

Propiedades antioxidantes de una película comestible de agar y gelatina aditivada con compuestos fenólicos de salvado de sorgo café

Jessica Estefania Catucuago Castro

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano

Honduras

Noviembre, 2018

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

Propiedades antioxidantes de una película comestible de agar y gelatina aditivada con compuestos fenólicos de salvado de sorgo café

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniera en Agroindustria Alimentaria en el Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Jessica Estefania Catucuago Castro

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2018

Propiedades antioxidantes de una película comestible de agar y gelatina aditivada con compuestos fenólicos de salvado de sorgo café

Jessica Estefania Catucuago Castro

Resumen. El desarrollo de empaques activos implementando polímeros biodegradables, renovables y de origen natural e incorporando compuestos bioactivos en las matrices, se visualizan como sistemas novedosos de empaque. El objetivo del estudio fue elaborar una película comestible de agar y gelatina adicionando compuestos fenólicos de salvado de sorgo café y caracterizarla en función de sus propiedades fisicoquímicas y antioxidantes. El estudio se realizó en dos etapas. La primera consistió, en la extracción de compuestos fenólicos del salvado de sorgo, mediante un proceso de decorticado a diferentes tiempos (1, 1.5 y 2 minutos). La segunda etapa fue establecer las concentraciones de agar, gelatina y de extracto fenólico para elaborar la película comestible. Las variables evaluadas fueron grosor, propiedades de color, mecánicas, térmicas, solubilidad en agua, permeabilidad al vapor de agua y microscopia electrónica de barrido (MEB). Se realizó un análisis de varianza y separación de medias con la prueba Tukey. El mayor contenido de compuestos fenólicos en las fracciones de salvado de sorgo se obtuvo al 1.5 min mostrando una concentración de 13.68 68 mg EAG/g de salvado. Para la elaboración de la película se optimizó una concentración de agar del 66.67 y 33.33% de gelatina, incorporando extracto fenólico a distintas concentraciones (0.066, 0.166, 0.333 y 1 mg/mL) y procianidinas a una concentración de 0.066 mg/mL. Se concluyó que la incorporación de compuestos fenólicos en la película mejoró la barrera de permeabilidad al vapor de agua, y afectó ligeramente las propiedades mecánicas, ópticas y de solubilidad, presentando cambios a medida que se incrementó la concentración del extracto fenólico. Además, la concentración de 1 mg/mL de extracto fenólico presentó 90% de inhibición de radicales DPPH presentan actividad antioxidante.

Palabras clave: Capacidad antioxidante, propiedades fisicoquímicas, salvado de sorgo.

Abstract. Development of active packaging implementing biodegradable, renewable and naturally occurring polymers and incorporating bioactive compounds into the matrices, are visualized as novel packaging systems. Objective of the study was to develop an edible film of agar and gelatin by adding phenolic compounds of brown sorghum bran and characterize it according to its physicochemical and antioxidant properties. Study was carried out in two stages. The first consisted in the extraction of phenolic compounds from the sorghum bran, by means of a decorticating process at different times (1, 1.5 and 2 minutes). Second stage was to establish the concentrations of agar, gelatin and phenolic extract to make the edible film. Variables evaluated were thickness, color, mechanical, thermal properties, water solubility, water vapor permeability and scanning electron microscopy (SEM). An analysis of variance and separation of means was performed with the Tukey test. The highest content of phenolic compounds in the fractions of sorghum bran was obtained at 1.5 min showing a concentration of 13.68 68 mg EAG / g of bran. For the preparation of the film, an agar concentration of 66.67 and 33.33% of gelatin was optimized, incorporating phenolic extract at different concentrations (0.066, 0.166, 0.333 and 1 mg / mL) and procyanidins at a concentration of 0.066 mg / mL. It was concluded that the incorporation of phenolic compounds in the film improved the water vapor permeability barrier, and slightly affected the mechanical, optical and solubility properties, presenting changes as the concentration of the phenolic extract was increased. In addition, the concentration of 1 mg / mL of phenolic extract showed 90% inhibition of DPPH radicals present antioxidant activity.

Key words: Antioxidant capacity, physicochemical properties, sorghum bran.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	10
4. CONCLUSIONES	20
5. RECOMENDACIONES	21
6. LITERATURA CITADA.....	22
7. ANEXOS	26

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Diferentes muestras de películas comestibles caracterizadas.....	9
2. Concentración de compuestos fenólicos en las fracciones de salvado de sorgo que se obtuvo por decorticación a diferentes tiempos.....	10
3. Grosor promedio de las películas de agar y gelatina con extracto fenólico y procianidinas.....	11
4. Propiedades ópticas promedio y desviación estándar de las películas comestibles a base de agar-gelatina con diferentes concentraciones de extracto fenólico y procianidinas.	12
5. Propiedades mecánicas promedio y desviación estándar de las películas.....	13
6. Resultados del contenido de humedad y solubilidad en agua promedio y desviación estándar a pH 4.3 y 7 de las películas comestibles.....	14
7. Permeabilidad promedio y desviación estándar al vapor de agua(PVA) de las películas de agar, gelatina, extracto completo y procianidinas.	15
8. Propiedades térmicas Análisis Termogravimétrico (TGA) y Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) de las películas.	16
9. Propiedades antioxidantes determinadas mediante los ensayos ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) y 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) a las concentraciones iniciales de los extractos fenólicos y procianidinas incorporadas.....	17

Figuras	Página
1. Micrografías de superficie de la película de agar (A) y la película de gelatina (B) a 1000x de resolución.....	18
2. Micrografías de superficie de la película de agar-gelatina (C), agar gelatina con extracto fenólico a 0.066 mg/mL(D), 0.166 mg/mL(E), 0.333 mg/mL (F), 1 mg/mL (G) y con 0.066 mg/mL de procianidinas (H) a 1000x de resolución.	19

1. Cromatogramas HPLC-UV-Vis en fase reversa del extracto fenólico completo (A) y la fracción de PCs aislada de salvado de sorgo café(B).....	26
2. Espectro FTIR de las películas comestibles de agar, gelatina, agar-gelatina con diferentes concentraciones de extracto fenólico (0.066,0.166,0.33 y 1 mg/mL) y procianidinas (0.066 mg/mL).	27
3. Espectros de TGA con las derivadas (A) película de agar y gelatina y (B) película de agar-gelatina y extracto fenólico de 0.0666 mg/mL.	28
4. Películas comestibles de agar y gelatina aditivada con diferentes concentraciones de extracto fenólico de salvado de sorgo.....	29

1. INTRODUCCIÓN

Los empaques desempeñan un papel importante en la protección, conservación y distribución de los productos alimenticios (Mohajer *et al.* 2017). Los materiales de envasado son derivados de petroquímicos, entre ellos el polietileno, polipropileno, poliestireno, poliamidas y policloruro de vinilo. A partir del siglo XIX incrementaron marcadamente su popularidad, dominando el mercado de envases para alimentos por su bajo costo, relación peso/volumen y buenas propiedades mecánicas. Sin embargo, dichos plásticos son altamente resistentes a la biodegradación ambiental, son no renovables y su reciclaje es bajo debido a limitaciones técnicas y económicas, creando graves problemas ambientales. Debido a sus características los plásticos derivados del petróleo representan potenciales contaminantes ambientales, y en consecuencia ponen en riesgo la salud de los seres vivos (Attaran *et al.* 2015).

La producción de desechos principalmente de empaques no biodegradables, ha desencadenado un interés por desarrollar materiales poliméricos sustitutos. Sobre esta problemática la industria de alimentos, los consumidores e incluso instituciones dedicadas a la investigación, han enfocado su visión a la implementación de polímeros biodegradables, renovables y de origen natural (Majeed *et al.* 2013; Valdés *et al.* 2014; Mohajer *et al.* 2017). Existe una amplia gama de biopolímeros naturales entre ellos los polisacáridos y proteínas, los cuales se han usado solos o en mezclas para producir matrices poliméricas biodegradables, biocompatibles y no tóxicas (Attaran *et al.* 2015). Las películas o revestimientos comestibles son sistemas prometedores en la industria. El uso de compuestos bioactivos en envases, representa un crecimiento tecnológico en la elaboración de materiales de empaque multifuncionales (Salgado *et al.* 2015).

El agar es un polisacárido extraído de algas rojas, como *Gelidium* y *Gracilaria spp*, está formado por la mezcla de agarosa y agarpectina, constituido por unidades repetitivas de D-galactosa y 3,6-anhidro-L galactosa, y un bajo contenido de esteres de sulfato. Además se encuentra entre los biopolímeros más atractivos para el desarrollo de películas biodegradable (Da Rocha *et al.* 2018). Por si solo el agar produce películas comestibles claras, transparentes, con alta fuerza mecánica, flexibles y termoestables, pero presenta baja adhesión celular y moderada resistencia al agua (Giménez *et al.* 2013; Arham *et al.* 2016; Vejdán *et al.* 2016). La gelatina es una proteína desnaturalizada que se obtiene por hidrólisis ácida o alcalina del colágeno animal (pescado, cerdo, bovino). La gelatina de pescado, se extrae a partir de la piel de pescado, considerada un subproducto de la industria que proporciona una valiosa fuente de gelatina, por lo tanto, ha incrementado su interés en los últimos años para la elaboración de películas comestibles (Hosseini *et al.* 2015). La gelatina forma películas claras, flexibles, impermeables al oxígeno, pero tiene baja termo estabilidad

y constituye estructuras más débiles comparadas con agar en cuanto a fuerza mecánica (Giménez *et al.* 2013; Rivadeneira *et al.* 2013; Somboon *et al.* 2014; Mohajer *et al.* 2017).

El sorgo (*Sorghum spp*) es el quinto cereal en importancia a nivel mundial después del maíz, el trigo, el arroz y la cebada. Durante varias décadas, México ha logrado mantenerse dentro de los primeros cinco productores de sorgo a nivel mundial y como el principal productor en Centroamérica (Awika J *et al.* 2005; SIAP 2016). En el período 2014-2016 logró una producción promedio de 6.198 mil toneladas, solo siendo superado por Estados Unidos y Nigeria, con una producción de 12.8781 y 6.942 mil toneladas, respectivamente (FAOSTAT 2014-2016). El salvado de sorgo café constituye una fuente importante de compuestos fenólicos, entre los que destacan los ácidos fenólicos, flavanoles como (+)-catequinas, (-)-epicatequina y poliflavanoles conocidos como procianidinas (PCs) (Gu *et al.* 2002; Awika y Rooney 2004). La concentración de fenoles en el salvado de sorgo, está relacionada con la pigmentación de la testa, (Awika *et al.* 2005; Salazar *et al.* 2017) señalan que las variedades de sorgo marrones contienen concentraciones más altas de fenoles a diferencia de la variedad blanca.

Sin embargo, el salvado de sorgo café no es un alimento incluido en la dieta humana, sino que es considerado un residuo agroindustrial. Por lo tanto, existen pocos estudios relacionados con sus propiedades antioxidantes y microbiológicas. Aproximadamente entre el 6 - 9% en peso del grano entero es salvado, es decir, de las 6.198 mil toneladas de sorgo producidas por México en el periodo 2014-2016, 560 toneladas corresponden a este residuo (FAO 1995).

En los últimos años la demanda de empaques activos que contribuyan a mejorar la vida útil de un alimento, se ha inclinado en la incorporación de agentes antioxidantes de origen natural, como extractos de plantas (Li *et al.* 2014). La fabricación se basa en la mezcla de biopolímeros compatibles en cuanto al peso molecular, estructuras químicas y conformación. El resultado son materiales híbridos, aprovechando las características de ambos compuestos y la sinergia de sus propiedades fisicoquímicas y mecánicas, para obtener películas con propiedades mejoradas (Giménez *et al.* 2013; Li *et al.* 2014; Mohajer *et al.* 2017).

El presente estudio forma parte de un proyecto de investigación del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., dirigido a la extracción de compuestos fenólicos del salvado de sorgo en aplicaciones biomédicas. Donde se elaboró una película comestible a base de agar y gelatina adicionando compuestos fenólicos de salvado de sorgo café; por lo que, se plantearon los siguientes objetivos:

- Establecer las concentraciones óptimas de agar, gelatina y compuestos fenólicos extraídos del salvado de sorgo para la elaboración de la película comestible.
- Caracterizar las propiedades fisicoquímicas de la película comestible elaborada.
- Determinar la actividad antioxidante de las distintas concentraciones de compuestos fenólicos incorporados en la película comestible.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación.

La investigación se realizó en el Laboratorio de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, AC), km. 0.6, Hermosillo, Sonora, México. El análisis estadístico de datos se realizó en la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, departamento de Francisco Morazán, Honduras.

Materiales.

Se trabajó con una variedad híbrida de sorgo café proporcionada por una empresa distribuidora de semillas ubicada en los Mochis, Sinaloa, México. Para la elaboración de la película se utilizó gelatina de pescado (Gelatin from cold water fish skin), distribuida por Sigma-Aldrich localizada en Estados Unidos. El agar-agar se adquirió en AgarMex ubicado en Baja California, México. El glicerol fue obtenido por medio de Sigma-Aldrich Scientific en Estados Unidos.

Limpieza del grano de sorgo.

Se eliminó la gluma de 10 Kg de grano de sorgo café manualmente para determinar el contenido de humedad.

Determinación del contenido de humedad del grano de sorgo.

Se empleó el Método (AACC 2000) que consistió en colocar los granos de sorgo (1 g en charolas de aluminio) en un horno de secado por convección a 100 °C durante 24 horas. El contenido de humedad se determinó a partir de la ecuación 1.

$$\% \text{Humedad} = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100 \quad [1]$$

Dónde, P_i es el peso inicial y P_f representa el peso final después de transcurrir las 24 horas.

Obtención del salvado de sorgo por decorticación.

Se llevó a cabo en el Laboratorio de Silos y Molinos del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (DIPA) de la Universidad de Sonora. El decorticado se realizó en un decortificador a través de un proceso de abrasión a diferentes tiempos (0.5, 1, 1.5 y 2 minutos), donde se sometieron los 10 Kg de sorgo para obtener el salvado.

Tamizado y reducción del tamaño de partícula del salvado de sorgo.

Seguido del proceso de decorticado se tamizaron las muestras de salvado de sorgo de los diferentes tiempos en un tamizador DuraTap™ con el uso de una malla N° 40, con la cual se obtuvo un tamaño de partícula de 0.42.

Extracción de compuestos fenólicos del salvado de sorgo.

Se partió de 1 g de salvado de sorgo, la extracción se realizó en tubos de centrifuga de 15 mL y se agregaron 10 mL de solución compuesta por acetona/agua/ácido acético (7 + 2.95 + 0.05 mL), la mezcla se sometió a agitación durante 30 segundos en vórtex y 10 minutos de sonicación a 37 °C por 10 minutos, se dejó reposar la mezcla por 25 minutos a temperatura ambiente y oscuridad. Posteriormente se centrifugó a temperatura ambiente por 15 minutos a 3500 rpm, se extrajo una alícuota de 8 mL del sobrenadante y se evaporó en un Rotaevapor BUCHI RE 121 a sequedad a 35 °C, finalmente se reconstituyó la muestra con 6 mL de agua HPLC (Gu *et al.* 2002).

Determinación de compuestos fenólicos totales.

Se empleó el método propuesto por (Xu y Chang 2007), donde se tomaron 50 µL del extracto, se añadieron 3 mL de agua HPLC y 250 µL de solución Folin-Ciocalteu 1N, se agitó la muestra y se dejó reposar durante 5 minutos. Posteriormente se añadieron 750 µL de una solución de carbonato de sodio (Na₂CO₃), se agregaron 950 µL de agua HPLC y se mantuvo a temperatura ambiente por 40 minutos. Después se realizó la lectura de la reacción contra un blanco a 765 nm, en un espectrofotómetro UV-Vis Cary 50 (Varian Inc., Palo Alto, CA). Se realizó una curva estándar de ácido gálico ($r^2 = 0.9988$).

Aislamiento de la fracción de procianidinas de salvado de sorgo a partir del extracto fenólico.

Se llevó a cabo en una columna sephadex LH-20 (6 x 1.5 cm) empacada manualmente y equilibrada con una mezcla de metanol/agua al 30% (v/v), durante 4 horas. Se cargó el extracto fenólico en la columna y se realizó un lavado con 60 mL de agua HPLC pH=7.0, (pH neutro favorece el desprendimiento de ácidos fenólicos (Michalkiewicz *et al.* 2008), 40 mL de una mezcla de metanol/agua al 30% (v/v) (remoción de azúcares y otros fenoles) y las PCs se eluyeron con 80 mL de una mezcla de acetona/agua al 70% (v/v), siendo esta última fracción concentrada en un Rotovapor BUCHI RE 121 y reconstituida con agua HPLC para su posterior congelamiento y liofilización. El aislamiento de las PCs se realizó siguiendo la metodología de (Gu *et al.* 2002).

Análisis de los compuestos fenólicos totales y procianidinas del extracto de salvado de sorgo mediante HPLC-UV-Vis en fase reversa.

La identificación de compuestos fenólicos y PCs se realizó en un sistema HPLC (Varian, Lake Forest, CA), equipado con bomba isocrática ProStar-210, detector ProStar 325 UV-Visible y el software Galaxy DAQ Varian LC. La separación de los compuestos se efectuó en una columna fase reversa Microsorb-MV, 100-5 C18 de 250 x 4.6 mm adquirida en Varian (Lake Forest, CA). El volumen de inyección fue de 200 µL, previa filtración de la

muestra y estándares a través de filtros PVDF de 13 mm GD/X y tamaño de poro 0.2 μm (Whatman, USA). La elución se llevó a cabo con fases móviles de ácido fórmico en agua HPLC conteniendo 1 % (v/v) (fase móvil B) y acetonitrilo (fase móvil A) a un flujo de 1 mL/min. El gradiente de elución fue el siguiente: 0-2 minutos 95 % A y 5 % B, 2-32 minutos (Carmelo 2015).

Elaboración de la película comestible de agar-gelatina incorporada con compuestos fenólicos de salvado de sorgo café.

Se pesó 1 g de agar y se agregaron 0.66 g de glicerol, los cuales se mezclaron y disolvieron en 90 mL de agua HPLC, agitando y calentando desde temperatura ambiente hasta ebullición (90-95 °C) durante 2 horas, después se enfrió la solución hasta 60 ± 2 °C. Posteriormente se pesó 0.5 g de gelatina de pescado y se disolvió en 50 mL de agua HPLC en un baño de agua entre 55-60 °C. La solución de gelatina se incorporó gota a gota en el agar a 60 ± 2 °C, se mezcló durante 30 minutos hasta lograr una solución homogénea. La incorporación de extracto fenólico y procianidinas en la solución de agar y gelatina se realizó a diferentes concentraciones (0.066, 0.166, 0.333 y 1 mg/mL), donde se incorporó 1 mL de extracto fenólico por cada 15 mL, agitando y calentando durante 30 minutos. Después se enfrió la solución hasta 50 ± 2 °C. Considerando que las procianidinas (PCs) fueron los compuestos más abundantes en el extracto fenólico de salvado de sorgo, también se elaboró una película comestible incorporada con PCs para comparar su efecto en relación con el extracto fenólico. Únicamente se utilizó una sola concentración de PCs (0.066 mg/mL) debido a que el proceso de aislamiento es laborioso y se obtienen bajas cantidades.

Secado y acondicionamiento de las películas.

Después del enfriamiento se vertieron 15 mL de la solución en cajas petri (56 mm de diámetro). El secado se realizó en un horno a 45 °C durante 16-18 horas. Luego se separaron manualmente las películas de las cajas petri y se acondicionaron en una cámara a 22 °C y 58 % de humedad relativa que se obtuvo con una solución saturada de Bromuro de Sodio (NaBr) durante 48 horas de acuerdo a la literatura (Giménez *et al.* 2013).

Caracterización de las películas comestibles.

Grosor. Se determinó utilizando un micrómetro manual (Minutoyo 7301, Japón) con una precisión de ± 0.001 mm. Se tomaron nueve mediciones en posiciones aleatorias en cada película para calcular su grosor final.

Propiedades ópticas.

Color. El color fue analizado mediante el procedimiento de García *et al.* (2014) donde las ocho distintas películas elaboradas fueron analizadas con un colorímetro Minolta Serie CR 300 Series, calibrado con un estándar ($Y = 92.9$; $x = 0.3161$; $y = 0.3321$). La escala que se utilizó fue CIE Lab, donde se midió la luminosidad (L^*) y los parámetros cromáticos a^* (rojo-verde) y b^* (amarillo-azul). Las mediciones se realizaron colocando la película sobre

el estándar. Todas las muestras se analizaron por triplicado para identificar las diferencias de color (ΔE) y el cálculo se realizó con la ecuación 2.

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad [2]$$

Dónde $\Delta L = L^* - L_0$, $\Delta a^* = a^* - a_0$, $\Delta b^* = b^* - b_0$

Y L^*_0 , a^*_0 y b^*_0 representan los valores del parámetro del color del estándar mientras que L , a^* y b^* representan los parámetros del color de la muestra.

Opacidad. La opacidad se determinó con la ayuda de un espectrofotómetro Cary 60 UV-Visible. Para la medición se cortaron piezas rectangulares de 50 mm de largo por 10 mm de ancho y se colocaron en moldes a medida de las celdas del espectrofotómetro. El rango de la longitud de onda utilizada fue de 200 a 800 nm y la opacidad de la película se calculó con la ecuación 3.

$$\text{Opacidad} = \frac{A_{600}}{T} \quad [3]$$

Dónde, A_{600} representa la absorbancia a 600 nm y T es el grosor de la película en mm. El análisis se realizó por triplicado. (Embuscado y Huber 2009).

Propiedades mecánicas.

Las propiedades mecánicas de interés para este estudio fueron fuerza de tensión y elongación. Estas se midieron en un texturómetro TA-XT2 Texture Analyser Stable Micro Systems (Inglaterra), siguiendo la metodología de (García *et al.* 2014). Las películas se cortaron en piezas de 50 mm de largo por 10 mm de ancho y fueron colocadas en las mordazas del texturómetro de tal manera que se ajustaron a 20 mm de profundidad en los bordes superior e inferior, dejando una distancia inicial de 10 mm y velocidad de tracción de 1,0 mm/s.

La resistencia a la tensión (TS) se calculó dividiendo la fuerza máxima (F_{\max}) entre la sección transversal inicial de la muestra, los resultados se expresaron como MPa. La elongación (ϵ) se consideró como la deformación lineal $[(L - L_0)/L_0]$, y se determinó con la curva de esfuerzo-deformación. Los resultados de TS y ϵ representaron un promedio de al menos cuatro muestras.

Solubilidad.

Pruebas en agua. La solubilidad de las películas se determinó de acuerdo al método de (Li *et al.* 2014) con una ligera modificación. Las películas se cortaron en 20 mm de ancho por 20 mm de largo, se pesaron y luego se sumergieron en 5 mL de agua HPLC a diferente pH (4.3 y 7) a temperatura ambiente 22 °C. Después de 24 horas, las muestras se filtraron a través de papel filtro Whatman N°1 para recuperar la película restante no disuelta, que se secó a 105 °C por 24 horas. Todas las pruebas se realizaron por triplicado y se calculó mediante la ecuación 4.

$$\% \text{ Solubilidad} = \frac{(W_1 - W_f)}{W_1} \times 100 \quad [4]$$

Donde, W_1 es el peso inicial de la película expresada como materia seca inicial y W_f representa el peso final de la película que no se solubilizó.

Contenido de humedad. El contenido de humedad se realizó con el método de Li *et al.* (2014). Las películas se cortaron en 20 mm de ancho por 20 mm de largo, se secaron a 105 °C durante 24 horas para determinar la materia seca inicial (W_0), después de transcurrir el tiempo requerido de secado se pesó nuevamente las películas (W_1). El contenido de humedad se calculó mediante la ecuación 5.

$$(\%) \text{ H} = \frac{(W_0 - W_1)}{W_0} \times 100 \quad [5]$$

Permeabilidad al vapor de agua (PVA). La permeabilidad al vapor de agua fue determinada de acuerdo al método ASTM-E96 con ligeras modificaciones. La película se fijó en la parte superior de la tapa (área de permeación 2.269 cm²) de un recipiente de plástico con 30 mL de agua HPL. Los vasos fueron sellados y colocados en desecadores con sílica, después se pesaron cada hora durante el transcurso de 30 horas. La permeabilidad al vapor de agua se calculó usando la ecuación 6.

$$\text{PVA} = \frac{\text{VTA} \times L}{\Delta P} \quad [6]$$

Dónde, VTA es la velocidad de la transmisión de agua (g mm / kPa h m²) calculada a partir de la pendiente de la línea recta dividida por el área de la película expuesta (m²), L es el espesor promedio de la película (mm) y ΔP representa la variación de la presión de vapor (kPa) a través de dos lados de la película. La prueba se llevó a cabo por triplicado.

Propiedades estructurales.

Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR). Este análisis se realizó en un espectrómetro infrarrojo Thermo Nicolet-Is50 (Boston, MA, USA), donde se evaluó la transmitancia de los compuestos de las películas en relación a la concentración de compuestos fenólicos. Se empleó un intervalo espectral de 4000 a 500 cm⁻¹, con una resolución de 2 cm⁻¹, siguiendo la descripción del método de (García *et al.* 2014). Posteriormente, los espectros se analizaron utilizando el software OriginPro 8.6.0 (OriginLab Corp., MA, USA).

Microscopia electrónica de barrido (SEM). Se realizaron análisis de morfología superficial de las películas en microscopio electrónico de barrido con las especificaciones establecidas por Mohajer *et al.* (2017). Las tiras de películas se pegaron sobre un trozo de cinta de carbono doble cara, luego se revistieron con oro en el Smart Coater (JEOL, modelo JFC-1600). El análisis de SEM se llevó a cabo en un microscopio JEOL JSM 541 LV (JEOL

Scanning Electron Microscope, USA). Se obtuvieron micrografías de la superficie de la muestra de 60 μm . y X1000 magnificación.

Propiedades térmicas. Fueron analizadas usando un calorímetro de barrido DSC 8500 con automuestreador, Perkin Elmer previamente calibrado, al igual que un analizador Termogravimétrico Perkin Elmer Pyris I-TGA. Donde se pesó muestras de 5 mg en la balanza electrónica modelo AD6000 Perkin Elmer para ambas pruebas. Para DSC se encapsularon en una bandeja de aluminio, como referencia se colocó otra bandeja vacía. La muestra se expuso a una temperatura a partir de $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ con una velocidad de calentamiento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Los parámetros térmicos que se determinaron están en relación a encontrar el inicio del pico endotérmico, exotérmico y la energía que se requirió para alcanzar la temperatura de transición vítrea (T_g), temperatura de fusión, (T_m) y temperatura de cristalización (T_c) (García *et al.* 2014). En el TGA las muestras se colocaron en el horno del equipo y se llevaron a cabo en una atmósfera de nitrógeno con una velocidad de calentamiento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ de 50 a $650\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las pérdidas de peso de las muestras se midieron en relación a los cambios de temperatura (Mohajer *et al.* 2017). Los datos que se registraron son de duplicados de cada película.

Determinación de actividad antioxidante.

Técnicas de inhibición del radical ABTS \bullet^+ . Para este análisis se empleó la metodología establecida por (Pellegrini *et al.* 2003) y Carmelo (2015). Basadas en medir la habilidad del antioxidante para desactivar al radical ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)). Las mediciones fueron comparadas con la capacidad del Trolox, análogo de la vitamina E, y expresadas como TEAC (Trolox-Equivalent Antioxidante Capacity). El valor TEAC se define como el número de milimoles de Trolox que tienen el mismo porcentaje de inhibición que un gramo de muestra.

El radical catiónico se generó por la reacción de una solución ABTS (7 mM) con persulfato de potasio (2.45 mM). La mezcla se mantuvo en oscuridad y temperatura ambiente durante 16 horas para la formación del radical. Posteriormente se diluyó con etanol para obtener una absorbancia de $0.70 (\pm 0.02)$ a 734 nm (A_B). Para la medición de las muestras se colocaron 1.32 mL del radical ABTS \bullet^+ con $10\text{ }\mu\text{L}$ de muestra que se obtuvo en la prueba de solubilidad de las películas comestibles, la reacción fue monitoreada hasta los 6 minutos y posteriormente se midió la absorbancia (A_E). El ensayo se llevó a cabo por triplicado en un espectrofotómetro UV-Vis Cary 60. El porcentaje de inhibición de los compuestos se determinó por la disminución de la absorbancia del radical ABTS \bullet^+ en presencia de compuestos antioxidantes y se calculó mediante la ecuación 7.

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{A_B - A_E}{A_B} \times 100 \quad [7]$$

Dónde, A_B representa la absorbancia del blanco a través del radical ABTS \bullet^+ , y A_E es la absorbancia de la muestra con el radical.

Técnica de inhibición del radical DPPH. La determinación de la actividad antioxidante mediante el radical DPPH fue analizada sobre la metodología de (Dudonné *et al.* 2009) con ligeras modificaciones. Se utilizó una solución de DPPH 6×10^{-5} M. Para el análisis de las muestras se mezclaron 3.9 mL de solución de DPPH con 100 μ L de muestra, dejándose reposar por 30 minutos a temperatura ambiente y oscuridad. Después del tiempo de reposo se midió la absorbancia en un espectrofotómetro UV-Vis Cary 60. El experimento se realizó por triplicado. La actividad antioxidante del radical se obtuvo calculando el porcentaje de inhibición usando la ecuación 8.

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{A_B - A_M}{A_B} \times 100 \quad [8]$$

Donde A_B es el valor de absorbancia del blanco y A_M la absorbancia de la muestra.

Análisis estadístico.

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con ocho tratamientos, para la caracterización de las películas. Los resultados fueron analizados con el programa “Statistical Analysis Software” (SAS versión 9.4[®]), realizándose un análisis de varianza y separación de medias con la prueba Tukey ($\alpha=0.05$) a las diferentes películas. Los tratamientos se describen en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Diferentes muestras de películas comestibles caracterizadas.

Películas	Tratamiento
Agar y glicerol	AG
Gelatina de pescado	GP
Agar y Gelatina	AG/GP
Concentraciones de extracto fenólico y procianidinas (mg /mL)*	
0.066	C ¹
0.166	C ²
0.333	C ³
1.00	C ⁴
0.066 Pcs	PCs ¹

*: mg de polvo de extracto fenólico y procianidinas liofilizado/ml de agua HPLC.

AG: Agar.

GP: Gelatina de pescado.

AG/GP C: Agar y gelatina con las diferentes concentraciones de extracto fenólico.

PCs: Procianidinas.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Contenido de humedad de los granos de sorgo.

Se determinó un porcentaje de humedad de 8.50%, por lo tanto, se consideró suficiente para el proceso de decortinado sin previo acondicionamiento del material.

Contenido de compuestos fenólicos en las fracciones de salvado de sorgo.

El mayor de contenido de compuestos fenólicos se obtuvo en la fracción de salvado de sorgo café de 1.5 minutos según se observa en el Cuadro 2, donde se registró una concentración de 13.68 mg EAG/g salvado de sorgo. Los resultados se encuentran dentro del rango reportados por (Awika *et al.* 2005), de acuerdo a dos variedades de sorgo café (sumac 22.5 mg EAG/g y SC103 13.5 mg EAG/g). Por lo tanto, se eligió a la fracción de salvado de sorgo de 1.5 minutos de decortinado como la idónea para la extracción de extracto fenólico y de donde se aislaron las procianidinas.

Cuadro 2. Concentración de compuestos fenólicos en las fracciones de salvado de sorgo que se obtuvo por decorticación a diferentes tiempos.

Tiempo de decortinado(min)	Concentración mg EAG/g salvado
1	11.56
1.5	13.68
2	10.28

EAG=Equivalente de ácido gálico

Caracterización de la película comestible.

Grosor. Las películas comestibles se definen como una capa delgada conformada por polímeros, las cuales pueden ser consumidas y empleadas en la superficie de un alimento (Montalvo *et al.* 2012). El grosor es una característica importante porque afecta las propiedades mecánicas y de permeabilidad al vapor de agua (PVA). Debido a las diferencias de presión del vapor de agua en la interfaz de la matriz, se puede producir una acumulación de humedad dentro de la película (Gutiérrez *et al.* 2015; Arham *et al.* 2016).

En el Cuadro 3, se muestra el espesor(mm) de las películas. El grosor de las películas fue uniforme con rangos de 0.030 hasta 0.032 mm, incluso con la incorporación de extracto fenólico y procianidinas mantuvo uniforme la estructura de la matriz polimérica de agar y gelatina. Finalmente, el grosor de las películas no se vio afectado por la adición de compuestos fenólicos dentro de su matriz polimérica.

Cuadro 3. Grosor promedio de las películas de agar y gelatina con extracto fenólico y procianidinas.

Películas	Grosor (mm ± D.E)
AG	0.031 ± 0.002
GP	0.032 ± 0.006
AG/GP	0.030 ± 0.006
C ¹	0.031 ± 0.002
C ²	0.030 ± 0.001
C ³	0.030 ± 0.001
C ⁴	0.030 ± 0.001
PCs ¹	0.031 ± 0.001

D.E: Desviación estándar.

AG: Película de agar.

GP: Película de gelatina.

AG/GP: Película de agar y gelatina.

C¹⁻⁴: Diferentes concentraciones de extracto fenólico (0.066, 0.166, 0.33 y 1 mg polvo/mL).

PCs: Procianidinas.

Propiedades ópticas.

Opacidad. La opacidad que presenta un material indica la cantidad de luz que pasa a través de él, por lo tanto, se relaciona con la transparencia de la película (García *et al.* 2014; Vejdán *et al.* 2016). El aumento de la opacidad según (Mohajer *et al.* 2017) puede relacionarse con la aglutinación en la matriz de la película, la cual reduce el espaciado entre las cadenas de los polímeros e impide el paso de la luz. Por otro lado, (Martins *et al.* 2012) mencionan que la alta transparencia de las películas de gelatina podrían contribuir al deterioro oxidativo, pérdidas de nutrientes y sabores desagradables en los alimentos a causa de la alta transmisión de luz. Sobre estas bases, se incorporaron en la matriz polimérica de la película, compuestos fenólicos extraídos del salvado de sorgo con el fin de evaluar el efecto de la concentración y los cambios en sus propiedades ópticas.

Los resultados de espectroscopia de las películas comestibles de agar y gelatina con compuestos fenólicos en un rango de luz visible (200-800 nm) se muestran en el Cuadro 4. La película de GP presentó una opacidad de 1.71 ± 0.002 mostrando alta transparencia y estableciendo diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) entre la película de mayor concentración de extracto completo (1 mg/mL). Por lo tanto, el valor de opacidad aumenta mientras mayor sea la concentración de extracto completo en la matriz polimérica alcanzando valores de hasta 2.97 ± 0.11 . Las películas con concentraciones de (0.066, 0.166 y 0.33 mg/mL) de extracto completo y procianidinas no presentaron diferencia significativa, por lo cual, no afectaron las propiedades ópticas dentro de la matriz de agar y gelatina.

Color. El color de la película presenta íntima relación con la apariencia del alimento influyendo en la aceptabilidad del producto por parte del consumidor. En películas biodegradables deben ser incoloras, con el fin de simular la apariencia de películas poliméricas comunes que se utilizan en la industria de alimentos (Vejdán *et al.* 2016). En

el Cuadro 4, se muestran los valores de acuerdo a los parámetros de croma representando (a*) verde-rojo, (b*) azul-amarillo, (L*) luminosidad y (ΔE) diferencia de color de las películas. Los resultados indican una alta luminosidad 96.60 ± 0.58 en la película GP, mostrando diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) al incorporar agar y extracto fenólico a concentraciones de 0.33 y 1 mg/mL disminuyendo L* hasta 91.96 ± 0.53 . Las concentraciones más altas de extracto fenólico afectan los parámetros a* y b*, en general las películas presentaron un color ligeramente amarillo. Sin embargo, las películas con concentraciones bajas no presentaron diferencias estadísticamente significativas en los valores L*, a* y b*. García *et al.* (2014) mencionan que probablemente este comportamiento se deba al punto de saturación de la matriz polimérica al incorporar compuestos fenólicos activos. Las variaciones en los parámetros de color fueron confirmadas por los valores ΔE , donde se observaron variaciones significativas en las altas concentraciones de extracto fenólico que se incorporó en la matriz de agar y gelatina.

Cuadro 4. Propiedades ópticas promedio y desviación estándar de las películas comestibles a base de agar-gelatina con diferentes concentraciones de extracto fenólico y procianidinas.

Películas	Opacidad	L*	a*	b*	ΔE
AG	1.92 ± 0.01^D	96.13 ± 0.63^{ABC}	-4.84 ± 0.12^{DE}	8.01 ± 0.22^D	8.12 ± 0.24^C
GP	1.71 ± 0.02^D	96.60 ± 0.58^A	-4.69 ± 0.13^{CD}	6.81 ± 0.55^E	7.08 ± 0.48^D
AG/GP	2.37 ± 0.11^{BC}	96.40 ± 0.43^{AB}	-4.94 ± 0.14^E	8.13 ± 0.48^{CD}	8.24 ± 0.45^C
C ¹	2.27 ± 0.26^C	95.80 ± 0.33^{ABC}	-4.73 ± 0.12^{CDE}	8.28 ± 0.16^{CD}	8.29 ± 0.20^C
C ²	2.46 ± 0.20^{BC}	95.73 ± 0.28^{BC}	-4.72 ± 0.12^{CDE}	8.62 ± 0.37^{CD}	8.57 ± 0.30^C
C ³	2.58 ± 0.25^B	94.80 ± 0.44^D	-4.41 ± 0.12^B	10.17 ± 0.42^B	9.88 ± 0.44^B
C ⁴	2.97 ± 0.11^A	91.96 ± 0.53^E	-3.66 ± 0.14^A	15.44 ± 0.47^A	15.14 ± 0.48^A
PCs ¹	2.42 ± 0.03^{BC}	95.45 ± 0.46^D	-4.51 ± 0.11^{BC}	8.76 ± 0.56^C	8.62 ± 0.52^C

^{A-E} Las diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

AG: Agar.

GP: Gelatina de pescado.

AG/GP: Película de agar y gelatina.

C¹⁻⁴: Diferentes concentraciones de extracto fenólico (0.066, 0.166, 0.33 y 1 mg polvo/mL).

PCs: Procianidinas

Propiedades mecánicas.

Las propiedades mecánicas en las películas comestibles son atribuidas al tipo de polímero y cantidad de plastificante que se utilicen, y se relacionan con la deformación de la película. En general, las propiedades de fuerza mecánica y flexibilidad son importantes en las películas comestibles, ya que garantizará la integridad, evitando la ausencia de defectos como poros dentro de la matriz (Giménez *et al.* 2013; Hosseini *et al.* 2015; Mohajer *et al.* 2017).

En el Cuadro 5, se visualizan los valores de fuerza de tensión (FT) y elongación (E) de las películas. Los resultados muestran que la incorporación de extracto fenólico y procianidinas en la película causó una disminución estadísticamente significativa ($P < 0.05$) en la FT en comparación con la película AG/GP. Un comportamiento similar fue observado por (Li *et al.* 2014; Rhim *et al.* 2014), quienes señalaron que la presencia de compuestos polifenólicos

promueve la formación de enlaces de hidrógeno y enlaces covalentes con los grupos amino e hidroxilos de la gelatina, los cuales debilitan las interacciones entre los polímeros. La deformación por elongación mide la flexibilidad o ductilidad de las películas (Valladares 2017). La película GP presentó una elongación de 2.46 ± 0.79 %, mostrando diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) con las películas de AG/GP aditivadas con extracto fenólico. Estos resultados coinciden con los reportados en el estudio de (Rivero *et al.* 2010), indicando que la ausencia de glicerol genera películas quebradizas y con baja flexibilidad. Por otro lado, la película PCs¹, presentó una elongación de 8.38 ± 0.90 %, esto se atribuye a que las procianidinas son muy susceptibles a cambios en configuración y conformación en su estructura de acuerdo a (Carmelo 2015; Valladares A. 2017).

Cuadro 5. Propiedades mecánicas promedio y desviación estándar de las películas.

Películas	FT(MPa)	E (%)
AG	13.58 ± 0.71^{AB}	16.97 ± 1.27^A
GP	16.67 ± 2.57^A	2.46 ± 0.79^D
AG/GP	14.73 ± 0.73^A	9.75 ± 0.33^{BC}
C ¹	8.44 ± 1.30^C	15.89 ± 3.66^{AB}
C ²	10.31 ± 1.71^{BC}	14.66 ± 4.14^{ABC}
C ³	10.96 ± 0.66^{BC}	17.41 ± 2.22^A
C ⁴	9.46 ± 1.19^C	13.05 ± 3.49^{ABC}
PCs ¹	8.54 ± 1.73^C	8.38 ± 0.90^{CD}

^{A-D} Las diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

FT=Fuerza de Tensión.

E=Elongación.

AG: Agar.

GP: Gelatina de pescado.

AG/GP: Película de agar y gelatina.

C¹⁻⁴: Diferentes concentraciones de extracto fenólico (0.066, 0.166, 0.33 y 1 mg polvo/mL).

PCs: Procianidinas.

Solubilidad en agua.

El contenido de humedad de las películas se vincula con el porcentaje de solubilidad en agua como por la estructura química de los compuestos fenólicos involucrados (Li *et al.* 2014). Los resultados se muestran en el Cuadro 6, indicando que las películas con extracto completo y procianidinas aumentan el contenido de humedad dentro de la matriz polimérica. La película de AG y GP muestran diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) con respecto a las películas con compuestos fenólicos presentando valores de 32.06 ± 1.52 % y 8.12 ± 1.08 % respectivamente.

Una de las propiedades de mayor importancia es la solubilidad de las películas, esto radica en que su aplicación está dirigida a la industria de alimentos. Las películas a base de gelatina presentan alta sensibilidad al agua, y escasa resistencia, esto se debe a la naturaleza hidrófila de la proteína (Hosseini *et al.* 2016). El Cuadro 6, muestra la solubilidad en agua con pH 4.3 y 7 de las películas. La solubilidad de la película GP fue total 100% , esto se atribuyó

a la ausencia de glicerol (plastificante), el mismo que proporciona elasticidad, afectando la solubilidad (~62%), este valor coincide con los resultados reportados por (Mohajer *et al.* 2017). Por otro lado, la adición de agar en la matriz polimérica mejoró la resistencia al agua en la película, por los entrelazamientos de las cadenas polipéptidas que se forman en la matriz. Así mismo, una alta solubilidad presentó relación directa con la degradabilidad del material, cambiando sus propiedades físicas y químicas.

En lo que se refiere a la solubilidad en agua de las películas con pH de 4.3 y 7, mostró valores estadísticamente similares, pero a un pH neutro, los valores tendieron a aumentar. Al someter las películas a los diferentes pH, presentaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) entre la película GP y las compuestas por agar, extracto fenólico y procianidinas. Las diferentes concentraciones de compuestos fenólicos no representaron cambios, alcanzando una solubilidad de hasta 40.15 ± 5.25 %, a diferencia de la solubilidad total de la película de gelatina. Arts *et al.* (2002) señalan que las interacciones entre proteína y compuestos polifenólicos están relacionados con el pH, la temperatura y las concentraciones de cada componente, y la fuerza de dichas interacciones pueden conducir a reacciones reversible o irreversibles.

Cuadro 6. Resultados del contenido de humedad y solubilidad en agua promedio y desviación estándar a pH 4.3 y 7 de las películas comestibles.

Películas	Humedad (%)	Solubilidad(%) pH 4.3	Solubilidad (%) pH 7
AG	32.06 ± 1.52^A	44.01 ± 2.99^B	43.55 ± 1.85^B
GP	8.12 ± 1.08^D	100.00 ± 0.00^A	100.00 ± 0.00^A
AG/GP	24.83 ± 1.58^B	42.95 ± 3.84^B	45.85 ± 0.71^B
C ¹	23.24 ± 1.96^{BC}	43.44 ± 0.60^B	45.44 ± 0.79^B
C ²	20.64 ± 1.71^C	40.28 ± 6.52^B	44.11 ± 2.48^B
C ³	21.96 ± 0.86^{BC}	40.15 ± 5.25^B	46.07 ± 0.48^B
C ⁴	22.96 ± 0.83^{BC}	43.78 ± 1.81^B	46.12 ± 0.83^B
PCs ¹	22.35 ± 0.65^{BC}	42.91 ± 1.18^B	47.07 ± 1.05^B

^{A-D} Las diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

AG: Agar.

GP: Gelatina de pescado.

AG/GP: Película de agar y gelatina.

C¹⁻⁴: Diferentes concentraciones de extracto fenólico (0.066, 0.166, 0.33 y 1 mg polvo/mL).

PCs: Procianidinas

Permeabilidad al vapor de agua(PVA).

El Cuadro 7, muestra la PVA de la película AG/GP C⁴ con una concentración de 1 mg/mL, la cual fue de 12.42×10^{-8} g mm/h Pa cm², mostrando una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) con la película AG y GP. A medida que disminuye la concentración de extracto fenólico y procianidinas en las películas, menores son los valores de PVA. Los valores obtenidos en el presente estudio son similares a los reportados por (Giménez *et al.* 2013), para películas de agar y gelatina adicionadas con extracto de té verde. Por otra parte, Reddy y Rhim (2014) reportan que películas compuestas por agar presentan baja

permeabilidad, debido a que disminuyen la difusión del vapor de agua en la matriz del polímero. Esto concuerda con los resultados del presente estudio, ya que la película de GP presentó una permeabilidad de 8.72×10^{-8} g mm/h Pa cm², pero al adicionar agar el valor de PVA disminuyó significativamente a 6.51×10^{-8} g mm/h Pa cm². La propiedad de barrera al vapor de agua de la película compuesta de agar y gelatina tendió a mantenerse e incluso mejorar al aditivarla con compuestos fenólicos (excepto la concentración C4). Esto se atribuye a que, los compuestos fenólicos se aglomeran en la matriz formada por los polímeros agar-gelatina, como se muestra en el análisis de MEB con una estructura homogénea. A diferencia en la concentración C4 (1mg/mL), se inicia la formación de dos fases(heterogénea), probablemente por la sobresaturación de la matriz polimérica (agar-gelatina)

Cuadro 7. Permeabilidad promedio y desviación estándar al vapor de agua(PVA) de las películas de agar, gelatina, extracto completo y procianidinas.

Películas	PVA ($\times 10^{-8}$) (g mm/h Pa cm²)
AG	6.79 ± 0.079^C
GP	8.72 ± 0.65^B
AG/GP	6.51 ± 0.13^C
C ¹	6.55 ± 0.11^C
C ²	6.29 ± 0.33^C
C ³	6.57 ± 0.21^C
C ⁴	12.42 ± 0.33^A
PCs ¹	6.17 ± 0.33^C

PVA: Permeabilidad al vapor de agua

^{ABC}: Las diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas(P<0.05).

AG: Agar.

GP: Gelatina de pescado.

AG/GP: Película de agar y gelatina.

C¹⁻⁴: Diferentes concentraciones de extracto fenólico (0.066, 0.166, 0.33 y 1 mg polvo/mL).

PCs: Procianidinas.

Propiedades térmicas.

El análisis de las propiedades térmicas de los materiales poliméricos, permite determinar las condiciones de procesamiento de estos biopolímeros. Así, se puede establecer el rango de temperatura óptimo que permita la fusión del material, evitando su degradación térmica (López *et al.* 2018). La estabilidad térmica de las películas se estudió a través de las mediciones en TGA. La degradación térmica de las películas se presentó en tres etapas, considerando la composición del material. En el Cuadro 8, se observan los resultados de acuerdo a la estabilidad térmica de las películas analizadas. La pérdida de peso inicial fue generada a consecuencia de la evaporación de humedad en las películas, donde se registró en el rango de temperatura de 80-100 °C. Para la segunda etapa, la película AG inició su degradación después de los 200 °C, pero al reemplazar un 33% de la composición de agar con gelatina e incorporar extracto fenólico y procianidinas se identificó que el deterioro disminuyó a rangos desde 140 – 180 °C. El contenido de glicerol también influyó en la

degradación térmica generando una alta cristalinidad en la estructura interna (Rhimal *et al.* 2013; Rhim *et al.* 2014), a excepción de la película GP la cual no contiene plastificante reportando una degradación a 265 -330 °C. Finalmente, la pérdida de peso de los polímeros y compuestos fenólicos se produjo en los rangos de 210-300 °C, en la película C⁴ mostrando, que a mayor concentración de extracto fenólico (1mg/mL) existe un disminución de la temperatura de descomposición de 217 hasta 244 °C. Los resultados de residuo en TGA mostraron que la estabilidad térmica de la película AG aumento significativamente al incorporar gelatina y compuestos fenólicos, además a mayor concentración de extracto fenólico el peso de residuo a 650 °C fue de 17.51%. La degradación de los materiales poliméricos de la película a través de los cambios de temperatura disminuyó a la presencia de extracto fenólico.

Los termogramas DSC de las películas compuestas por compuestos fenólicos determinaron (T_g) temperatura de transición vítrea y (ΔH_g) energía de fusión, a partir de la posición del máximo de los picos durante el proceso endotérmicos. En el cuadro 8, se muestra los resultados indicando una disminución de T_g y atribuyéndole a la incorporación de gelatina y al aumento en las concentraciones de extracto completo y procianidinas en la matriz. El aumento de H_g se debe a la energía requerida para fundir los compuestos cristalinos y vaporizar los compuestos fenólicos presentes en la película de agar y gelatina. Es importante observar que todas las películas presentaron degradación durante el proceso de calentamiento. García *et al.* (2014) reportaron que la energía de fusión es mucho más alta que la energía de cristalización, en consecuencia del consumo que esto requiere, con el fin de generar cambios de estado en la matriz polimérica.

Cuadro 8. Propiedades térmicas Análisis Termogravimétrico (TGA) y Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) de las películas.

Películas	TGA				Residuo a 650°C (%)	DSC	
	T ₁ inicio (°C)	T ₁ máx. (°C)	T ₂ inicio (°C)	T ₂ máx. (°C)		T _g (°C)	ΔH_g (J/g)
AG	228.52	245.75	278.89	286.05	2.04	85.86	80.26
GP	-	-	265.88	330.61	27.71	77.85	118.25
AG/GP	140.96	164.58	249.09	259.65	25.80	70.69	30.93
C ¹	152.06	178.19	251.01	262.71	26.12	75.93	101.70
C ²	164.78	175.94	249.04	259.96	24.33	76.73	129.46
C ³	158.85	173.94	231.07	257.66	22.22	82.01	93.75
C ⁴	157.51	177.57	217.86	244.59	17.51	77.75	21.64
PCs ¹	154.89	175.77	244.31	261.87	24.87	79.38	111.05

T inicio: Temperatura de inicio de la descomposición de la película.

T máx.: Temperatura máxima de descomposición de la película.

T_g: Temperatura de transición vítrea.

ΔH_g : Calor latente de fusión. AG/GP: Película de agar y gelatina. PCs: Procianidinas.

C¹⁻⁴: Diferentes concentraciones de extracto fenólico (0.066, 0.166, 0.33 y 1 mg polvo/mL).

Propiedades antioxidantes.

La incorporación de antioxidantes en los empaques, constituye una técnica muy prometedora para prolongar la vida útil del producto. Además, el incorporar compuestos fenólicos con propiedades antioxidantes en películas de distintos materiales poliméricos mejoran las propiedades nutricionales, mecánicas, ópticas, sin afectar la integridad del producto alimenticio (Li *et al.* 2014). Los métodos más ampliamente utilizados son los ensayos de los radicales ABTS y DPPH, basados en mediciones de degradación de color de los mismos (Moo Huchin *et al.* 2015).

El Cuadro 9 refleja que las concentraciones de 1mg/mL de extracto fenólico presentó 78.16% de inhibición del radical ABTS, presentando diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$). A concentraciones más bajas de extracto fenólico presentó valores bajos de inhibición sin diferencias estadísticamente significativas ($P > 0.05$). La capacidad de eliminación de radical DPPH, es un método crucial para medir las propiedades antioxidantes. Los valores sobre la actividad antioxidante del extracto fenólico y procianidinas extraídos del salvado de sorgo, mediante la eliminación de radicales DPPH, indican que la concentración de 1mg/mL de extracto fenólico presentó inhibición del 92.67%, mostrando diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) con las concentraciones de 0.33 mg/mL, 0.166 mg/mL y 0.066 mg/mL. Muñoz *et al.* (2014) estudiaron la actividad antioxidante en extractos de hojas de laurel, cilantro y amarantaceae, reportando valores de 94 % de inhibición del radical DPPH con las hojas de laurel, siendo similares a las halladas en el presente trabajo . Al mismo tiempo, se determinó capacidad antioxidante determinando el equivalente de Trolox (TEAC), obteniendo valores de 41.16 $\mu\text{mol ET/película}$.

Los valores de TEAC encontrados en las concentraciones iniciales de extracto fenólico y procianidinas, son superiores a los informados para salvado de maíz trigo (38.47 $\mu\text{mol ET g}^{-1}$) y salvado de trigo (11.46 $\mu\text{mol ET g}^{-1}$) (Urías *et al.* 2016). Por otro lado, (Carmelo 2015) reporto valores de 3.81 y 2.22 mmol Eq Trolox g⁻¹ muestra, para las PCs y el extracto fenólico, respectivamente.

Cuadro 9. Propiedades antioxidantes determinadas mediante los ensayos ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) y 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) a las concentraciones iniciales de los extractos fenólicos y procianidinas incorporadas.

Concentraciones	Inhibición ABTS (%)	Inhibición DPPH (%)	$\mu\text{mol ET/película}$
Extracto Fenólico (mg/mL)*			
0.066	10.90 \pm 2.49 ^C	10.56 \pm 1.29 ^D	2.72
0.166	14.59 \pm 0.19 ^C	27.23 \pm 1.06 ^C	6.83
0.33	27.13 \pm 1.37 ^B	50.09 \pm 2.45 ^B	13.58
1	78.16 \pm 4.46 ^A	92.67 \pm 0.59 ^A	41.16
PCs (mg/mL)			
0.066	11.10 \pm 3.53 ^C	27.37 \pm 2.58 ^C	4.43

* mg de polvo de extracto fenólico y procianidinas liofilizado/ml de agua HPLC

ET: Equivalente Trolox

Los resultados se representan como media \pm desviación estándar.

^{A-D} Las diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Por lo tanto, se puede concluir que, utilizando una concentración de 1 mg/mL de extracto fenólico, es posible incrementar la capacidad de inhibición de radicales libres de DPPH y ABTS. Giménez *et al.*(2013) reportaron que la presencia de gelatina afecta la liberación de compuestos polifenólicos disminuyendo la actividad antioxidante, por la posible formación de complejos polifenoles-proteínas. (Staszewski *et al.* 2011) resaltan que las interacciones con proteínas generan una disminución de la capacidad antioxidante de los compuestos polifenólicos.

Microscopía Electrónica de Barrido(MEB).

La Figura 1, muestra la MEB de la película de agar y gelatina. Puede observarse que la superficie de la película presentó homogeneidad sin burbujas ni irregularidades como porosidad. Por otro lado, en la película de gelatina pura mostró una superficie quebradiza y frágil por la ausencia de glicerol, el cuál le brinda flexibilidad. En la Figura 2, se observan las películas de agar y gelatina aditivadas con diferentes concentraciones de extracto fenólico y procianidinas. Demostrando una superficie homogénea, sin cambios con respecto a las películas de agar-gelatina, con excepción de la concentración C4 (1mg/mL), donde inicia la formación de dos fases. Estas similitudes estructurales en las películas se relacionan con la PVA obtenidas en todos los casos.

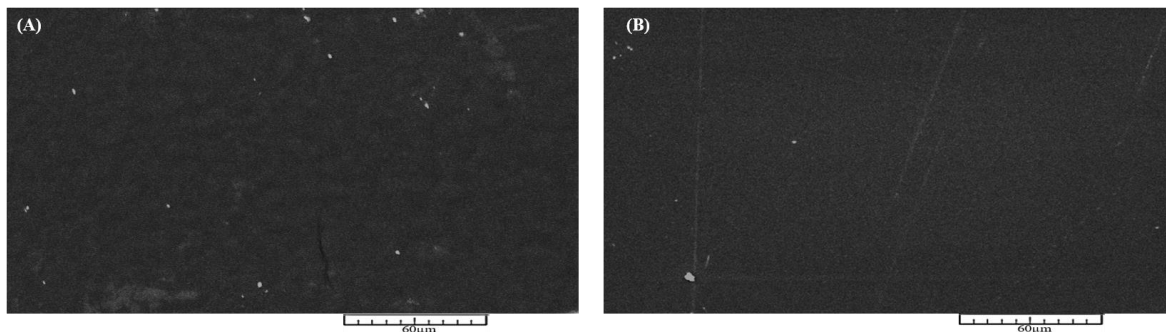


Figura 1. Micrografías de superficie de la película de agar (A) y la película de gelatina (B) a 1000x de resolución.

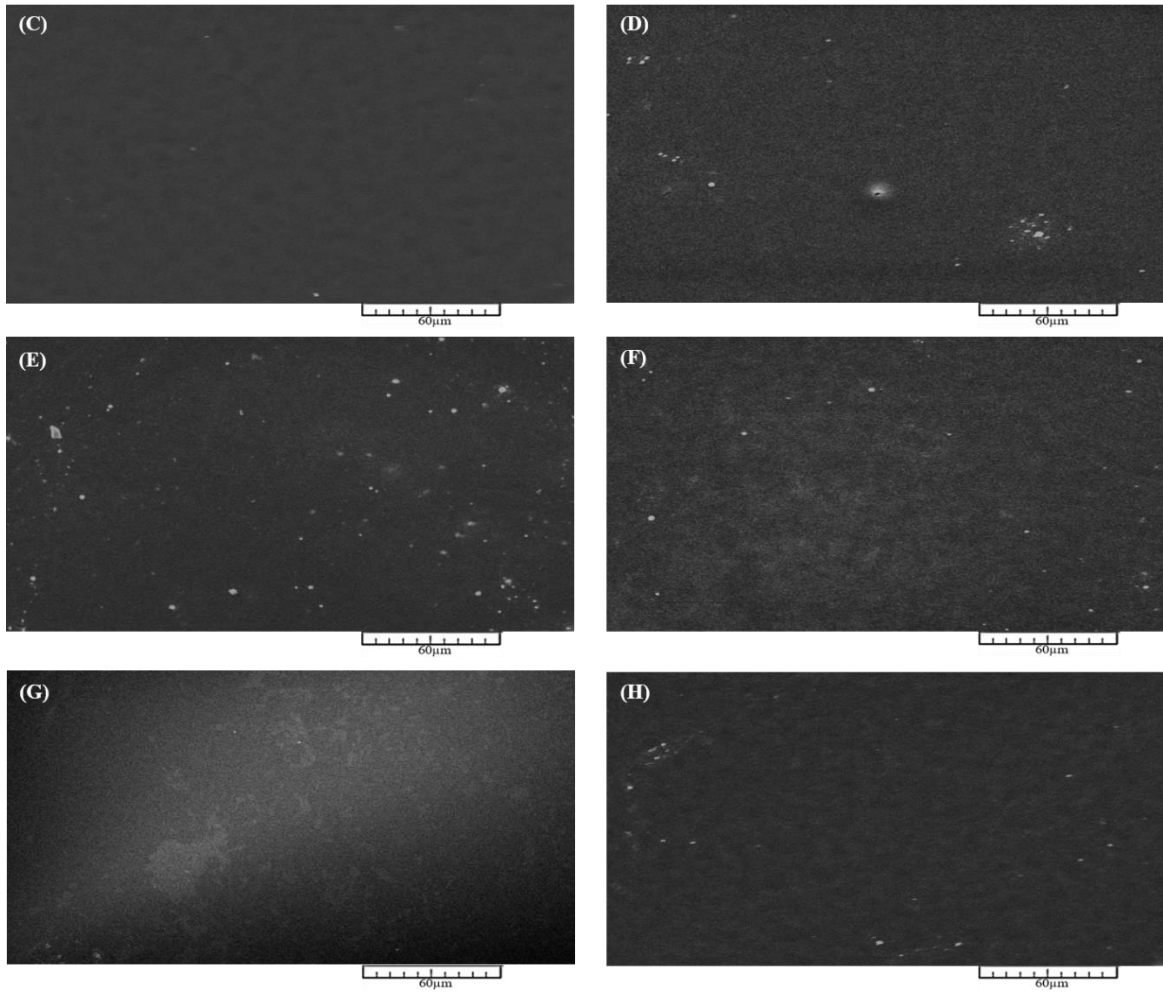


Figura 2. Micrografías de superficie de la película de agar-gelatina (C), agar gelatina con extracto fenólico a 0.066 mg/mL(D), 0.166 mg/mL(E), 0.333 mg/mL (F), 1 mg/mL (G) y con 0.066 mg/mL de procianidinas (H) a 1000x de resolución.

4. CONCLUSIONES

- La incorporación de 66.67% de agar y 33.33% de gelatina produjo una alta compatibilidad entre polímeros, generando entrecruzamientos en sus estructuras, desarrollando una matriz polimérica idónea para la incorporación de sustancias bioactivas.
- La incorporación de compuestos fenólicos en la película de agar y gelatina mejoró la barrera de permeabilidad al vapor de agua, y afectó ligeramente las propiedades mecánicas, ópticas y de solubilidad, presentando cambios a medida que incrementa la concentración del extracto fenólico de salvado de sorgo.
- A concentración de 1 mg/mL el extracto fenólico incrementó la inhibición de radicales libres hasta un 90%, demostrando que los compuestos fenólicos incorporados en la película presentan actividad antioxidante.

5. RECOMENDACIONES

- Realizar ensayos con diferentes concentraciones de plastificantes considerando la miscibilidad que se forme entre los biopolímeros.
- Implementar otras técnicas de incorporación de compuestos fenólicos en la matriz polimérica.
- Evaluar la degradación y capacidad antimicrobiana de los compuestos fenólicos al liberarse de la matriz de la película.
- Aplicar la película comestible complementada o solo con compuestos fenólicos en productos cárnicos u otros alimentos incluyendo frutos cortados y exponiéndolos a diferentes condiciones.

6. LITERATURA CITADA

AACC (American Association of Cereal Chemists). 2000. Method 44-15.02. (Humedad). 10th ed. St. Paul, MN. American Association of Cereal Chemists.

Arham R, Mulyati M, Metusalach M, Salengke S. 2016a. Physical and mechanical properties of agar based edible film with glycerol plasticizer. *International Food Research Journal*. 23(4):1669–1675.

Arts M, Haenen G, Wilms L, Beetstra S, Heijnen C, Voss H, Bast A. 2002. Interactions between Flavonoids and Proteins: Effect on the Total Antioxidant Capacity. *J Agric Food Chem*. 50(5):1184–1187. doi:10.1021/jf010855a.

Attaran S, Hassan A, Wahit M. 2015. Materials for food packaging applications based on bio-based polymer nanocomposites. *Journal of Thermoplastic Composite Materials*. 30(2):143–173. doi:10.1177/0892705715588801.

Awika J, McDonough C, Rooney L. 2005. Decorticating sorghum to concentrate healthy phytochemicals. *J Agric Food Chem*. 53(16):6230–6234. eng. doi:10.1021/jf0510384.

Awika J, Rooney L. 2004. Sorghum phytochemicals and their potential impact on human health. *Phytochemistry*. 65(9):1199–1221. doi:10.1016/j.phytochem.2004.04.001.

Carmelo F. 2015. Caracterización teórico- experimental de la estructura y propiedades antirradicales en procianidinas aisladas de salvado de sorgo café. Hermosillo, Sonora.: 85 p.

Da Rocha M, Alemán A, Romani V, López M, Gómez M, Montero P, Prentice C. 2018. Effects of agar films incorporated with fish protein hydrolysate or clove essential oil on flounder (*Paralichthys orbignyanus*) fillets shelf-life. *Food Hydrocolloids*. 81:351–363. doi:10.1016/j.foodhyd.2018.03.017.

Dudonné S, Vitrac X, Coutière P, Woillez M, Mérillon J-M. 2009. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *J Agric Food Chem*. 57(5):1768–1774. eng. doi:10.1021/jf803011r.

Embuscado ME, Huber KC. 2009. *Edible Films and Coatings for Food Applications*: Springer New York. ISBN: 9780387928241.

FAO. 1995. Sorghum and millets in human nutrition. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nation; [actualizado 2007]. Chemical composition and nutritive value.

FAOSTAT. 2014-2016. Estadísticas: Food and Agricultural Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/faostat/en/>.

García C, Vargas I, Azamar J, Madera T. 2014. Biodegradable agar films with natural semiochemical extract: Effect of extract concentration on physicochemical and release properties. *J Biobased Mat Bioenergy*. 8(3):363–369. doi:10.1166/jbmb.2014.1442.

Giménez B, López de Lacey A, Pérez E, López M, Montero P. 2013. Release of active compounds from agar and agar–gelatin films with green tea extract. *Food Hydrocolloids*. 30(1):264–271. doi:10.1016/j.foodhyd.2012.05.014.

Gu L, Kelm M, Hammerstone J, Beecher G, Cunningham D, Vannozzi S, Prior RL. 2002. Fractionation of Polymeric Procyanidins from Lowbush Blueberry and Quantification of Procyanidins in Selected Foods with an Optimized Normal-Phase HPLC–MS Fluorescent Detection Method. *J Agric Food Chem*. 50(17):4852–4860.

Gutiérrez TJ, Tapia MS, Pérez E, Famá L. 2015. Structural and mechanical properties of edible films made from native and modified cush-cush yam and cassava starch. *Food Hydrocolloids*. 45:211–217. doi:10.1016/j.foodhyd.2014.11.017.

Hosseini SF, Javidi Z, Rezaei M. 2016. Efficient gas barrier properties of multi-layer films based on poly(lactic acid) and fish gelatin. *International Journal of Biological Macromolecules*. 92:1205–1214. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.08.034.

Hosseini SF, Rezaei M, Zandi M, Farahmandghavi F. 2015. Fabrication of bio-nanocomposite films based on fish gelatin reinforced with chitosan nanoparticles. *Food Hydrocolloids*. 44:172–182. doi:10.1016/j.foodhyd.2014.09.004.

Li JH, Miao J, Wu JL, Chen SF, Zhang QQ. 2014. Preparation and characterization of active gelatin-based films incorporated with natural antioxidants. *Food Hydrocolloids*. 37:166–173. doi:10.1016/j.foodhyd.2013.10.015.

López O, Castillo L, Farenzena S, Pintos E, Rodríguez M, García M, Villar M. 2018. Biodegradable films based on thermoplastic starch and chitosan with antimicrobial activity employed as active packaging. *Matéria (Rio de Janeiro)*. 23(2). doi:10.1590/s1517-707620180002.0423.

Majeed K, Jawaid M, Hassan A, Abu Bakar A, Abdul Khalil HPS, Salema AA, Inuwa I. 2013. Potential materials for food packaging from nanoclay/natural fibres filled hybrid composites. *Materials y Design*. 46:391–410. doi:10.1016/j.matdes.2012.10.044.

- Martins JT, Cerqueira MA, Vicente AA. 2012. Influence of α -tocopherol on physicochemical properties of chitosan-based films. *Food Hydrocolloids*. 27(1):220–227. doi:10.1016/j.foodhyd.2011.06.011.
- Michalkiewicz A, Biesaga M, Pyrzynska K. 2008. Solid-phase extraction procedure for determination of phenolic acids and some flavonols in honey. *J Chromatogr A*. 1187(1-2):18–24. eng. doi:10.1016/j.chroma.2008.02.001.
- Mohajer S, Rezaei M, Hosseini SF. 2017. Physico-chemical and microstructural properties of fish gelatin/agar bio-based blend films. *Carbohydrate Polymers*. 157:784–793. doi:10.1016/j.carbpol.2016.10.061.
- Montalvo C, López A, Palou E. 2012. Películas comestibles de proteína: características, propiedades y aplicaciones. *Temas de selectos de ingeniería de alimentos*. 6-2:32-46.
- Moo Huchin V, Moo Huchin M, Estrada R, Cuevas L, Estrada I, Ortiz E, Betancur D. 2015. Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruits from Yucatan, Mexico. *Food Chemistry*. 166:17–22. doi:10.1016/j.foodchem.2014.05.127.
- Muñiz DB, Rodríguez R, Balagurusamy N, Carrillo ML, Belmares R, Contreras JC, Nevárez GV, Aguilar CN. 2014. Phenolic content and antioxidant capacity of extracts of *Laurus nobilis* L., *Coriandrum sativum* L. and *Amaranthus hybridus* L.; 12(3):271-276.
- Pellegrini N, Serafini M, Colombi B, Del Rio D, Salvatore S, Bianchi M, Brighenti F. 2003. Total Antioxidant Capacity of Plant Foods, Beverages and Oils Consumed in Italy Assessed by Three Different In Vitro Assays. *J Nutr*. 133(9):2812–2819. doi:10.1093/jn/133.9.2812.
- Reddy JP, Rhim JW. 2014. Characterization of bionanocomposite films prepared with agar and paper-mulberry pulp nanocellulose. *Carbohydrate Polymers*. 110:480–488. doi:10.1016/j.carbpol.2014.04.056.
- Rhim JW, Wang LF, Lee Y, Hong SI. 2014. Preparation and characterization of bionanocomposite films of agar and silver nanoparticles: Laser ablation method. *Carbohydrate Polymers*. 103:456–465. doi:10.1016/j.carbpol.2013.12.075.
- RhimaL JW, Wanga LF, Hong SI. 2013. Preparation and characterization of agar/silver nanoparticles composite films with antimicrobial activity. *Food Hydrocolloids*. 33(2):327–335. doi:10.1016/j.foodhyd.2013.04.002.
- Rivadeneira J, Carina Audisio M, Boccaccini AR, Gorustovich AA. 2013. In vitro antistaphylococcal effects of a novel 45S5 bioglass/agar-gelatin biocomposite films. *J Appl Microbiol*. 115(2):604–612. eng. doi:10.1111/jam.12254.
- Rivero S, García M, Pinotti A. 2010. Correlations between structural, barrier, thermal and mechanical properties of plasticized gelatin films. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 11(2):369–375. doi:10.1016/j.ifset.2009.07.005.

Salazar NJ, González GA, Loarca G, Cinco FJ, Rouzaud O, Domínguez JA, Robles M. 2017. Contribution and interactions of hydroxycinnamic acids found in bran and wholegrain sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench): Effects on the antioxidant capacity and inhibition of human erythrocyte hemolysis. *Oxid Med Cell Longev*. 2017:8219023. eng. doi:10.1155/2017/8219023.

Salgado PR, Ortiz CM, Musso YS, Di Giorgio L, Mauri AN. 2015. Edible films and coatings containing bioactives. *Current Opinion in Food Science*. 5:86–92. doi:10.1016/j.cofs.2015.09.004.

SIAP. 2016. Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera. Atlas Agroalimentario. México: SIAP. http://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2016/Atlas-Agroalimentario-2016.

Somboon N, Karrila T, Kaewmanee T, Karrila S. 2014. Properties of gels from mixed agar and fish gelatin. *International Food Research Journal*. 21(2):485–492.

Staszewski M, Pilosof A, Jagus R. 2011. Antioxidant and antimicrobial performance of different Argentinean green tea varieties as affected by whey proteins. *Food Chemistry*. 125(1):186–192. doi:10.1016/j.foodchem.2010.08.059.

Urías V, Basilio J, Muy Rangel D, Niño G. 2016. Ácidos fenólicos con actividad antioxidante en salvado de maíz y salvado de trigo. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*. 3(7):43–50.

Valdés A, Mellinas A, Ramos M, Garrigós M, Jiménez A. 2014. Natural additives and agricultural wastes in biopolymer formulations for food packaging. *Front Chem*. 2:6. eng. doi:10.3389/fchem.2014.00006.

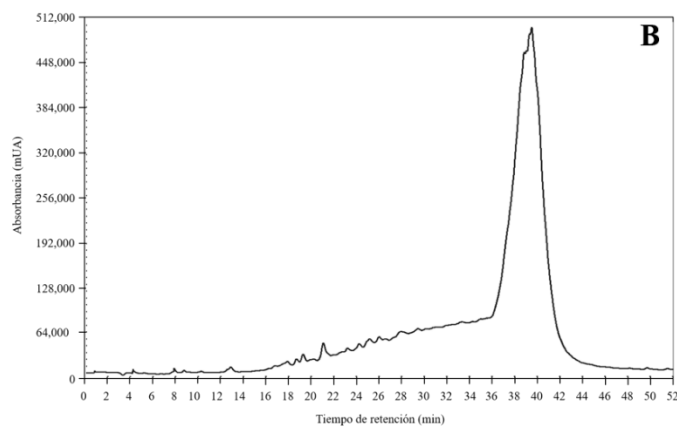
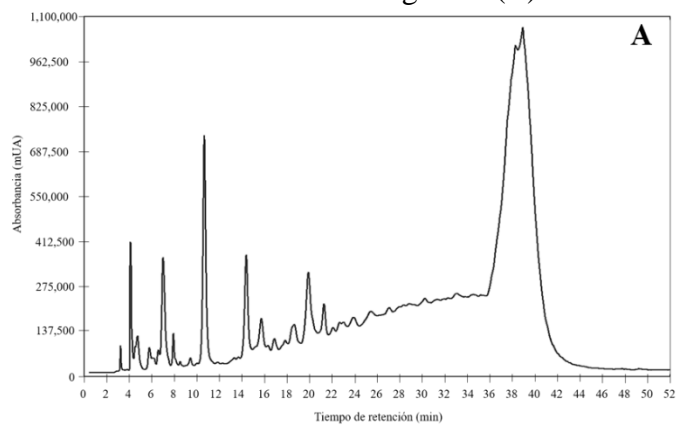
Valladares A. KP. 2017. Efectividad antimicrobiana de películas de quitosano, poli adipato (co-tereftalato de butileno) y almidón de yuca en carne fresca. [sin lugar]: Zamorano: Escuela Agrícola Panamericana, 2017. spa. <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/6076/1/AGI-2017-054.pdf>.

Vejdan A, Ojagh S, Adeli A, Abdollahi M. 2016. Effect of TiO₂ nanoparticles on the physico-mechanical and ultraviolet light barrier properties of fish gelatin/agar bilayer film. *LWT - Food Science and Technology*. 71:88–95. doi:10.1016/j.lwt.2016.03.011.

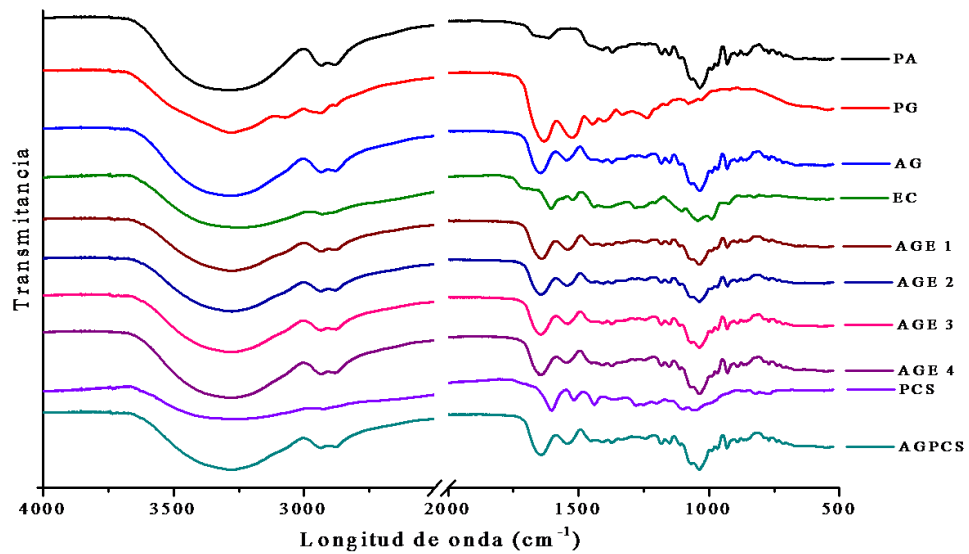
Xu BJ, Chang SKC. 2007. A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *J Food Sci*. 72(2):S159-66. eng. doi:10.1111/j.1750-3841.2006.00260.x

7. ANEXOS

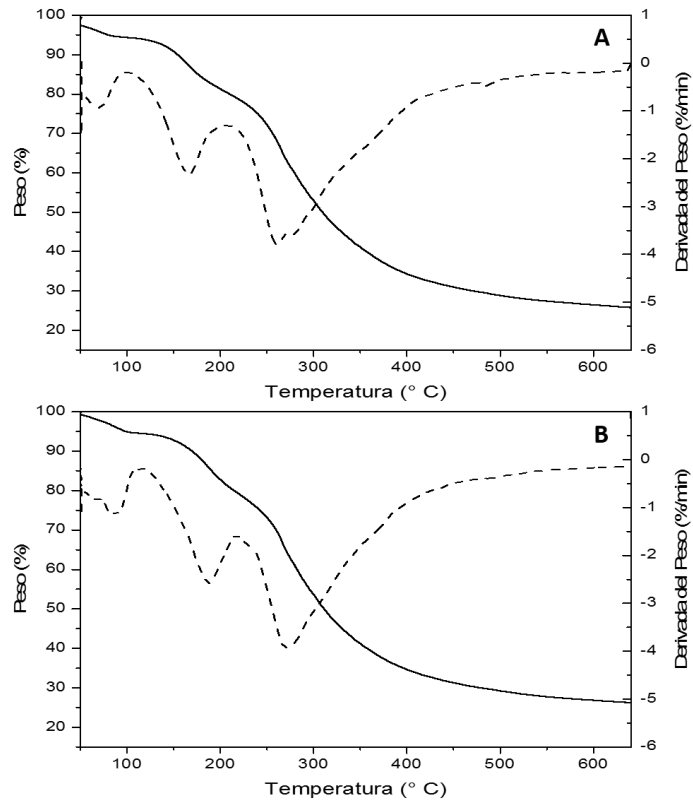
Anexo 1. Cromatogramas HPLC-UV-Vis en fase reversa del extracto fenólico completo (A) y la fracción de PCs aislada de salvado de sorgo café(B).



Anexo 2. Espectro FTIR de las películas comestibles de agar, gelatina, agar-gelatina con diferentes concentraciones de extracto fenólico (0.066,0.166,0.33 y 1 mg/mL) y procianidinas (0.066 mg/mL).



Anexo 3. Espectros de TGA con las derivadas (A) película de agar y gelatina y (B) película de agar-gelatina y extracto fenólico de 0.0666 mg/mL.



Anexo 4. Películas comestibles de agar y gelatina aditivada con diferentes concentraciones de extracto fenólico de salvado de sorgo.

