control (lado izquierdo) y las fresas con biopelícula (lado derecho) para el día 8 de almacenamiento, se observó que las fresas control ya tenían presencia de hongos, mientras que las fresas con biopelícula aun conservaban un buen aspecto.



Figura 12. Fresas control (lado izquierdo) y fresas con biopelícula (lado derecho), para el día 8 de almacenamiento (Fuente: Autoría propia).

La cuantificación de las bacterias coliformes totales se realizó tomando como base la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-113-SSA1-1994. El incremento en el recuento de coliformes totales en las fresas control fue muy rápido del día 3 al día 7, ya que fue de 9 a 105 UFC/g como se muestra en la Figura 13, en cambio se observó un incremento paulatino de UFC en las fresas tratadas con la biopelícula, en las que se logró un menor desarrollo de coliformes totales, observándose un valor máximo de 62.5 UFC/g hasta el día 15, observándose una diferencia significativa en la disminución del recuento de Coliformes totales de las fresas tratadas con la biopelícula con respecto a las que no tenían tratamiento y un incremento en la vida media de las fresas tratadas a un valor de “p” < 0.001, usando la prueba de t-student

La Figura 14 muestra el crecimiento de CT en placas de agar rojo violeta bilis, tomadas el día siete de almacenamiento, para la muestra de fresas con biopelícula y sin biopelícula (control).

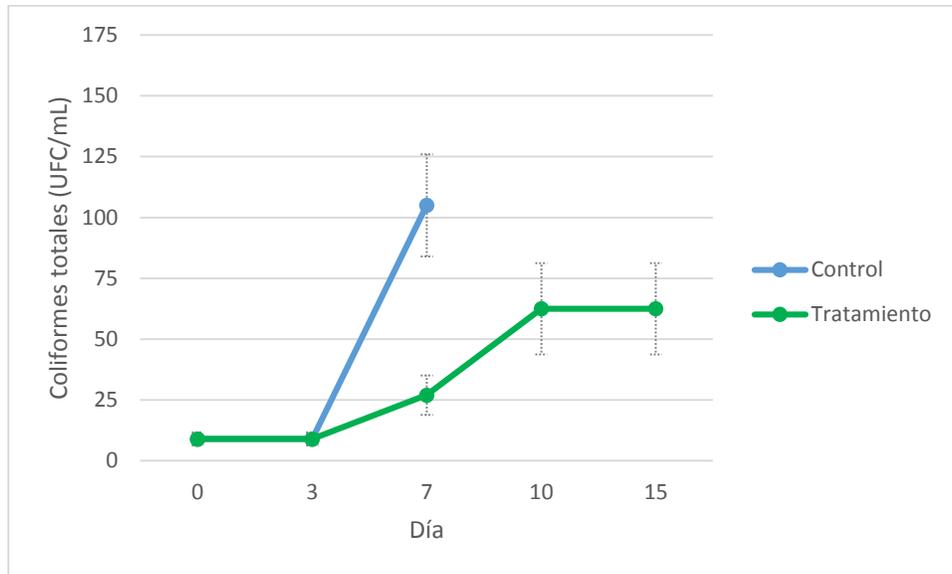


Figura 13. Comportamiento de los coliformes totales en las fresas control y fresas con biopelícula comestible aplicada. Se observó una diferencia significativa a un valor de “p” < 0.001, usando la prueba de t-student

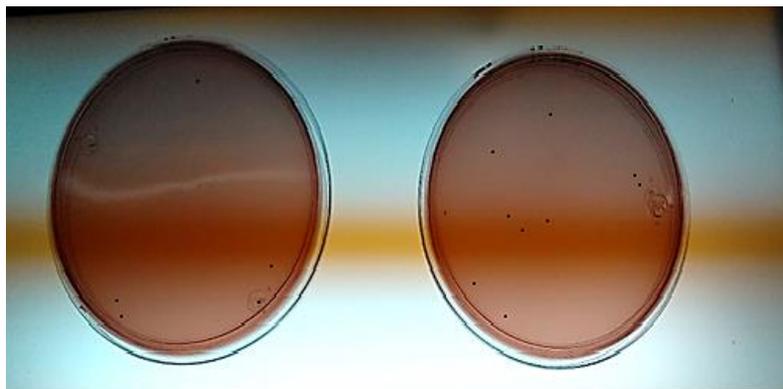


Figura 14. Crecimiento de coliformes totales para las muestras de fresas con biopelícula (izquierda), control (derecha) (Fuente: Autoría propia).

La determinación de *Salmonella* se consideró un indicador importante, dado que las fresas son de consumo directo, se realizó tomando en cuenta la norma oficial mexicana NOM-210-SSA1-2014, apéndice A normativo, y como no existía un inciso específico para fresas se tomó el apartado A.6.2.23. Tanto en las fresas control como en las fresas tratadas con la biopelícula no se aisló a *Salmonella*.

9.9 Análisis estadístico de resultados

Con el fin de establecer posibles relaciones entre el crecimiento de bacterias mesófilas aerobias, coliformes totales, y mohos y levaduras, presentes en las muestras evaluadas, se efectuó una matriz de correlación, utilizando el programa Excel, los valores se observan en la Tabla 5, la cual muestra una correlación positiva entre las BMA y CT esto quiere decir que cuanto mayor sea la cantidad de colonias de CT mayor será el número de colonias de BMA, esto debido a que las bacterias mesófilas aerobias incluyen a los coliformes totales, también muestra una correlación negativa entre BMA y HyL, y una correlación negativa entre CT y HyL, la correlación negativa entre bacterias y mohos puede deberse a factores fisicoquímicos como la actividad de agua.

Tabla 5. Matriz de correlación fresas control, fresas con biopelícula.

	BMA	CT	HyL
BMA	1		
CT	1	1	
HyL	-1	-1	1

Además de la diferencia significativa entre los recuentos obtenidos de las fresas control y de las fresas cubiertas con la biopelícula para cada grupo de microorganismos (detallado en cada uno de los grupos de microorganismos), obtenida al tratar los resultados experimentales con la prueba de t de student para muestras independientes a un nivel de significancia $\alpha= 0.05$. Los resultados obtenidos mostraron que sí existe diferencia significativa entre los datos obtenidos para las fresas control y los de las fresas cubiertas con biopelícula con 95 % de confiabilidad, lo cual corresponde a que la biopelícula influye negativamente en el crecimiento de los microorganismos evaluados; las fresas con biopelícula presentaron menor carga microbiana durante su almacenamiento.

10. DISCUSIÓN

Debido a que no existen normas en las que se señale el límite máximo permitido de ácido cianhídrico para las semillas de tamarindo se tomó como referencia el ACUERDO POR EL QUE SE DETERMINAN LOS ADITIVOS Y COADYUVANTES EN ALIMENTOS, BEBIDAS Y SUPLEMENTOS ALIMENTICIOS, SU USO Y DISPOSICIONES SANITARIAS, publicado en el Diario Oficial de La Federación el Lunes 16 de Julio de 2012, el cual señala que el límite máximo permitido es de 50 mg/kg en turrón, nougat, mazapán y productos similares elaborados con semillas (Diario Oficial de la Federación, 2012).

Los resultados obtenidos en este estudio para la determinación de ácido cianhídrico fueron de 0.216 mg/kg, encontrándose dentro del límite máximo permisible de acuerdo a la referencia anterior, lo que muestra que el extracto acuoso de semilla de tamarindo es apto para el consumo humano.

El espectro de absorción FTIR-ATR obtenido para el extracto acuoso de semilla de tamarindo mostró señales a 3331 y 2932 cm^{-1} que corresponden al enlace =C-O y -C=O respectivamente, y forman parte de la fracción lipídica. La Fracción proteica se observa con las señales pertenecientes a las amidas I y II. La señal a 1615 corresponde a la amida I y al grupo C=O, por otra parte, la amida II se encuentra a 1527 cm^{-1} y está asociada al grupo N-H. La señal a 1284 corresponde al estiramiento C-O y así mismo la señal a 1058 está en la región de los estiramientos C-C, C-N, C-O, los cuales pueden ser atribuidos al xiloglucano, ya que picos en 1370, 1150, 1037, 1071, 944 y 987 cm^{-1} son características del xiloglucano (Alpizar *et al.*, 2017). Los valores de las señales obtenidas para el extracto acuoso de semilla de tamarindo son similares a las obtenidas por Alpizar *et al.*, (2017) quienes obtuvieron un espectro del mucilago obtenido de la semilla de tamarindo, obteniendo señales en 310 cm^{-1} atribuidos al enlace =C-O correspondientes a la fracción lipídica, una señal a 1610 cm^{-1} la cual menciona que corresponde a la amida I, también muestran una señal en 1525 cm^{-1} la cual corresponde a la amida

Il asociada al grupo N-H. La señal a 1415 cm^{-1} obtenida para el extracto acuoso de semilla de tamarindo se puede asociar a grupos carboxilo (Saeid *et al.*, 2017).

Para el espectro de absorción FTIR-ATR de la biopelícula, la señal a 1030 cm^{-1} está en la región de los estiramientos C-C, C-N, C-O que puede ser atribuida al xiloglucano (Alpizar *et al.*, 2017). La señal a 1319 cm^{-1} , 1417 cm^{-1} se puede asociar a grupos carboxilo, mientras que la señal a 1596 cm^{-1} puede estar asociada a grupos carbonilo, estos resultado son similares a los obtenidos por Saeid *et al.*, (2017) quienes realizaron un FTIR de carboxilmetilcelulosa, y obtuvieron señales a $1400\text{-}1450\text{ cm}^{-1}$ asociándolas a grupos carboxilos, y una a 1600 cm^{-1} asociándola a grupos carbonilo. La fracción lipídica del mucilago asociada a 2931 y 2880 cm^{-1} corresponden al enlace $=\text{C-O}$ y $-\text{C=O}$ respectivamente (Alpizar *et al.*, 2017). Sin embargo la señal de 3286 cm^{-1} es más comúnmente asociada a grupos OH vibrando principalmente por la presencia de agua en la muestra, estos valores se aproximan a los obtenidos por Chawanorasest *et al.*, (2016), quienes realizaron un extracto etanólico de la semilla de tamarindo obteniendo señales en 3351.95 , 3355.85 y 3357.46 cm^{-1} asociándolos también a grupos OH. El pico correspondiente a la amida primaria probablemente de los grupos amino de las cadenas laterales de los aminoácidos de las proteínas se reduce en intensidad con respecto al del extracto acuoso de las semillas, lo que podría estar sugiriendo una modificación estructural en la biopelícula.

La prueba de susceptibilidad antimicrobiana del aceite esencial de la *Mentha piperita* dio resultados favorables ya que se obtuvieron halos de inhibición para las cuatro especies de microorganismos empleados, este efecto concuerda con el obtenido por Mahboub y Kazempour (2014), quienes realizaron un ensayo de microdilución en caldo obteniendo efecto bactericida contra microorganismos como *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae* y *Escherichia coli*. En los resultados obtenidos en este trabajo se observa una mayor actividad ante el hongo *Botrytis cinerea*, lo cual es importante debido a que una de las enfermedades que ataca a la fresa es la Pudrición del fruto, la cual es producida por el hongo *Botrytis cinerea* (Cámara de Comercio de Bogotá 2015) y es por esta razón que se decidió utilizar

el aceite esencial de *Mentha piperita* como componente de la biopelícula.

Estudios previos han aplicado quitosano para el recubrimiento de fresas como Khalifa *et al.*, (2016), pero no se ha reportado el uso de biopelículas comestibles en donde se use extracto acuoso de semilla de tamarindo, por lo que éste es un estudio exploratorio y descriptivo.

La seguridad microbiana es uno de los factores más importantes a considerar para la conservación de alimentos mínimamente procesados (Duran *et al.*, 2016). Se observó que a través de los días existió para las BMA, un incremento mayor de colonias en las fresas control, aumentando rápidamente hacia el día siete, a diferencia de las fresas con biopelícula en las que se logró un menor incremento bacteriano incluso hasta el día 15, este comportamiento se puede atribuir a la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Mentha piperita*, la cual ha sido reportada en un estudio realizado por Mahboub y Kazempour (2014), en el que dicha actividad se evaluó frente a bacterias, mohos y levaduras mediante un ensayo de microdilución en caldo, sus resultados mostraron actividad antimicrobiana para bacterias Gram positivas, Gram negativas, mohos y levaduras, también puede deberse a una disminución en la permeabilidad al oxígeno ambiental debido a la biopelícula, ya que una propiedad de las biopelículas es que presentan permeabilidad a los gases (Vázquez *et al.*, 2013).

El recuento en nuestro producto es inferior a los reportados por Duran *et al.*, (2016) quienes desarrollaron recubrimientos de quitosano con nisina, aplicados en fresas, reportando valores de 23900 UFC/g el día 1 y aumentando a 36900 UFC/g para el día 10, aunque se nota la misma tendencia de incremento de colonias durante el almacenamiento.

La calidad microbiana de las fresas en México se puede referir a la NOM-093-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. PRACTICAS DE HIGIENE Y SANIDAD EN LA PREPARACION DE ALIMENTOS QUE SE OFRECEN EN ESTABLECIMIENTOS FIJOS en donde se establece un valor límite de 150,000 UFC/g de BMA, y un valor límite de 100 UFC/g de organismos coliformes fecales, en la presente investigación los valores de BMA se encuentran dentro de lo establecido, y no se recuperaron

coliformes fecales durante el almacenamiento, lo que indica que el producto es apto para su consumo, estos resultados concuerdan con los obtenidos por Pérez *et al.*, (2016) quienes aplicaron un recubrimiento comestible de aloe vera en mangos donde señalan que sus resultados obtenidos para coliformes totales, coliformes fecales y *Salmonella* no sobrepasaron los límites establecidos.

El grupo de fresas control mostró un rápido incremento de mohos y levaduras, hacia el día 7, lo que contribuyó a su deterioro, posiblemente debido a que los hongos aumentan su incidencia con condiciones de humedad relativa alta, que fue uno de los datos que se incrementó en las fresas no tratadas con el paso del tiempo (datos no mostrados), tal como lo reporta Ávila (2015); en cambio se observó un incremento paulatino de UFC en las fresas tratadas con la biopelícula, mostrando recuentos más bajos aún en el día 15, lo cual se puede atribuir a la actividad antifúngica del extracto de *Mentha piperita* mencionado por Mahboub y Kazempour (2014) y comprobado también por los experimentos realizados y también puede deberse a que el glicerol en la biopelícula reduce la transpiración, la deshidratación como lo menciona De Ancos *et al.*, (2015), retardando el aumento de la humedad relativa en las fresas con biopelícula.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Shahbazi (2018), quien desarrolló un recubrimiento comestible de carboximetilcelulosa y quitosano, adicionando aceite esencial de *Mentha spicata* aplicado en fresas, ya que a lo largo del almacenamiento también obtuvo un incremento de colonias en sus muestras, pero al igual que en este estudio sus recuentos para las fresas con recubrimiento son menores en comparación con su control, realizando el recuento hasta el día 12.

El incremento en el recuento de coliformes totales en las fresas control fue muy rápido del día 3 al día 7, en cambio se observó un incremento paulatino de UFC en las fresas tratadas con la biopelícula, en las que se logró un menor desarrollo de coliformes totales hasta el día 15, pero permanece dentro de la normatividad lo que se puede atribuir a la actividad antimicrobiana del extracto de *Mentha piperita* la cual ha sido reportada en estudios realizados por Mahboub y Kazempour (2014) para bacterias Gram negativas y otros microorganismos.

Este incremento de colonias concuerda con el obtenido por Copa (2017) quien desarrolló un recubrimiento a base de gelatina aplicando cloruro de calcio en fresas, en el que menciona que se observó un incremento de las UFC de CT durante el almacenamiento de las fresas.

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación podemos señalar que en las fresas recubiertas con la biopelícula a base de extracto acuoso de la semilla del tamarindo se incrementa la vida media a comparación de las fresas del control negativo, de igual manera que disminuye el número de microorganismos indicadores debido a la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Mentha piperita* adicionado a la biopelícula, lo que conlleva al cumplimiento de los valores aceptables establecidos según la NOM-093-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. PRACTICAS DE HIGIENE Y SANIDAD EN LA PREPARACION DE ALIMENTOS QUE SE OFRECEN EN ESTABLECIMIENTOS FIJOS, hasta el día 15.

11. CONCLUSIONES

- Se logró obtener una biopelícula a base del extracto acuoso de semilla de tamarindo, con características idóneas, ya que la cantidad de ácido cianhídrico se encuentra dentro de los límites normativos.
- La aplicación de esta biopelícula duplicó la vida media de las fresas en comparación de las fresas a las que no se les aplicó la biopelícula.
- El aceite esencial de *Mentha piperita* tuvo actividad antimicrobiana contra *Botrytis cinerea*, *E. coli*, *Shigella sp.* y *Salmonella montevideo*, presentando actividad principalmente en el hongo *Botrytis cinerea*.
- La aplicación de la biopelícula logró retardar el crecimiento microbiano y contribuyó a incrementar la vida media de las fresas, evitando su rápido deterioro.

12. PERSPECTIVAS

- Realizar un análisis sensorial para comprobar la aceptabilidad de la fresa con biopelícula.
- Aplicar la biopelícula en otros frutos para comprobar si también tiene funcionalidad.
- Realizar un análisis antimicrobiano del extracto acuoso de semilla de tamarindo.

13. BIBLIOGRAFÍA

- Alpizar, E., Carrillo, H., Gallardo, R., Varela, V., Alvarez, J., & César, P. (2017). Functional properties and physicochemical characteristics of tamarind (*Tamarindus indica* L.) seed mucilage powder as a novel hydrocolloid. *Journal of Food Engineering*, 68-75.
- Ávila, A., & González, D. d. (2012). La competitividad de las fresas (*Fragaria* spp.) mexicanas en el mercado nacional, regional y de Estados Unidos. *Agricultura, sociedad y desarrollo*, 17-27.
- Ávila, E. P. (2015). *Manual Fresa*. Colombia: Cámara de Comercio de Bogotá.
- Barbosa, G. (2012). Películas y recubrimientos comestibles en contexto con otras tecnologías novedosas de conservación. En G. I. Olivas, G. A. González, O. Martín, & R. Soliva, *Películas y recubrimientos comestibles* (pág. 14). Hermosillo: AM EDITORES.
- Camacho, A., Giles, M., Ortegón, A., Palao, M., Serrano, B., & Velázquez, O. (2009). Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. *Facultad de Química UNAM*, 1-10.
- Campo, Y., Boada, E., & Delgado, J. (2015). Comparación de tres empaques para la conservación en postcosecha de la fresa "Fragaria vesca". *Revista Alimentos hoy*, 42-48.
- Castillo, D. A., Salazar, K., Mosquera, S., & Rengifo, E. (2018). Efecto de recubrimientos de almidón modificado de yuca, proteína aislada de soya y aceite esencial de óregano aplicados a la papaya. *Revista U.D.C.A. Actualidad & Divulgación Científica*, 71-80.
- Castillo, E., Pérez, L., Loredó, K., Meneses, P., & H., R. (2014). Aprovechamiento del mucílago de nopal verdura (*opuntia ficus*) para el desarrollo de películas biodegradables comestibles. *Simposio Nacional de Investigación e Innovación en Ingeniería Química*, 92-94.
- Chawanoraset, K., Saengtongdee, P., & Kaemchantuek, P. (2016). Extraction and Characterization of Tamarind (*Tamarind indica* L.) Seed Polysaccharides (TSP) from Three Different Sources. *Molecules*, 1-9.
- Chiralt, A., Fabra, M. J., & Sánchez, L. (2012). Propiedades de las películas comestibles. En I. O. Guadalupe, A. G. Gustavo, O. Martín, & S. Robert, *Películas y recubrimientos comestibles* (pág. 23). Hermosillo: AM EDITORES.

- Copa, M. P. (2017). *Evaluación de la vida útil de la Fragaria x ananassa Duch (FRESA) por efecto de la plicación de cloruro de calcio y un recubrimiento comestible*. Riobamba: Escuela Superior Politecnica de Chomborazo.
- Dantas, I. C., Lima, P., Souza, A., Carneiro, A. S., Fachine, J., Barbosa, J. M., . . . Leite, E. (2015). Coatings comprising chitosan and Mentha piperita L. or Mentha x villosa Huds essential oils to prevent common postharvest mold infections and maintain the quality of cherry tomato fruit. *International Journal of Food Microbiology* , 168-178.
- Dantas, I. C., Lima, P., Souza, A., Carneiro, A. S., Fachine, J., Barbosa, J. M., . . . Leite, E. (2016). he effects of composite coatings containing chitosan and Mentha(piperita L. or x villosa Huds) essential oil on postharvest mold occurrence and quality of table grape cv. Isabella. *Innovative Food and Emerging Technologies*, 112-121.
- DHF, I. (30 de Agosto de 2013). *D.H.F Informaciones*. Obtenido de D.H.F Informaciones: <http://dhfinformaciones.blogspot.com/2013/08/la-menta-piperita-y-sus-propiedades.html>
- Diario Oficial de la Federación. (16 de Julio de 2012). ACUERDO POR EL QUE SE DETERMINAN LOS ADITIVOS Y COADYUVANTES EN ALIMENTOS, BEBIDAS Y SUPLEMENTOS ALIMENTICIOS, SU USO Y DISPOSICIONES SANITARIAS. *Diario Oficial de la Federación*, pág. 8.
- Diario Oficial de la Federación. (16 de Octubre de 1995). NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-110-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. PREPARACIÓN Y DILUCIÓN DE MUESTRAS DE ALIMENTOS PARA SU ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/110ssa14.html>
- Diario Oficial de la Federación. (12 diciembre 1995) NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-092-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA CUENTA DE BACTERIAS AEROBIAS EN PLACA. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/092ssa14.html>
- Diario Oficial de la Federación. (26 de Junio de 2015). NORMA Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos. http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5398468&fecha=26/06/2015
- Diario Oficial de la Federación. (15 de Agosto de 1994). NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-111-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA CUENTA DE MOHOS Y LEVADURAS EN ALIMENTOS. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/111ssa14.html>

Diario Oficial de la Federación. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-113-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA CUENTA DE MICROORGANISMOS COLIFORMES TOTALES <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/113ssa14.html>

Duarte, P. G., Castellanos, L. C., Gutierréz, C., Pérez, B., Molina, H. G., & Gallego, D. Y. (2016). ONDAS DE ULTRASONIDO Y RADIACIÓN ULTRAVIOLETA COMO TRATAMIENTOS PARA ELIMINAR LA CARGA MICROBIANA. *Tecnoacademia*, 94-101.

Duran, M., Mehmet, S., Demirel, Z., Temiskan, R., Burak, M., & Caner, C. (2016). Potential of antimicrobial active packaging containing natamycin, nisin, pomegranate and grape seed extract in chitosan coating to extend shelf life of fresh strawberry. *Food and Bioprocess Technology*, 354-363.

Galiotta, G., Harte, F., Molinari, D., Capdevielle, R., & Diano, W. (2004). Aumento de la vida útil postcosecha de tomate usando una película de proteína de suero de leche. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 117-1123.

Hoffman, P. (2005). *Mentha piperita*. México D.F: PAX MÉXICO.

Khalifa, I., Barakat, H., El-Mansy, H., & Soliman, S. (2016). Improving the shelf-life stability of apple and strawberry fruits applying chitosan-incorporated olive oil processing residues coating. *Food Packaging and Shelf Life*, 10-19.

López, M., Ruiz, S., Navarro, C., Ornelas, J., Estrada, M. G., & Rodrigo, J. (2012). Efecto de recubrimientos comestibles de quitosano en la reducción microbiana, y conservación de la calidad de las fresas. *Revista Biotecnología*, 33-43.

Mahboubi, M., & Kazempour, N. (2014). Chemical composition and antimicrobial activity of peppermint (*Mentha piperita* L.) Essential oil. *Songklanakarin Journal of Science Technology*, 83-87.

Merchán, J. B., Ferrucho, R., & Álvarez, J. (2014). Efecto de dos cepas de *Trichoderma* en el control de *Botrytis cinerea* y la calidad del fruto en fresa (*Fragaria* sp.). *REVISTA COLOMBIANA DE CIENCIAS HORTÍCOLAS*, 44-56.

México Produce. (2016). *México Produce*. Obtenido de México Produce: <http://www.mexicoproduce.com.mx/>

Norma Mexicana 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 <http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-428-1982.PDF>

- Norma Mexicana NMX-F-103-1982. ALIMENTOS. FRUTAS Y DERIVADOS. DETERMINACIÓN DE GRADOS BRIX. FOODS. FRUITS AND DERIVATIVES. DETERMINATION OF DEGREES BRIX. NORMAS MEXICANAS. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS. <https://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-103-1982.PDF>
- Norma Mexicana NMX-F-317-S-1978. DETERMINACIÓN DE pH EN ALIMENTOS. DETERMINATION OF pH IN FOODS. NORMAS MEXICANAS. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS. <http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-317-S-1978.PDF>
- Olivas, G., & Pérez, M. B. (2012). Películas y recubrimientos comestibles para frutas y vegetales. En G. I. Olivas, G. A. González, O. Martín, & R. Soliva, *Películas y recubrimientos comestibles* (pág. 405). Hermosillo: AM EDITORES.
- Pérez, A., Aristizábal, I., & Restrepo, J. (2016). Conservación de mango Tommy atkins mínimamente procesado mediante la aplicación de un recubrimiento de aloe vera (*Aloe barbandensis miller*). *Vitae*, 65-77.
- Quintero, J., Falguera, V., & Muñoz, A. (2010). Películas y recubrimientos comestibles: importancia y tendencias recientes en la cadena hortofrutícola. *Revista Tumbaga*, 93-118.
- Ramos, M. d., Bautista, S., Barrera, L. L., Bosquez, E., Alia, I., & Estrada, M. (2010). Compuestos antimicrobianos adicionados en recubrimientos comestibles para uso en productos hortofrutícolas. *REVISTA MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA*, 44-57.
- Romo, K. F., Pérez, L. E., & Ramírez, R. E. (2014). Quitosanos de *Cherax quadricarinatus* utilizados como recubrimientos comestibles sobre frutos de fresa mínimamente procesados. *Ciencia y Tecnol. Agropec.* , 36-43.
- Ruiz, M. (2018). *Aplicación de Quitosano con Aceites Esenciales contra Botrytis cinerea Pers. "Moho Gris" en Lycopersicon esculentum P. Mill "Tomate"*. . Lima: Universidad Ricardo Palma .
- Saeid, A., Mousavi, M., & Labbafi, M. (2017). Synthesis and Characterization of Carboxymethyl Cellulose From Sugarcane. *Journal of Food Processing & Technology*, 1-6.
- SAGARAPA. (2017). *Fresa Mexicana SAGARPA*. Obtenido de Fresa Mexicana SAGARPA: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257075/Potencial-Fresa.pdf>

- Shahbazi, Y. (2018). Application of carboxymethyl cellulose and chitosan coatings containing *Mentha spicata* essential oil in fresh strawberries. *Internatinal Journal of Biological Macromolecules*, 264-272.
- Singh, R., Shushni, M., & Belkheir, A. (2015). Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. *Arabian Journal of Chemistry*. *Arabian Journal of Chemistry*, 322-328.
- Tirado, D., Acevedo, D., & Montero, P. (2014). Propiedades Reológicas de la pulpa edulcorada de Tamarindo. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 495-501.
- Uribe, M. F. (2018). *Efecto de la concentración de aceite esencial de canela (Cinnamomum verum) en una cobertura comestible a base de Aloe vera (Aloe barbadensis) y gelatina, y tiempo de almacenamiento sobre las características fisicoquímicas, recuento de mohos y levaduras*. Trujillo: UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO.
- Vázquez, M., & Guerrero, J. (2013). Recubrimientos de frutas con biopelículas. *Temas Selectos de Ingenieria de Alimentos*, 5-14.
- Ventura, R. I., Bautista, S., Flores, G., & Zavaleta, L. (2018). Impact of chitosan based edible coatings functionalized with natural compounds on *Colletotrichum fragariae* development and the quality of strawberries. *Food Chemistry*, 142-149.
- Zipmec. (2013). *Zipmec*. Obtenido de Zipmec: <https://www.zipmec.com/es/fresas-historia-produccion-comercio.html>