

CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA, MECÁNICA Y ESTRUCTURAL DE PELÍCULAS DE ALMIDONES OXIDADOS DE AVENA Y PLÁTANO ADICIONADAS CON BETALAÍNAS

PHYSICOCHEMICAL, MECHANICAL, AND STRUCTURAL FEATURES OF OXIDIZED OAT AND BANANA STARCH FILMS ENRICHED WITH BETALAINS

Paul B. Zamudio-Flores^{1*}, Emilio Ochoa-Reyes¹, José de J. Ornelas-Paz¹, Juan M. Tirado-Gallegos¹, Luis A. Bello-Pérez², Anilú Rubio-Ríos³, Rosario G. Cárdenas-Félix³

¹Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Unidad Cuauhtémoc, Fisiología y Tecnología de alimentos de la Zona Templada. 31570. Avenida Río Conchos s/n, Parque Industrial, Ciudad Cuauhtémoc, Chihuahua, México. (pzamudio@ciad.mx). ²Instituto Politécnico Nacional, CEPROBI. 62731. Km. 8.5 carretera Yautepec-Jojutla, colonia San Isidro, Yautepec, Morelos, México. ³Grupo BAFAR S. A. B. de C. V. a través de su subsidiaria AIA, S. A. de C. V. 31450. Km. 7.5 carretera a Cuauhtémoc s/n, colonia Las Ánimas, Chihuahua, Chihuahua, México.

RESUMEN

El almidón es una alternativa para elaborar películas biodegradables y reducir el problema de contaminación ambiental generada por los plásticos sintéticos. Para ello se buscan materiales inocuos, con propiedades similares a los plásticos comunes y, de manera reciente, que tengan una funcionalidad adicional. Por ello, el objetivo de este estudio fue elaborar películas con almidones oxidados de plátano y avena adicionadas con betalaínas. El diseño experimental fue completamente aleatorizado con cuatro tratamientos y se realizó ANDEVA de una vía con una prueba de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$). Las películas de almidón oxidado de plátano presentaron valores mayores de tensión a la fractura (5.7 MPa) y módulo de elasticidad (7.2 MPa), pero su porcentaje de elongación fue menor (25 %) en comparación con las películas de almidón oxidado de avena (1.6 MPa en tensión a la fractura, 0.2 MPa módulo de elasticidad, y 127 % de elongación). La adición de betalaínas aumentó el porcentaje de elongación en las películas de almidón sin afectar otras propiedades mecánicas, y además aumentó la permeabilidad al vapor de agua. La difracción de rayos X mostró una posible interacción entre el almidón oxidado de plátano y la betalaína. La modificación química por oxidación de los almidones de plátano y avena confirmó propiedades fisicoquímicas y funcionales a las películas para usarse como materiales de

ABSTRACT

Starch is an alternative for developing biodegradable films that reduces the problem of environmental pollution generated by synthetic plastics. Safe materials with this characteristics must looked after, with similar properties to those of common plastics and, rather recently, they should have additional functionality. Therefore, the objective of this study was to produce films with oxidized starches of banana and oats with added betalains. The experimental design was completely random with four treatments. A one way ANOVA was carried out and means comparison was assessed with the Tukey statistical test ($p \leq 0.05$). The oxidized banana starch films presented higher tensile strenght values (5.7 MPa) and elastic modulus (7.2 MPa), but its percentage of elongation was lower (25 %) compared with the films of oxidized oat starch (1.6 MPa in stress fracture, 0.2 MPa modulus of elasticity, and 127 % elongation). The addition of betalains increased the elongation percentage in the starch films without affecting other mechanical properties, and further increased the permeability to water vapor. The x-rays diffraction showed a possible interaction between the oxidized banana starch and the betalain. Chemical modification by oxidation of the starches conferred physicochemical and functional properties to the films for packaging materials and polymeric matrices use via the incorporation of betalains.

*Autor responsable ❖ Author for correspondence.

Recibido: septiembre, 2014. Aprobado: junio, 2015.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 49: 483-498. 2015.

Key words: Biodegradable films, chemical modification, mechanical properties, water vapor permeability, antioxidants.

empaques y como matrices poliméricas para la incorporación de betalainas.

Palabras clave: Películas biodegradables, modificación química, propiedades mecánicas, permeabilidad al vapor de agua, antioxidantes.

INTRODUCCIÓN

El almidón es un carbohidrato utilizado para elaborar plásticos biodegradables debido a su bajo costo, biodisponibilidad y productos de degradación no tóxicos. Por ello se buscan fuentes alternativas para aislar almidón, como frutos en estado inmaduro (verde) y cereales subutilizados (Bello-Pérez y Paredes-López, 2009). El almidón en su forma nativa presenta limitaciones, como baja resistencia a los esfuerzos al corte, descomposición térmica, alta retrogradación y sinéresis, los cuales limitan su aplicación industrial, pero pueden ser superados por su modificación química (Simsek *et al.*, 2012). El almidón oxidado tiene propiedades de formación de película (Zhang *et al.*, 2009), con mejores propiedades mecánicas que las obtenidas con el almidón nativo (Zamudio-Flores *et al.*, 2006). Además, el consumo de pigmentos, vitaminas, fibra dietética y compuestos fenólicos puede ayudar a reducir el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares y cáncer (Yahia, 2010). Los mecanismos de los efectos protectores de estos compuestos no se conocen por completo, pero pueden deberse a su actividad antioxidante que les permite neutralizar radicales libres que desencadenan diversas patologías (Ferruzzi y Blakeslee, 2007). Las betalainas se encuentran en los vegetales (*e. g.* betabel y tunas) y se usan como pigmentos en los jugos de frutas, pero el potencial industrial es mayor debido a su capacidad antioxidante (Butera *et al.*, 2002) y hay actividad anticancerígena en humanos (Zou *et al.*, 2005). Además hay investigaciones acerca de películas y recubrimientos de otros polisacáridos mezclados con agentes antioxidantes aplicados en frutas. Así, Brancoli y Barbosa-Cánovas (2000) evitaron el pardeamiento enzimático en rodajas de manzana usando un recubrimiento de metilcelulosa y maltodextrina con ácido ascórbico, mientras que Rojas-Graü *et al.* (2007 y 2008) confirman el potencial de una película de alginato como transportador de antioxidantes (cisteína y glutatión) en trozos de manzana,

INTRODUCTION

Starch is a carbohydrate used to make biodegradable plastics due to its low cost, availability and the non-toxic degradation characteristics of its products. For these reasons alternative methods to isolate starch are looked after, like immature fruits (green) and underutilized cereals (Bello-Pérez and Paredes-López, 2009). Starch in its native form has limitations, such as low resistance to cut effort, thermal decomposition, high retrogradation and syneresis, which limited its industrial application. Still, these may be overcome by chemical modification (Simsek *et al.*, 2012). Oxidized starch has film-forming properties (Zhang *et al.*, 2009) with better mechanical properties than those obtained with native starch (Zamudio-Flores *et al.*, 2006). In addition, the pigments consumption, vitamins, dietary fiber and phenolic compounds can help reduce risk of cardiovascular diseases and cancer (Yahia, 2010). The mechanisms of the protective effects of these compounds are not completely known, but may be due to its antioxidant activity that allows them to neutralize free radicals that trigger various pathologies (Ferruzzi and Blakeslee, 2007). Betalains are found in vegetables (*e. g.* beet and prickly pear) and used as pigments in fruit juices, but their industrial potential is greater due to its antioxidant capacity (Butera *et al.*, 2002) and anticancer activity in humans (Zou *et al.*, 2005). There is also research about films and coatings of other polysaccharides blended with antioxidant agents applied in fruits. Thus, Brancoli and Barbosa-Cánovas (2000) prevented enzymatic browning in apple slices using a methylcellulose and maltodextrin with ascorbic acid coating, while Rojas-Graü *et al.* (2007 and 2008) confirms the potential of alginate films as carriers of antioxidants (cysteine and glutathione) in pieces of apple, avoiding browning during more than 20 days of storage.

The development of films from oxidized banana starch that incorporate antimicrobials as Chitosan (Zamudio-Flores *et al.*, 2010a), with biodegradable synthetic polymers such as polyvinyl-alcohol (Palma-Rodríguez *et al.*, 2012), and non-biodegradable low density polyethylene (Vargas-Torres *et al.*, 2008), shows the versatility of this starch to be mixed with various compounds to improve or change its physicochemical and functional properties.

evitando el pardeamiento durante más de 20 días de almacenamiento.

La elaboración de películas a base de almidón oxidado de plátano con la incorporación de antimicrobianos como el quitosano (Zamudio-Flores *et al.*, 2010a), con polímeros sintéticos biodegradables como el polivinil-alcohol (Palma-Rodríguez *et al.*, 2012), y no biodegradables como el polietileno de baja densidad (Vargas-Torres *et al.*, 2008), mostraron la versatilidad de este almidón para mezclarse con diversos compuestos y mejorar o cambiar sus propiedades fisicoquímicas y funcionales.

En la literatura revisada no hay reportes sobre la factibilidad de emplear extractos de betalaínas con almidones oxidados de fuentes vegetales subutilizadas (como la avena y el plátano) para la elaboración de películas y como la adición de las betalaínas modifican sus propiedades mecánicas y de barrera. Por ello el objetivo de este estudio fue elaborar películas con almidones oxidados de avena y plátano adicionadas con betalaínas y caracterizarlas mediante métodos fisicoquímicos, mecánicos y estructurales.

MATERIALES Y MÉTODOS

En este estudio se usaron lotes de 5 kg de granos de avena (*Avena sativa* L. cv. *Bachiniva*) descascarillados en estado seco (maduro) procedentes de Canadá, adquiridos de Avenas del Norte S. A. de C. V. (Ciudad Cuauhtémoc, Chihuahua, México). Además se usaron plátanos machos (*Musa paradisiaca* L.) en estado fisiológico inmaduro, los cuales se compraron en el mercado de Cuautla, estado de Morelos. El glicerol (99 % pureza) y los demás reactivos usados fueron de grado analítico y se adquirieron de Sigma-Aldrich Co. (Toluca, Estado de México).

Almidón de avena y plátano

Para obtener el almidón de avena se usó el método de la molienda húmeda (Bello-Pérez *et al.*, 2010); los granos de avena se remojaron (16-24 h) en una solución amortiguadora de acetato de sodio (0.02 M) y se ajustó el pH a 6.5 con una solución amortiguadora de acetato de sodio 2 M. La relación de grano/solución de remojo fue 1:2 (p/v). La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente (20 ± 3 °C) y fue agitada 24 h por periodos de 30 min. La solución se desechó, los granos se lavaron con agua destilada, se molieron (150 g) en una licuadora (Waring Laboratory, modelo 38BL54, Torrington, Connecticut, EE.UU.) con 500 mL de agua a la máxima velocidad por 1.5 min. La mezcla se tamizó con las mallas estándar ASTM no.

In the reviewed literature, no reports were found on the feasibility of using betalain extracts with oxidized starches from underutilized vegetable sources (such as oats and bananas) for the production of films and how the addition of betalains modify its mechanical and barrier properties. Therefore the objective of this study was to produce films with oatmeal and banana oxidized starches added with betalains, and to characterize them by physicochemical, mechanical, and structural methods.

MATERIALS AND METHODS

In this study 5 kg lots of oats (*Avena sativa* L. cv. *Bachiniva*) shelled and dry (mature), from Canada, were used. This was acquired from Avenas del Norte S. A. de C. V. (Ciudad Cuauhtémoc, Chihuahua, México). Also, physiologically immature plantains (*Musa paradisiaca* L.) were used, which were purchased on the local market at Cuautla, Morelos, México. Glycerol (99 % purity) and other reagents used were of analytical grade and, purchased from Sigma-Aldrich Co. (Toluca, Estado de México).

Starch from oatmeal and bananas

To obtain the oat starch, the wet milling method was used (Bello-Pérez *et al.*, 2010); oats grains were soaked (16-24 h) in a sodium acetate buffer solution (0.02 M); the pH was adjusted to 6.5 with a 2 M sodium acetate buffer. The grain ratio: soaking solution was 1:2 (w/v). The mixture was kept at room temperature (20 ± 3 °C), and was stirred in 30 min periods for 24 h. The solution was then discarded; grains were then washed with distilled water, grounded (150 g) in a blender (Waring Laboratory model 38BL54, Torrington, Connecticut, USA) with 500 mL of water at maximum speed for 1.5 min. The mixture was sieved with an ASTM standard mesh no. 40 (425 μ m), 100 (150 μ m), 200 (75 μ m), 270 (53 μ m) and 325 (45 μ m) using an electric sieve shaker (Retsch AS 200 model Control, Haan, Germany). The resulting filtering was dried (40 °C) in an oven (VWR, Scientific Products, 1370GM-2 model, Cornelius, Oregon, USA) for 24 h. Banana starch was isolated following the methodology reported by Flores-Gorosquera *et al.* (2004). Peeled fruits were cut into 5-6 cm (3 kg in total weight) cubes, and immediately immersed in a citric acid aqueous solution (0.5 g L⁻¹), were then grounded at low speed in a Waring blender (38BL54 model, Torrington, Connecticut, USA) with 500 mL for 1.5 min. The mixture was sieved by ASTM standard mesh no. 40 (425 μ m), 100 (150 μ m), 200 (75 μ m), 270 (53 μ m) and 325 (45 μ m) using

40 (425 μm), 100 (150 μm), 200 (75 μm), 270 (53 μm) y 325 (45 μm) usando una tamizadora eléctrica (Retsch, modelo AS 200 Control, Haan, Alemania). Finalmente, se secó el filtrado (40 °C) en una estufa (VWR, Scientific Products, modelo 1370GM-2, Corneliuss, Oregon, USA) por 24 h. El almidón de plátano se aisló de acuerdo con la metodología reportada por Flores-Gorosquera *et al.* (2004). Los frutos se pelaron, y se cortaron en cubos de 5-6 cm (3 kg en peso total), y se sumergieron inmediatamente en una solución acuosa de ácido cítrico (0.5 g L⁻¹), después se molieron a baja velocidad en una licuadora Waring (modelo 38BL54, Torrington, Connecticut, EE.UU.) con 500 mL por 1.5 min. La mezcla se tamizó por las mallas estándar ASTM no. 40 (425 μm), 100 (150 μm), 200 (75 μm), 270 (53 μm) y 325 (45 μm) con una tamizadora eléctrica (Restch, modelo AS 200 Control, Hann, Alemania). El filtrado se secó (40 °C) en una estufa (VWR, Scientific Products, modelo 1370GM-2, Corneliuss, Oregon, EE.UU.) por 24 h.

Oxidación de los almidones

Almidón (200 g, base seca) se pesaron y colocaron en un vaso de 2 L se pesaron y se agregaron 371 mL de agua destilada. La mezcla se mantuvo a 35 °C y se ajustó a un pH de 9.5 con NaOH 2 N. Gota a gota se adicionaron, 100 mL de NaOCl al 0.5 % de cloro activo, manteniendo un pH de 9.5 con H₂SO₄ 1 N. Terminada la adición del NaOCl, se mantuvo el pH a 9.5 agregando NaOH 2 N durante 30 min como lo reportan Zamudio-Flores *et al.* (2006). La mezcla se ajustó a un pH de 7 con H₂SO₄ 1 N, se filtró al vacío y se lavó dos veces con agua desionizada; la pasta húmeda se secó 48 h a 40 °C. Los almidones se molieron y tamizaron en malla 100 US (150 μm).

Cuantificación de grupos carbonilo y carboxilo en almidones oxidados

El nivel de oxidación de los almidones se determinó por la cuantificación de los grupos carbonilo y carboxilo. El contenido de grupos carbonilo se determinó mediante el método de titulación propuesto por Smith (1967). El contenido de grupos carbonilo se calculó así:

$$\% \text{ Carbonillos} = \frac{[(\text{blanco-muestra})\text{mL} \times \text{N ácido} \times 0.028 \times 100]}{\text{Peso muestra (base seca) en g}} \quad (1)$$

Se utilizó 1 g de almidón (base seca) a la concentración de 1 % p/v. En promedio de tres repeticiones se consumieron 4.2 mL de blanco y $\approx$ 4.0 mL de muestra.

El contenido de grupos carboxilo de los almidones oxidados se determinó con el procedimiento modificado por

an electric sieve shaker (Restch, AS 200 model Control, Hann, Germany). The resulting filtering were dried (40 °C) in an oven (VWR Scientific Products, 1370GM-2 model, Corneliuss, Oregon, USA) for 24 h.

Starch oxidation

Starch (200 g, dry basis) were weighed and poured into a 2 L beaker, and 371 mL of distilled water added. The mixture was maintained at 35 °C, and its pH adjusted to 9.5 with 2 N NaOH. Drop by drop 100 mL of NaOCl at 0.5 % active chlorine, maintaining the pH at 9.5 with 1 N H₂SO₄. After the NaOCl addition, the pH was maintained at 9.5 by adding 2 N NaOH during 30 min, as reported by Zamudio-Flores *et al.* (2006). The mixture was adjusted to pH 7 with 1 N H₂SO₄, vacuum filtered and washed twice with deionized water; the slurry was dried 48 h at 40 °C. Starches were grinded and sieved in a 100 US mesh (150 μm).

Quantification of carbonyl and carboxyl groups in oxidized starches

The oxidation level of the starch was determined by quantifying the carbonyl and carboxyl groups. The content of the carbonyl groups was determined by the titration method proposed by Smith (1967). The carbonyl groups content was calculated as follows:

$$\text{Carbonyls (\%)} = \frac{[(\text{control-sample})\text{mL} \times \text{N acid} \times 0.028 \times 100]}{\text{Sample weight (dry base) g}} \quad (1)$$

One gram of starch (dry basis) was used on a 1 % w/v concentration. On average, three repetitions were achieved, 4.2 mL of the control and $\approx$ 4.0 mL of the sample.

The carboxyl groups content of the oxidized starches was determined with the procedure modified by Chattopadhyay *et al.* (1997). The percentage of carboxyl groups was assessed using the following equation:

$$\frac{\text{Acidity milliequivalents}}{100 \text{ g of starch}} = \frac{[(\text{control-sample})\text{mL} \times \text{N NaOH} \times 0.028 \times 100]}{\text{Sample weight (dry base) g}} \quad (2)$$

Chattopadhyay *et al.* (1997). El porcentaje de grupos carboxilo se calculó así:

$$\frac{\text{Miliequivalentes de acidez}}{100 \text{ g de almidón}} = \frac{[(\text{blanco-muestra})\text{mL} \times N \text{ NaOH} \times 0.028 \times 100]}{\text{Peso muestra (base seca) en g}} \quad (2)$$

$$\% \text{ Carboxilos} = \frac{(\text{Miliequivalentes de acidez}) \times 0.045}{100 \text{ g de almidón}} \quad (3)$$

donde 0.028 son los miliequivalentes del grupo carbonilo y 0.045 son los miliequivalentes del grupo carboxilo. Esta determinación se realizó con 1 g de almidón (base seca) a una concentración de 1 % p/v. Se cuantificó un promedio de tres repeticiones por muestra y se consumieron 4.0 mL de blanco y $\approx$ 3.8 mL de muestra.

Análisis químico proximal

En los almidones nativos y oxidados se determinó el contenido de humedad (método 934.01), proteínas (33.2.11), lípidos (920.39) y cenizas (942.05) (AOAC, 2002). El almidón total se determinó por los métodos 76-13 y 996-11 de la AACC (2000).

Elaboración de películas a partir de almidones oxidados

Para preparar las películas se usó el método de Zamudio-Flores *et al.* (2006) con modificaciones. Cuatro lotes fueron preparados: dos con los almidones oxidados de avena y plátano, y dos con los almidones oxidados adicionados con betalainas. Los almidones oxidados y el glicerol se mezclaron con agua destilada para hacer lotes con un peso total de 2 kg. La concentración de glicerol y almidón en la solución fue de 2 y 4 % (p/v), respectivamente. La solución se calentó en una placa Corning (Modelo PC-620D, EE.UU.), iniciando a 25 °C y calentando hasta 95 °C. Esta última temperatura se mantuvo 10 min con una velocidad de agitación uniforme (250 rpm) con un agitador de hélice (IKA modelo RW 20 digital, WERKE, Wilmintong, NC, EE.UU). Otros estudios bajo estas condiciones y equipo permitieron corroborar que la gelatinización del almidón y su historial termomecánico fueron reproducibles. Después, la solución filmogénica se enfrió a 60 °C y se adicionó una solución acuosa de betalainas a una concentración de 0.01 g por cada 120 mL de solución (se usó un solo lote de betalainas para todos los tratamientos) continuando la agitación por 15 min a 250 rpm. Las películas

$$\text{Carboxyl (\%)} = \frac{(\text{Acidity milliequivalents}) \times 0.045}{100 \text{ g of starch}} \quad (3)$$

where 0.028 are the milliequivalents of the carbonyl group, and 0.045 are the milliequivalents of the carboxyl group. This assessment was made from 1 g of starch (dry basis) at a 1 % w:v concentration. Three replicates per sample (in average) were determined, and 4.0 mL of the control were consumed and $\approx$ 3.8 mL of sample.

Proximal chemical analysis

In native and oxidized starches the humidity content was determined (method 934.01), proteins (33.2.11), lipids (920.39) and ash (942.05) (AOAC, 2002). Total starch was determined by the 76-13 and 996-11 methods from the AACC (2000).

Production of films using oxidized starches

To prepare the films, the method proposed by Zamudio-Flores *et al.* (2006) with modifications was used. Four lots were prepared: two with the oxidized oat and banana starches, and two with the oxidized starches added with betalains. The oxidized starches and glycerol were mixed with distilled water to make 2 kg total weight lots. The concentration of glycerol and starch in solution was of 2 and 4 % (w:v). The solution was heated in a heating plate Corning (PC-620 d model, USA), beginning at 25 °C and heating it up to 95 °C. The latter temperature was maintained for 10 min with uniform shaking (250 rpm) speed by a propeller agitator (IKA model RW 20 digital, WERKE, Wilmintong, NC, USA). Other studies made under these conditions and equipment made it possible to corroborate that starch gelatinization and its thermo-mechanical history were reproducible. Subsequently, the filmogenic solution was cooled to 60 °C and a 0.01 g per 120 mL aqueous solution of betalains was added (a single lot of betalains was used for all treatments), agitation was maintained for 15 min at 250 rpm. Films were prepared by "casting" (plate cast), by placing the gelatinized suspensions in polystyrene (P100) sterile Petri dishes, and dried at room temperature (20 ± 5 °C) for 72 h. Films were detached from the Petri dishes and conditioned in driers containing a NaBr saline solution ($RH = 50 \pm 5$ %) for 48 h. Subsequently, the films were stored in air-tight bags (Ziploc®, Johnson and Sons, Inc., Racine, WI, USA) for a minimum of 24 h until their characterization.

se prepararon por "casting" (vaciado en placa), depositando las suspensiones gelatinizadas en cajas petri estériles de poliestireno (P100), y se secaron a temperatura ambiente (20 ± 5 °C) por 72 h. Las películas formadas se desprendieron de las cajas petri y se acondicionaron en desecadores que contenían una solución salina de NaBr (HR=50±5 %) por 48 h. Después, las películas se almacenaron en bolsas herméticas (Ziploc®, Johnson y Sons, Inc., Racine, WI, EE.UU.) por un mínimo de 24 h hasta su caracterización.

Obtención de betalaínas

La metodología reportada por Zamudio-Flores *et al.* (2015) fue usada. El extracto de betalaínas se obtuvo de betabeles frescos adquiridos en un mercado local, los cuales se lavaron y cortaron en trozos de 2 cm^3 , se introdujeron a un extractor (Túrmix, modelo Ext. Uso rudo, México). El jugo se filtró, centrifugó ($13\,000 \text{ g } 15 \text{ min}^{-1}$ 4 °C $^{-1}$) y liofilizó. Para cuantificar betalaínas, el extracto se filtró través de una membrana de nylon con un tamaño de poro de $0.2 \mu\text{m}$ (Millipore Corp., Bedford, MA, EE.UU.) y se inyectó manualmente ($20 \mu\text{L}$) a un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, Agilent, modelo 1200, Tokio, Japón), compuesto por un desgasificador, una bomba cuaternaria, un compartimento de columna de temperatura controlable y un detector UV-Vis con arreglo de diodos. La separación de las betalaínas (betanina) se realizó en una columna Zorbax Eclipse XDB-C18, la cual se mantuvo a 25 °C. Se empleó un sistema isocrático de fase móvil, compuesto por agua y metanol (70:30, v/v). El flujo de la fase móvil fue de 1 mL min^{-1} . El análisis se determinó a $\lambda=538 \text{ nm}$. La cuantificación se realizó empleando una curva de calibración construida con tres series de diluciones independientes de betanina (como estándar externo, Sigma-Aldrich CDS000584-1G). El contenido de betalaínas en el extracto de betabel fue 5.17 mg g^{-1} . Para los cuatro lotes de películas se utilizó un solo lote de betalaínas.

Contenido de humedad en las películas

Después de acondicionadas las películas (50 % HR) y como parte de su caracterización se determinó el contenido de humedad, para lo cual se pesaron 0.5 g de las películas y se secaron 12 h en una estufa a 106 °C. El contenido de humedad fue el promedio de diez repeticiones.

Porcentaje de solubilidad de las películas

La solubilidad de las películas se determinó a 25 y 80 °C de acuerdo con la metodología de García *et al.* (2004). Pie-

Betalains obtainment

We used the methodology reported by Zamudio-Flores *et al.* (2015). Betalains extract was obtained from fresh beets acquired at a local market; beets were washed, cut into 2 cm^3 pieces and placed in a blender (Túrmix, Ext. Heavy-duty model, Mexico). Their juice then was filtered, centrifuged ($13\,000 \text{ g } 15 \text{ min}^{-1}$ 4 °C $^{-1}$) and lyophilized. To quantify the betalains, the extract was filtered through a nylon membrane with a $0.2 \mu\text{m}$ pore size (Millipore Corp., Bedford, MA, USA), and manually injected ($20 \mu\text{L}$) to a liquid high resolution chromatography system (HPLC, Agilent, 1200 model, Tokyo, Japan), with a degassing, a quaternary pump, a column compartment of variable temperature and UV-Vis detector with diode array. Betalains (betanin) separation was carried out in a Zorbax Eclipse XDB-C18 column kept at 25 °C. An isocratic mobile phase system, consisting of water and methanol (70:30, v/v) was used. The mobile phase flow was of 1 mL min^{-1} . The analysis was determined at $\lambda=538 \text{ nm}$. The quantification was performed using a calibration curve constructed with three independent series of betanin dilutions (as external standard, CDS000584-1G Sigma-Aldrich). The betalains content in the beet extract was 5.17 mg g^{-1} . A single lot of betalains was used for the four lots of films.

Moisture content in the films

After films were conditioned (50 % RH), and as part of its characterization, moisture content was determined; 0.5 g of the film were dried in an oven at 106 °C for 12 h. The reported moisture content was the average of ten repetitions.

Films solubility percentage

Films solubility was determined at 25 °C and 80 °C according to the methodology proposed by García *et al.* (2004). Sections of $2 \times 3 \text{ cm}$ were cut, weighed, placed in 150 mL beakers to which 80 mL of deionized water were added. Film samples were kept in constant shaking (250 rpm) on a warming plate with controlled agitation (Corning, PC-620D model, USA) for 1 h at 25 °C or 80 °C. Films were then dried in an oven at 60 °C for 2 h. The soluble matter percentage (percent of solubility) was calculated as follow:

Solubility (%) =

$$\left[\frac{(\text{sample initial weight} - \text{Sample dry weight})}{\text{Sample initial weight}} \right] \times 100 \quad (4)$$

zas de 2×3 cm se cortaron, se pesaron, se colocaron en vasos de precipitados de 150 mL y se agregaron 80 mL de agua desionizada. Las muestras se mantuvieron en agitación constante (250 rpm) en una placa de calentamiento y agitación controlada (Corning, Modelo PC-620D, EE.UU.) por 1 h a 25 °C o a 80 °C. Las películas se secaron 2 h en una estufa a 60 °C. El porcentaje de materia soluble (% solubilidad) se calculó así:

$$\% \text{ Solubilidad} =$$

$$\left[\frac{(\text{Peso inicial de la muestra} - \text{Peso de la muestra seca})}{\text{Peso inicial de la muestra}} \right] \times 100 \quad (4)$$

Color triestímulo de las películas

El color triestímulo se evaluó con un colorímetro Minolta CR-300 (Minolta, Co., Ltd., Osaka, Japón). El equipo se calibró con un estándar de color blanco. Las lecturas se tomaron de puntos aleatorios en la superficie de las películas (por quintuplicado). Un promedio de 10 lecturas por muestra fue registrado. Las lecturas se reportaron en el sistema CIELAB (L^* , a^* , b^*). El valor del ángulo hue (°hue) se calculó por la relación $\tan^{-1} (b^*/a^*)$, y el croma por $(a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$.

Propiedades mecánicas de las películas

Las pruebas mecánicas consistieron en la determinación de la tensión a la fractura (TF), porcentaje de elongación (% E) y el módulo de elasticidad (ME). Las determinaciones se realizaron de acuerdo con el método ASTM-882-95a con una celda de carga de 30 kg. Se utilizaron muestras rectangulares de 6×1 cm, a las cuales se les determinó el grosor en 10 posiciones aleatorias longitudinales. El promedio de estas determinaciones se utilizó para calcular el área de sección transversal sobre la cual se ejerció la fuerza de tensión. Los rectángulos se mantuvieron por 24 h a una HR de 52 % en desecadores con solución salina saturada de NaBr. Las muestras se colocaron en las mordazas de sujeción del texturómetro TAXT- Plus (Stable Micro Systems, Surrey, UK), dotado con el software Exponent lite (versión 4.0). La separación entre las mordazas fue de 4 cm y se utilizó una velocidad de deformación de 20 mm min⁻¹. La TF se calculó por la división de la fuerza máxima sobre la película durante la fractura entre el área de sección transversal (A =grosor promedio por el ancho). El % E se determinó como el porcentaje del cambio en la longitud original entre la separación inicial de las mordazas durante la ruptura (siendo una deformación de Cauchy) $\%E = [(L - L_0) / L_0 \times 100]$ como fue reportado por Zamudio-

Tristimulus color of the films

The films tristimulus color was evaluated with a CR-300 Minolta colorimeter (Minolta, Co., Ltd., Osaka, Japan). The equipment was calibrated with a white color standard. Readings were taken from random points on the surface of the films (fivefold). An average of 10 readings per sample was recorded. Readings were reported in the CIELAB (L^* , a^* , b^*) system. The hue angle (°hue) value was calculated by the relationship $\tan^{-1} (b^*/a^*)$, and the chroma by $(a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$.

Mechanical properties of the films

Mechanical tests included determination of the tensile strength (TF), elongation percentage (% E) and elastic modulus (ME). Determinations were carried out according with the ASTM-882-95a method with a 30 kg cell load. Rectangular samples of 6×1 cm were used to determine the thickness. Measurements were taken in 10 random longitudinal points. The average of these measurements was used to calculate the cross-sectional area over which tension force was exerted. Rectangles were kept for 24 h at 52 % RH in desiccators with a NaBr saturated saline solution. The samples were placed in the clamping jaws of the TAXT-Plus texture analyzer (Stable Micro Systems, Surrey, UK), equipped with the Exponent lite software (version 4.0). The separation between jaws was of 4 cm and a 20 mm min⁻¹ deformation speed was used. The TF was calculated by dividing the maximum force to split a film by the cross-sectional area (A =average thickness by width). The E percentage was determined as the percentage of the original length, changed by the initial separation of the jaws during the film split (Cauchy deformation): $E(\%) = [(L - L_0) / L_0 \times 100]$ as reported by Zamudio-Flores *et al.* (2010a). The EM was evaluated from the slope obtained during the linear behavior of section of the force-deflection curve. Ten repetitions were performed for each film.

Barrier property to water vapor of the films

The property as water vapor barrier consisted of the permeability to water (PVA), the standard gravimetric method of the ASTM E96-80 was used. Film circles of 9 cm diameter ($\text{area} = 20.25 \times 10^{-4} \text{ m}^2$) were conditioned in a desiccator at a 52 % RH, they were then placed on the top of the test cells. Silica gel was placed inside the cells to generate a RH close to 0 %. Each cell was then placed in a desiccator, which contained a saturated solution of NaCl (60 % RH). Changes in the cells weight were recorded every hour for at least 7 h. A linear regression analysis

Flores *et al.* (2010a). El ME se evaluó de la pendiente obtenida durante el comportamiento lineal de la curva de esfuerzo-deformación. Para cada película se realizaron diez repeticiones.

Propiedad de barrera al vapor de agua de las películas

La propiedad de barrera al vapor de agua consistió en la evaluación de la permeabilidad al vapor de agua (PVA) y se utilizó el método gravimétrico estándar de la ASTM E96-80. Las películas se cortaron en forma circular con un diámetro de 9 cm ($\text{área} = 20.25 \times 10^{-4} \text{ m}^2$), se acondicionaron en un desecador a una HR de 52 %, y se colocaron sobre la parte superior en las celdas de prueba. En el interior de las celdas se colocó sílica gel para generar una HR cercana al 0 %. Cada celda se colocó en un desecador, el cual contenía una solución saturada de NaCl (60 % HR). Los cambios de peso de las celdas se registraron cada hora durante al menos 7 h. Con los datos se realizó un análisis de regresión lineal, registrando la ganancia de peso en función del tiempo para calcular el coeficiente de transmisión de vapor de agua (CTVA) a partir de la pendiente de la línea recta (g s^{-1}) dividido por el área de transferencia (m^2). Después de las pruebas de permeación, se midió el grosor (promedio de diez determinaciones aleatorizadas sobre el área de la película) y se determinó la PVA ($\text{g Pa}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-1}$):

$$\text{PVA} = [\text{CTVA}/S(R_1 - R_2) \times D]$$

donde S es la presión de saturación del vapor de agua (Pa) a la temperatura de prueba (25 °C), R_1 es la HR en el desecador, R_2 , es la HR en la celda de permeación y D es el grosor promedio de la película (m). Bajo estas condiciones, el producto $(R_1 - R_2) \times D$ fue 1753.55 Pa. Todas las pruebas se realizaron a 25 °C por cuadruplicado para cada formulación de la película.

Difracción de rayos X

Para esta difracción se usó un difractómetro de rayos X (modelo 2100, Rigaku, Amsterdam, Países Bajos) con barridos desde $2\theta = 2^\circ$ a $2\theta = 40^\circ$, utilizando una radiación de $\text{CuK}\alpha$ (longitud de onda = 0.1543 nm). Se pesaron 20 mg de muestras de películas y se colocaron entre dos hojas de aluminio, las cuales se sellaron herméticamente. El equipo se trabajó a 30 kV y 16 mA con una velocidad de graficación de 0.067 °/s.

Análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente aleatorizado y los tratamientos fueron las películas con las formulaciones de

was performed with the data, weight gain as a time function was recorded to calculate the transmission coefficient of water vapor (TTVA) from the straight line slope (g s^{-1}) divided by the transfer area (m^2). After the permeation test, thickness (average of 10 random measurements on the film area) was measured and PVA ($\text{g Pa}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-1}$) was determined:

$$\text{PVA} = [\text{CTVA}/S(R_1 - R_2) \times D]$$

where S is the water vapor saturation pressure (Pa) at test temperature (25 °C), R_1 is the RH in the desiccator, R_2 is the RH in the permeation cell and D is the average thickness of the film (m). Under these conditions the product $(R_1 - R_2) \times D$ was 1753.55 Pa. All tests were performed at 25 °C four times for each film formulation.

X-ray diffraction

We used an X-ray diffractometer (2100 model, Rigaku, Amsterdam, Netherlands) with scans from $2\theta = 2^\circ$ to $2\theta = 40^\circ$, with a $\text{CuK}\alpha$ radiation (wavelength = 0.1543 nm). 20 mg of films samples were placed between two sheets of aluminum, which were hermetically sealed. The analysis was carried out to 30 kV and 16 mA with graphing a speed of 0.067 ° s^{-1} .

Statistical analysis

The experimental design was completely random, treatments were films with oxidized starches (oat and banana starch) formulations with and without betalains. A one-way ANOVA was performed with the data in the Sigma-Stat software, version 2.03 (Fox *et al.*, 1995). Differences between treatment means were assessed with the Tukey statistical test ($p \leq 0.05$) (Walpole *et al.*, 1999).

RESULTS AND DISCUSSION

Carbonyl and carboxyl groups content

Oxidized banana starch showed 0.060 ± 0.001 % of carbonyl groups and 0.010 ± 0.004 % carboxyl groups. Oxidized oat starch showed 0.018 ± 0.005 % of carbonyl groups and 0.022 ± 0.001 % of carboxyl groups. There are differences between both starches, which affected their films properties. Differences in carbonyl and carboxyl groups content in starches can be attributed to the starch components (amylose and amylopectin) arrangements in semi-crystalline structures, the presence of pores or fractures, as

almidones oxidados (avena y almidón de plátano) sin y con betalaínas. Con los datos se realizó un ANDEVA de una vía y se usó el programa Sigma-Stat, versión 2.03 (Fox *et al.*, 1995). Las diferencias entre las medias de los tratamientos se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) (Walpole *et al.*, 1999).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Contenido de grupos carbonilo y carboxilo

En el almidón oxidado de plátano se obtuvo 0.060 ± 0.001 % de grupos carbonilo y 0.010 ± 0.004 % de grupos carboxilo. El almidón oxidado de avena presentó 0.018 ± 0.005 % de grupos carbonilo y 0.022 ± 0.001 % de grupos carboxilo. Hubo diferencias entre ambos almidones, lo cual repercutió en las propiedades de las películas. Las diferencias encontradas en el contenido de grupos carbonilo y carboxilo en los almidones pueden ser atribuidas al arreglo de los componentes del almidón (amilosa y amilopectina) en una estructura semicristalina, a la presencia de poros o fracturas, así como al tamaño de los gránulos de almidón, los cuales son característicos de cada almidón (Chávez-Murillo *et al.*, 2008; Wurzburg, 1986). Chávez-Murillo *et al.* (2008) reportaron en almidones de cebada y maíz oxidado a diferentes concentraciones de NaOCl, para carbonilos de 0.05-0.26 % en maíz y 0.15-0.30 % en cebada, y para carboxilos 0.09-0.74 % en maíz y 0.20-0.83 % en cebada. Los valores aquí encontrados fueron similares en cebada e inferiores a los reportados en maíz. Otros estudios sugieren que la fuente botánica de la que procede el almidón es una variable que repercute directamente en la capacidad que tienen los almidones de oxidarse, ya que esta determina la relación de amilosa/amilopectina, la presencia de poros, canales o fracturas, el tamaño, forma y la distribución granular, y la relación de áreas amorfo/cristalinas (Chávez-Murillo *et al.*, 2008; Palma-Rodríguez *et al.*, 2012; Simsek *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2009).

Análisis químico proximal

El contenido de humedad en los almidones nativos y oxidados osciló entre 4.2 y 13.1 % (Cuadro 1). El contenido de humedad aumentó en los almidones oxidados y fue mayor en el almidón de plátano; esto se relaciona con el aumento en el

well as the size of the starch granules, which are characteristic of each starch type (Wurzburg, 1986; Chávez-Murillo *et al.*, 2008). Chávez-Murillo *et al.* (2008) reported that barley and corn starch, oxidized at different concentrations of NaOCl, had 0.05-0.26 % and 0.15-0.30 % carbonyls, and 0.09-0.74 % and 0.20-0.83 % carboxyl. The values showed in the preset study were similar to those of barley but lower than corn. Other studies suggest that the starch oxidant capacity depends on origin of the plant species it comes from, because it determines the amylose/amylopectin relation, the presence of pores, channels or fractures, the size, shape and granular distribution, and the amorphous/crystalline area relationship (Chávez-Murillo *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009; Palma-Rodríguez *et al.*, 2012; Simsek *et al.*, 2012).

Proximal chemical analysis

The moisture content in the native and oxidized starches ranged between 4.2 and 13.1 % (Table 1). Moisture content increased in oxidized starches, and was higher in the banana starch. This is related to the increase in the starches hydrophilic character, because the carbonyl and carboxyl groups in the oxidized starches are capable of forming hydrogen bonds with water molecules (Adebowale *et al.*, 2002). The oxidation reduced lipids and total starch content in both starches. Banana starch showed a greater decrease of protein content and ash compared to the oat starch. The decrease in proteins, lipids and ash content is associated with the protein hydrolysis, the lipid saponification because of chemical reagents, as well as successive washings carried out during the oxidation process (Zamudio-Flores *et al.*, 2007 and 2010b).

Evaluation of films color

All color variables were significantly different ($p \leq 0.05$) when betalain was added. Luminosity (L^*) dropped from 95 to 91, which meant a slight film darkening, but visually the film showed clear (Table 2). The variable a^* best described the color of the films, since it showed negative values in oxidized starches films without betalain and positive values when betalain was added. Chroma significantly increased from 2.8 to 4.6 when betalain was added.

Cuadro 1. Composición químico proximal y contenido de almidón total en los almidones nativos y oxidados.[†]
Table 1. Proximate chemical composition and total starch content in native and oxidized starches.[†]

Análisis	Muestra			
	Almidón nativo de avena	Almidón oxidado de avena	Almidón nativo de plátano	Almidón oxidado de plátano
Lípidos	1.73 ± 0.15 ^a	0.77 ± 0.07 ^c	1.85 ± 0.11 ^a	1.05 ± 0.15 ^b
Proteínas [‡]	0.52 ± 0.03 ^c	0.38 ± 0.03 ^c	2.06 ± 0.15 ^a	0.88 ± 0.17 ^b
Cenizas	0.01 ± 0.001 ^c	0.01 ± 0.003 ^c	1.89 ± 0.12 ^a	0.69 ± 0.08 ^b
Humedad	4.21 ± 0.05 ^d	6.93 ± 0.01 ^c	8.30 ± 1.70 ^b	13.10 ± 2.10 ^a
Almidón total	85.00 ± 1.10 ^b	80.75 ± 0.86 ^c	91.20 ± 1.20 ^a	84.90 ± 1.60 ^b

[†] Media aritmética de cinco repeticiones ± error estándar, porcentaje en base seca. Valores con letras diferentes en cada fila son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$). [‡]Contenido de nitrógeno × 6.25. [§]Arithmetic mean of five replications ± standard error. Values with different letters in each column are statistically different ($p \leq 0.05$). [§]Nitrogen content × 6.25.

carácter hidrofílico de los almidones, debido a que los grupos carbonilo y carboxilo en los almidones oxidados son susceptibles de formar puentes de hidrógeno con moléculas de agua (Adebawale *et al.*, 2002). La oxidación redujo el contenido de lípidos y el almidón total en ambos almidones, y en el almidón de plátano hubo una disminución mayor en el contenido de proteínas y cenizas comparado con la muestra de almidón de avena. La reducción en el contenido de proteínas, lípidos y cenizas está relacionada con la hidrólisis de las proteínas, reacciones de saponificación en los lípidos a causa de los reactivos químicos, y con los lavados sucesivos realizados durante el proceso de oxidación (Zamudio-Flores *et al.*, 2007 y 2010b).

Evaluación de color en las películas

Hubo una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en todas las variables de color cuando se adicionó betalaína. La variable luminosidad (L^*) disminuyó de 95 a 91, lo que significó un ligero oscurecimiento de la película, pero visualmente la película se mostró transparente (Cuadro 2). La variable a^* describió mejor el color de las películas, ya que mostró valores negativos en las películas de almidones oxidados sin betalaína y positivos cuando se adicionó betalaína. El croma aumentó significativamente de 2.8 a 4.6 cuando se agregó la betalaína. Las variables de color como el croma y sobre todo el °hue indicaron que las películas de los almidones oxidados (plátano y avena) sin la adición de las betalaínas presentaron un aspecto transparente, y las que contenían betalaína

The chroma, especially hue suggested that oxidized starches films (banana and oats) without betalains added presented a transparent appearance and those containing betalains in its formulation took a slight pink color.

Films moisture content and thickness

Film from oxidized starch with betalain of oat presented higher moisture content than those without betalain. Moisture did not change in the banana starch film with betalain addition (Table 3). Moisture of banana films without betalain was lower than the oat, which is related to a greater oat starch oxidation. There were no significant differences ($p > 0.05$) in the mean thickness of the films, which neither the source of starch or betalains addition modified in this variable. A homogeneous thickness of films is due to the standardization of the manufacturing procedure. These values are similar to those reported by López *et al.* (2008) in starch films chemically modified by acetylation, crosslinking and acetylation, crosslinking and hydroxipropilation, and by acid hydrolysis. Films thickness is an important feature, since it can change the mechanical and water vapor permeability properties.

Films solubility

Banana starch films with and without betalains were less soluble than those of oat at both temperatures (Table 3). These results are due to the higher hydrophilicity of the oxidized oat starch,

Cuadro 2. Variables de color triestímulo (L^* , a^* , b^* , croma y $^{\circ}\text{hue}$) evaluadas en las películas[†].
Table 2. Color tristimulus variables (L^* , a^* , b^* , chroma and $^{\circ}\text{hue}$) evaluated in the films[†].

Película [‡]	L^*	a^*	b^*	Croma	$^{\circ}\text{hue}$
PAIOxPls/b	94.88 $\pm$ 0.27 ^a	-0.03 $\pm$ 0.02 ^b	2.83 $\pm$ 0.09 ^a	2.83 $\pm$ 0.09 ^b	90.59 $\pm$ 0.34 ^a
PAIOxPlc/b	92.23 $\pm$ 0.29 ^b	4.18 $\pm$ 0.28 ^a	1.73 $\pm$ 0.08 ^b	4.55 $\pm$ 0.23 ^a	23.83 $\pm$ 2.65 ^b
PAIOxAvs/b	92.63 $\pm$ 0.55 ^b	-0.02 $\pm$ 0.02 ^b	2.81 $\pm$ 0.07 ^a	2.81 $\pm$ 0.07 ^b	90.24 $\pm$ 0.36 ^a
PAIOxAvc/b	91.01 $\pm$ 0.19 ^c	4.32 $\pm$ 0.21 ^a	1.48 $\pm$ 0.06 ^b	4.57 $\pm$ 0.19 ^a	19.31 $\pm$ 1.39 ^b

[†]Media aritmética de cinco repeticiones $\pm$ error estándar. Valores con letras diferentes en cada columna son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$). [‡]Nomenclatura de las películas: PAIOxPls/b=Almidón oxidado de plátano sin betalaína; PAIOxPlc/b=Almidón oxidado de plátano con betalaína; PAIOxAvs/b=Almidón oxidado de avena sin betalaína; PAIOxAvc/b=Almidón oxidado de avena con betalaína. $\diamond$ Arithmetic mean of five replications $\pm$ standard error. Values with different letters in each column are statistically different ($p \leq 0.05$). Film Nomenclature: PAIOxPls/b=banana oxidized starch without betalain; PAIOxPlc/b=banana oxidized starch with betalain; PAIOxAvs/b=oats oxidized starch without betalain; PAIOxAvc/b=oatmeal oxidized starch with betalain.

en su formulación tomaron un color ligeramente rosado.

Contenido de humedad y grosor en las películas

La película de almidón oxidado de avena con betalaína presentó mayor contenido de humedad que su contraparte sin betalaína, pero la humedad no cambió en la película de almidón de plátano por la adición de betalaína (Cuadro 3). Al comparar la humedad de las películas sin betalaína, la de plátano presentó un valor menor que la de avena, lo cual está relacionado con la mayor oxidación en el almidón de avena. No hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) en el grosor promedio de las películas, por lo que ni la fuente de almidón ni la adición de betalaínas modificó esta variable.

besides the higher number of short chains, which is characteristic of cereal starches (Chávez-Murillo *et al.*, 2008). High temperature increased solubility, which is related to the increase of kinetic energy which results in chains breaking, and therefore they will solubilize. Oxidized banana starch added with betalains significantly increased ($p \leq 0.05$) the percentage of solubility at both temperatures, whereas in the film of oxidized starch of oat we observed the opposite behavior. In the oxidized oat starch film an interaction could exist between betalains and OH^- groups of starch, thus resulting in a decrease in the solubility. While in the banana starch this interaction may not be strong enough, albeit at higher temperatures the increase in the kinetic energy causes greater solubility due to the breaking of these interactions. Therefore, the solubility of the films with and without betalains

Cuadro 3. Contenido de humedad, solubilidad, grosor y permeabilidad al vapor de agua (PVA) de las películas.
Table 3. Moisture content, solubility, thickness and permeability to steam (PVA) of the films.

Película [†]	Humedad (%) [‡]	Solubilidad (%) [§]		Grosor promedio [¶] (μm)	PVA $\times 10^{-11}$ ($\text{g m}^{-1} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$) [§]
		25 °C	80 °C		
PAIOxPls/b	19.74 $\pm$ 0.81 ^c	35.51 $\pm$ 0.40 ^d	44.92 $\pm$ 2.16 ^d	134 $\pm$ 9.00 ^a	14.50 $\pm$ 0.58 ^d
PAIOxPlc/b	19.53 $\pm$ 0.87 ^c	38.02 $\pm$ 1.74 ^c	49.87 $\pm$ 1.31 ^c	176 $\pm$ 22.00 ^a	18.50 $\pm$ 1.54 ^c
PAIOxAvs/b	22.61 $\pm$ 1.28 ^b	75.60 $\pm$ 5.70 ^a	72.81 $\pm$ 3.62 ^a	186 $\pm$ 6.00 ^a	21.30 $\pm$ 0.57 ^b
PAIOxAvc/b	42.46 $\pm$ 2.97 ^a	56.46 $\pm$ 7.17 ^b	69.57 $\pm$ 2.18 ^b	225 $\pm$ 16.00 ^a	27.90 $\pm$ 2.81 ^a

[†]Para nomenclatura de las películas ver nota al pie del Cuadro 2. [‡]Media aritmética obtenida de diez determinaciones $\pm$ error estándar. [§]Media aritmética de cuatro determinaciones $\pm$ error estándar. Valores con letras diferentes en cada columna son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$). $\diamond$ [†]For films nomenclature see note at the bottom of Table 2. [¶]Arithmetic mean of ten determinations $\pm$ standard error. [§]Arithmetic media of four determinations $\pm$ standard error. Values with different letters in each column are significantly different ($p \leq 0.05$).

Un grosor homogéneo de las películas se debe a la estandarización del procedimiento de elaboración. Estos valores son similares a los reportados por López *et al.* (2008) en películas obtenidas a partir de almidones modificados químicamente por acetilación, entrecruzamiento y acetilación, entrecruzamiento e hidroxipropilación, y por hidrólisis ácida. El grosor de las películas es una característica importante ya que puede modificar propiedades como la permeabilidad al vapor de agua y propiedades mecánicas.

Solubilidad de las películas

Las películas de almidón de plátano con y sin betalaínas presentaron menor solubilidad que las de avena a las dos temperaturas (Cuadro 3). Estos resultados se deben al mayor carácter hidrofílico del almidón oxidado de avena y al mayor número de cadenas cortas, lo cual es característico de los almidones de cereales (Chávez-Murillo *et al.*, 2008). Al aumentar la temperatura se incrementó la solubilidad, lo cual está relacionado con el aumento en la energía cinética que ocasiona rompimiento de las cadenas y por lo tanto se solubilizan. La adición de las betalaínas en la formulación de almidón oxidado de plátano incrementó de manera significativa ($p \leq 0.05$) el porcentaje de solubilidad a las dos temperaturas, mientras que en la película de almidón oxidado de avena se observó un comportamiento inverso. En la película de almidón oxidado de avena pudiera existir una interacción entre las betalaínas y los grupos OH^- del almidón, lo cual produce una disminución en la solubilidad, mientras que en el almidón de plátano esta interacción pudiera no ser suficientemente fuerte, aunque a mayor temperatura el aumento en la energía cinética provoca mayor solubilidad debido al rompimiento de dichas interacciones y, por lo tanto el valor de solubilidad de las películas con y sin betalaínas fue similar (Barros *et al.*, 2012). Los valores de solubilidad a 80 °C son similares a los encontrados en películas de almidón oxidado de plátano y sus mezclas con quitosano (Zamudio-Flores *et al.*, 2009 y 2010a). Romero-Bastida *et al.* (2005) reportaron que el porcentaje de solubilidad en las películas de almidón de plátano, okenia y mango dependió, en su mayor parte, del tipo de almidón de fruta empleado en su elaboración.

was similar (Barros *et al.*, 2012). At 80 °C solubility values are similar to those found in films of oxidized starch of banana and its mixtures with chitosan (Zamudio-Flores *et al.*, 2009 y 2010a). Romero-Bastida *et al.* (2005) reported that the percentage of films solubility of starch of banana, okenia and mango depended on, for the most part, the type of fruit starch used for its preparation.

Mechanical properties of films

Betalains increased the percentage of elongation (% E), whereas tensile strength (TF) and modulus of elasticity (ME) did not change significantly ($p > 0.05$) (Figure 1). Films of oxidized oat starch presented higher values of % E (though absorbed less moisture) than the banana starch, indicating that oat starch films are more flexible, which is important for some applications such as covers for fruits and fresh vegetables (Das *et al.*, 2013; Pan *et al.*, 2013). The addition of betalains did not substantially alter the elongation, so these films can additionally produce antioxidant effect when used as covering of products. The more hydrophilic character of the oxidized oat starch is responsible for the highest % E, although this does not necessarily correspond with its solubility, since this involves some other physicochemical variables as the density at bulk, cohesiveness, adhesiveness, and granular size and shape (Fu *et al.*, 2012; Traina *et al.*, 2013), which were not evaluated in our study. The TF values and % E are comparable to those found in studies with chemically modified starch films (Romero-Bastida *et al.*, 2005; López *et al.*, 2008; Zamudio-Flores *et al.*, 2009 y 2010a). Palma-Rodríguez *et al.* (2012) reported values of TF between 5.7 MPa, in films of native starch from banana, to 6.3 MPa, in films of oxidized banana starch. The % E values ranged from 34 to 61 % in these films, noting that the chemical modification by oxidation favors the elongation percentage in the mechanical characteristics due to the increased in water uptake. This favored the molecular relaxation by the plasticizing effect.

Water vapor barrier property of the films

Betalains significantly increased the water vapor permeability (PVA) of the films, which may be

Propiedades mecánicas de las películas

La adición de betalaínas incrementó el porcentaje de elongación (% E), mientras que la tensión a la fractura (TF) y módulo de elasticidad (ME) no cambiaron significativamente ($p > 0.05$) (Figura 1). Las películas de almidón oxidado de avena presentaron valores mayores de % E (aunque absorbieron menor humedad) que las de almidón de plátano, lo que indica que las películas de almidón de avena son más flexibles, lo cual es importante para algunas aplicaciones como pueden ser en cubiertas para frutas y vegetales frescos (Das *et al.*, 2013; Pan *et al.*, 2013). La adición de betalaínas no modificó sustancialmente la elongación, por lo que se tiene una película que adicionalmente puede producir efecto antioxidante sobre el producto que recubre. El mayor carácter hidrofílico del almidón oxidado de avena es responsable del mayor % E, aunque esto no necesariamente corresponde con su solubilidad, ya que para esta intervienen otras variables fisicoquímicas como la densidad a granel, cohesividad, adhesividad, y el tamaño y forma granular (Fu *et al.*, 2012; Traina *et al.*, 2013), las cuales no se determinaron en nuestro

related to the increase in their solubility, because of the hydrophilic characteristic of betalains (Table 3). The films of oxidized oat starch presented a higher water vapor permeability than the banana ones, which is related to their higher content of carbonyl and carboxyl groups. Zamudio-Flores *et al.* (2006) reported similar PVA values of films prepared with oxidized banana starch ($\text{PVA} \times 10^{-11} = 12.50 \pm 3.20 \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$) and Romero Bastida *et al.* (2005) found slightly greater values of PVA ($24.50 \times 10^{-11} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$). This evaluation indicates that the developed films represent, to some extent, a barrier to the moisture exchange from the product to the environment.

Film X-ray diffraction

All the films showed a peak of diffraction in $2\theta = 19^\circ$, while the oxidized banana starch films presented other diffraction peaks in $2\theta = 19, 23$ and 25° . Films of banana starch showed a small peak at $2\theta = 5^\circ$, which was not present in films of oxidized oat starch with and without betalain. The peak at

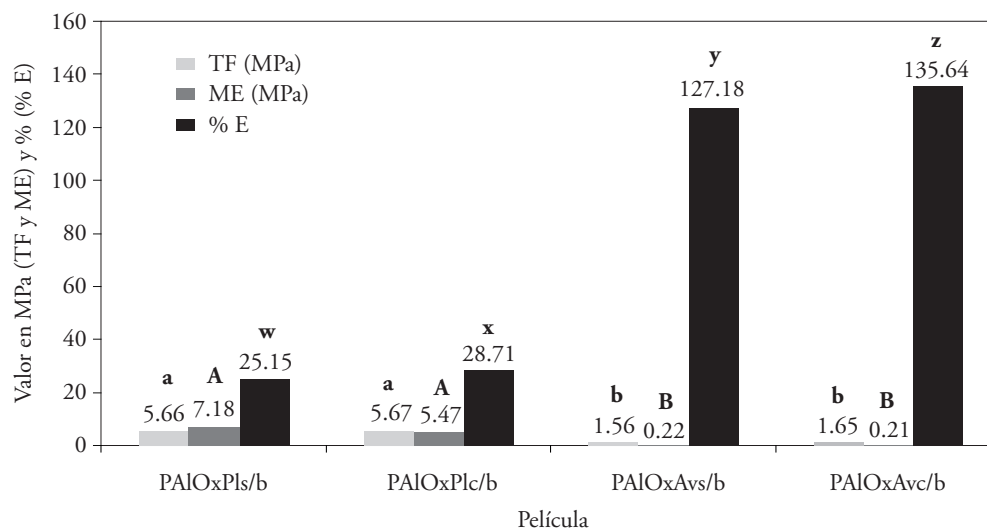


Figura 1. Tensión a la fractura (TF), módulo de elasticidad (ME) y % elongación (% E) en las películas. Valores promedio de diez repeticiones $\pm$ barras de error estándar. Valores de cada variable con letras minúsculas (a-b, en TF; w-z, en % E) y mayúsculas (A-B, en ME) diferentes son estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$). Para nomenclatura de las películas ver nota al pie del Cuadro 2.

Figure 1. Tensile strength (TF), modulus of elasticity (ME) and percentage of elongation (% E) of the films. Mean values of ten repetitions $\pm$ standard error. Mean values of each variable with different lowercase letters (a-b, on TF; w-z on % E) and uppercase (A-B, on ME) are statistically significant ($p \leq 0.05$). For nomenclature of films see note at the bottom of Table 2.

estudio. Los valores de TF y % E son comparables a los encontrados en estudios con películas de almidones modificados químicamente (Romero-Bastida *et al.*, 2005; López *et al.*, 2008; Zamudio-Flores *et al.*, 2009 y 2010a). Palma-Rodríguez *et al.* (2012) reportaron valores de TF que variaron de 5.7 MPa, en películas de almidón nativo de plátano, a 6.3 MPa, en películas elaboradas con almidón oxidado de plátano, mientras que los valores de % E variaron entre 34 y 61 % en dichas películas, observando que la modificación química por oxidación favorece el porcentaje de elongación en las propiedades mecánicas debido a la mayor captación de agua, lo cual favoreció la relajación molecular por el efecto plastificante.

Propiedad barrera al vapor de agua de las películas

La adición de betalaínas incrementó significativamente la permeabilidad al vapor de agua (PVA) de las películas, lo cual puede estar relacionado con el incremento en la solubilidad, por el carácter hidrofílico de las betalaínas (Cuadro 3). Las películas de almidón oxidado de avena presentaron valores mayores de permeabilidad al vapor de agua que las de plátano, lo cual está relacionado con su mayor contenido de grupos carbonilos y carboxilos. Zamudio-Flores *et al.* (2006) reportaron valores de PVA similares en películas elaboradas con almidón oxidado de plátano ($PVA \times 10^{-11} = 12.50 \pm 3.20 \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$) y Romero-Bastida *et al.* (2005) encontraron valores ligeramente mayores de PVA ($24.50 \times 10^{-11} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$). Esta evaluación indicó que las películas desarrolladas representan, hasta cierto punto, una barrera para el intercambio de humedad del producto con el medio ambiente.

Difracción de rayos X de las películas

En todas las películas se observó un pico de difracción en $2\theta=19^\circ$, mientras que las películas de almidón oxidado de plátano presentaron otros picos de difracción en $2\theta=19$, 23 y 25° . En las películas de almidón de plátano se observó un pico pequeño a $2\theta=5^\circ$, el cual no estuvo presente en las películas de almidón oxidado de avena sin betalaína y con

$2\theta=5^\circ$ es característico de almidones que presentan un patrón de difracción de rayos X tipo B, y fue reportado en almidón de plátano (Millan-Testa *et al.*, 2005). La adición de betalaínas produjo un incremento en los picos a $2\theta=23$ y 25° en las películas de los dos almidones, lo cual sugiere posibles interacciones entre estos compuestos y el almidón, tópico en controversia y que se estudia, sobre todo por los aspectos relacionados con la digestibilidad del almidón (Azeredo, 2009). Las diferencias en la intensidad de los picos de los patrones de difracción de rayos X en las películas de los dos almidones, ayudan a explicar sus propiedades fisicoquímicas, ya que ellos indican diferentes arreglos de los componentes del almidón en la matriz de la película.

CONCLUSIONS

Betalains modified color and % E of the films of oxidized starches of banana and oats, without affecting other mechanical properties; it also significantly increased the permeability to water vapor. The pattern of X-ray diffraction showed different arrangement of the structure of oat and banana starch films, as well as those films added with betalains. Chemical modification by oxidation conferred properties for the films to be used as coatings and as polymeric matrices for betalains incorporation.

—End of the English version—



betalaína. El pico a $2\theta=5^\circ$ es característico de los almidones que presentan un patrón de difracción de rayos X tipo B, y fue reportado en almidón de plátano (Millan-Testa *et al.*, 2005). La adición de betalaínas produjo un incremento en los picos a $2\theta=23$ y 25° en las películas de los dos almidones, lo cual sugiere posibles interacciones entre estos compuestos y el almidón, tópico en controversia y que se estudia, sobre todo por los aspectos relacionados con la digestibilidad del almidón (Azeredo, 2009). Las diferencias en la intensidad de los picos de los patrones de difracción de rayos X en las películas de los dos almidones, ayudan a explicar sus propiedades fisicoquímicas, ya que ellos indican diferentes arreglos de los componentes del almidón en la matriz de la película.

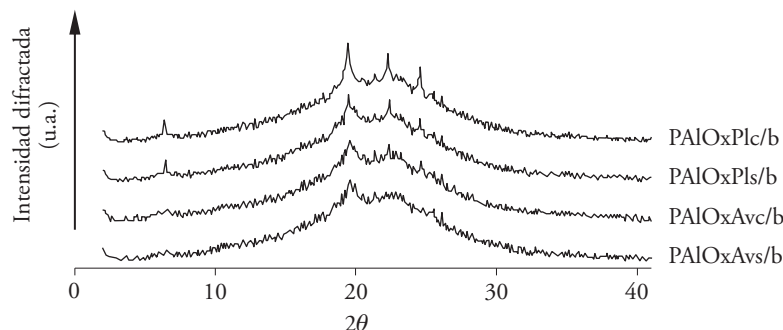


Figura 2. Difracción de rayos X de las películas (para nomenclatura de las películas ver nota al pie del Cuadro 2).

Figure 2. X-ray diffraction of the starch films (see note at the bottom of Table 2 for films nomenclature).

CONCLUSIONES

Las betalaínas modificaron el color y el % E en las películas de almidones oxidados de plátano y avena, sin afectar las otras propiedades mecánicas; también aumentó significativamente la permeabilidad al vapor de agua. El patrón de difracción de rayos X mostró diferente arreglo de la estructura en las películas de almidón de avena y plátano, así como en las adicionadas con betalaínas. La modificación química por oxidación confirió propiedades a las películas para ser utilizadas como recubrimientos y como matrices poliméricas para la incorporación de betalaínas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Mileidy Rubí Rodríguez Orozco y Arturo Ramos Martínez por su asistencia técnica. JMTG agradece la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT-México). Este trabajo fue financiado por el CONACYT y el Gobierno del Estado de Chihuahua (FOMIX CHIH-2009-C02-126281).

LITERATURA CITADA

- AACC (American Association of Cereal Chemists). 2000. Approved Methods of the AACC. 10th ed. St. Paul, MN, EE.UU.
- Adebawale, K. O., T. A. Afolabi, and O. S. Lawal. 2002. Isolation, chemical modification and physicochemical characterisation of Bambarra groundnut (*Voandzeia subterranean*) starch and flour. Food Chem. 78: 305-311.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemist). 2002. Official Methods of Analysis. 18th ed. Gaithersburg, MA, EE.UU.

- Azeredo, A. 2009. Betalains: Properties, sources, applications, and stability—A review. Int. J Food Sci. Tech. 44: 2365-2376.
- ASTM D-882-95a. (American Society for Testing and Materials). 1995. Standard test methods for tensile properties of thin plastic sheeting. Philadelphia, PA, EE.UU.
- ASTM E-96-80. (American Society for Testing and Materials). 1980. Standard methods of test for water vapor transmission of materials in sheet form. Philadelphia, PA, EE.UU.
- Barros, F., J. M. Awika, and L. W. Rooney. 2012. Interaction of tannins and other sorghum phenolic compounds with starch and effects on *in vitro* starch digestibility. J. Agric. Food Chem. 60: 11609-11617.
- Bello-Pérez, L. A., and O. Paredes-López. 2009. Starches of some food crops, changes during processing and their nutraceutical potential. Food Eng. Rev. 1: 50-65.
- Bello-Pérez, L. A., M. M. Sánchez-Rivera, C. Núñez-Santiago, S. L. Rodríguez-Ambriz, and A. D. Román-Gutiérrez. 2010. Effect of the pearled in the isolation and the morphological, physicochemical and rheological characteristics of barley starch. Carbohydr. Polym. 81: 63-69.
- Butera, D., L. Tesoriere, F. di Gaudio, A. Bongiorno, M. Allegra, A. M. Pintaudi, R. Kohen, and M. A. Livrea. 2002. Antioxidant activities of sicilian prickly pear (*Opuntia ficus indica*) fruit extracts and reducing properties of its betalains: Betanin and indicaxanthin. J. Agric. Food Chem. 50: 6895-6901.
- Chattopadhyay, S., R. S. Singhal, and P. R. Kulkarni. 1997. Optimisation of conditions of synthesis of oxidized starch from corn and amaranth for use in film-forming applications. Carbohydr. Polym. 34: 203-212.
- Chávez-Murillo, C. E., Y. -J. Wang, and L. A. Bello-Pérez. 2008. Morphological, physicochemical and structural characteristics of oxidized barley and corn starches. Starch/Stärke 60: 634-645.
- Das, D. K., H. Dutta, and C. L. Mahanta. 2013. Development of a rice starch-based coating with antioxidant and microbe-barrier properties and study of its effect on tomatoes stored at room temperature. LWT-Food Sci. Technol. 50: 272-278.
- Ferruzzi, M. G., and J. Blakeslee. 2007. Digestion, absorption, and cancer preventative activity of dietary chlorophyll derivatives. Nut. Res. 27: 1-12.

- Flores-Gorosquera, E., F. J. García-Suárez, E. Flores-Huicochea, M. C. Nuñez-Santiago, R. A. González-Soto, y L. A. Bello-Pérez. 2004. Rendimiento del proceso de extracción de almidón de frutos de plátano (*Musa paradisiaca*). Estudio en planta piloto. *Acta Cient. Venez.* 55: 86-90.
- Fox, E., K. Shotton, and C. Ulrich. 1995. Sigma-Stat User's Manual. San Rafael, CA, EE.UU, Jandel Scientific Co. (cd).
- Fu, X., D. Huck, L. Makein, B. Armstrong, U. Willen, and T. Freeman. 2012. Effect of particle shape and size on flow properties of lactose powders. *Particuology* 10: 203-208.
- García, M. A., A. Pinotti, M. N. Martino, and N. E. Zaritzky. 2004. Characterization of composite hydrocolloid films. *Carbohydr. Polym.* 56: 339-345.
- López, O. V., M. A. García, and N. E. Zaritzky. 2008. Film forming capacity of chemically modified corn starches. *Carbohydr. Polym.* 73: 573-581.
- Millan-Testa, C. E., M. G. Méndez-Montealvo, M. -A. Ottenhof, I. A. Farhat, and L. A. Bello-Pérez. 2005. Determination of the molecular and structural characteristics of okenia, mango and banana starches. *J. Agric. Food Chem.* 53: 495-501.
- Palma-Rodríguez, H. M., G. Aguirre-Álvarez, N. Chavarría-Hernández, A. I. Rodríguez-Hernández, L. A. Bello-Pérez, and A. Vargas-Torres. 2012. Oxidized banana starch-polyvinyl alcohol film: Partial characterization. *Starch/Stärke* 64: 882-889.
- Pan, S. -Y., C. -H. Chen, and L. -S. Lai. 2013. Effect of tapioca starch/decolorized hsian-tsao leaf gum-based active coatings on the qualities of fresh -cut apples. *Food Bioprocess Tech.* 6: 2059-2069.
- Romero-Bastida, C. A., L. A. Bello-Pérez, M. A. García, M. N. Martino, J. Solorza-Feria, and N. E. Zaritzky. 2005. Physicochemical and microstructural characterization of films prepared by thermal and cold gelatinization from non-conventional sources of starches. *Carbohydr. Polym.* 60: 235-244.
- Simsek, S., M. Ovando-Martínez, K. Whitney, and L. A. Bello-Pérez. 2012. Effect of acetylation, oxidation and annealing on physicochemical properties of bean starch. *Food Chem.* 134: 1796-1803.
- Smith, R. J. 1967. Production and use of hypochlorite oxidized starches. In: Whistler, R. L., and E. F. Paschall (eds). *Starch Chemistry and Technology*. Vol II. Academic Press, New York. pp: 620-625.
- Traina, K., R. Cloots, S. Bontempis, G. Lumay, N. Vandewalle, and F. Boschini. 2013. Flow abilities of powders and granular materials evidenced from dynamical tap density measurement. *Podwer Technol.* 235: 842-852.
- Vargas-Torres, A., P. B. Zamudio-Flores, R. Salgado-Delgado, and L. A. Bello-Pérez. 2008. Biodegradation of low-density polyethylene banana starch films. *J. Appl. Polym. Sci.* 110: 3464-3472.
- Walpole, R. E., R. H. Myers, y S. L. Myers. 1999. Probabilidad y Estadística para Ingenieros. 6a. ed. Prentice-Hall Hispanoamericana, México. pp: 481-482.
- Wurzburg, O. B. 1986. Modified Starches: Properties and Uses. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, EE.UU. pp: 1-277.
- Yahia, E. M. 2010. The contribution of fruits and vegetables to human health. In: De la Rosa, L. A., E. Alvarez-Parrilla, and G. A. Gonzalez-Aguilar (eds). *Fruit and vegetable phytochemicals: Chemistry, nutritional value and stability*. Blackwell Publishing, Ames, IA, EE.UU. pp: 35-62.
- Zamudio-Flores, P. B., A. Vargas-Torres, J. Pérez-González, E. Bosquez-Molina, and L. A. Bello-Pérez. 2006. Films prepared with oxidized banana starch: Mechanical and barrier properties. *Starch/Stärke* 58: 274-282.
- Zamudio-Flores, P. B., L. A. Bello-Pérez, A. Vargas-Torres, J. P. Hernández-Urbe, y C. A. Romero-Bastida. 2007. Caracterización parcial de películas preparadas con almidón oxidado de plátano. *Agrociencia* 41: 837-844.
- Zamudio-Flores, P. B., S. Bautista-Baños, R. Salgado-Delgado, and L. A. Bello-Pérez. 2009. Effect of oxidation level on the dual modification of banana starch: The mechanical and barrier properties of its films. *J. Appl. Polym. Sci.* 112: 822-829.
- Zamudio-Flores, P. B., A. Vargas-Torres, R. Salgado-Delgado, and L. A. Bello-Pérez. 2010a. Influence of the oxidation and acetylation of banana starch on the mechanical and water barrier properties of modified starch and modified starch/chitosan blend films. *J. Appl. Polym. Sci.* 115: 991-998.
- Zamudio-Flores, P. B., A. Vargas-Torres, F. Gutiérrez-Meraz, y L. A. Bello-Pérez. 2010b. Caracterización fisicoquímica de almidones doblemente modificados de plátano. *Agrociencia* 44: 283-295.
- Zamudio-Flores, P. B., E. Ochoa-Reyes, J. de J. Ornelas-Paz, A. Aparicio-Saguilán, A. Vargas-Torres, L. A. Bello-Pérez, A. Rubio-Ríos, y R. G. Cárdenas-Félix. 2015. Effect of storage time on physicochemical and textural properties of sausages covered with oxidized banana starch film with and without betalains. *CyTA-J. Food.* 13: 456-463.
- Zhang, Y. -R., X. -L. Wang, S. -D. Zhang, R. -Y. Chen, and Y. -Z. Wang. 2009. Effect of carbonyl content on the properties of thermoplastic oxidized starch. *Carbohydr. Polym.* 78: 157-161.
- Zou, D., M. Brewer, F. Garcia, J. M. Feugang, J. Wang, R. Zang, H. Liu, and C. Zou. 2005. Cactus pear: A natural product in cancer chemoprevention. *Nutr. J.* 4: 1-12.