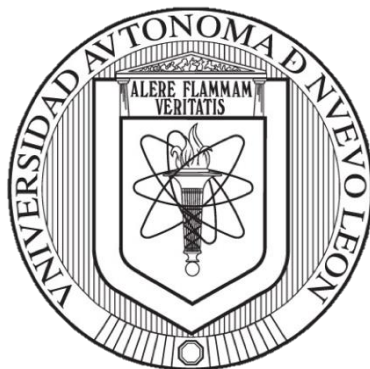


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE EMULSIONES DOBLES
GELIFICADAS CON MUCÍLAGO DE CHÍA (*Salvia hispanica* L.) Y DIFERENTES
BIOPOLÍMEROS E INCORPORADAS CON UN EXTRACTO DE TÉ VERDE
(*Camellia Sinensis*)

POR

DIANA ALEJANDRA GUZMÁN DÍAZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
CON ACENTUACIÓN EN ALIMENTOS

2024

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE EMULSIONES DOBLES
GELIFICADAS CON MUCÍLAGO DE CHÍA (*Salvia hispanica* L.) Y DIFERENTES
BIOPOLÍMEROS E INCORPORADAS CON UN EXTRACTO DE TÉ VERDE
(*Camellia Sinensis*)

POR

DIANA ALEJANDRA GUZMÁN DÍAZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
CON ACENTUACIÓN EN ALIMENTOS

2024

DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE EMULSIONES DOBLES
GELIFICADAS CON MUCÍLAGO DE CHÍA (*Salvia hispanica* L.) Y DIFERENTES
BIOPOLÍMEROS E INCORPORADAS CON UN EXTRACTO DE TÉ VERDE
(*Camellia Sinensis*)

Comité de tesis



Presidente
Dr. Juan Gabriel Báez González



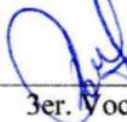
Secretario
Dr. Sergio A. Galindo Rodríguez



1er. Vocal
Dr. Carlos Abel Amaya Guerra



2do. Vocal
Dra. Claudia Tomasa Gallardo Rivera



3er. Vocal
Dra. Sandra L. Castillo Hernández



Subdirector de Posgrado

Dra. Katiushka Arévalo Niño

DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE EMULSIONES DOBLES
GELIFICADAS CON MUCÍLAGO DE CHÍA (*Salvia hispanica* L.) Y DIFERENTES
BIOPOLÍMEROS E INCORPORADAS CON UN EXTRACTO DE TÉ VERDE
(*Camellia Sinensis*)

Dirección de Tesis



Dr. Juan Gabriel Báez González
Director



Dra. Mayra Zulema Treviño Garza
Director externo

DERECHOS RESERVADOS©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

Este trabajo fue financiado por el CONACYT a través del proyecto CB-157511 y por el Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica, PAICYT, UANL CT 736-19.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Juan Gabriel Báez González, por aceptarme como su alumna, por su apoyo y guía en el desarrollo de este proyecto.

A todos mis asesores que me acompañaron a lo largo de este camino a la Dra. María Adriana Núñez, Dra. Ma. Guadalupe Alanís, Dra. Claudia Gallardo, Dra. Mayra Treviño y el Dra. Sandra L. Castillo Hernández, gracias por transmitirme sus conocimientos y apoyo.

Al Laboratorio de Alimentos del Departamento de Alimentos y Laboratorio de Química Analítica por brindar sus instalaciones para la realización del proyecto. Universidad Autónoma Metropolitana, Cinvestav Querétaro e Instituto Tecnológico de Durango.

A COCACYT, por la beca de manutención para la realización de este doctorado.

A mi esposo José Eduardo y mis hijos José Emiliano y Pablo Eduardo que me dan la fuerza de seguir adelante, alentando cada paso que doy y animándome día a día, gracias por su amor.

A mis padres, Irma e Isidro, y a mis hermanos, Diego y Daniel, por creer en mí, apoyarme en todo momento y nunca dejarme sola. Abuelito José Antonio y tía Marissa, gracias por darme el ejemplo del trabajo y perseverancia en todo lo que hacemos. Gracias a mi familia de Tepic, Martha Beltrán, Santiago Pérez, Yolanda Pérez, Eduardo Rodríguez, Carlos Pérez e Iveth Barrutia por enseñarme a creer que todo es posible.

A mis amigas Edith, Jenny, Vero, Cynthia por compartir conmigo esta etapa, la cual nos unió para toda la vida. Agradezco también a Melissa y Valeria, fueron de gran apoyo en el desarrollo de esta investigación.

DEDICATORIAS

Para ti mi Dios, a ti todo el honor y toda la gloria

Para mi esposo José Eduardo y mis hijos José Emiliano y Pablo Eduardo, quienes son el motor que me hace superarme día a día, los amo con todo mi corazón

En especial a ustedes mamá y papá, por apoyarme todos los días en cada etapa que paso. Gracias por su ejemplo del trabajo y el empeño por sacarnos adelante, sin su apoyo no hubiera llegado hasta donde estoy ahora.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
2	ANTECEDENTES	4
2.1	Té verde (<i>Camellia sinensis</i>)	4
2.1.1	Propiedades nutritivas	4
2.1.2	Polifenoles	5
2.1.3	Catequinas	6
2.1.4	Beneficios a la salud	7
2.2	Emulsiones	8
2.3	Mucilago de chía	¡Error! Marcador no definido.
3	JUSTIFICACIÓN	12
4	HIPÓTESIS	13
5	OBJETIVOS	14
5.1	Objetivo General	14
5.2	Objetivos Particulares	15
6	MATERIALES Y MÉTODOS	16
6.1	Materiales	16
6.2	Obtención de extracto de GTE	16
6.3	Caracterización de GTE	17
6.3.1	Actividad antioxidante y contenido total de fenoles	17
6.4	Extracción de mucílago de chía	18
6.5	Preparación de emulsiones dobles gelificadas	18
6.6	Caracterización de emulsiones dobles gelificadas	19
6.6.1	Microscopia óptica	19
6.6.2	Tamaño de partícula	22
6.6.3	Índice de cremado	22
6.6.4	Actividad antioxidante y contenido fenólico total	22
6.7	Biodisponibilidad (proceso de digestión in vitro)	22
6.8	Análisis estadístico	23

7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
7.1	Obtención de extracto de té verde (GTE)	24
7.2	Actividad antioxidante y contenido fenólico total de GTE	24
7.3	Extracción de mucílago de chía (CM)	28
7.4	Caracterización y estabilidad de emulsiones dobles gelificadas	28
7.4.1	Análisis microscópico	28
7.4.2	Mediciones de tamaño de gota	29
7.4.3	Mediciones de estabilidad de las emulsiones	33
7.4.4	Efecto protector de la doble emulsión gelificada sobre GTE	33
7.5	Digestibilidad (in vitro) de emulsiones dobles gelificadas	41
7.5.1	Biodisponibilidad (proceso de digestión in vitro)	41
7.5.2	Actividad antioxidante durante el proceso de digestión in vitro	42
7.5.3	Tamaño de la gota durante el proceso de digestión in vitro	43
7.5.4	Microscopía óptica durante el proceso de digestión in vitro	46
8	CONCLUSIONES	48
9	PERPECTIVAS	49
10	BIBLIOGRAFIA	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición química de las emulsiones dobles gelificadas	20
Tabla 2. Propiedades antioxidantes (DPPH·+ and ABTS·+) y contenido total de polifenoles de las emulsiones dobles gelificadas y GTE, después de 35 días de almacenamiento.	37
Tabla 3. Método ABTS ($\mu\text{mol TE mL}^{-1}$) de emulsiones dobles gelificadas (día 0) durante el proceso de digestión in-vitro.	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Emulsión múltiple $W_1/O/W_2$	¡Error! Marcador no definido.
Figura 2. Tipos de inestabilidad en una emulsión.	11
Figura 3. Propiedades antioxidantes por el método DPPH+, del GTE almacenado a 4 °C durante 35 días. Valores promedios ± desviación estándar (n=3).	25
Figura 4. Propiedades antioxidantes por el método ABTS del GTE almacenado a 4 °C durante 35 días. Valores promedios ± desviación estándar (n=3).	26
Figura 5. Contenido total de polifenoles del GTE almacenado a 4 °C durante 35 días. Valores promedios ± desviación estándar (n=3).....	27
Figura 6. Imágenes de microscopio de las emulsiones dobles gelificadas —(a) CM, (b) CMC, (c) CML, (d) CMT y (e) CMW— a los 0 días de almacenamiento.....	28
Figura 7. Tamaño de partícula $D_{4,3}$ de emulsiones dobles gelificadas almacenadas a 4 °C durante 35 días de almacenamiento. Valores promedios± Desviación estándar (n=3).	31
Figura 8. Tamaño de partícula $D_{3,2}$ de emulsiones dobles gelificadas almacenadas a 4 °C durante 35 días de almacenamiento. Valores promedios± Desviación estándar (n=3).	32
Figura 9. Propiedades Antioxidantes del método DPPH de las emulsiones dobles gelificadas y GTE almacenados a 4 °C durante 35 días de almacenamiento. Valores promedio ± desviación estándar (n=3).	38
Figura 10. Propiedades Antioxidantes del método ABTS+ de las emulsiones dobles gelificadas y GTE almacenados a 4 °C durante 35 días de almacenamiento. Valores promedio ± desviación estándar (n=3).	39
Figura 11. Contenido total de polifenoles de las emulsiones dobles gelificadas y GTE almacenados a 4 °C durante 35 días de almacenamiento. Valores promedio ± desviación estándar (n=3).....	40
Figura 12. Perfil de liberación del GTE de las emulsiones dobles gelificadas — durante el proceso de digestion in v-vitro gástrico e intestinal (day 0). Valores promedio ± desviación estándar (n=3).....	44

Figura 13. Tamaño de partícula de las emulsiones dobles gelificadas — durante el proceso de digestión in v-vitro gástrico e intestinal (day 0). Valores promedio \pm desviación estándar (n=3). 45

Figura 14. Imágenes de microscopio de emulsiones dobles gelificadas — antes y después — de las fases de la digestión in-vitro de la fase gástrica e intestinal. 47

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

CM: Mucílago de chía

C: κ -carragenina

L: Goma de algarrobo

T: Thixogum

W: Aislado de proteína de suero de leche

GTE: Extracto de té verde

W1: Fase Acuosa

O: Fase Oleosa

CMC: Mucílago de chía y κ -carragenina

CML: Mucílago de chía y goma de algarrobo

CMT: Mucílago de chía y thixogum

CMW: Mucílago de chía y aislado de proteína de suero de leche

RESUMEN

El té verde es una planta originaria de China y algunas regiones de la India cuyo nombre botánico es *Camellia sinensis* en el año 2019 se reportó un consumo global de 6, 300 millones de kilogramos, quedando como la segunda bebida más consumida después del agua debido a sus beneficios hacia la salud . Con la finalidad de incorporar estos compuestos bioactivos en el desarrollo de nuevos productos se ha probado protegerlos a través de emulsiones múltiples (W/O/W), sin embargo son sistemas termodinamicamente inestables que pueden estabilizarse por medio de emulgentes. Actualmente hay especial atención en la búsqueda de emulgentes de grado alimenticio como los biopolímeros naturales, entre los cuales se encuentran las proteínas y polisacáridos. El mucílago de chía es un polisacárido complejo de alto peso molecular de consistencia viscosa (gel), la cual puede ser utilizada como agente emulsionante en la estabilidad de las emulsiones múltiples. Por lo que el objetivo de esta investigación fué desarrollar y caracterizar emulsiones dobles gelificadas a base de mucílago de chía (CM) y diferentes biopolímeros (carragenina; C, goma de algarrobo; L, tixogum; T, y concentrado de proteína de suero; W) con extracto de té verde (GTE), evaluando la preservación y actividad antioxidante durante 35 días de almacenamiento. Todas las emulsiones mostraron estabilidad y efectividad para reducir la pérdida de actividad antioxidante, siendo CMT, CML y CM las más efectivas. Las emulsiones mostraron un efecto protector al modular la liberación del GTE en un ambiente gastrointestinal simulado, lo que permitió una liberación controlada durante las fases de digestión gástrico. Así, las emulsiones dobles gelificadas son una alternativa para la conservación de GTE y podrían ser una alternativa potencial para su aplicación en el desarrollo de alimentos funcionales.

ABSTRACT

Green tea is a plant native to China and some regions of India whose botanical name is *Camellia sinensis*. In 2019, a global consumption of 6.3 billion kilograms was reported, making it the second most consumed beverage after water due to its health benefits. In order to incorporate these bioactive compounds in the development of new products, they have been tested to protect them through multiple emulsions (W/O/W), however, they are unstable thermodynamic systems that can be stabilized by emulsifiers. Currently, there is special attention in the search for food-grade emulsifiers such as natural biopolymers, among which are proteins and polysaccharides. Chia mucilage is a high molecular weight complex polysaccharide with a viscous consistency (gel), which can be used as an emulsifying agent in the stability of multiple emulsions. Therefore, the aim of this research was to develop and characterize double gelled emulsions based on chia mucilage (CM) and different biopolymers (carrageenan; C, locust bean gum; L, tixogum; T, and whey protein concentrate; W) with green tea extract (GTE), evaluating the preservation and antioxidant activity during 35 days of storage. All emulsions showed stability and effectiveness in reducing activity loss, with CMT, CML and CM being the most effective. The emulsions showed a protective effect by modulating the release of GTE in a simulated gastrointestinal environment, which allowed a controlled release during the gastric digestion phases. Thus, double gelled emulsions are an alternative for the conservation of GTE and could be a potential alternative for its application in the development of functional foods.

1 INTRODUCCIÓN

En la actualidad los consumidores están concentrando su atención en alimentos que no solo proporcionen un valor nutritivo, sino también beneficios para su salud, reduciendo enfermedades (Klaypradit y Hang 2008). El té verde (*Camellia sinensis*) es una planta originaria de China. El Statista Consumer Market Outlook reportó un consumo global de 6,300 millones de kilogramos siendo la segunda bebida más consumida en el mundo (van der Hooff et al. 2012; Wang y Ho 2009; McKay y Blumberg 2002; Plazas Creixell 1999). Satoh y colaboradores (2009) mencionan que el té verde es una fuente importante de flavonoides debido a que su contenido (62.5 ± 0.3 GAE/200 μ g de extracto acuoso) es superior al de el té blanco y negro con 50.2 ± 0.3 , 44.3 ± 0.3 GAE/200 μ g de extracto acuoso. Destacan las catequinas que actúan como antioxidantes, como la epicatequina (EC), epicatequina-3-galato (ECG), epigallocatequina (EGC) y epigallocatequina-3-galato (EGCG) (van der Hooff et al. 2012; Ananingsih et al. 2011; von Staszewski et al. 2010; Wang y Ho 2009). Se ha reportado que el té verde puede prevenir enfermedades como el cáncer y de origen cardiovascular. Su acción ha sido limitada cuando se incorpora a sistemas alimentarios debido a que pueden degradarse, oxidarse y sufrir cambios como la epimerización y la polimerización durante el proceso. Su biodisponibilidad es limitada a causa de altas temperaturas o prolongadas (40°C), pH alcalinos (>8) de los sistemas, disponibilidad de oxígeno, presencia de iones metálicos, así como los ingredientes añadidos. Para reducir la degradación de GTE se destaca el uso de técnicas como aspersión en frío, secado por aspersión, liofilización, electropulverización, liposomas, homogeneización de alto corte y homogeneización a alta presión, como nanopartículas, nanoemulsiones, formación de películas, emulsiones simples y dobles (Cutrim et al. 2019; Bhushani et al. 2017; Wrona et al. 2017; Zokti et al. 2016; Pasrija et al. 2015; Rashidinejad et al. 2014; Mahmood et al. 2013; Mahmood et al. 2014; Von Staszewski 2014; Siripatrawan et al. 2012; Kim et al. 2012; Ananingsih et al. 2011). Para reducir la degradación de GTE destaca el uso de técnicas como aspersión en frío (Cutrim et al. 2019), secado por aspersión (Zokti et al. 2016), liofilización (Pasrija et al. 2015), electropulverización (Bhushani et al. 2017), liposomas (Rashidinejad et al. 2014), homogeneización de alto

corte y homogeneización a alta presión, como nanopartículas (Wrona et al. 2017), nanoemulsiones (Kim et al. 2012), formación de películas (Siripatrawan et al. 2012), emulsiones simples y dobles (Von Staszewski 2014; Mahmood et al. 2013; Mahmood et al. 2014). Las emulsiones dobles ($W_1/O/W_2$) son una alternativa prometedora en la incorporación de compuestos bioactivos en diferentes matrices, favoreciendo el diseño y desarrollo de nuevos productos. La formación de emulsiones dobles consta de formar una emulsión agua-en-aceite (W_1/O) mediante homogenización de alto corte, enseguida se homogeniza la emulsión W_1/O con una nueva fase acuosa (W_2), obteniendo como resultado una emulsión dobles (Surh et al. 2007). Mahmood y colaboradores (2014) desarrollaron una emulsión múltiple encapsulando extracto de té verde y extracto de loto como agentes cosméticos funcionales estabilizados con emulsionantes hidrófilos, Polioxietileno (20) cetil éter y cetomacrogol 1000®. En estos sistemas se han observado procesos de desestabilización física a largo plazo, que se manifiestan por fenómenos como la cremación, inversión o separación de fases, floculación y coalescencia. Por lo que se han estudiado los biopolímeros agentes estabilizadores, observando que logran formar una red de gel en la fase continua mejorando la estabilidad de emulsiones múltiples durante el tiempo de almacenamiento (Mohammadi et al. 2015). Existen estudios de emulsiones dobles ($W_1/O/W_2$) basadas en aceite de parafina extra puro/copoliol de cetil dimeticona/polisorbato 80) incorporado con GTE (5%). Sin embargo, aunque tales emulsiones eran lo suficientemente estables frente a cualquier separación de fases, algunos parámetros, como el pH, la viscosidad y la conductividad, no eran lo suficientemente estables a largo plazo (30 días) (Mahmood et al. 2013). En otro estudio, Mahmood et al. (2013) evaluaron la estabilidad de emulsiones dobles ($W_1/O/W_2$) basadas en copoliol de cetil dimeticona (emulsionante lipofílico) y una mezcla de polioxietileno (20) cetil éter y cetomacrogol 1000® (emulsionantes hidrofílicos) con presencia de un espesante e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC). Estos espesantes mejoraron considerablemente la estabilidad de $W_1/O/W_2$ durante un período de 12 meses. Actualmente la chía (*Salvia hispanica* L.) ha tomado un gran interés entre los investigadores como biopolímero natural para estabilizar emulsiones. La chía es una planta herbácea originaria del sur de México. El consumo de semillas de chía se relaciona con efectos beneficiosos para la salud debido a sus altos niveles de proteínas, minerales, vitaminas, antioxidantes y

fibra dietética (5-6% del mucílago) (Capitani et al. 2016; Xingú et al. 2017). El mucílago de chía (CM) es un heteropolisacárido aniónico que consta de un tetrasacárido con residuos de 4-O-metil-a-Dglucoronopiranosilo que se forman como ramificaciones de b-D-xilopiranosilo en la cadena principal (Ferrari et al. 2015). El CM se podría utilizar como ingrediente en la industria alimentaria debido a su alto contenido en fibra, excelente capacidad de retención de agua, alta solubilidad y viscosidad a bajas concentraciones, entre otras propiedades (Capitani et al. 2016; De Campo et al. 2017). Investigaciones recientes se han centrado en el uso de CM como biomaterial para estabilizar emulsiones para consumo humano (Avila- de la Rosa et al. 2015). Además, Capitani y colaboradores (2016) encontraron que la adición de CM a emulsiones simples (O/W) mejoró su estabilidad frente a la separación de fases gravitacionales al aumentar la viscosidad de la fase acuosa, limitando la movilidad de las gotas de aceite en las emulsiones. No obstante, aunque existen algunos estudios sobre el efecto de CM en la estabilidad de las emulsiones, hasta donde sabemos, no ha habido estudios previos con respecto a las emulsiones dobles gelificadas incorporadas con GTE. Así, el objetivo de esta investigación fue desarrollo de emulsiones múltiples gelificadas con diferentes mezclas de biopolímeros para la protección de un extracto del té verde. (*Camellia sinensis*) durante el almacenamiento.

2 ANTECEDENTES

2.1 Té verde (*Camellia sinensis*)

El té verde es una planta originaria de China, en la cual se producen alrededor de 1.9 millones de toneladas, representando el 45% de la producción a nivel global (Qiang Xua et al. 2021). También se encuentra en países como Japón, Corea, el Norte de África y Medio Oriente (Plazas Creixell 1999). El nombre botánico del te verde es *Camellia sinensis*, pertenece a la familia Teáceas y es un árbol de hoja perenne que puede llegar a medir 5-10 m de alto en estado salvaje, aunque cuando se cultiva no suele sobrepasar los dos metros de altura (Hernández et al. 2004). Existen tres tipos de té que se producen: el té negro (78%), té verde (20%) y el té oolong (2%) (Wang y Ho 2009; Kaput y Rodríguez 2006). Su composición química y en consecuencia, su sabor y las características terapéuticas depende de factores como el tratamiento postcosecha, el genotipo, las condiciones de cultivo y el procesamiento de la planta (van der Hooff et al. 2012).

2.1.1 Propiedades nutritivas

El té verde contiene macronutrientes como proteínas (15-20% del peso seco) de las cuales una parte considerable son enzimas. Su contenido de hidratos de carbono (5-7% de su peso seco), incluye celulosa, pectina, glucosa, fructosa y sacarosa, así como componentes lipídicos como ácido linoleico y linolénico, y esteroides (estigmasterol). También contiene micronutrientes como vitaminas (B, C, E), bases xánticas como la cafeína (27 mg/240 ml de infusión del té) y la teofilina, pigmentos como la clorofila y los carotenoides, componentes volátiles como aldehídos y alcoholes, minerales y oligoelementos tales como Ca, Mg, Cr, Mn, Fe, Cu, Zn, Mo, Se, Na, P, Co, Sr, Ni, K, M y Al (Narotzki et al. 2012) los cuales son elementos importantes que juegan un papel en el metabolismo humano regulando la función celular y neutralizando los radicales libres, bloqueando los efectos nocivos de la producción de oxígeno y en la actividad catalítica de las enzimas (Namal et al. 2013)

2.1.2 Polifenoles

El extracto de té verde (GTE) está compuesto principalmente de polifenoles como las catequinas, ácido gálico, quercitina y cafeína, entre otras sustancias (Ananingsih et al. 2011; Namal et al. 2013). Los polifenoles son metabolitos secundarios que existen en diversas plantas, especialmente en sus semillas y hojas verdes, se clasifican generalmente en flavonoides, compuestos fenólicos y ácidos. Los flavonoides, derivados de benzo- γ -pirano que consiste en anillos fenólicos y piranos, se dividen en flavanoles, flavonas, flavonoles, flavanonas, isoflavonas y antiocianidinas. Los ácidos fenólicos se dividen en dos subclases: derivados del ácido benzoico y derivados de ácido cinámico (Wang y Ho 2009). Su estructura se caracteriza por la presencia de anillos fenólicos y más de un grupo OH-, los cuales confieren la capacidad antioxidante. Esta capacidad antioxidante, impacta positivamente en el metabolismo ya que el oxígeno siendo indispensable para la vida, puede convertirse en moléculas altamente tóxicas a través de la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (radicales libres), los organismos poseen un complejo sistema de antioxidantes, los cuales evitan que estos radicales sean formados o los eliminan antes de que puedan dañar los componentes vitales de la célula; sin embargo, algunas veces no son suficientes y el organismo se auxilia de componentes externos integrados en la dieta (antioxidantes) que ayudan en la labor de atrapar radicales libres (Velázquez-Paniagua et al. 2004). Un radical libre, estabiliza su estructura al recibir electrones de las biomoléculas que están a su alrededor, causando destrucción de macromoléculas indispensables para la vida y provocando con ello múltiples patologías humanas. Un polifenol es capaz de donar uno o más electrones al radical libre, estabilizar su estructura y detener la reacción en cadena, con lo cual se previene el daño (Arts y Hollman 2005; Gutiérrez-Maydata 2002). Algunos alimentos y bebidas ricos en polifenoles se destacan por contribuir a la reducción del riesgo (Fukushima Yoichi et al. 2009; Wang y Ho 2009). El té verde contiene aproximadamente 115 mg polifenoles totales (Fukushima Yoichi et al. 2009); es rico en flavonoles (300-400 mg/g), estos son de gran interés para la salud humana. Entre los cuales se destacan las catequinas como principales antioxidantes, representando del 30-40% de los sólidos solubles en

agua sin color que imparten amargor y astringencia en el té verde (van der Hoof et al. 2012; Ananingsih et al. 2011; von Staszewski et al. 2010; Wang y Ho 2009).

2.1.3 Catequinas

El contenido de catequinas del té en relación depende de cómo las hojas se procesan antes del secado, así como la ubicación geográfica y las condiciones de cultivo. (Kaput y Rodríguez 2006). La EGCG es la catequina más abundante, que representa aproximadamente un tercio de todos los polifenoles a la que se atribuye beneficios a la salud (Wang y Ho 2009; Kaput y Rodríguez 2006). También se encuentran en menor proporción el ácido gálico, quercetina, kaempferol, miricetina y sus glucósidos (van der Hoof et al. 2012; Ananingsih et al. 2011). Las principales catequinas (flaban-2-oles) del GTE son: epigallocatequina -3-galato (EGCG) que constituye aproximadamente el 59% del total de catequinas, epicatequina (EC) alrededor del 6.4%, epigallocatequina (EGC) alrededor del 19% y epicatequina-3-galato (ECG) el 15.6% (Narotzki et al. 2012; Ananingsih et al. 2011; Wang and Ho 2009; Kaput y Rodríguez 2006; McKay y Blumberg 2002). Su actividad antioxidante se puede evaluar mediante métodos que se basan en comprobar cómo un agente oxidante induce daño oxidativo a un sustrato oxidable; daño que es inhibido o reducido por la presencia de un antioxidante (Fernández-Pachón et al. 2006; Prior et al. 2005). Un ejemplo de estas técnicas es el DPPH, el cual es un método consiste en que este radical tiene un electrón desapareado y es de color azul-violeta, decolorándose hacia amarillo pálido por la reacción de la presencia de una sustancia antioxidante, siendo medida espectrofotométricamente a 517 nm (García-Becerra et al. 2010), otra técnica utilizada es ABTS, método evalúa la actividad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC), se basa en la reducción de la coloración verde/azul producida por la reacción del radical ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS) con el antioxidante presente en la muestra (Thaipong et al. 2006).

La degradación de las catequinas del GTE es más evidente cuando se somete a altas temperaturas (Ananingsih et al. 2011). Entre las estrategias utilizadas que se destacan para reducir la degradación del GTE, es la técnica de secado por enfriamiento (Cutrin

et al. 2019), secado por aspersión (Zokti et al. 2016), liofilización (Pasroja et al. 2015), electroatomización (Bhushani *et al.* 2017), atrapamiento en liposomas (Rashidinejad et al. 2014) y homogeneización de alto corte, así como, nanopartículas (Wrona et al. 2017), nanoemulsiones (Kim et al. 2012), formación de película (Siripatrawan y Noipha 2012), emulsiones simples (Von Staszewski *et al.* 2014) y dobles (Mahmood y Akhtar 2013; Mahmood y Akhtar 2014).

2.1.4 Beneficios a la salud

En México, las enfermedades cardiovasculares y el cáncer son las principales causas de muerte. El 19% de mujeres y hombres de 30 a 69 años muere de enfermedades cardiovasculares, y se estima que el 70.3% de la población adulta vive con al menos un factor de riesgo cardiovascular y se registraron 847 716 defunciones: 10.6 % fue por tumores malignos (89 574) (INEGI 2024), por esta razón, en los últimos años, se ha dado una tendencia hacia la prevención (Velázquez-Paniagua *et al.* 2004), a través de alternativas de ingredientes y alimentos más saludables, así como el desarrollo de alimentos funcionales (Martínez-Flores *et al.* 2002). El té verde tiene efectos importantes para promover la salud, estudios epidemiológicos muestran que un consumo diario de 3 a 5 tazas promueven un estilo de vida saludable. Se utiliza para mejorar el flujo sanguíneo, eliminar alcohol y toxinas, mejorar la resistencia a las enfermedades, aliviar el dolor en las articulaciones, así como limpiar y mejorar el flujo de la orina. Thieleck y Boschmann (2009)

2.3 Mucilago de chía

La chía (*Salvia hispanica L.*) es una planta herbácea originaria del sur de México. El consumo de semillas de chía se relaciona con efectos beneficiosos para la salud, se caracteriza por altos niveles de proteínas (valores), minerales(valores), vitaminas(valores), antioxidantes(valores) y fibra dietética (5-6% del mucílago), (Xingú et al. 2017; Capitani et al. 2016). Además contiene un polisacárido de alto peso molecular (0.8 a 2×10^6 Dalton) y mucílagos donde se han identificado xilosa, glucosa y ácido glucurónicometilo; también es una fuente de proteína (234 g/k de semilla) y

aceite esencial (298 g/K de semilla) con un alto contenido de ácidos α -linoénico y linoleico (Álvarez-Chávez et al. 2008).

El mucílago de chía (CM) es un heteropolisacárido aniónico que consta de un tetrasacárido con residuos de 4-O-metil-a-Dglucoronopiranosilo que se forman como ramificaciones de b-D-xilopiranosilo en la cadena principal (Ferrari et al. 2015). La CM es un ingrediente alternativo en la industria alimentaria debido a su alto contenido en fibra, capacidad de retención de agua, solubilidad y viscosidad a bajas concentraciones, entre otras propiedades (Capina et al. 2016). Otras aplicaciones se han centrado en el uso de CM como biomaterial para estabilizar emulsiones para consumo humano (Avila-de la Rosa *et al.* 2015) Capitani et al. (2016) encontraron que la adición de CM a emulsiones simples (O / W) mejoró su estabilidad frente a la separación de fases gravitacionales al aumentar la viscosidad de la fase acuosa, limitando la movilidad de las gotas de aceite en las emulsiones.

2.2 Emulsiones

Una emulsión consiste de dos líquidos inmiscibles (usualmente aceite y agua), uno de los dos líquidos dispersos en forma de pequeñas gotas esféricas en el otro. En la mayoría de los alimentos como aderezos, salsas, cremas, margarinas, leche, helados y embutidos, los diámetros de las gotas usualmente oscilan entre 0.1 y 100 μ m (Dickinson 1992). Morfológicamente se clasifican en dos tipos, una consiste en gotas de aceites dispersas en una fase acuosa, llamada emulsión aceite en agua (O/W) y la segunda consiste en gotas de agua dispersas en una fase oleosa, que es llamada emulsión agua en aceite (W/O) (McClements 2005; Dickinson y McClements 1995). La sustancia que constituye las gotas en una emulsión es llamada fase dispersa, discontinua o fase interna y el líquido circundante es llamado fase dispersante, continua o externa. La concentración de las gotas en una emulsión se asocia con la fracción del volumen en la fase dispersa, Φ (Dickinson 1992) fase que es minoritaria frente a la otra, o sea, que se dispersa dentro de la fase dispersante, por ejemplo en el caso de las emulsiones W/O.

A partir de las emulsiones O/W o W/O, es posible preparar emulsiones múltiples. La emulsión doble se forma a partir de una emulsión primaria W/O que se dispersa en una solución acuosa para formar la emulsión múltiple ($W_1/O/W_2$). Esta emulsión tiene una fase interna y externa acuosa separadas por una fase oleosa, constituyendo un sistema complejo e inestable como se observa en la figura 1 (Chávez-Paéz *et al.* 2012; Bonet *et al.* 2010; Schmidts *et al.* 2009; McClements 2005; Wang *et al.* 2006; Mezzenga *et al.* 2004; Ficheux *et al.* 1998; Dickinson y McClements, 1995).

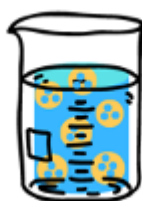


Figura 1. Emulsión múltiple $W_1/O/W_2$

Las emulsiones dobles se clasifican como aceite-en-agua-en-aceite (O/W/O) o agua-en-aceite-en-agua ($W_1/O/W_2$). La emulsión doble $W_1/O/W_2$ (Figura 1), consisten en una fase acuosa interna (W_1), atrapada como pequeñas gotas dentro de gotas de aceite más grandes (O), que posteriormente se dispersan en otra fase acuosa (W_2) (Surh *et al.* 2007; Altunas *et al.* 2016). Estas emulsiones generalmente utilizan emulsionantes que las estabilizan como lecitina, carragenina, goma xantana, goma guar, polisorbatos, celulosas, entre otros.

Estudios previos, han demostrado que las emulsiones $W_1/O/W_2$ proporcionan una alta capacidad de atrapamiento y protección de las sustancias encapsuladas hacia la degradación. Presentan un alto número de aplicaciones potencialmente benéficas como la liberación controlada o liberación inducida, reducción de grasa contenida, enmascaramiento de sabor y protección de los ingredientes lábiles o probióticos sensibles (Bonet *et al.* 2010). La cual es una característica que presenta las emulsiones, lo que las hace adecuadas para aplicaciones industriales y el desarrollo tecnológico, por ejemplo, para la encapsulación de sustancias incorporadas en la fase acuosa interna

(fármacos, nutrientes, sabores, enzimas, cosméticos) y su liberación gradual de la eficacia prolongada (Chávez-Paéz et al. 2012).

Las emulsiones dobles que encapsulan GTE se han desarrollado para uso cosmético y de alimentos, entre otras aplicaciones, sin embargo, el uso de estos sistemas ha sido limitado debido a los procesos de desestabilización física en el periodo de almacenamiento. Periodos que disminuyen la vida útil, debido a su inestabilidad termodinámica y tiempo de almacenamiento, dependiendo de los diferentes mecanismos físicoquímicos, que pueden producir simultáneamente (Figura 2) como:

1. Cremado o sedimentación: Este proceso ocurre debido a la diferencia de las densidades entre las fases dispersa y continua. Las gotas se redistribuyen en la parte superior de la emulsión, si la fase dispersa (las gotas) tiene menor densidad; en el caso contrario, se sedimenta. En estos mecanismos no se observa cambio en la distribución del tamaño (Chuah et al; 2009).
2. Floculación: las gotas de la fase dispersa se agregan entre si, sin formar una coalescencia. En este mecanismo no tiene modificación en la distribución del tamaño de las gotas que forman la emulsión(Chuah et al; 2009).
3. Coalescencia: proceso de crecimiento de las gotas que se produce cuando las gotas pequeñas se unen al contacto entre si. Este mecanismo es irreversible, hay una fusión de las gotas aumentando su tamaño (Chuah et al; 2009).

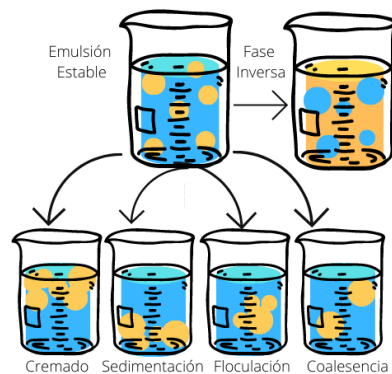


Figura 2. Tipos de inestabilidad en una emulsión

Se ha demostrado que los biopolímeros pueden formar una red de gel en la fase continua mejorando la estabilidad de múltiples emulsiones durante el tiempo de almacenamiento (Chuah et al; 2009; Mohammadi et al. 2015). Mahmood y Akhtar 2013 desarrollaron emulsiones dobles ($W_1/O/W_2$) basadas en aceite de parafina extra puro (cetil dimeticona copoliol/polisorbato 80) incorporado con GTE (5%), aunque tales emulsiones fueron lo suficientemente estables frente a cualquier separación de fases, algunos parámetros, como el pH, la viscosidad y la conductividad, no fueron lo suficientemente estables a largo plazo (30 días) para el desarrollo de emulsiones múltiples. Debido a lo anterior, Mahmood et al. (2014) evaluaron la estabilidad de las emulsiones dobles ($W_1/O/W_2$) basadas en cetil dimeticona copoliol (emulsionante lipofílico) y una mezcla de polioxietileno (20) cetil éter y cetomacrogol 1000® (emulsionantes hidrófilos) con la presencia de un espesante e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC). Con estas pruebas se logró estabilizar la emulsión $W_1 / O / W_2$ durante un período de 12 meses.

3 JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, los consumidores han centrado su atención en el consumo de alimentos funcionales que brinden las propiedades nutricionales básicas y además que proporcionan efectos benéficos a la salud, reduciendo el riesgo de algunas enfermedades como enfermedades crónico no transmisibles, cardiovasculares, cáncer, entre otras. En este contexto, el té verde es ampliamente consumido a nivel global ya que posee una amplia variedad de propiedades antioxidantes, antimicrobianas, anticancerígenas, anticardiovasculares y antihiper glucémicas, entre otras. En años recientes el interés de la industria alimentaria se ha enfocado en el desarrollo de una amplia variedad de productos suplementados con compuestos bioactivos. Debido a sus propiedades, la incorporación de té verde es una buena alternativa para el desarrollo de alimentos funcionales. Sin embargo, factores tales como la temperatura, pH, oxígeno, presencia de iones metálicos, así como ingredientes añadidos durante su procesamiento, contribuyen a la degradación de los compuestos activos, principalmente de las catequinas, provocando su oxidación, epimerización y polimerización, entre otras. La tecnología de emulsiones múltiples gelificadas puede ser una alternativa para disminuir los problemas asociados con la degradación de los compuestos activos del té verde durante el almacenamiento, y podría ser una alternativa para reducir los problemas asociados con la incorporación del té verde en el desarrollo de diversos productos alimenticios.

4 HIPÓTESIS

Las emulsiones dobles gelificadas a base de mucílago de chía y mezclas con diferentes biopolímeros brindan una barrera de protección contra la degradación de los compuestos bioactivos del GTE durante el almacenamiento permitiendo una liberación controlada durante el proceso de digestión gástrica e intestinal (*in-vitro*).

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Desarrollar y caracterizar emulsiones dobles gelificadas a base de mucílago de chía (*Salvia hispanica*) y mezclas de diferentes biopolímeros (WPC, Thixogum, Goma de algarrobo y κ -carragenano) incorporadas con un extracto de té verde (*Camellia sinensis*) durante el almacenamiento.

5.2 Objetivos Particulares

1. Extraer un extracto de té verde para la obtención de compuestos antioxidantes.
2. Extraer el mucílago de chía para su uso como biopolimero en el desarrollo de las emulsiones dobles gelificadas.
3. Desarrollar las emulsiones dobles gelificadas con mucílago de chía y mezcla de diferentes biopolímeros.
4. Caracterizar fisicoquímicamente las emulsiones dobles gelificadas respecto al tiempo (tamaño de partícula, índice de cremado, actividad antioxidante y contenido total de polifenoles)
5. Evaluar el proceso de digestión de las emulsiones dobles gelificadas e incorporadas con GTE en un ambiente gastrointestinal simulado.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Materiales

GTE se obtuvo de Organic by the Cup S.A. de C.V. El aceite de canola y la semilla de chía se compraron en un supermercado local en Monterrey, Nuevo León, México. (goma), goma de algarrobo (L), κ -carragenano (C) y Thixogum (T; mezcla sinérgica coprocesada de goma de acacia altamente purificada y xantano) fueron adquiridos en Gomas Naturales, S.A de C.V (Ciudad de México, Distrito Federal). El concentrado de proteína de suero (W) fue adquirido en de Ingresas México S.A de C.V (Monterrey, Nuevo León, México). El poliricinoleato de poliglicerol (PGPR 4125, HLB ~ 1.5) Millikan, S.A de C.V (Tlalnepantla, Estado de México, México. Los radicales libres; 1,1 difenil-2-picrilhidrazil (DPPH·+), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS·+) y ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchromano-2 carboxílico (Trolox) se compraron en Sigma-Aldrich Química, S. de R.L. de C.V (Toluca, Estado México, México). Etanol, *n*-hexano, acetona, azida de sodio y cloruro de sodio se compraron en Desarrollo de Especialidades Químicas S.A de C.V (Monterrey, Nuevo León, México).

6.2 Obtención de extracto de GTE

El GTE en polvo, se extrajo mediante agitación magnética constante (Thermo scientific, Super Nova) con una solución etanólica (80%) en una proporción constante 1: 100 (p/v) durante 4 h. Posteriormente, la solución se sometió a un baño ultrasónico(valores), se filtró al vacío (papel de filtro Whatman No. 1), y el etanol se evaporó en un rotavapor (Rotavapor Lauda Alpha, IKA Instruments). La solución concentrada se congeló con CO₂ y luego se liofilizó durante 24 h (Druzyńska et al. 2007)

6.2.1 Caracterización de GTE

6.2.2 Actividad antioxidante y contenido total de fenoles

La actividad antioxidante de GTE (500 mg kg^{-1}) se midió usando los métodos DPPH y ABTS durante 35 días de almacenamiento (0, 7, 14, 21, 28 y 35 días). Se utilizó Trolox (ácido 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcromo-2- carboxílico 97%) como estándar de referencia. Para el ensayo de DPPH se determinó siguiendo el método de Thaipong et al. (2006), con algunas modificaciones; La solución DPPH (0.1 mM) se preparó en etanol al 96% y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (Genesys 5, Thermo Spectronic) a 517 nm (absorbancia = 1.00 ± 0.02). Alícuotas de GTE ($600 \mu\text{L}$) se mezclaron con 2.27 mL de DPPH. Luego se dejó reaccionar la mezcla durante 2 h a $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ en oscuridad y se registró la absorbancia a 517 nm . Se determinó una curva de calibración estándar de Trolox para el radical DPPH variando concentraciones (0 a $300 \mu\text{mol}$). La ecuación de la curva fue $y = 0.7736x + 3.6801$, $R^2 = 0.99$. Los valores de actividad antioxidante se expresaron como μmol equivalente de Trolox (TE) mL^{-1} .

Además, la determinación de ABTS se midió de acuerdo con Jin et al. (2016) con algunas modificaciones. La solución ABTS se preparó en etanol 96 ° (7.0 mmol L^{-1}) y se dejó reaccionar con una solución de persulfato de potasio (2.45 mmol L^{-1}) en una relación 1: 1 (v/v) durante 16 h a $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ en oscuridad. Posteriormente se registró la absorbancia por espectrofotómetro a 734 nm (absorbancia = 0.700 ± 0.02). Se mezclaron alícuotas de GTE ($150 \mu\text{L}$) con solución ABTS (2.7 mL), se dejó reaccionar la mezcla durante 6 minutos a $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ en condiciones oscuras y se registró la absorbancia a 734 nm . Finalmente, se determinó una curva de calibración estándar de Trolox para el radical ABTS a concentraciones que varían de 0 a $300 \mu\text{mol}$. La ecuación de la curva fue $y = 0.4387x + 3.7833$, $R^2 = 0.99$. Los valores de actividad antioxidante se expresaron como $\mu\text{mol TE mL}^{-1}$. La actividad antioxidante para los métodos DPPH y ABTS se calculó como un porcentaje de inhibición de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{[(\text{Absorbancia de control sin GTE}) - (\text{Absorbancia de muestra})]}{(\text{Absorbancia de control sin GTE})} \times 100$$

Finalmente, el contenido total de fenol se determinó mediante el método Folin-Ciocalteu según Thaipong et al. 2006, con algunas modificaciones. Brevemente, se mezclaron GTE (600 μL), agua destilada (1 mL) y reactivo Folin-Ciocalteu (1N; 100 μL) (3 min) y posteriormente se agregó una solución de Na_3CO_2 (20%; 300 μL) y se dejó reaccionar por 90 min; la absorbancia se midió a 734 nm. Se determinó una curva de calibración estándar para catequina en un rango de concentraciones de 20-180 $\mu\text{mol L}^{-1}$. El contenido total de fenol se expresó como μg de equivalentes de catequina (CE) mL^{-1} .

6.3 Extracción de mucílago de chía

La extracción de CM se realizó de acuerdo con los métodos reportados por Capitani et al. 2016 y Timilsena et al. 2016 con algunas modificaciones. Las semillas de chía (100 g) se lavaron con etanol (200 ml) y se pasaron por agitación magnética (2 min) para eliminar las impurezas y se recuperaron con un filtro. Las semillas se colocaron en agua destilada (1:1000 p/v) y se mantuvieron bajo agitación magnética constante durante 4 h; después las semillas hidratadas se congelaron con CO_2 y se secaron por liofilización. Posteriormente la CM se separó de las semillas usando tamices (malla; 297 μm), el CM recuperado (polvo blanquecino) se almacenó en recipientes de plástico. Su rendimiento se determinó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{[\text{masa de semillas de chía}]}{[\text{masa de mucílago de chía}]} \times 100$$

6.4 Preparación de emulsiones dobles gelificadas

La fase acuosa interna (W_1) se preparó disolviendo WPC, azida de sodio, NaCl y GTE (500 mg kg^{-1} para obtener una concentración final de 100 mg kg^{-1}) en agua destilada mediante agitación magnética constante (2 h) y aceite. La fase (O) se preparó

dispersando PGPR en aceite de canola a 50° C para reducir la viscosidad de estas soluciones. La fase W¹ ($\phi_1= 0.2$; fracción en peso de la fase dispersa) se dispersó en la fase O con un homogeneizador de alta potencia (Ultra Turrax IKA-T50 digital) a 7500 rpm durante 5 min⁻¹ (emulsión primaria). Se prepararon cinco soluciones diferentes para las fases acuosas externas (W₂); CM (solo) y en combinaciones (1:1), CMC (mucílago de chíá/ κ -carragenano), CML (mucílago de chíá/goma de algarrobo), CMT (mucílago de chíá/tixogum) y CMW (mucílago de chíá /concentrado de proteína de suero) por agitación magnética constante hasta que se disuelva por completo; las concentraciones se establecieron en base a experimentos previos (datos no mostrados). Finalmente, la fase W₁/O se goteó en la fase W₂ ($\phi_2= 0.2$), seguido de la mezcla con un homogeneizador de alta potencia a 7500 rpm durante 5 min⁻¹ (emulsión doble, W₁/O/W₂). Las emulsiones dobles gelificadas se almacenaron a 4° C durante 35 días, su composiciones se muestra en la Tabla 1.

6.5 Caracterización de emulsiones dobles gelificadas

6.5.1 Microscopia óptica

Se obtuvieron imágenes microscópicas de las emulsiones dobles gelificadas (día 0 de almacenamiento) usando un microscopio óptico convencional (Leica DM 500) equipado con una cámara y el software Image pro plus 4.0. Las emulsiones se observaron con un objetivo de aumento de 100x, utilizando aceite de inmersión.

Tabla 1. Composición química de las emulsiones dobles gelificadas

Emulsiones	Emulsión Primaria (W₁/O) ($\phi_1=0.2$)					Segunda fase acuosa (W₂) ($\phi_2=0.2$)				
	Fase acuosa			Fase oleosa		Fase acuosa				
	WPC (%)	NaCl (%)	Azida de sodio (%)	GTE mg kg ⁻¹	PGPR (%)	CM (%)	C (%)	L (%)	T (%)	W (%)
CM	15	0.02	0.02	500	7.5	2	-	-	-	-
CMC	15	0.02	0.02	500	7.5	1	1	-	-	-
CML	15	0.02	0.02	500	7.5	1	-	1	-	-
CMT	15	0.02	0.02	500	7.5	1	-	-	1	-
CMW	15	0.02	0.02	500	7.5	1	-	-	-	1

Note: CM (mucílago de chíá), C (κ -carragenano), L (goma de algarrobo), T (thixogum), W (concentrado de proteína de suero).

6.5.2 Tamaño de partícula

El tamaño de partícula se determinó mediante dispersión de luz láser, utilizando un Mastersizer 3000 (Malvern Instruments, Reino Unido) acoplado a un accesorio hidro EV utilizando agua como dispersante. La difracción láser midió la distribución del tamaño de partícula (diámetro equivalente al volumen) a partir de la variación angular de la intensidad de la luz dispersa, cuando el rayo láser atraviesa las partículas dispersas en la solución. Los datos se integran en función de la intensidad de dispersión angular, calculando tamaño de partícula a través de la teoría de Mie de dispersión de luz. El tamaño de partícula se evaluó a través del diámetro promedio superficial del volumen ($D_{3,2}$) a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, como lo reportan Guo y Mu (2011). Las propiedades ópticas de las muestras se definieron como índice de refracción de 1.46 (WPC) y 1.43 para los biopolímeros (C, L, T, W), agua como dispersante con un índice de refracción de 1.33. Los resultados se expresaron como el valor medio \pm desviación estándar (Khor *et al.* 2014).

6.5.3 Índice de cremado

Las medidas de estabilidad de la formación de crema de emulsiones dobles gelificadas (Tabla 1.) se realizaron de acuerdo con Surh *et al.* (2007) con ligeras modificaciones. Las emulsiones (10 g) se transfirieron a un recipiente de plástico (15 ml) y se almacenaron a 4°C durante 35 días. La estabilidad de la crema se determinó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Índice de cremación (\%)} = \frac{[(\text{altura total de la emulsión}) / (\text{altura de la capa de suero})] \times 100}$$

6.5.4 Actividad antioxidante y contenido fenólico total

El efecto protector de las emulsiones dobles gelificadas se determinó evaluando la actividad antioxidante y el contenido total de fenoles de GTE encapsulado en las emulsiones durante 35 días de almacenamiento. En primer lugar, la ruptura de las

emulsiones dobles gelificadas se llevó a cabo según lo informado por Rodríguez-Huezo et al. 2004 con algunas modificaciones. Las emulsiones (1 g) se colocaron por separado en un tubo de centrífuga que contenía 3 ml de una solución de NaCl (10%) / metanol (1:1) y se agitó durante 10 minutos, luego, se añadieron 8 ml de una solución de hexano/acetona (1:1), la mezcla permaneció en agitación constante en un vórtice (2 min; Mixer Labnet Internacional, Inc.). Posteriormente se colocó en un baño ultrasónico (70 Hz; Sonic Ruptor 250, Omni International) durante 10 min. La mezcla se centrifugó (10,000 rpm durante 30 minutos) y la fracción orgánica media resultante de este proceso se usó para determinar la actividad antioxidante y fenoles totales (sección 6.3.1). El efecto protector de las emulsiones dobles gelificadas se determinó en los días 7, 14, 21, 28 y 35 de almacenamiento, respectivamente. Los resultados se expresaron como pérdida de actividad antioxidante (DPPH·+ and ABTS·+) y pérdida de contenido fenólico total de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Pérdida de actividad (\%)} = \frac{[(\text{mediciones en diferentes días}) / (\text{mediciones en el día 0})]}{x 100}$$

6.6 Biodisponibilidad (proceso de digestión in vitro)

Los procesos de digestión in vitro se realizaron según lo señalado por Aceituno-Medina *et al.* 2015 con algunas modificaciones. Para la fase de digestión gástrica, por separado, se prepararon soluciones que contenían emulsiones dobles gelificadas y agua destilada (30 ml en una proporción 1:1). Estas soluciones se acidificaron con HCl (6 M) para obtener un pH= 2 y posteriormente se agregaron a una solución de pepsina porcina (0.6 mL; 160 mg mL⁻¹ previamente preparada en una solución de HCl 0.1 M) y agua destilada para obtener un volumen final de 40 ml. Esta solución permaneció bajo agitación constante durante 2 ha 37° C en condiciones oscuras (0-120 min). Después de la digestión gástrica, el pH de la solución se ajustó a 7 mediante la adición de NaHCO₃ (0.045 M) y una solución de pancreatina-bilis (2.4 mL; pancreatina 4 mg mL⁻¹, bilis 25 mg mL⁻¹ preparada en 0.1 NaHCO₃) adicional; la mezcla se agitó a 37° C durante 2 h en obscuridad (fase de digestión intestinal; 120 - 240 min). El GTE liberado durante las condiciones gástricas (10, 30, 60, 90 y 120 min, respectivamente)

e intestinal (130, 160, 180, 210 y 240 min, respectivamente) se calculó midiendo las muestras (600 µL) obtenidas directamente del tubo del medio digestivo por el método de actividad antioxidante (ABTS) como se informó en las secciones anteriores (2.2.1). El GTE liberado se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{GTE liberado (\%)} = \left[\frac{\text{(mediciones en diferentes momentos)}}{\text{(mediciones a 0 min)}} \right] \times 100$$

Se calculó el tamaño medio de gota $D_{4,3}$ (µm) y las imágenes microscópicas de las emulsiones dobles gelificadas durante el proceso de digestión in vitro como se describe en las secciones anteriores (6.6.2).

6.7 Análisis estadístico

Todas las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado (n= 3). El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el software SPSS (IBM versión 22, SPSS Inc, Chicago IL). Los datos se analizaron mediante una prueba de varianza (ANOVA) y una prueba de Tukey. Las diferencias entre medias se consideraron significativas a valores de $p \leq 0.05$.

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Obtención de extracto de té verde (GTE)

El GTE tuvo un rendimiento de 28.2% de materia seca total (datos no mostrados), similar al reportado por Unno y Osakabe, 2018.

7.2 Actividad antioxidante y contenido fenólico total de GTE

Los resultados obtenidos con respecto a la actividad antioxidante y el contenido total de polifenoles de GTE se muestran en la Figura 1, 2 y 3 respectivamente. La medición de la actividad antioxidante realizada por el método DPPH varió entre 1868.57 y 208.86 $\mu\text{mol TE mL}^{-1}$ (% de inhibición: 53.53% y 9.25% en los días 0 y 35, respectivamente; datos no mostrados) y para ABTS entre 9164.26 y 1685.45 $\mu\text{mol TE mL}^{-1}$ (% de inhibición: 84.19% y 18.57% en los días 0 y 35, respectivamente; datos no mostrados). Wang y Liang 2018 y Afify et al. 2011 informaron resultados similares en fase acuosa de GTE. Se observó el mismo comportamiento de una pérdida significativa de actividad antioxidante al final del tiempo de almacenamiento ($p < 0.05$; 88.82% y 81.60% para DPPH y ABTS respectivamente). Por otro lado, GTE mostró un contenido inicial total de polifenoles de 1360.49 $\mu\text{g CE mL}^{-1}$, con una pérdida significativa de hasta 64.26% (486.14 $\mu\text{g CE mL}^{-1}$) para el día 35 de almacenamiento. Los valores más altos de este parámetro han sido reportados en estudios previos (Gramza et al. 2005; Kodama et al. 2009). Este efecto puede estar asociado con el método de extracción. Según el informe de Friedman et al. 2009, la pérdida de actividad antioxidante y polifenoles en GTE a lo largo del tiempo se puede atribuir a una degradación progresiva de los niveles de catequinas, principalmente de -epigallocatequina y epigallocatequina 3-galato.

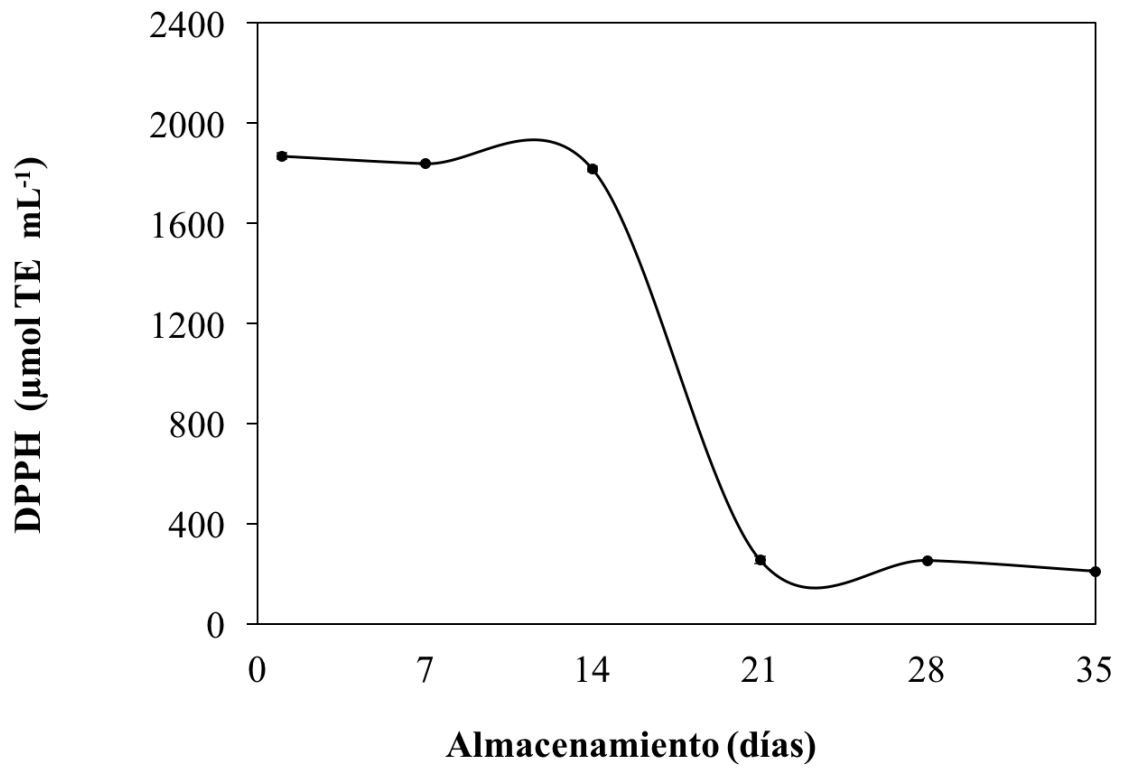


Figura 3. Propiedades antioxidantes del GTE por el método DPPH·+, del GTE almacenado a 4 °C durante 35 días. Valores promedios ± desviación estándar (n=3).

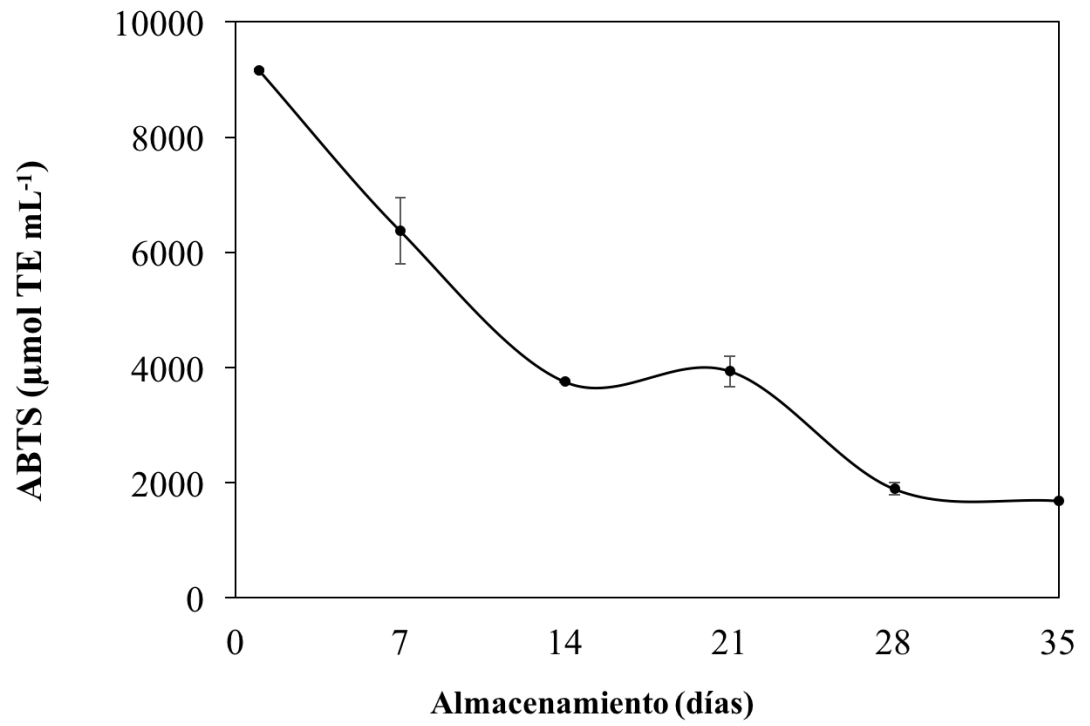


Figura4. Propiedades antioxidantes del GTE ,por el método ABTS almacenado a 4 °C durante 35 días. Valores promedios ± desviación estándar (n=3).

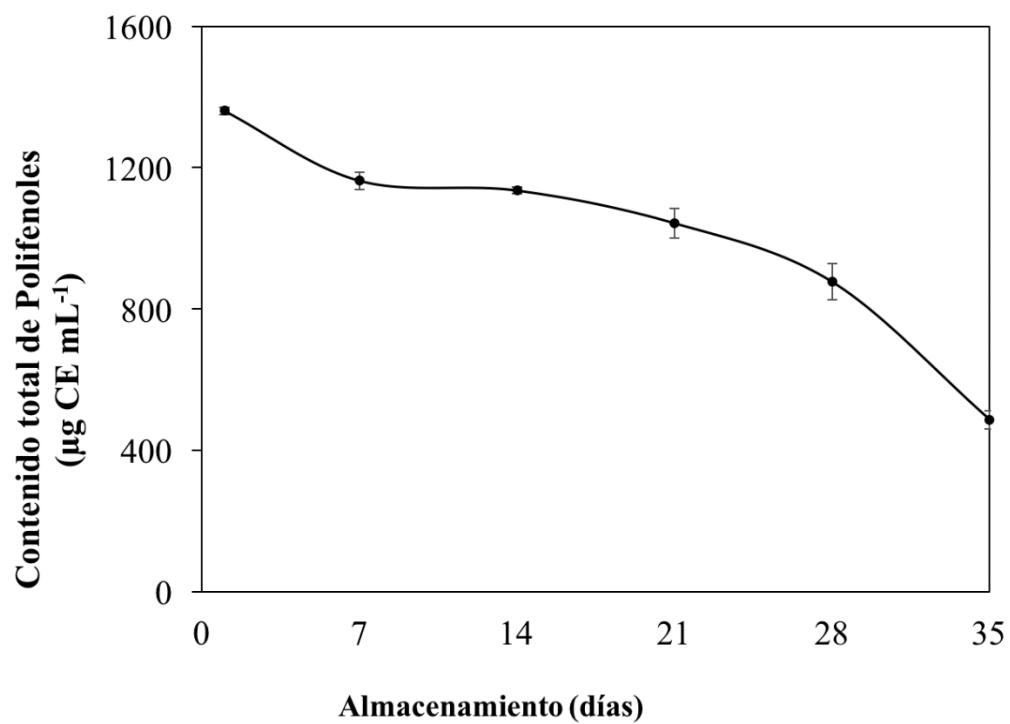


Figura 5. Contenido total de polifenoles del GTE almacenado a 4 °C durante 35 días. (n=3) Valores promedios \pm desviación estándar (n=3).

7.3 Extracción de mucílago de chíá (CM)

Los rendimientos de CM obtenidos en este estudio fueron de 5.31% de materia seca total (datos no mostrados), similar al encontrado por Campos et al. 2016. Además, Muñoz et al. 2012, informaron valores más altos, con rendimientos del 6,97%; Esta diferencia puede estar vinculada a la variedad de semillas y al método de extracción.

7.4 Caracterización y estabilidad de emulsiones dobles gelificadas

7.4.1 Análisis microscópico

Se obtuvieron emulsiones dobles gelificadas basadas en CM y mezclas con diferentes biopolímeros (CMC, CML, CMT y CMW) encapsulando GTE. En la Figura 6 se muestran las imágenes microscópicas de las emulsiones dobles gelificadas recién elaboradas. En general, en todas las emulsiones se observaron claramente las gotas de la fase interna rodeadas por gotas de aceite dispersas en la segunda fase acuosa, que son características típicas de las emulsiones dobles (Surh et al. 2007; Frasch-Melnik et al. 2010; Aditya et al. 2015).

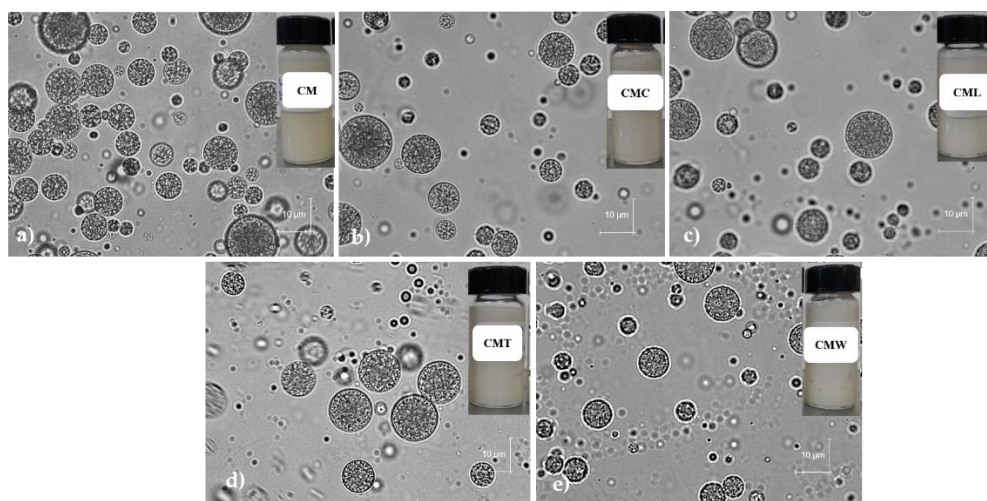


Figura 6. Imágenes de microscopio de las emulsiones dobles gelificadas —(a) CM, (b) CMC, (c) CML, (d) CMT y (e) CMW— a los 0 días de almacenamiento.

7.4.2 Mediciones de tamaño de gota

El tamaño de gota fue significativamente diferente ($p < 0.05$) entre las emulsiones dobles gelificadas (día 0), el valor más alto fue presentado por CMT ($D_{3,2} = 3.02 \mu\text{m}$ y $D_{4,3} = 25.48 \mu\text{m}$) y el más bajo fue para CMW con valores de $D_{3,2} = 2.42 \mu\text{m}$ y $D_{4,3} = 10.10 \mu\text{m}$. Los tamaños intermedios fueron presentados por CM, CML y CMC ($D_{3,2} = 2.55\text{-}2.84 \mu\text{m}$; Figura 8 y $D_{4,3} = 12.02\text{-}21.04 \mu\text{m}$; Figura 7). Según Mohammadi *et al.* 2015, el uso simultáneo de dos biopolímeros puede aumentar el grosor de la capa de emulsionante alrededor de las gotas y, por lo tanto, aumentar el tamaño de las gotas, similar al que se encuentra en CML, CMC y CMT. Por otro lado, Capitani *et al.* 2016, informan que este efecto también puede estar asociado con un aumento en la viscosidad de la fase acuosa generada por los diferentes biopolímeros, ya que la viscosidad podría afectar el proceso de homogeneización, evitando la ruptura completa de las gotas, dando como resultado una distribución más grande de gotas, similar a la encontrada en emulsiones dobles gelificadas CML, CM, CMT y CMC (viscosidad = 10.15-104.53 Pa.s a una velocidad de corte $\dot{\gamma} = 0.1 \text{ seg}^{-1}$, datos no mostrados), sin embargo, este comportamiento no se encontró en CMW porque el WPC forma un gel débil de baja viscosidad (viscosidad = $2.23 \pm 0.43 \text{ Pa.s}$ a una velocidad de corte $\dot{\gamma} = 0.1 \text{ seg}^{-1}$, datos no mostrados). En comparación con la literatura, se han informado valores de tamaño de partícula inferiores a CML CMC y CMT (Mahmood *et al.* 2013; Von Staszewski *et al.* 2011) y similares a CMW y CM en estudios previos de emulsiones dobles que encapsulan té verde (Mahmood *et al.* 2013). Por otro lado, con respecto al tamaño de partícula durante el almacenamiento, las emulsiones CMW y CM se mantuvieron significativamente estables ($p < 0.05$), con valores de $10.90 \mu\text{m}$ y $10.44 \mu\text{m}$ ($D_{4,3}$), respectivamente, para el día 35 de almacenamiento. Los valores de tamaño de gota más bajos encontrados en la emulsión doble gelificada CMW durante el almacenamiento se pueden atribuir al hecho de que CMW contiene una cantidad significativa de proteínas, las cuales tienen una superficie activa y mejores propiedades emulsionantes, lo que resulta en una emulsión más estable (Von Staszewski *et al.* 2011). Del mismo modo, CM (solo) mostró pequeñas gotas que resultan en una emulsión estable (Capitani *et al.* 2016). Además, para las emulsiones CMC, CML,

CMT, se observó una disminución ($p < 0.05$) en el tamaño de partícula desde el día 7 de almacenamiento, con valores finales de 15.00, 10.26 y 19.00 μm ($D_{4,3}$), respectivamente, de acuerdo con informes anteriores (McClements 2015). Este efecto podría estar asociado con el hecho de que estas mezclas no son particularmente activas en la superficie, lo que lleva a emulsiones con tamaños de gotas más grandes. En general, este comportamiento también se encontró en los valores $D_{3,2}$ durante todo el período de almacenamiento esta reducción del tamaño de gota podría estar asociada con una fuga de agua desde la fase acuosa interna a la fase externa de las emulsiones; resultados que son congruentes en nanoemulsiones dobles cargadas con té verde (Mahmood et al. 2014).

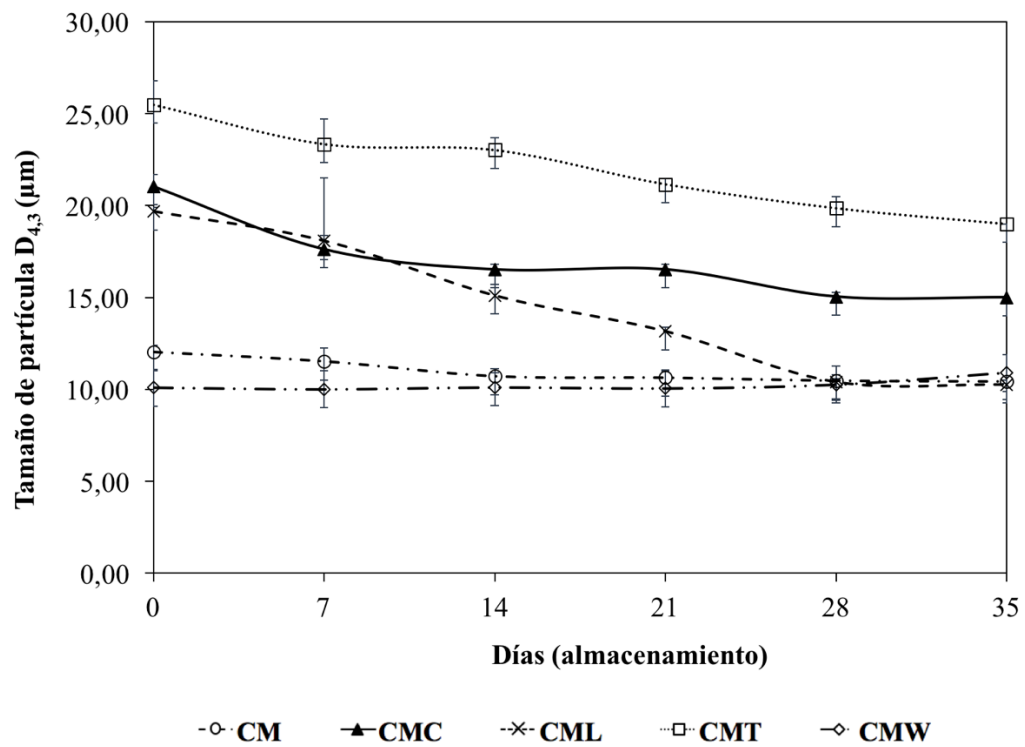


Figura 7. Tamaño de partícula $D_{4,3}$ de emulsiones dobles gelificadas almacenadas a 4 °C durante 35 días de almacenamiento. Valores promedios \pm Desviación estándar (n=3).

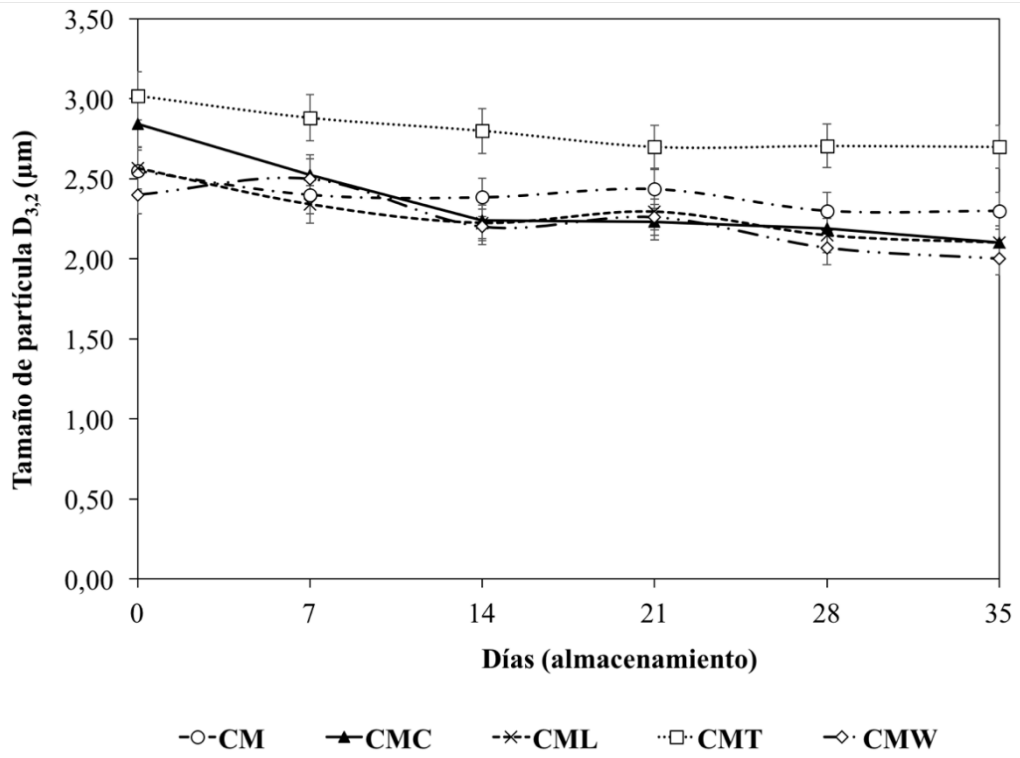


Figura 8. Tamaño de partícula $D_{3,2}$ de emulsiones dobles gelificadas almacenadas a 4 °C durante 35 días de almacenamiento. Valores promedios \pm Desviación estándar (n=3).

7.4.3 Mediciones de estabilidad de las emulsiones

Las emulsiones dobles gelificadas fueron altamente estables contra la formación de crema durante los 35 días de almacenamiento (índice de crema= 0%), lo que indica que CM y su uso simultáneo con CMC, CML, CMT y CMW eran una alternativa adecuada para estabilizar las gotas externas en las emulsiones dobles debido al hecho de que forman una gruesa red polimérica de gelificación fuerte que mejora la estabilidad mecánica y estérica, proporcionando resistencia a la ruptura de las gotas [módulo elástico (G') de CM= 80.792 Pa, CMW= 13.463 Pa, CML= 69.020 Pa, CMT= 98.109 Pa y CMC= 564.428 Pa, a una velocidad de corte $\dot{\gamma}$ = 0.1 seg^{-1} , datos no mostrados] (Capitani *et al.* 2016; Kosegarten *et al.* 2012; Schuch *et al.* 2015). Finalmente, nuestros resultados están de acuerdo con Ye *et al.* 2004, quienes encontraron que la incorporación de polisacáridos en fase acuosa externa a concentraciones > 0.1% evita la formación de cremas durante el tiempo de almacenamiento.

7.4.4 Efecto protector de la emulsión doble gelificada sobre GTE

El efecto protector contra la degradación de GTE contenido en emulsiones dobles gelificadas durante el almacenamiento por DPPH, ABTS y el contenido total de polifenoles se muestra en la Tabla 2 y la Figura 7, 8 y 9, respectivamente. Para emulsiones dobles gelificadas los valores iniciales de actividad antioxidante realizados por los métodos DPPH y ABTS variaron entre 1954.50-2333.15 $\mu\text{mol TE mL}^{-1}$ y 17343.51-19098.70 $\mu\text{mol TE mL}^{-1}$, respectivamente. En estas emulsiones el contenido total de polifenoles, mostraron valores que oscilaban entre 2656.36-4135.97 $\mu\text{mol CE mL}^{-1}$ (Tabla 2) que corresponden a los valores mas altos. En general, la emulsión doble gelificada CML mostró los valores más altos en estos parámetros. Por el contrario, GTE mostró los valores más bajos de actividad antioxidante (DPPH= 1868.57 $\mu\text{mol TE mL}^{-1}$ y ABTS= 9164.30 $\mu\text{mol TE mL}^{-1}$), y fenoles totales (1360.49 $\mu\text{mol CE mL}^{-1}$; día 0). Además, durante el tiempo de almacenamiento de 35 días, se observó una disminución significativa ($p < 0.05$) en los valores de actividad antioxidante en todos los tratamientos. Sin embargo, esta disminución fue

significativamente mayor ($p < 0.05$) en GTE, lo que indica que las emulsiones dobles gelificadas tuvieron un efecto protector contra la degradación de antioxidantes y compuestos fenólicos. Al final del almacenamiento (día 35), los valores de actividad antioxidante de las emulsiones dobles gelificadas oscilaron entre 1361.83-1839.26 $\mu\text{mol TE mL}^{-1}$ (DPPH) y 15898.77-17689.77 $\mu\text{mol TE mL}^{-1}$ (ABTS) mientras que el contenido total polifenoles fluctuaron entre 2312.88- 3805.70 $\mu\text{mol CE mL}^{-1}$; de nuevo, la emulsión doble gelificada de CML mostró los valores más altos en estos parámetros (Tabla 2). Finalmente, GTE mostró los valores más bajos de actividad antioxidante y fenoles totales que fueron de 208.82 $\mu\text{mol TE mL}^{-1}$ (DPPH), 1685.45 $\mu\text{mol TE mL}^{-1}$ (ABTS) y 486.14 $\mu\text{mol CE mL}^{-1}$, respectivamente (Tabla 2). Las emulsiones dobles gelificadas CMT, CML, CM presentaron una barrera de protección similar en relación con la pérdida de actividad antioxidante (día 35, 15.13-25.86% y 6.89-8.33% para DPPH y ABTS, respectivamente) y polifenoles (7,99-15,13%), con respecto a sus valores iniciales (día 0). Además, aunque la CMC mostró altos valores de actividad antioxidante y fenoles totales, esta emulsión fue menos efectiva para prevenir la degradación de antioxidantes y polifenoles (DPPH= 33.48%, ABTS= 13.41%, fenoles totales= 17.25% en el día 35) con respecto a sus valores iniciales (día 0), en comparación con CMT, CML y CM. Del mismo modo, aunque CMW mostró valores altos de actividad antioxidante y fenoles totales, esta emulsión mostró los valores más altos de pérdida de actividad antioxidante (DPPH= 38.32%; Figura 9 y ABTS= 9.82%; Figura 10 en el día 35) y polifenoles (15.12 %; Figura 11 en el día 35) con respecto a sus valores iniciales (día 0). Finalmente, GTE mostró la mayor pérdida de actividad antioxidante (hasta 88.82%; Figura 9 y 19) y de fenoles totales (64.26%; Figura 11) durante el almacenamiento. Las emulsiones dobles gelificadas estabilizadas con CM y combinadas con otros polisacáridos, como el tixogum, la goma de algarrobo y el κ -carragenano fueron efectivos para reducir la pérdida de actividad antioxidante y polifenoles durante el almacenamiento, este hecho puede atribuirse a que estos polisacáridos actúan como agentes espesantes, aumentando la viscosidad de la fase acuosa externa formando una red fuerte de polímeros que atrapa el compuesto activo dentro de su estructura, actuando como una barrera protectora contra la degradación de GTE (Patel et al. 2015). Por otro lado, la pérdida de actividad en CMW podría estar asociada con la formación de una red de polímeros más débil (geles débiles) (Lizarraga

et al. 2006; Manoi et al. 2006). Además, se ha reportado que las interacciones proteína-polifenoles de la fase externa podrían afectar y enmascarar la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos (Siebert et al. 1996; Jakobek 2015).

Tabla 2. Propiedades antioxidantes (DPPH·+ and ABTS·+) y contenido total de polifenoles de las emulsiones dobles gelificadas y GTE, después de 35 días de almacenamiento.

Emul -siones Gelificadas	DPPH·+		ABTS·+		Contenido Total de Polifenoles	
	Dobles(μmol TE mL ⁻¹)		(μmol TE mL ⁻¹)		(μg CE mL ⁻¹)	
	Día 0	Día 35	Día 0	Día 35	Día 0	Día 35
CM	^b 1,954.50 ± 11.40 ^A	^b 1,449.08 ± 80.29 ^B	^b 17,343.51 ± 20.68 ^A	^b 15,898.77 ± 20.68 ^B	^d 3,951.02 ± 82.05 ^A	^e 3,353.23±2.86 ^B
CMC	^c 2,176.75 ± 44.54 ^A	^b 1,439.21 ± 5.70 ^B	^c 18,704.68 ± 41.36 ^A	^c 16,197.27 ± 54.71 ^B	^d 4,010.47 ± 2.86 ^A	^d 3,318.56±2.86 ^B
CML	^d 2,333.15 ± 7.54 ^A	^c 1,839.26 ± 2.85 ^B	^c 19,098.70 ± 20.68 ^A	^e 17,689.77 ± 20.86 ^B	^e 4,135.97 ± 5.72 ^A	^f 3,805.70±8.58 ^B
CMT	^c 2,143.82 ± 18.08 ^A	^c 1,819.50 ± 11.40 ^B	^b 17,844.99 ± 593.28 ^A	^d 16,615.17 ± 230.29 ^B	^b 2,656.36 ± 42.09 ^A	^b 2,312.88±2.86 ^B
CMW	^c 2,208.03 ± 69.14 ^A	^b 1,361.83 ± 22.81 ^B	^c 18,609.16 ± 62.04 ^A	^c 16,782.33 ± 35.82 ^B	^c 3,526.63 ± 5.72 ^A	^c 2,993.24±8.58 ^B
GTE	^a 1,868.57 ± 12.43 ^A	^a 208.82 ± 5.70 ^B	^a 9,164.30 ± 18.80 ^A	^a 1,685.45 ± 16.28 ^B	^a 1,360.49 ± 176.08 ^A	^a 486.14± 24.99 ^B

Note: CM (mucilago de chíá), CMC (mucilago de chíá/κ-carragenano), CML (chía/goma de algarrobo), CMT (chía/thixogum), CMW (mucilago de chíá / concentrado de proteína de suero) and GTE (extracto de té verde). Las medias dentro de la fila (A, B, C) y una columna (a, b, c) que no tiene una letra superíndice común, son significativamente diferentes (P < 0.05).

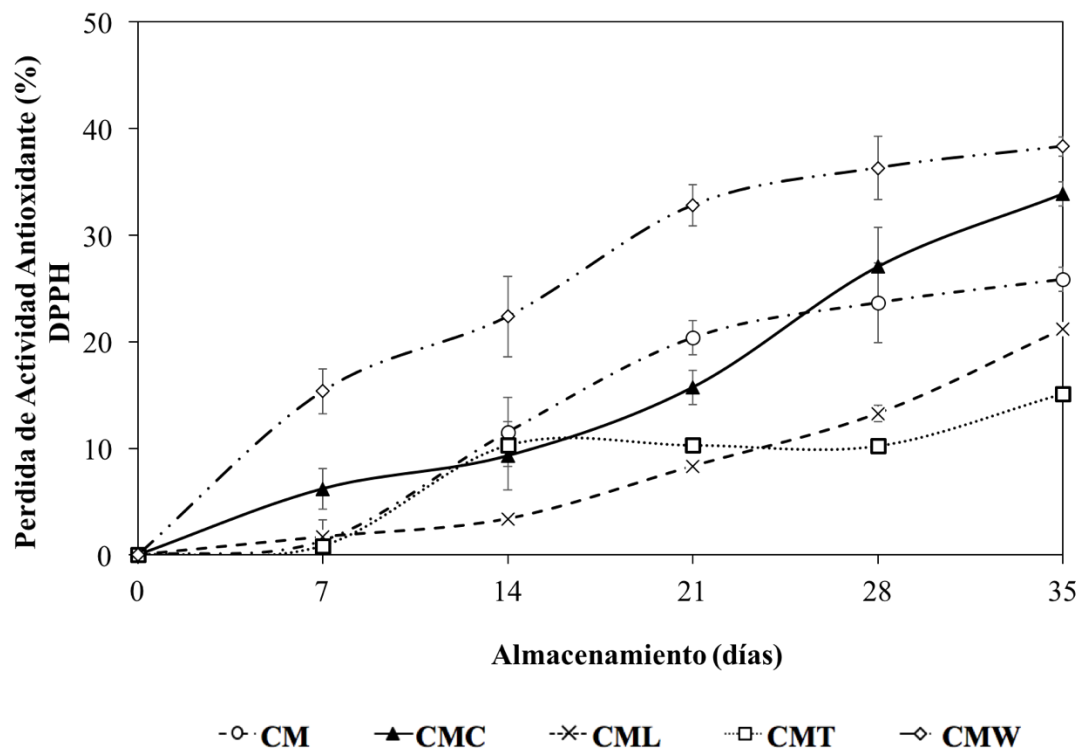


Figura 9. Propiedades antioxidantes de las emulsiones dobles gelificadas y GTE (almacenadas 4°C x35 días) determinadas con el método DPPH. (n=3)

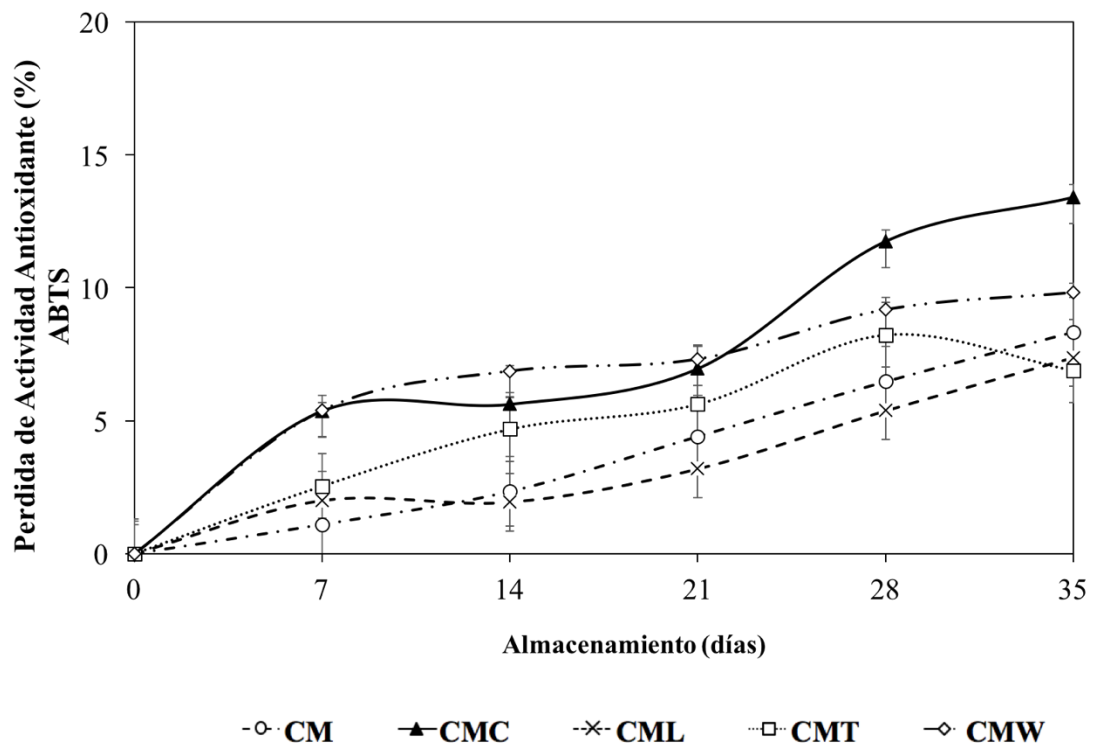


Figura 10. Propiedades Antioxidantes de las emulsiones dobles gelificadas y GTE del método ABTS.+ almacenados a 4 °C durante 35 días de almacenamiento. Valores promedio \pm desviación estándar (n=3).

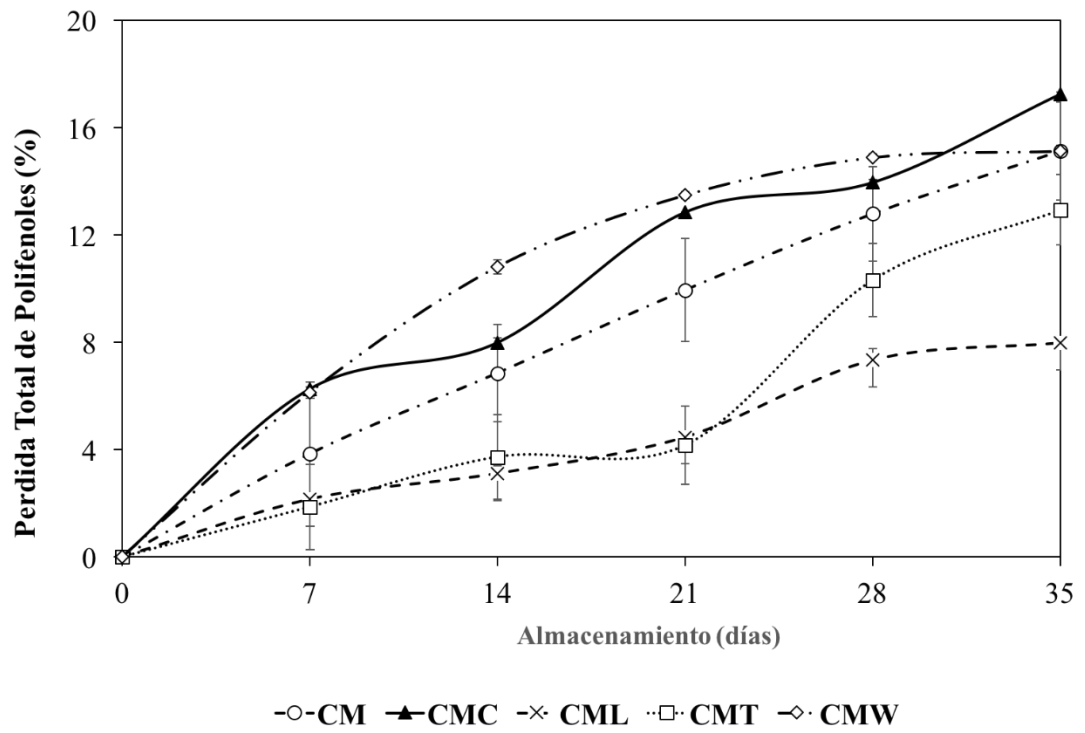


Figura 11. Contenido total de polifenoles de las emulsiones dobles gelificadas y GTE almacenados a 4 °C durante 35 días de almacenamiento. Valores promedio \pm desviación estándar (n=3).

7.5 Digestibilidad (in vitro) de emulsiones dobles gelificadas

7.5.1 Biodisponibilidad (proceso de digestión in vitro)

Los perfiles de liberación de las emulsiones dobles gelificadas cargadas con GTE (día 0) durante el proceso de digestión in vitro se muestran en la Figura 12. Entre 0-10 min se observó un aumento significativo ($p < 0.05$) en la liberación de GTE en CMC, CMT, CM (36.47-39.94%), seguido de CMW (48.22%) y CML (8.47%), cuyos valores fueron menor en comparación con el resto de los tratamientos. Además, entre los 30-120 minutos se observó una estabilidad significativa ($p < 0.05$) en el perfil de liberación de GTE en las emulsiones CML, CMT, CM y CMW (9.42, 41.55, 49.42 y 53.33% a los 120 minutos, respectivamente). La emulsión doble CMC fue la más sensible al proceso de digestión gástrica, presentó una liberación constante entre los 10-120 min (36.47-50.05%). Lamothe et al. 2014 y Namal 2013 señalan que el efecto de la estabilidad observada en el proceso de digestión gástrica in vitro puede atribuirse al hecho de que algunos compuestos fenólicos del GTE (por ejemplo, catequinas y ácido gálico) son estables a pH similares a los reportados en el estómago ($pH < 4$). Además, estos polifenoles pueden interactuar con la pepsina, lo que resulta en un cambio en su conformación molecular y reduce su actividad catalítica. Por otro lado, en la transición de la fase gástrica a la intestinal se observó nuevamente un rápido aumento ($p < 0.05$) en el perfil de liberación del GTE en todos los tratamientos. Las emulsiones dobles gelificadas CMC, CM y CMT se digirieron con mayor facilidad y presentaron un mayor porcentaje de liberación a los 160 min (67,98%) y 180 min (83,31% y 78,06%), respectivamente. Además, CML y CMW mostraron su mayor liberación a 210 y 240 min con valores de 64.57% y 74.58%, respectivamente. Este efecto puede estar asociado con la inestabilidad de las catequinas de GTE a pH alcalino (> 6). Los hallazgos indican que las emulsiones dobles gelificadas pueden actuar como una barrera protectora al modular el proceso de liberación de polifenoles en un entorno gastrointestinal simulado, preservando su estabilidad y permitiendo una liberación controlada de GTE en el intestino delgado (Lamothe et al. 2014; Parija et al. 2015; López et al. 2014). Los valores de actividad antioxidante tanto de las emulsiones

dobles gelificadas como del GTE (libre) a lo largo de las fases de digestión in vitro se muestran en la siguiente sección.

7.5.2 Actividad antioxidante durante el proceso de digestión in vitro

Con respecto a la actividad antioxidante a lo largo de las fases de digestión in vitro, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 3) y entre las fases del proceso de digestión ($p < 0.05$). Los valores de actividad antioxidante en la fase inicial (10 min) fueron mayores para GTE libre ($8984.24 \mu\text{mol TE mL}^{-1}$), seguidos de CMW ($7315.70 \mu\text{mol TE mL}^{-1}$). Por otro lado, CMT, CM y CMC presentaron valores similares (5059.73 - $5265.95 \mu\text{mol TE mL}^{-1}$) mientras que el valor más bajo fue para CML ($1466.48 \mu\text{mol TE mL}^{-1}$). Entre los 10-120 minutos de la fase de digestión gástrica, se encontró un aumento en la actividad antioxidante tanto para GTE libre como para emulsiones dobles gelificadas. Al final de este proceso, la actividad antioxidante fue mayor para GTE ($9315.45 \mu\text{mol TE mL}^{-1}$) porque es libre, seguido de CMW ($8090.60 \mu\text{mol TE mL}^{-1}$), CMC ($7228.21 \mu\text{mol TE mL}^{-1}$), CM ($6353.32 \mu\text{mol TE mL}^{-1}$), CMT ($5697.15 \mu\text{mol TE mL}^{-1}$) y CML ($1631.46 \mu\text{mol TE mL}^{-1}$; Tabla 3). Los altos valores de actividad del GTE con respecto a las emulsiones de doble gel se atribuyen a un proceso de liberación controlada, consistente con el encontrado en el perfil de liberación de GTE (Figura 12). Finalmente, los valores de actividad antioxidante al final de la digestión intestinal (240 min) fueron más bajos para CM y CMT (6465.80 - $6565.79 \mu\text{mol TE mL}^{-1}$), seguidos de ($8365.56 \mu\text{mol TE mL}^{-1}$), CML y CMW (11008.98 - $11315.20 \mu\text{mol TE mL}^{-1}$), similar al encontrado en el perfil de liberación (Figura 12), mientras que los valores más altos fueron para GTE libre ($16470.80 \mu\text{mol TE g}^{-1}$; Tabla 3).

7.5.3 Tamaño de la gota durante el proceso de digestión in vitro

Por otro lado, en el proceso de digestión simulada, solo se encontraron ligeras variaciones en el tamaño de partícula durante la fase de digestión gástrica en todos los tratamientos, resultados que son acordes con investigaciones precedentes (Tokle et al. 2012; Sreedhara et al. 2014). Estas ligeras variaciones podrían estar asociadas con la inestabilidad de las emulsiones de doble gelificación debido al efecto del pH ácido y la pepsina. Sin embargo, ha sido reportado que la adición de GTE reduce significativamente la degradación de varias matrices de alimentos durante el proceso de digestión gástrica (Lamothe et al. 2014). En el correspondiente proceso de digestión intestinal se observó un aumento significativo ($p < 0.05$) en el tamaño de gota de CM (108.20 μm ; 130 min), CMC (210.40 μm ; 130 min), CMW (129.33 μm ; 150 min), CMT (129,20 μm ; 150 min) y CML (252,60 μm ; 150 min), debido al efecto del pH básico, las sales biliares y la pancreatina (Zou *et al.* 2014), seguido de una disminución gradual en el tamaño de partícula entre 150 y 240 min, asociado con la liberación del GTE en la fase intestinal y consistente con el encontrado en el perfil de liberación del GTE (Figura 10).

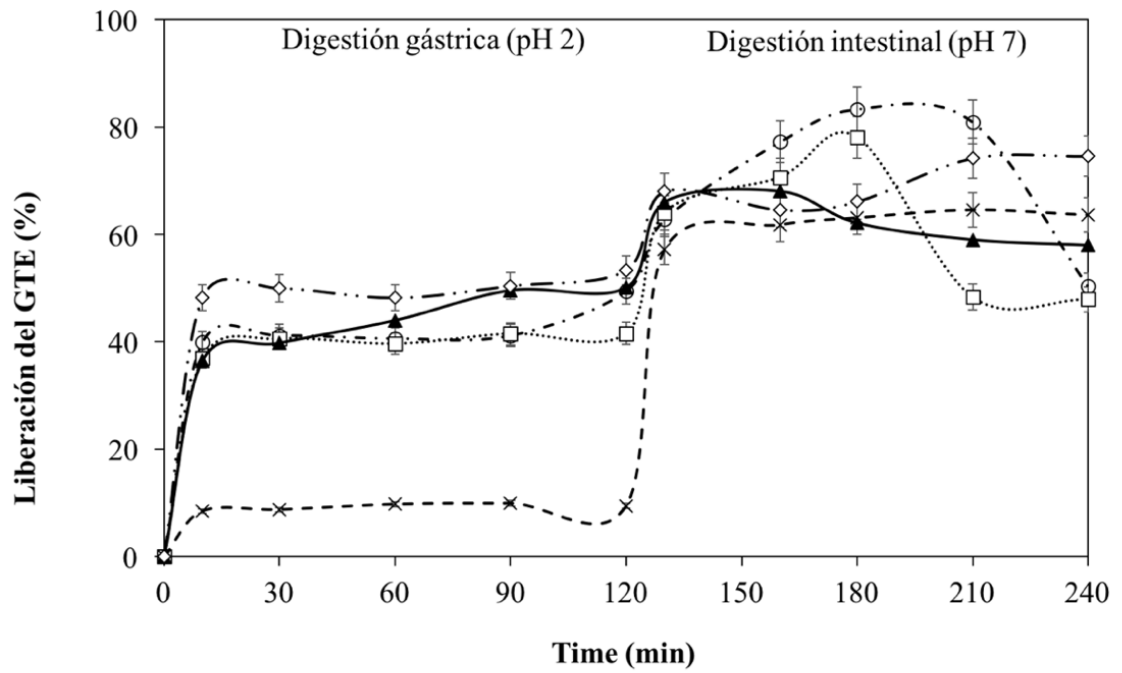


Figura 12. Perfil de liberación del GTE de las emulsiones dobles gelificadas — durante el proceso de digestión in v-vitro gástrico e intestinal (día 0). Valores promedio \pm desviación estándar (n=3).

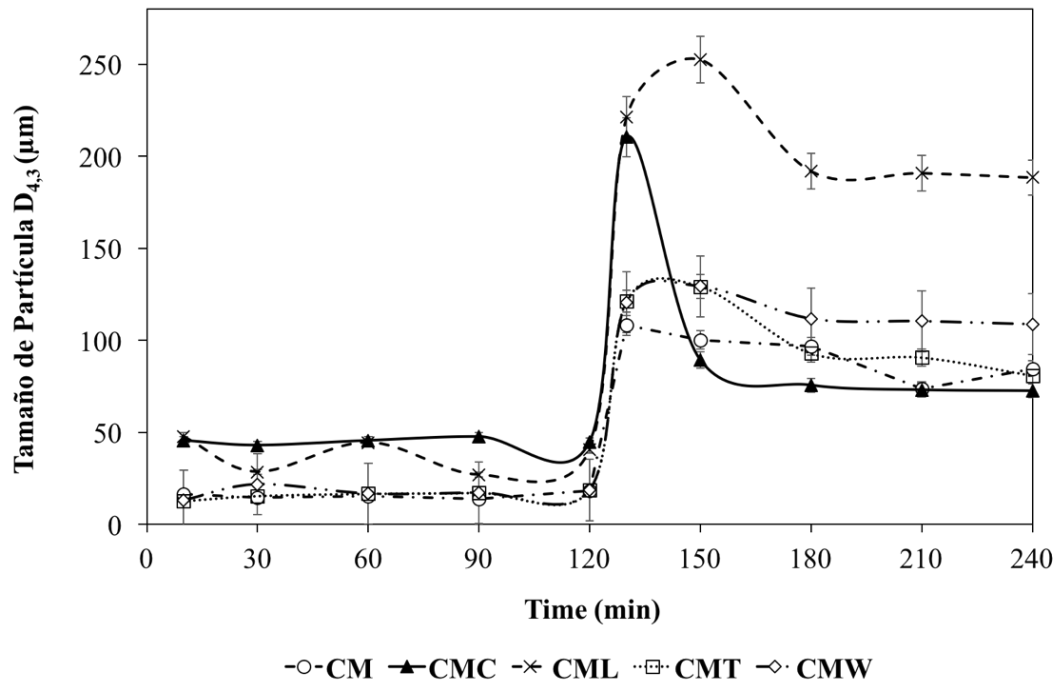


Figura 1. Tamaño de partícula de las emulsiones dobles gelificadas — durante el proceso de digestión in v-vitro gástrico e intestinal (día 0). Valores promedio \pm desviación estándar (n=3).

7.5.4 Microscopía óptica durante el proceso de digestión in vitro

En la microscopía de las emulsiones dobles gelificadas al final de la fase de digestión gástrica (120 min), se observaron las gotas de la fase interna rodeadas de gotas de aceite dispersas en la segunda fase acuosa, lo que indica que las emulsiones mantuvieron la morfología típica de una emulsión doble durante este proceso (Figura 14). Por el contrario, en la microscopía de las emulsiones después de la fase de digestión intestinal (240 min), se evidenciaron gotas internas en menor cantidad y tamaño, lo que indica una migración parcial de la fase interna (W_1) a la fase externa (W_2), asociada con la liberación del GTE (Sreedhra et al. 2014).

Tabla 3. Método ABTS ($\mu\text{mol TE mL}^{-1}$) de emulsiones dobles gelificadas durante el proceso de digestión in-vitro

Emulsiones dobles gelificadas	Condiciones iniciales (10 min)	Condiciones gástricas (120 min)	Condiciones intestinales (240 min)
CM	^b 5,134.72 ± 107.15 ^A	^e 6,353.32 ± 353.86 ^B	^a 6,465.80 ± 479.39 ^B
CMC	^b 5,265.95 ± 19.36 ^A	^d 7,228.21 ± 96.81 ^B	^b 8,365.56 ± 413.47 ^C
CML	^a 1,466.48 ± 36.96 ^A	^a 1,631.46 ± 53.39 ^A	^c 11,008.98 ± 294.04 ^B
CMT	^b 5,059.73 ± 290.84 ^A	^b 5,697.15 ± 161.56 ^A	^a 6,565.79 ± 836.07 ^B
CMW	^c 7,315.70 ± 294.28 ^A	^e 8,090.60 ± 479.39 ^B	^c 11,315.20 ± 117.78 ^C
GTE	^d 8,984.24 ± 586.05 ^A	^f 9,315.45 ± 411.19 ^A	^d 16,470.80 ± 152.61 ^B

Nota: CM (mucílago de chíá), CMC (mucílago de chíá / κ -carragenano), CML (mucílago de chíá/goma de algarrobo), CMT (mucílago de chíá /thixogum), CMW (mucílago de chíá / WPC) and GTE (extracto de té verde). Las medias dentro de la fila (A, B, C) y una columna (a, b, c) que no tiene una letra superíndice común, son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

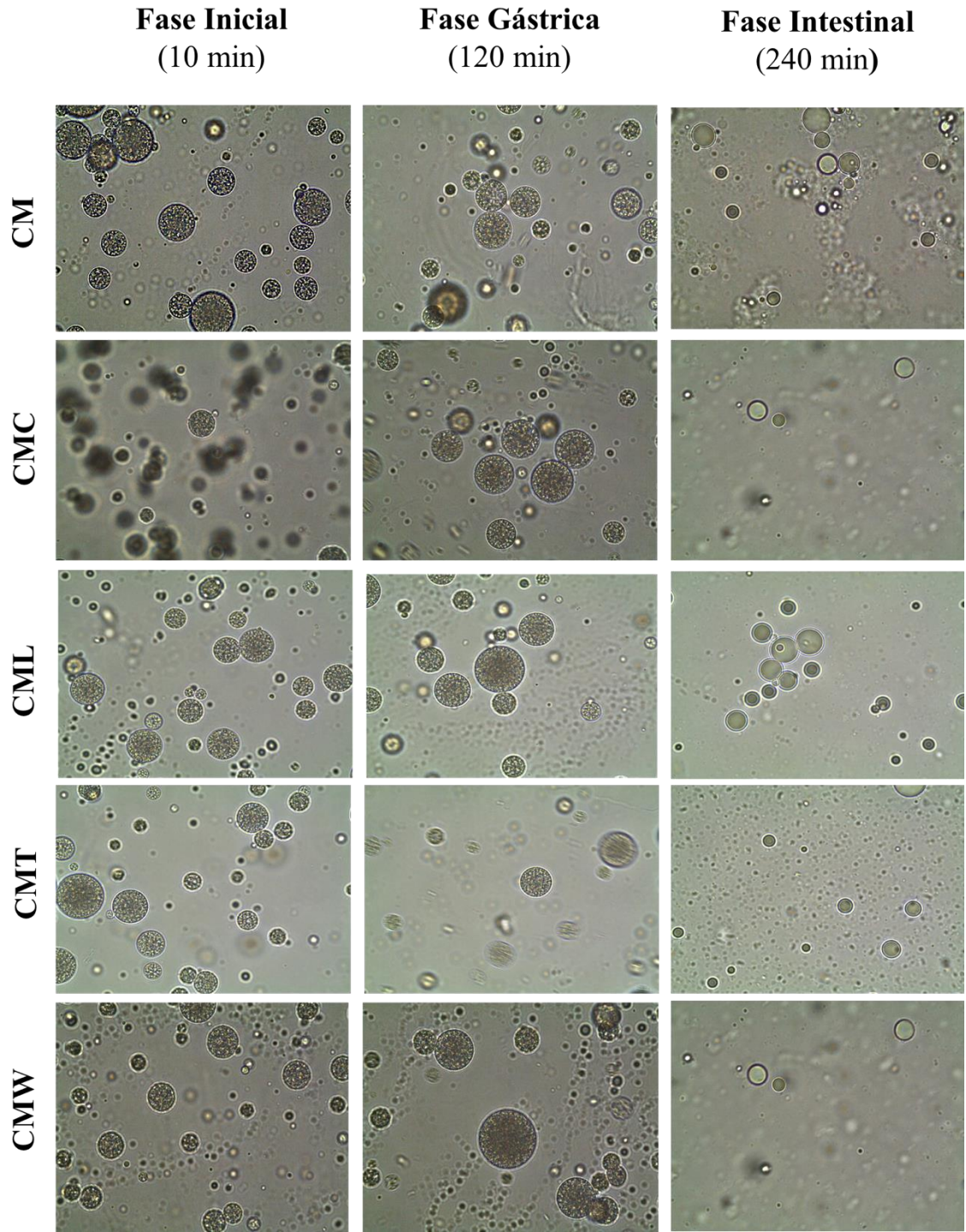


Figura 2. Imágenes de microscopio de emulsiones dobles gelificadas — antes y después — de las fases de la digestión in-vitro de la fase gástrica e intestinal.

8 CONCLUSIONES

Se obtuvieron GTE y CM con rendimientos de 28.2% y 5.31%, respectivamente. GTE presentó una alta actividad antioxidante (DPPH= 1868.57 y ABTS= 9164.30 $\mu\text{m TE mL}^{-1}$) y un alto contenido fenólico total (1360.49 $\mu\text{g CE g}^{-1}$), con una pérdida de actividad de hasta 88.82%, 81.60 % y 64.26%, respectivamente, en dichos parámetros después de 35 días de almacenamiento. Además, se obtuvieron cinco emulsiones dobles gelificadas basadas en CM y mezclas con diferentes biopolímeros (CMC, CML, CMT y CMW) cargados con GTE. La microscopía óptica de emulsiones mostró claramente las gotas de la fase interna rodeadas por gotas de aceite dispersas en la segunda fase acuosa, que son características típicas de las emulsiones dobles. El tamaño de gota de las emulsiones dobles gelificadas fluctuó entre 2.42 - 3.02 μm ($D_{3,2}$) y 10.10 - 25.48 μm ($D_{4,3}$), los valores más bajos fueron para CMW mientras que los valores más altos fueron para CMT. Las emulsiones dobles gelificadas fueron altamente estables en la formación de cremas y fueron efectivas para reducir la pérdida de actividad antioxidante (hasta 25.86% para DPPH) y fenoles totales (15.13%) durante 35 días de almacenamiento; CMT, CML y CM fueron los más efectivos. Por otro lado, las emulsiones dobles gelificadas mostraron un efecto protector al modular la liberación de GTE en un entorno gastrointestinal simulado, permitiendo una liberación controlada durante las fases de digestión gástrico-intestinal y alcanzando su máxima liberación en la fase intestinal (64.57 - 83.31 %). Si bien las evaluaciones del proceso de digestión in vitro proporcionan información importante sobre el comportamiento de las emulsiones gelificadas dobles y GTE, es necesario continuar con esta investigación para determinar el efecto del ambiente gastrointestinal en las emulsiones dobles gelificadas y GTE durante diferentes tiempos de almacenamiento. Por lo tanto, las emulsiones dobles gelificadas son una alternativa para preservar GTE y podrían ser una alternativa potencial para su aplicación en el desarrollo de alimentos funcionales.

9 PERSPECTIVAS

Actualmente, no hay investigaciones con el estudio de emulsiones dobles gelificadas con mucílago de chía debido a que este es utilizado en su mayoría como fuente de fibra. Esta investigación proporciona fundamentos para el uso del mucílago de chía como material de pared para el desarrollo de emulsiones dobles gelificadas con mucílago de chía y mezcla con biopolímeros, dado que se obtienen emulsiones estables que se pueden utilizar como medio encapsulamiento de compuestos bioactivos de importancia en la industria alimenticia. Esto ofrece la oportunidad de una liberación controlada, así como permitiendo que sean protegidos de diferentes factores que afecten su degradación en el desarrollo de nuevos productos alimenticios.

10 BIBLIOGRAFIA

Aceituno-Medina, M., Mendoza, S., Rodríguez B.A., Lagaron, J.M., & López-Rubio, A. (2015). Improved antioxidant capacity of quercetin and ferulic acid during in-vitro digestion through encapsulation within food-grade electrospun fibers. *Journal of Functional Foods*, 12: 332-34. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.11.028>

Aditya, N.P., Aditya, S., Yang H.J., Kim, H.W., Park S.O., Lee, J., & Ko, S. (2015). Curcumin and catechin co-loaded water-in-oil-in-water emulsion and its beverage application. *Journal of Functional Foods*, 15:35-43. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.03.013>

Afify, A.E.M., Shalaby, E.A., & El-Beltagi, H.S. (2011). Antioxidant activity of aqueous extracts of different caffeine products. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 39: 117-123. <https://doi.org/10.15835/nbha3926254>

Akhtar, M., Murray, B.S., Afeisume E.I., & Khew S.H.(2013). Encapsulation of flavonoid in multiple emulsion using spinning disc reactor technology. *Food Hydrocolloids*, 34: 62-67. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.12.025>

Altunas, O.Y., Sumnu, G., & Sahin, S. (2016). Preparation and characterization of W/O/W type double emulsion containing PGPR-Lecithin mixture as lipophilic surfactant. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 38: 486-493. <https://doi.org/10.1080/01932691.2016.1179121>

Álvarez-Chávez, L.M., Valdivia-López, M.A., & Aburto-Juárez, M.L., & Tecante, A. (2008). Chemical Characterization of the Lipid Fraction of Mexican Chia Seed (*Salvia hispanica* L.). *International Journal of Food Properties*, 11: 687-697. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10942910701622656>

Ananingsih, V.K., Sharma, A., & Zhou, W. (2013). Green tea catechins during food processing and storage: A review on stability and detection. *Food Research International*, 50(2), 469-479. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.004>

Arts, C.W., & Hollman, C.H. (2008). Polyphenols and disease risk in epidemiologic. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81: 317-325. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.004>

Avila-de la Rosa, G., Alvarez-Ramirez, J., Vernon-Carter, E.J., Carrillo-Nava, H., & Pérez-Alonso, C. (2015). Viscoelasticity of chia (*Salvia hispánica* L.) seed mucilage dispersion in the vicinity of an oil-water interface. *Food Hydrocolloids*, 49: 200-207. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.03.017>

Bhushani, J.A., Kurrey, N.K., & Anandharamakrishnan, C. (2017). Nanoencapsulation of green tea catechins by electrospraying technique and its effects on controlled release and in-vitro permeability. *Journal of Food Engineering*, 199: 82-92. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.12.010>

Bonnet, M., Cansell, M., Placina, F., Monteilm J., & Anton, M., & Leal-Calderona, F. (2010). Influence of the oil globule fraction on the release rate profiles from multiple W/O/W emulsions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 78: 44-52. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.02.010>

Campos, B., Ruivo, T.D., Scapim, M., Madrona, G., & Bergamasco, R. (2016). Optimization of the mucilage extraction process from chia application in ice cream as a stabilizer and emulsifier. *Food Science and Technology*, 65: 874-883. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.09.021>

Capitani, M.I., Nolasco, S.M., & Tomás, M.C. (2016). Stability of oil-in-water (O/W) emulsions with chia (*Salvia hispánica* L.) mucilage. *Food Science and Technology*, 61: 573-546. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.06.008>

Cutrim, C.S., Alvim I.D., & Cortez M.A.S. (2019). Microencapsulation of green tea polyphenols by ionic gelation and spray chilling methods. *J Food Science and Technology*, 56: 3561-3570. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03908-1>

Chavez-Páez, M., Quezada, C.M., Bracamontes, L.I., González-Ochoa, H.O., & Arauz-Lara, J.L. (2012). Coalescence in Double Emulsions. *The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 28: 5893-6200. <https://doi.org/10.1021/la205144g>

Chuah, A., Kuroiwa, T., Kobayashi, I., & Nakajima, M., (2009). Effect of chitosan on the stability and properties of modified lecithin stabilized oil-in-water monodisperse emulsion prepared by microchannel emulsification. *Food Hydrocolloids*, 23: 600-610 <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.03.014>

De Campo, C., Pereira dos Santos, P., Hass, T.M., Paese, K., Stanisquaski, S., de Oliveira, A., & Hickmann, S. (2017). Nanoencapsulation of chia seed oil with chia mucilage (*Salvia hispánica* L.) as wall material: Characterization and stability evaluation. *Food Chemistry*, 234:1-9. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.153>

Dickinson E. (1992). Faraday research article. Structure and composition of adsorbed protein layers and the relationship to emulsion stability. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, 88: 2973-2983. <https://doi.org/10.1039/FT9928802973>

Dickinson E, McClements DJ. 1995. *Advances in food colloids*. Springer Science & Business Media

Fernández-Pachón, M.S., Villaño, D., Troncoso, A.M., García-Parrilla, M.C. (2006). Revisión de los métodos de la actividad antioxidante in vitro del vino y valoración de sus efectos in vivo. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 56: 110-122. 56(2), 110-122. Disponible online en:

http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S000406222006000200002&lng=es&tlng=es.

Ferrari, F.M., Wahanik, A.L., Rodrigues, G.C., Pedrosa, S.C., Kil, & C.Y. Steel, J.C. (2015). Use of chia (*Salvia hispanica* L.) mucilage gel to reduce fat in pound cakes. *Food Science and Technology*, 63:1049-1055. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.114>

Ficheux, M., Bonakdar, L., Leal-Calderon, F., & Bibette, J. (1998). Some Stability Criteria for double Emulsions. *Langmuir*, 12: 2702-2706. <https://doi.org/10.1021/la971271z>

Frasch-Melnik S, Spyropoulos F, Norton IT. 2010. W₁/O/W₂ double emulsions stabilized by fat crystals – Formulation, stability and salt release. *Food Science and Technology* 35(6): 178-185. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2010.06.039>

Friedman, M., Levin, C.E., Lee, S.U., & Kozukue, N. (2009). Stability of green tea catechins in commercial tea leaves during storage for 6 months. *Food Science and Technology*, 74: 47-51. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.01033.x>

Fukushima, Y., Takashie, O., Yonekawa, Y., Yonemoto, K., Aizawa, H., Mori, Y., Waranabe, M., Takechi, M., Hasegawa, M., Taguchi, Ch., & Kondo, K. (2009). Coffee and Green Tea As a Large Source of Antioxidant Polyphenols in the Japanese Population. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57: 1253-1259. <https://doi.org/10.1021/jf802418j>

García-Becerra, L., Verde, J., Castro, R., Chávez, A., Oranday, A., Núñez, A., & Rivas, C. (2010). Actividad biológica de un extracto de orujo de uva mexicana. *Revista mexicana de ciencia farmacéutica*, 41:28-36. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57916060004>

Gramz, A., Pawlak-Lemańska, K., Korczak, J., Wąsowicz, E., & Rudzinka, M. (2005). Tea extracts as Free Radical Scavengers. *Polish Journal of Environmental Studies*, 6: 861867. https://www.researchgate.net/publication/285533472_Tea_extracts_as_free_radical_savengers

Gutiérrez, M., & Buenaventura, A. (2002). Chocolate, polifenoles y protección a la salud. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 21: 149-152 http://www.latamjpharm.org/trabajos/21/2/LAJOP_21_2_3_1_S2133VGV50.pdf

INEGI (2024) Estadísticas de definciones registradas Disponible en línea en: https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2024/EDR/EDR2023_En-Jn.pdf

Jakobek, L. (2015). Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. *Food Chemistry*, 175: 556-567. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.013>

Jin, L., Li, X.B., Tian, D.Q., Fang, X.P., Yu, Y.M., Zhu, H.Q., Ge, Y.Y., Ma, G.Y., Wang, W.Y., Xiao, W.F., & Li, M. (2016). Antioxidant properties and color parameters of herbal teas in China. *Industrial Crops and Products*, 87:189-209. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.04.044>

Kaput, J. & Rodríguez, R.L. (2006). Nutritional genomics: discovering the path to personalized nutrition. John Wiley & Sons. Inc, Hoboken, New Jersey, pp 179-206

Kim, Y.J., Houn, S.J., Kim, J.H., Kim, Y., Ji, H.G., & Lee, S. (2012). Nanoemulsified green tea extract shows improved hypocholesterolemic effects in C57BL/6 mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 23:186-191. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2010.11.015>

Klaypradit, W., & Huang, Y. (2008). Fish oil encapsulation with chitosan using ultrasonic atomizer. *Lebensmittel- Wissenschaft and Technologie*, 41: 1133–1139. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.06.014>

Kodama, D.H., Gonçalves, A.E., de Souza Schmidt, L., Franco, M., & Genovese, M.I. (2009). Flavonoids, total phenolic and antioxidant capacity: comparison between commercial Green tea preparations. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30:1077-1082. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612010000400037>

Kosegarten-Conde, C.E., Jiménez-Munguía M-T. (2012). Factores que intervienen en la estabilidad de una emulsión doble. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* 6:1-18 <https://tsia.udlap.mx/factores-principales-que-intervienen-en-la-estabilidad-de-una-emulsion-doble-2/>

Lamothe, S., Azimy, N., Bazinet, L., & Couillard, C. (2014). Britten M. Interactions of green tea polyphenols with dairy matrices in a simulated gastrointestinal environment. *Food and Function*, 5:2621-2631. <https://doi.org/10.1039/C4FO00203B>

Lizarraga, M.S., Vicini, D., González, A., Rubiolo, A., & Santiago, L. (2006). Rheological behavior of whey protein concentrate and κ -carrageenan aqueous mixtures. *Food Hydrocolloids* 20:740-748. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.07.007>

Mahmood, T., & Akhtar, N. (2013). Stability of a Cosmetic Multiple Emulsion Loaded with Green Tea Extract. *Science World Journal* 2013:1-7.

Mahmood, T., Akhtar, N., & Manickman, S. (2014). Interfacial film stabilized W/O/W nano multiple emulsions loaded with green tea and lotus extracts: systematic characterization of physicochemical properties and shelf-storage stability. *Journal of Nanobiotechnology*, 12:1-8. <https://doi.org/10.1155/2013/153695>

Manoi, K., & Rizvi, S.H. (2008). Rheological characterizations of texturized whey protein concentrate-based powders produced by reactive supercritical fluid extrusion. *Food Research International*, 41:786-796. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.07.001>

Martínez-Flores, A., González-Gallegos, J., & Culebras, M. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, 6: 271-278. https://www.researchgate.net/publication/237359143_Los_flavonoides_propiedades_y_acciones_antioxidantes

McClements, D. (2015). Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques, 3rd ed; *Taylor & Francis Group, Florida*, pp. 304-306 <https://doi.org/10.1201/b18868>

McKay, D. & Blumberg, J. (2002). The role of tea in human health. *Journal of the American College of Nutrition*, 21: 1-13 <https://doi.org/10.1080/07315724.2002.10719187>

Mezzenga, R., Folmer, B., & Hughes, E. 2004. Desing of Double Emulsions by Osmotic Pressure Tailoring. *Langmuir*, 20: 3574-3582. <https://doi.org/10.1021/la036396k>

Mohammadi, A., Mahdi, J., Assadpour, E., & Faridi, A. (2015). Nano-encapsulation of olive leaf phenolic compounds through WPC-pectin complexes and evaluating their release rate. *International Journal of Biological Macromolecules* 82: 816-822. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.10.025>

Muñoz, L.A., Cobos, A., Diaz, O., & Aguilera, J.M. (2012). Chia sedes: Microstructure, mucilage extraction and hydration. *J Food Eng*, 108:216-224. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.06.037>

Namal, S.S.P.J. (2013). Green tea extract: Chemistry, antioxidant properties and food applications – A review. *Journal of Functional Foods*, 5:1529-1541. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.08.011>

Narotzki B; Reznick A.Z; Aizenbud D. & Levy Y. Green tea: a promising product in oral health. (2012). *Journal Archives of Oral Biology*, 57: 429-35 <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.11.017>

Pasrija, D., Ezhilarasi, P.N., Indrani, D., & Anandharamakrishnan, C. (2015). Microencapsulation of green tea polyphenols and its effect on incorporated bread quality. *LWT- Food Science and Technology*, 64:289-296. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.05.054>

Patel, A.R., Dumlu, P., Vermeir, L., Lewille, B., & Lesaffer, A. (2015). Rheological characterization of gel-in-oil-in-gel type structured emulsions. *Food Hydrocolloids*, 46: 84-92. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.12.029>

Plazas, M. (1999). Desarrollar el arte de beber infusiones. *Cuadernos de nutrición*, 22:270-273. <https://www.imbiomed.com.mx/ejemplar.php?id=11613>

Prior, L., Ou, B. & Huang, D. (2005). The Chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 1841-1856. <https://doi.org/10.1021/jf030723c>

Rashidinejad, A., Birch, E.J., Sun-Waterhouse, D., & Everett, D.W. (2014). Delivery of green tea catechin and epigallocatechin gallate in liposomes incorporated into low-fat hard cheese. *Food Chemistry*, 156:176-183. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.115>

Rodríguez-Huezo, M.E., Pedroza-Islas, R., Prado-Barragán, L.A., Beristain, C.I., & Vernon-Carter, E.J. (2004). Microencapsulation by spray drying of multiple emulsions containing carotenoids. *Journal of Food Science*, 69:351-359.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb13641.x>

Satoh, E., Tohyama, N., & Nishimura, M. (2009). Comparison of the antioxidant activity of roasted tea with green, oolong, and black teas. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 56:551-559.

<https://doi.org/10.1080/09637480500398835>

Schmidts, T., Dobler, D., Nissing, C., & Runkel, F. (2009). Influence of hydrophilic surfactants on the properties of multiple W7O/W emulsions. *Journal of Colloid Interface Sciences*, 338: 184-92 <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2009.06.033>

Schuch, A., Helfenritter, C., Funck, M., & Schuchmann, H.P. (2015). Observations on the influence of different biopolymers on coalescence of inner water droplets in W/O/W (water-in-oil-in-water) double emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Surfaces A: Physicochemical and Engineering*, 475: 2-8. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.06.012>

Siebert, K.J., Troukhanova, N.V., & Lynn, P.Y. 1996. Nature of Polyphenol- Protein Interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44:80-85. <https://doi.org/10.1021/jf9502459>

Siripatrawan, U., & Noipha, S. (2012). Active film from chitosan incorporating green tea extract for shelf life extension of pork sausages. *Food Hydrocolloids*, 27:102-108. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.08.011>

Sreedhara, A., Vegarud, G.E., Ekeberg, D., Devols, T.G., Rukke, E.O., & Schüller, R.B. (2014). Rheological behavior and droplet size distribution of emulsions stabilized by whey proteins and chitosan during ex vivo digestion. *Annual transactions*

- *The Nordic Rheology Society*, 22:245-252.
https://www.researchgate.net/publication/265140058_Rheological_behavior_and_dr_oilet_size_distribution_of_emulsions_stabilized_by_whey_proteins_and_chitosan_d_uring_ex_vivo_digestion

Surh, J., Vladisavljevic, G.T., Mun, S., & McClements, D.J. (2007). Preparation and characterization of water/oil and water/oil/water emulsions containing biopolymer-gelled water droplets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55:175- 184.
<https://doi.org/10.1021/jf061637q>

Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., Hawkins, & Bryne, D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis* 19:669-675. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.01.003>

Thieleck, F. & Boschmann, M. (2009). The potential role of green tea catechins in the prevention of the metabolic syndrome – a review. *Phytochemistry*. 70: 11-24

Timilsena, Y.P., Adhikari, R., Rarrow, C.J., & Ahikari, B. (2016). Microencapsulation of chia seed oil using chia seed protein isolate-chia seed gum complex coacervates. *International Journal of Biological Macromolecules*, 91:347-357.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.11.011>

Tokle, T., Lesmes, U., Andrew, E., & McClements, D.J. (2012). Impact of dietary fiber coatings on behavior of protein-stabilized lipid droplets under simulated gastrointestinal conditions. *Food & Functions Journal*. 3:58-66.
<https://doi.org/10.1039/C1FO10129C>

Unno, T., & Osakabe, N. (2018). Green tea extract and black tea extract differentially influence cecal levels of short-chain fatty acids in rats. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 6:728-735. <https://doi.org/10.1002/fsn3.607>

van der Hoof, J., Vos, R., Mihaleva, V., Bino, R., Ridder, L., de Roo, N., Jacobs, D., van Duynhoven, J., & Vervoot, J. (2012). Structural Elucidation and Quantification of Phenolic Conjugates Present in Human Urine After Tea Intake. *Analytical Chemistry*. 84: 7263-7271 <https://doi.org/10.1021/ac3017339>

Velázquez-Paniagua, M., Prieto-Gómez, B. & Contreras-Pérez, R. (2004). El envejecimiento y los radicales libres. *Ciencias*, 75: 37-43. <https://www.redalyc.org/pdf/644/64407506.pdf>

Von Staszewski, M., Pilosof, A.M.R., & Jagus, R.J. (2011). Antioxidant and antimicrobial performance of different Argentinean green tea varieties as affected by whey proteins. *Food Chemistry*, 125:186-192. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.059>

Von Staszewski, M., Ruiz, H., Vitor, M.P., & Pilosof, A.M.R. (2014). Green tea polyphenols- β -lactoglobulin nanocomplexes: Interfacial behavior emulsification and oxidation stability of fish oil. *Food Hydrocolloids*, 35:505-511 <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.07.008>

Wang, L., Yin, A.W., Wu, L.Y., Qi, J.R, Guo, J., & Yang, X.Q. (2016). Fabrication and characterization of Pickering emulsions and oils gels stabilized by highly charged zein/chitosan complex particles (ZCCPs). *Food Chemistry*. 213: 462-469 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.119>

Wang, Y. & Ho, C.T. (2009). Polyphenolic Chemistry of Tea and Coddee: A century of Progress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 8109 – 8114 <https://doi.org/10.1021/jf804025c>

Wang, C.W., Liang, C. (2018). Reductive lindane degradation with tea extracts in aqueous phase. *Chemical Engineering Journal*, 338:157-165. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.12.158>

Wrona, M., Nerín, C., Alfonso, M.J., & Caballero, M.A. (2017). Antioxidant packaging with encapsulated green tea for fresh minced meat. *Innovate Food Science and Emerging Technologies*, 41: 307-313. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.04.001>

Xiang, L., Zhang, H., Qi, R., Tsao, R., & Mine, Y. (2019). Recent advances in the understanding of the health benefits and molecular mechanisms associated with green tea polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67:1029-1043. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b06146>

Xingú, L.A., González, H.A., De la Cruz, T.E. (2017). Sangerman-Jarquín, D.M.; Orozco, D.R.G.; Rubí, A.M. Chía (*Salvia hispanica* L.) situación actual y tendencias futuras. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 8:619-1631. <https://doi.org/10.29312/remexca.v8i7.516>

Ye, A., Hemar, Y., & Singh H. (2004). Influence of polysaccharides on the rate of coalescence in oil-in-water emulsions formed with highly hydrolyzed whey proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52:5491-5498. <https://doi.org/10.1021/jf030762o>

Zokti, J.A., Sham, B., Mohammed, A.S., & Abas, F. (2016). Green tea leaves extract: microencapsulation, physicochemical and storage stability study. *Molecules*, 21: 940. <https://doi.org/10.3390/molecules21080940>

Zou, L., Peng, S., Liu, W., Gan, L., Liu, W., Liang, R., Liu, C., Niu, J., Cao, Y., Liu, Z., & Chen, X. (2014). Improved in vitro digestion stability of (-)-epigallocatechin gallate through nanoliposome encapsulation. *Food Research International* 64: 492-499.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Diana Alejandra Guzmán Díaz

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con acentuación en Alimentos

Tesis: PROTECCIÓN Y BIODISPONIBILIDAD DE UN EXTRACTO DE TÉ VERDE (*Camellia Sinensis*) A TRAVÉS DE EMULSIONES MÚLTIPLES GELIFICADAS CON DIFERENTES BIOPOLIMEROS

Campo de Estudio: Alimentos

Datos Personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León, el 21 de Noviembre de 1987, hija de Isidro Guzmán Garza e Irma Idalia Díaz Avendaño

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Licenciado en Nutrición en 2010

Experiencia Profesional:

1. Corporativo Soriana 2010 al 2012
2. Coordinadora de Programas de Salud a Nivel Nacional
3. Manejo de personal

CONGRESOS

Guzmán-Díaz D.A, Gallegos-Garza M.M, Amaya-Guerra C.A, Báez-González J.G. **Protección de un extracto de polifenoles del té verde (*Camellia sinensis*) por medio de un complejo de ovoalbúmina.** Ponencia *Oral*. 2^{do}. Congreso internacional de alimentos funcionales y nutraceuticos. 22-24 Junio del 2016. Instalaciones de Posgrado de Ciencia y tecnología de Alimentos de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Guzmán-Díaz D.A, Báez-González J.G, Torres-Álvarez C., Vilcanqui-Perez F, Alanís-Guzmán M.A, Amaya-Guerra C.A,. **Cuantificación de Polifenoles y Actividad Antioxidante en un Extracto de Té Verde (*Camellia sinensis*) con Diferentes Concentraciones de Solventes.** Ponencia en *Poster*. XV Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. 23-24 de mayo del 2013. UANL - UG.- UC Colima, Col., México.

Diana A. Guzmán-Díaz, Mayra Z. Treviño-Garza, Beatriz A. Rodríguez-Romero, Claudia T. Gallardo-Rivera, Fulgencio Vilcanqui-Pérez, Juan G. Báez-González. **Desarrollo y caracterización de emulsiones dobles a base de mucílago de chía y biopolímeros para el encapsulamiento de té verde.** Ponencia *Poster* I Congreso Internacional de Calidad e inocuidad Alimentaria – II Congreso Nacional de Calidad e Inocuidad Alimentaria. 14-16 de Noviembre de 2019. Instituto de Control y Certificación de la Calidad e Inocuidad Alimentaria ICCCIA-URP de la Universidad Ricardo Palma. Lima, Perú

Article

Development and Characterization of Gelled Double Emulsions Based on Chia (*Salvia hispanica* L.) Mucilage Mixed with Different Biopolymers and Loaded with Green Tea Extract (*Camellia sinensis*)

Diana A. Guzmán-Díaz ¹, Mayra Z. Treviño-Garza ¹, Beatriz A. Rodríguez-Romero ², Claudia T. Gallardo-Rivera ¹, Carlos Abel Amaya-Guerra ¹ and Juan G. Báez-González ^{1,*}

¹ Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Alimentos, Av. Pedro de Alba s/n, Cd. Universitaria, C.P. 66455 San Nicolás de los Garza, NL, Mexico; lic.nut.aleguzman@gmail.com (D.A.G.-D.); mayra_trevinogarza@hotmail.com (M.Z.T.-G.); claudia.gallardorv@uanl.edu.mx (C.T.G.-R.); carlos.amayagr@uanl.edu.mx (C.A.A.-G.)

² Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Agronomía, Francisco I. Madero S/N, Ex Hacienda el Cañada, 66050 Cd. Gral. Escobedo, NL, Mexico; rodriguez_beatriz@outlook.com

* Correspondence: juan.baezgn@uanl.edu.mx; Tel.: +52-81-8329-4000 (ext. 3654)

Received: 29 October 2019; Accepted: 9 December 2019; Published: 13 December 2019



Abstract: The aim of this research was to develop and characterize five gelled double emulsions based on chia mucilage (CM) and different biopolymers (κ -carrageenan, C; locust bean gum, L; thixogum, T; and whey protein concentrate, W) loaded with green tea extract (GTE). Gelled double emulsions consisted of W₁ (whey-protein-concentrate/sodium-azide/NaCl/GTE)/O and (PGPR/canola-oi)/W₂ (CM, CMC, CML, CMT and CMW), and were characterized based on physicochemical properties during 35 days of storage. Optical microscopy clearly showed the drops of the internal phase surrounded by droplets of oil dispersed in the second aqueous phase; the droplet size was higher for CMT and lowest for CMW. In addition, all emulsions were highly stable at creaming and were effective in reducing the loss of antioxidant activity (88.82%) and total phenols (64.26%) during storage; CMT, CML and CM were the most effective. Furthermore, all emulsions showed a protective effect by modulating the release of the GTE in a simulated gastrointestinal environment, allowing a controlled release during the gastric-intestinal digestion phases and reaching its maximum release in the intestinal phase (64.57–83.31%). Thus, gelled double emulsions are an alternative for the preservation of GTE and could be a potential alternative for their application in the development of functional foods.

Keywords: gelled double emulsion; chia mucilage; green tea extract; antioxidant activity; stability

1. Introduction

Nowadays, consumers are focusing their attention on the consumption of high-quality foods that provide basic nutritional properties and provide beneficial effects to health, reducing the risk of disease

[1,2]. Green tea is obtained from the *Camellia sinensis* L. plant native to China and is one of the most popular and beverages consumed around the world [3,4]. Green tea extract (GTE) is mainly composed of polyphenols, such as catechins (e.g., (-) epigallocatechin gallate, (-) epicatechin gallate, (-) epilgallocatechin and (-) epicatechin), gallic acid, quercetin and caffeine, among other substances [5,6]. Due to its composition, green tea has a wide variety of antioxidant, antimicrobial, anticancer, antihyperglycemic and anticardiovascular properties, among others [2,7,8]. In recent years, interest in the development of a wide variety of food products (e.g., meat, lactic and baker

products) supplemented with GTE has increased [6,9,10]. However, the problem associated with the incorporation of green tea into various food systems is related to the stability of biologically active compounds during processing and conservation. Factors such as oxygen, temperature, pH and added ingredients, among others, contribute to the degradation of active compounds, mainly of catechins, limiting their bioavailability [5,11]. Among the strategies used to reduce the degradation of GTE, those which stand out are the use of techniques such as spray chilling [12], spray-drying [13], freeze drying [14], electrospraying [15], liposomes [16], high shear homogenization and high pressure homogenization, such as nanoparticles [17], nanoemulsions [18], film formation [19], simple [20] and double emulsions [21,22].

Double emulsions ($W_1/O/W_2$) are systems consisting of an internal aqueous phase (W_1), trapped as small drops within larger oil droplets (O), which are subsequently dispersed in another aqueous phase (W_2) [23–25]. Double emulsions encapsulating GTE have been developed for cosmetic use and food, among other applications. However, the use of these systems has been limited due to long-term physical destabilization processes, manifested by phenomena such as creaming, phase inversion or phase separation, as well as flocculation and coalescence. It has been shown that biopolymers can form a gel network in the continuous phase improving the stability of multiple emulsions during storage time [26,27]. There are studies of double emulsions ($W_1/O/W_2$) based on extra pure paraffin oil/cetyl dimethicone copolyol/polysorbate 80 incorporated with GTE (5%). However, although such emulsions were stable enough against any phase separation, some parameters, such as pH, viscosity and conductivity, were not impressive enough to assume multiple emulsions in the long term (30 days) [21]. In another study, Mahmood et al. [22] evaluated the stability of double emulsions ($W_1/O/W_2$) based on cetyl dimethicone copolyol (lipophilic emulsifier) and a blend of polyoxyethylene (20) cetyl ether and cetomacrogol 1000[®] (hydrophilic emulsifiers) with the presence of a thickener and hydroxypropyl methylcellulose (HPMC); these thickeners considerably improved the stability of $W_1/O/W_2$ for a period of 12 months.

On the other hand, chia (*Salvia hispanica* L.) is an herbaceous plant originally from southern Mexico. Chia seed consumption is related with beneficial effects on health due to its high levels of protein, minerals, vitamins, antioxidants and dietary fiber (5–6% of mucilage) [28–30]. Chia mucilage (CM) is an anionic heteropolysaccharide consisting of a tetrasaccharide with 4-O-methyl- α -D-glucuronopyranosyl residues occurring as branches of β -D-xylopyranosyl on the main chain [31]. CM is a promising alternative as an ingredient in the food industry due to its high fiber content, excellent water retention capacity, high solubility and viscosity at low concentrations, among other properties [28,29]. Recent research has focused on the use of CM as a biomaterial for stabilizing emulsions for human consumption [32]. In addition, Capitani et al. [28] found that the incorporation of CM to simple emulsions (O/W) increased their stability against coalescence and the gravitational phase separation by increasing the viscosity of the aqueous phase, limiting the mobility of the oil droplets in the emulsions. Nonetheless, although there are some studies on the effect of CM in the stability of emulsions, to our knowledge, there have been no previous studies with respect to gelled double emulsions incorporated with GTE. Thus, the aim of this research was to develop and characterize gelled double emulsions based on CM mixed with different biopolymers and loaded with GTE as a function of storage time.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

GTE was obtained from Organic by the Cup S.A. de C.V. Canola oil and chia seed were purchased from a local supermarket in Monterrey, Nuevo León, México. ThixogumTM (T; a synergistic co-processed blend of highly purified gum acacia and xanthan), locustbean gum (L), and κ -carrageenan (C) were acquired from Gomas Naturales, S.A. de C.V. (Ciudad de México, México). Whey protein concentrate (W) was purchased from Ingesa México S.A. de C.V. (Monterrey, Nuevo León, México). Polyglycerol polyricinoleate (PGPR 4125,

HLB ~1.5) was donated by Millikan, S.A de C.V (Tlalnepantla, Estado de México, Mexico). Free radicals; 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH+), 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS+) and 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2 carboxylic acid (Trolox) were obtained from Sigma-Aldrich Química, S. de R. L. de C.V. (Toluca, Estado de México, México). Ethanol, *n*-hexane, acetone, sodium azide and sodium chloride were purchased from Desarrollo de Especialidades Químicas S.A de C.V (Monterrey, Nuevo León, México).

2.2. Obtention of Green Tea Extract (GTE)

GTE was extracted by constant magnetic stirring (Thermo Scientific, Super Nuova, Inc., Waltham, MA, USA) with an ethanolic solution (80%) at a constant ratio 1:100 (w/v) for 4 h. Subsequently, the solution was subjected to an ultrasonic bath (conditions), filtered under vacuum (Whatman filter paper No.1), and ethanol was evaporated in a rotary evaporator (Rotavapor Lauda Alpha, IKA Instruments, Wilmington, NC, USA). The concentrated solution was kept frozen with CO₂ and then freeze-dried for 24 h [33]. Yield was determined according the following equation:

$$\text{Yield (\%)} = ((\text{mass of GTE})/(\text{mass of green tea})) \times 100. \quad (1)$$

2.2.1. Characterization of GTE

- Antioxidant Activity and Total Phenol Content

Antioxidant activity of GTE (500 mg kg⁻¹) was measured using the DPPH+ and ABTS+ methods during 35 days of storage (0, 7, 14, 21, 28 and 35 days). Trolox was used as a standard reference. A DPPH+ radical scavenging assay was determined following the method of Thaipong et al. [34], with some modifications; a DPPH+ solution (0.1 mM) was prepared in ethanol at 96% and then was measured in a spectrophotometer (Genesys 5, Thermo Spectronic, Rochester, NY, USA) at 517 nm (absorbance = 1.00 ± 0.02). Aliquots of GTE (600 µL) were mixed with 2.27 mL of DPPH+. The mixture was then allowed to react for 2 h at 25 ± 2 °C in dark conditions and the absorbance was recorded at 517 nm. A standard calibration curve of Trolox was determined for the DPPH+ radical at concentrations ranging from 0 to 300 µmol. The curve equation was $y = 0.7736x + 3.6801$, $R^2 = 0.99$. Antioxidant activity values were expressed as µmol Trolox equivalent (TE) mL⁻¹.

Moreover, an ABTS+ radical scavenging assay was measured according to Jin et al. [4] with some modifications. An ABTS+ solution was prepared in ethanol 96% (7.0 mmol L⁻¹) and allowed to react with a potassium persulfate solution (2.45 mmol L⁻¹) at a 1:1 ratio (v/v) for 16 h at 25 ± 2 °C in dark conditions, the absorbance then being recorded by a spectrophotometer at 734 nm (absorbance = 0.700 ± 0.02). Aliquots of GTE (150 µL) were mixed with ABTS+ solution (2.7 mL), the mixture was allowed to react for 6 min at 25 ± 2 °C in dark conditions and the absorbance was recorded at 734 nm. Finally, a standard calibration curve of Trolox was determined for the ABTS+ radical at concentrations ranging from 0 to 300 µmol. The curve equation was $y = 0.4387x + 3.7833$, $R^2 = 0.99$. Antioxidant activity values were expressed as µmol TE mL⁻¹. Additionally, antioxidant activity for both the DPPH+ and ABTS+ methods was calculated as a percentage of inhibition according to the following equation:

$$\text{Inhibition (\%)} = ((\text{Absorbance of control without GTE}) - (\text{Absorbance of sample})) / (\text{Absorbance of control without GTE}) \times 100. \quad (2)$$

Finally, total phenol content was determined by the Folin–Ciocalteu method as reported by Thaipong et al. [34], with some modifications. Briefly, GTE (600 µL), distilled water (1 mL) and Folin–Ciocalteu reagent (1N; 100 µL) were mixed (3 min) and a solution of Na₃CO₂ (20%; 300 µL) was subsequently added and allowed to react for 90 min. Absorbance was measured at 734 nm. A standard calibration curve was determined for catechin at concentrations range of 20–180 µmol L⁻¹. The curve equation was $y = 0.0037x - 0.0162$, $R^2 = 0.99$. Total phenol content was expressed as µg catechin equivalents (CE) mL⁻¹.

2.3. Extraction of Chia Mucilage

CM extraction was carried out according to the methods reported by Capitani et al. [28] and Timilsena et al. [35] with some modifications. Chia seeds (100 g) were washed with ethanol (200 mL) under magnetic stirring (2 min) to remove impurities and were subsequently recovered with a strainer. Seeds were placed in distilled water (1:1000 p/v) and kept under constant magnetic stirring for 4 h. Hydrated seeds were freeze-dried for 5 days and CM was separated from seeds using sieves (mesh; 297 μm). The CM recovered (off-white powder) was stored in plastic containers until later use. Yield was determined according the following equation:

$$\text{Yield (\%)} = ((\text{mass of chia seeds})/(\text{mass of chia mucilage})) \times 100. \quad (3)$$

2.4. Preparation of Gelled Double Emulsions

The inner aqueous phase (W_1) was prepared dissolving WPC, sodium azide, NaCl and GTE (500 mg kg^{-1} to obtain a final concentration of 100 mg kg^{-1}) into distilled water by constant magnetic stirring (2 h), and the oil phase (O) was prepared by dispersing PGPR into canola oil at 50 $^{\circ}\text{C}$ to reduce the viscosity of these solutions. The W_1 phase ($\phi_1 = 0.2$; weight fraction of the dispersed phase) was dispersed into the O phase with a high-power homogenizer (Ultra Turrax IKA-T50 digital, Werke, Staufen, Germany) at 7500 rpm for 5 min^{-1} (primary emulsion). Five different solutions for the external aqueous phases (W_2) were prepared; CM (alone) and in combinations (1:1), CMC (chia mucilage/ κ -carrageenan), CML (chia mucilage/locust bean gum), CMT (chia mucilage/thixogum) and CMW (chia mucilage/whey protein concentrate) by constant magnetic stirring until completely dissolved; concentrations were established based on previous experiments (data not shown). Finally, the W_1 O phase was dripped into the W_2 phase ($\phi_2 = 0.2$), followed by mixing with a high-power homogenizer at 7500 rpm for 5 min^{-1} (double emulsion, W_1 /O/ W_2). Finally, gelled double emulsions obtained were stored at 4 $^{\circ}\text{C}$ for 35 days. The compositions of the gelled double emulsions are shown in Table 1.

Table 1. Chemical composition of gelled double emulsions.

Primary Emulsion (W_1 /O) ($\phi_1 = 0.2$)					Second Aqueous Phase (W_2) ($\phi_2 = 0.2$)					
Aqueous Phase			Canola Oil Phase		Aqueous Phase					
Emul-sions	WPC (%)	NaCl (%)	Sodium azide (%)	GTE mg kg^{-1}	PGPR (%)	CM (%)	C (%)	L (%)	T (%)	W (%)
CM	15	0.02	0.02	500	7.5	2	-	-	-	-
CMC	15	0.02	0.02	500	7.5	1	1	-	-	-
CML	15	0.02	0.02	500	7.5	1	-	1	-	-
CMT	15	0.02	0.02	500	7.5	1	-	-	1	-
CMW	15	0.02	0.02	500	7.5	1	-	-	-	1

Note: CM, chia mucilage; C, κ -carrageenan; L, locust bean gum; T, thixogum; W, whey protein concentrate.

2.4.1. Characterization of Gelled Double Emulsions

- Optical Microscopy

Microscopic images of gelled double emulsions (day 0 of storage) were obtained using a conventional optical microscope (Leica DM 500, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) equipped with a camera and Image pro plus 4.0 software. The emulsions were observed with a 100 \times magnification objective, using immersion oil.

- Droplet Size Determinations

Droplet size measurements of the gelled double emulsions were made using static light scattering with Mastersizer 3000 equipment (Malvern Instruments, Malvern, UK). Results were expressed as the mean droplet size ($D_{4,3}$ and $D_{3,2}$ μm). Measurements were made at days 0, 7, 14, 21, 28 and 35 of storage, respectively.

- Creaming Index

Creaming stability measurements of gelled double emulsions were performed according to Surhet al. [23] with slight modifications. Emulsions (10 g) were transferred into a plastic container (15 mL) and stored at 4 °C for 35 days. Creaming stability was determined according the following equation:

$$\text{Creaming index (\%)} = ((\text{total height of the emulsion})/(\text{height of serum layer})) \times 100. \quad (4)$$

- Antioxidant Activity and Total Phenolic Content

The protective effect of gelled double emulsions was determined by evaluating the antioxidant activity and total phenolic content of GTE loaded into the emulsions during 35 days of storage. Firstly, the breaking of the gelled double emulsions was carried out as reported by Rodríguez-Huezo et al. [36] with some modifications. Emulsions (1 g) were collocated separately in a centrifuge bottle containing 3 mL of a solution of NaCl (10%)/methanol (1:1) and stirred for 10 min. Then 8 mL of a solution of hexane/acetone (1:1) were added and the mixture remained in constant agitation in a vortex (2 min; Mixer Labnet Internacional, Inc, Woodbridge, NJ, USA), subsequently placed in an ultrasonic bath (70 Hz; Sonic Ruptor 250, Omni International, Inc., Marietta, GA, USA) for 10 min. Finally, the mixture was centrifugated (10,000 rpm for 30 min) and the mean organic fraction resulting from this process was used for antioxidant activity and total phenols determinations (Section 2.2.1). The protective effect of gelled double emulsions was determined at days 7, 14, 21, 28 and 35 of storage, respectively. Results were expressed as both loss of antioxidant activity (DPPH+ and ABTS+) and loss of total phenolic content according to the following equation:

$$\text{Activity loss (\%)} = ((\text{measurements at different days})/(\text{measurements at day 0})) \times 100. \quad (5)$$

- Bioavailability (In Vitro Digestion Process)

In vitro digestion processes were conducted as reported by Aceituno-Medina et al. [37] with some modifications. For the gastric digestion phase, separately, solutions containing gelled double emulsions and distilled water were prepared (30 mL in a ratio 1:1). These solutions were acidified with HCl (6 M) to obtain a pH = 2 and subsequently were added into a porcine pepsin solution (0.6 mL; 160 mg mL⁻¹ previously prepared in a solution of HCl 0.1 M) and distilled water to obtain a final volume of 40 mL. This solution remained under constant stirring for 2 h at 37 °C in dark conditions (0–120 min). After gastric digestion, the pH of the solution was adjusted to 7 by addition of NaHCO₃ (0.045 M) and a pancreatin-bile solution (2.4 mL; pancreatin 4 mg mL⁻¹, bile 25 mg mL⁻¹ prepared in 0.1 NaHCO₃) was added; the mixture was stirred at 37 °C for 2 h in dark conditions (intestinal digestion phase; 120–240 min). GTE released throughout gastric (10, 30, 60, 90 and 120 min, respectively) and intestinal (130, 160, 180, 210 and 240 min, respectively) conditions was calculated by measuring the samples (600 µL) obtained directly from the gastrointestinal medium at different times, by the antioxidant activity method (ABTS+) as reported in a previous section (Section 2.2.1). GTE released was calculated according the following equation:

$$\text{GTE released (\%)} = ((\text{measurements at different times})/(\text{measurements at 0 min})) \times 100. \quad (6)$$

Finally, parameters such as mean droplet size $D_{4,3}$ (µm) and microscopic images of the gelled double emulsions during the in vitro digestions process were obtained as reported in a previous section (Section 2.4.1).

2.5. Statistical Analysis

All determinations were carried out in triplicate ($n = 3$). Statistical analysis of the data was performed using SPSS software (IBM version 22, SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Data were analyzed through a variance test (ANOVA) and a Tukey test. Differences between means were considered significant at p values ≤ 0.05 .

3. Results and Discussion

3.1. Obtention of Green Tea Extract (GTE)

The GTE had a yield of 28.2% total dry matter (data not shown), similar to the reported by Unno and Osakabe [38].

Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of GTE

Results obtained regarding antioxidant activity and total polyphenol content are shown in Figure 1. The measurement of antioxidant activity performed by the DPPH+ method ranged between 1868.57 and 208.86 $\mu\text{mol TE mL}^{-1}$ (% inhibition: 53.53% and 9.25% at days 0 and 35, respectively; data not shown) and for ABTS+ between 9164.26 and 1685.45 $\mu\text{mol TE mL}^{-1}$ (% inhibition: 84.19% and 18.57% at days 0 and 35, respectively; data not shown). Similar results have been reported by Wang and Liang [39] and Afify et al. [40]. In both methods, the same behavior was observed with a significant loss of antioxidant activity at the end of storage time ($p < 0.05$; 88.82% and 81.60% for DPPH+ and ABTS+, respectively). On the other hand, GTE showed an initial total phenols content of 1360.49 $\mu\text{g CE mL}^{-1}$, with a significant loss of up to 64.26% (486.14 $\mu\text{g CE mL}^{-1}$) for day 35 of storage. Higher values of this parameter have been reported in previous studies [41,42]. This effect may be associated with the extraction method. According to the report by Friedman et al. [43], the loss of antioxidant activity and polyphenols in GTE over time can be attributed to a progressive degradation of catechins levels, mainly of the -epigallocatechin and -epigallocatechin 3-gallate.

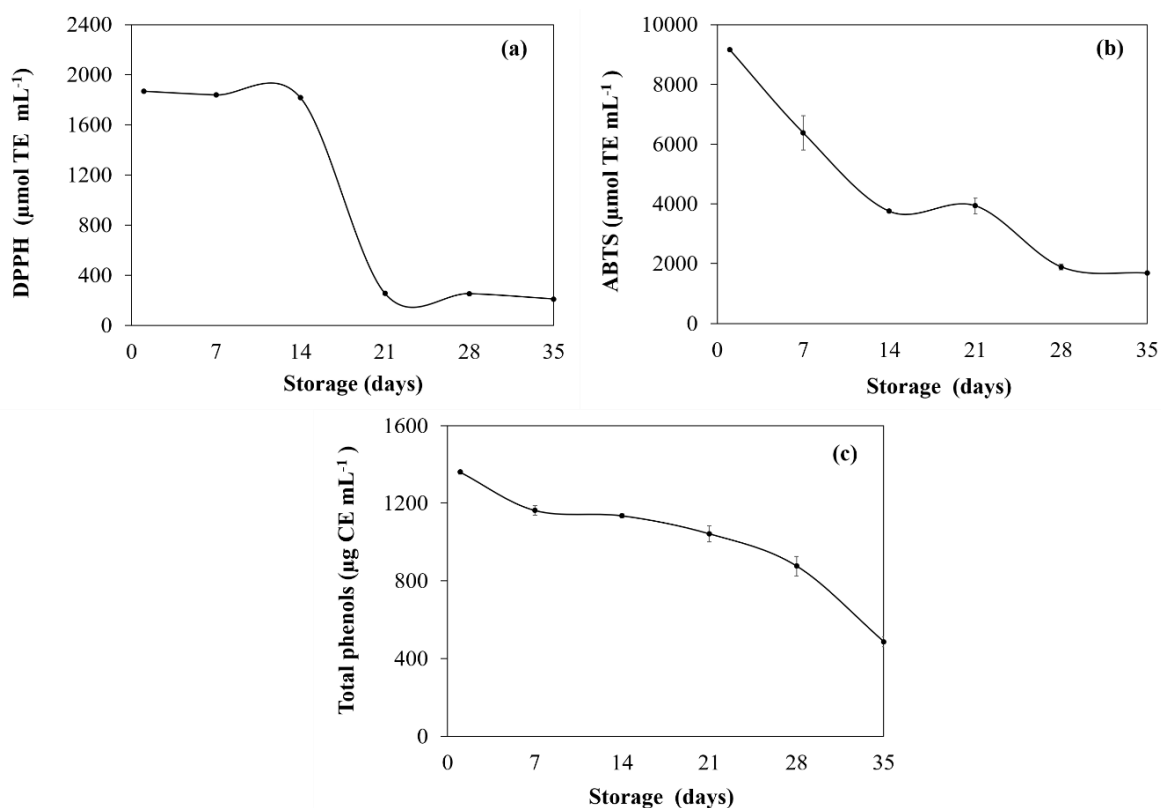


Figure 1. Antioxidant properties—(a) DPPH+ radical scavenging assay, (b) ABTS+ radical scavenging assay, and (c) total phenolic contents—of green tea extract (GTE) stored at 4 °C during 35 days of storage. Mean values \pm standard deviation ($n = 3$).

3.2. Extraction of Chia Mucilage (CM)

CM yields obtained in this study were of 5.31% total dry matter (data not shown), similar to that found by Campos et al. [44]. In addition, higher values were reported by Muñoz et al. [45] with yields of 6.97%; this difference can be linked to the seed variety and to the extraction method.

3.3. Characterization and Stability of Gelled Double Emulsions

3.3.1. Microscopic Analysis

Gelled double emulsions based on CM and mixtures with different biopolymers (CMC, CML, CMT and CMW) encapsulating GTE were obtained. In Figure 2 the microscopic images of the gelled double emulsions at days 0 of storage are shown. In general, in all emulsions the drops of the internal phase surrounded by oil droplets dispersed in the second aqueous phase were clearly observed, which are typical characteristics of double emulsions [23,46,47].

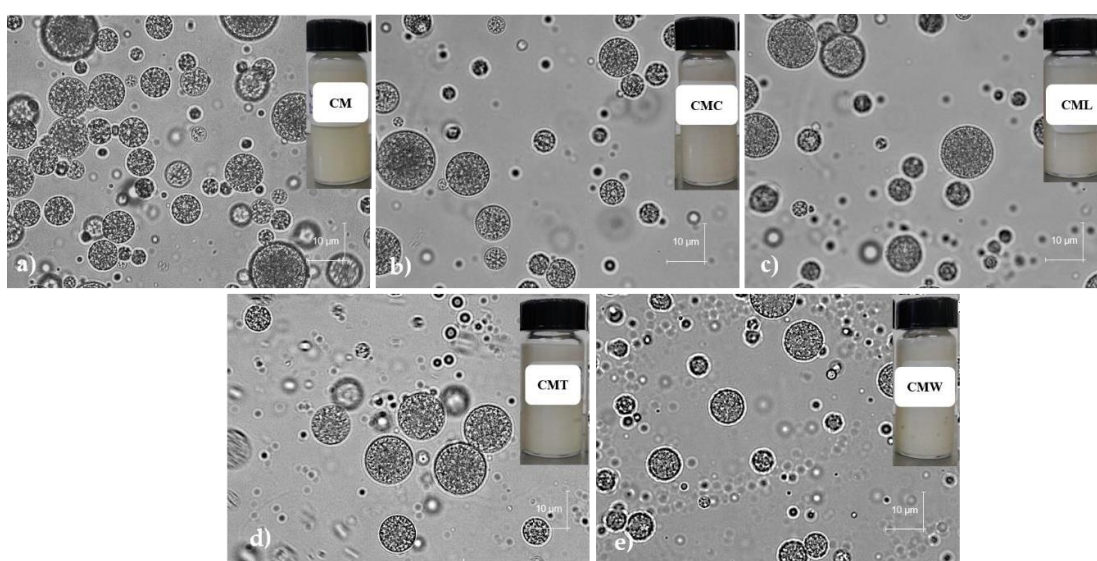


Figure 2. Microscopic images of the gelled double emulsions—(a) CM, (b) CMC, (c) CML, (d) CMT y (e) CMW—at day 0 of storage. Note: CM = chia mucilage with the different biopolymers (κ -carrageenan, C; locust bean gum, L; thixogum, T; and whey protein concentrate, W).

3.3.2. Droplet Size Measurements

The droplet size was significantly different ($p < 0.05$) between the gelled double emulsions (day 0), the highest value was presented by CMT ($D_{3,2} = 3.02 \mu\text{m}$ and $D_{4,3} = 25.48 \mu\text{m}$) and the lowest was for CMW with values of $D_{3,2} = 2.42 \mu\text{m}$ and $D_{4,3} = 10.10 \mu\text{m}$. Intermediate sizes were presented by CM, CML and CMC ($D_{3,2} = 2.55\text{--}2.84 \mu\text{m}$ and $D_{4,3} = 12.02\text{--}21.04 \mu\text{m}$; Figure 3). According to Mohammadi et al. [26], the simultaneous use of two biopolymers can increase the thickness of the emulsifier layer around the droplets and therefore increase the droplet size, similar to that found in CML, CMC and CMT. On the other hand, Capitani et al. [28] report that this effect can also be associated with an increase in the viscosity of the aqueous phase generated by the different biopolymers, since the viscosity could affect the homogenization process, preventing the complete disruption of the droplets and resulting in a larger population of droplets, similar to that found in CML, CM, CMT and CMC gelled double emulsions (viscosity = 10.15–104.53 Pa·s at a shear rate $\dot{\gamma} = 0.1 \text{ seg}^{-1}$, data not shown). However, this behavior was not found in CMW because the WPC forms a weak gel of low viscosity (viscosity = $2.23 \pm 0.43 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ at a shear rate $\dot{\gamma} = 0.1 \text{ seg}^{-1}$, data not shown). Compared to the literature, particle size values lower than CML, CMC and CMT [21,48] and similar to CMW and CM have been reported in previous studies of double emulsions encapsulating green tea [21]. On the other hand, regarding the particle

size during storage, CMW and CM emulsions remained significantly stable ($p < 0.05$), with values of 10.90 μm and 10.44 μm ($D_{4,3}$), respectively, for day 35 of storage. The lower droplet size values found in CMW gelled double emulsion during storage can be attributed to the fact that CMW contains a significant amount of proteins, which are surface active, and have better emulsifying properties, resulting in a more stable emulsion [20]. Similarly, CM (alone) is active on the surface since it forms small droplets that result in a stable emulsion [28]. Moreover, for emulsions CMC, CML and CMT, a decrease ($p < 0.05$) in the particle size was observed from day 7 of storage, with final values of 15.00, 10.26 and 19.00 μm ($D_{4,3}$), respectively, in accordance with previous reports [49]. This effect could be associated with the fact that these mixtures are not particularly active on the surface, leading to emulsions with larger droplet sizes. In general, this behavior was also found in $D_{3,2}$ values throughout the storage period. This droplet size reduction could be associated with a leakage of water from the internal aqueous phase to the external phase of the emulsions; similar behavior has been previously reported in double nanoemulsions loaded with green tea [22].

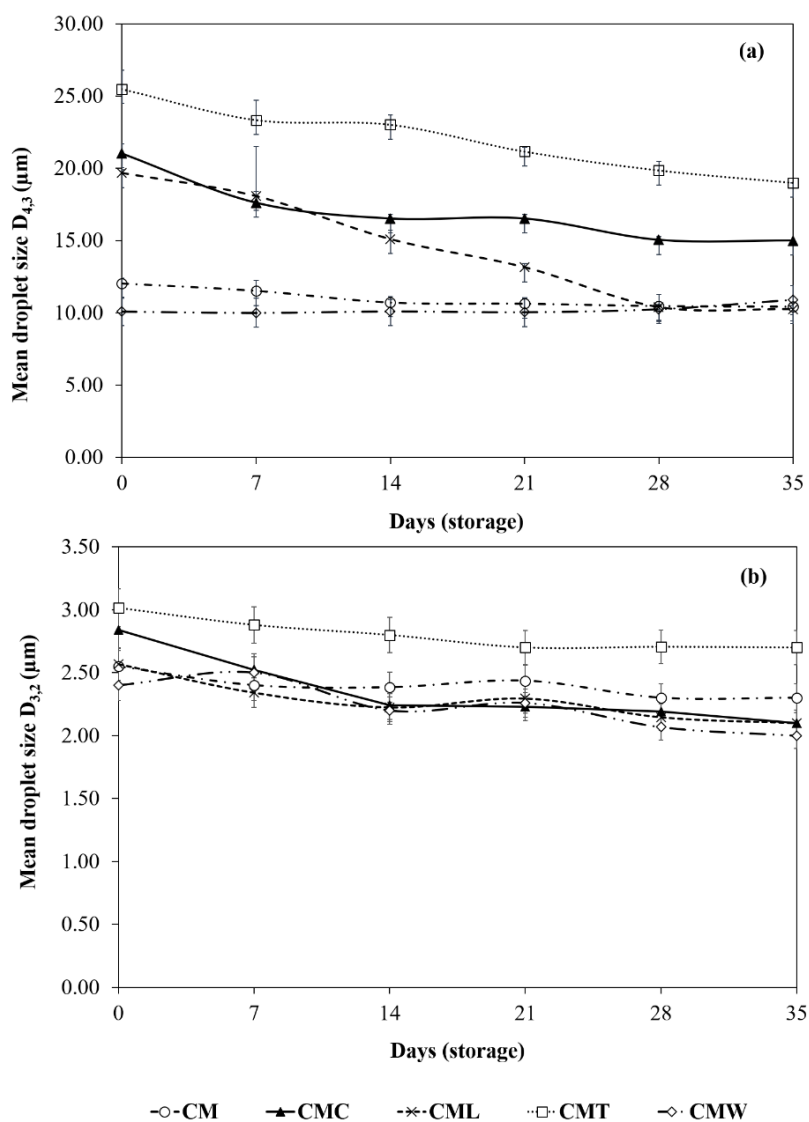


Figure 3. Mean droplet size—(a) $D_{4,3}$ and (b) $D_{3,2}$ —of the gelled double emulsions stored at 4 °C during 35 days of storage. Mean values \pm standard deviation ($n = 3$).

3.3.3. Creaming Stability Measurements

Gelled double emulsions were highly stable against creaming during 35 days of storage (creaming index = 0%), indicating that CM and its simultaneous use with CMC, CML, CMT and CMW were an adequate alternative to stabilize the external drops in the double emulsions due to the fact that they form a thick polymeric network of strong gelation that improves the mechanical and steric stability, providing resistance to the rupture of the drops (elastic modulus (G') of CM = 80.792 Pa, CMW = 13.463 Pa, CML = 69.020 Pa, CMT = 98.109 Pa and CMC = 564.428 Pa, at a shear rate $\dot{\gamma} = 0.1 \text{ seg}^{-1}$, data not shown [28,50,51]). Finally, our results are in agreement with Ye et al. [52], who reported that the incorporation of polysaccharides in the external aqueous phase at concentrations $>0.1\%$ avoid creaming during storage time.

3.3.4. Protective Effect of Gelled Double Emulsion on GTE

The protective effect against GTE degradation during storage by DPPH+, ABTS+ and the total phenolic content is shown in Table 2 and Figure 4. Initial antioxidant activity values performed by the DPPH+ and ABTS+ methods ranged between 1954.50 and 2333.15 $\mu\text{mol TE mL}^{-1}$, and between 17,343.51 and 19,098.70 $\mu\text{mol TE mL}^{-1}$ for gelled double emulsions, respectively. Regarding total phenolic content, gelled double emulsions had values ranged from 2656.36 to 4135.97 $\mu\text{mol CE mL}^{-1}$ (Table 2). In general, CML gelled double emulsion showed the higher values in these parameters. On the contrary, GTE showed the lowest values of antioxidant activity (DPPH+ = 1868.57 $\mu\text{mol TE mL}^{-1}$ and ABTS+ = 9164.30 $\mu\text{mol TE mL}^{-1}$) and total phenols (1360.49 $\mu\text{mol CE mL}^{-1}$; day 0). Moreover, during storage time, in general, a significant decrease ($p < 0.05$) was observed in the antioxidant activity values in all treatments. However, this decrease was significantly higher ($p < 0.05$) in GTE, indicating that the gelled double emulsions had a protective effect against the degradation of antioxidants and phenolic compounds. By the end of storage (day 35), antioxidant activity values of gelled double emulsions ranged from 1361.83 to 1839.26 $\mu\text{mol TE mL}^{-1}$ (DPPH+) and 15,898.77 to 17,689.77 $\mu\text{mol TE mL}^{-1}$ (ABTS+), while the total phenols fluctuated between 2312.88 and 3805.70 $\mu\text{mol CE mL}^{-1}$; again, the CML gelled double emulsion showed the highest values in these parameters (Table 2). Finally, GTE showed the lowest values of antioxidant activity and total phenols which were of 208.82 $\mu\text{mol TE mL}^{-1}$ (DPPH+), 1685.45 $\mu\text{mol TE mL}^{-1}$ (ABTS+) and 486.14 $\mu\text{mol CE mL}^{-1}$, respectively (Table 2). In general, CMT, CML and CM gelled double emulsions presented a similar protection barrier in relation to the loss of antioxidant activity (day 35, 15.13–25.86% and 6.89–8.33% for DPPH+ and ABTS+, respectively) and polyphenols (7.99–15.13%) with respect to its initial values (day 0). In addition, although CMC showed high values of antioxidant activity and total phenols, this emulsion was less effective in preventing the degradation of antioxidants and polyphenols (DPPH+ = 33.48%, ABTS+ = 13.41% and total phenols = 17.25% at day 35) with respect to its initial values (day 0), compared to CMT, CML and CM. In the same way, although CMW showed high values of antioxidant activity and total phenols, this emulsion showed the highest values of loss of antioxidant activity (DPPH+ = 38.32% and ABTS+ = 9.82% at day 35) and polyphenols (15.12% at day 35) with respect to its initial values (day 0; Figure 4). Finally, GTE showed the highest loss of antioxidant activity (up to 88.82%) and of total phenols (64.26%) during storage (Figure 4). In general, gelled double emulsions stabilized with CM and combined with other polysaccharides, such as tixogum, locust bean gum and κ -carrageenan, were effective in reducing the loss of antioxidant activity and polyphenols throughout storage and this fact can be attributed to the fact that these polysaccharides act as thickening agents, increasing the viscosity of the external aqueous phase and forming a strong polymer network that traps the active compound within its structure, acting as a protective barrier against GTE degradation [24]. On the other hand, the loss of activity in CMW could be associated with the formation of a weaker polymer network (weak gels) [53,54]. It also has been reported that the protein–polyphenol interactions of the external phase could affect and mask the antioxidant capacity of the phenolic compounds [55,56].

Table 2. Antioxidant properties (DPPH+ and ABTS+) and total phenolic content of gelled double emulsions and GTE, after 35 days of storage.

Gelled Double Emulsions	DPPH ^{•+} (μmol TE mL ⁻¹)		ABTS ^{•+} (μmol TE mL ⁻¹)		Total Phenols (μg CE mL ⁻¹)	
	Day 0	Day 35	Day 0	Day 35	Day 0	Day 35
CM	^b 1954.50 ± 11.40 ^A	^b 1449.08 ± 80.29 ^B	^b 17,343.51 ± 20.68 ^A	^b 15,898.77 ± 20.68 ^B	^d 3951.02 ± 82.05 ^A	^e 3353.23 ± 2.86 ^B
CML	^d 2333.15 ± 7.54 ^A	^c 1839.26 ± 2.85 ^B	^c 19,098.70 ± 20.68 ^A	^e 17,689.77 ± 20.86 ^B	^e 4135.97 ± 5.72 ^A	^f 3805.70 ± 8.58 ^B
CMC	^c 2176.75 ± 44.54 ^A	^b 1439.21 ± 5.70 ^B	^c 18,704.68 ± 41.36 ^A	^c 16,197.27 ± 54.71 ^B	^d 4010.47 ± 2.86 ^A	^b 2312.88 ± 2.86 ^B
CMW	^c 2208.03 ± 69.14 ^A	^b 1361.83 ± 22.81 ^B	^c 18,609.16 ± 62.04 ^A	^c 16,782.33 ± 35.82 ^B	^c 3526.63 ± 5.72 ^A	^c 2993.24 ± 8.58 ^B
CMT	^c 2143.82 ± 18.08 ^A	^c 1819.50 ± 11.40 ^B	^b 17,844.99 ± 593.28 ^A	^d 16,615.17 ± 230.29 ^B	^b 2656.36 ± 42.09 ^A	^a 486.14 ± 24.99 ^B
GTE	^a 1868.57 ± 12.43 ^A	^a 208.82 ± 5.70 ^B	^a 9164.30 ± 18.80 ^A	^a 1685.45 ± 16.28 ^B	^a 1360.49 ± 176.08 ^A	

Note: CM (chia mucilage), CMC (chia mucilage/κ-carrageenan), CML (chia/locust bean gum), CMT (chia/thixogum), CMW (chia mucilage/whey protein concentrate) and GTE (green tea extract). Means within a row (A,B) and column (a–f) that do not have a common superscript letter are significantly different ($p < 0.05$).

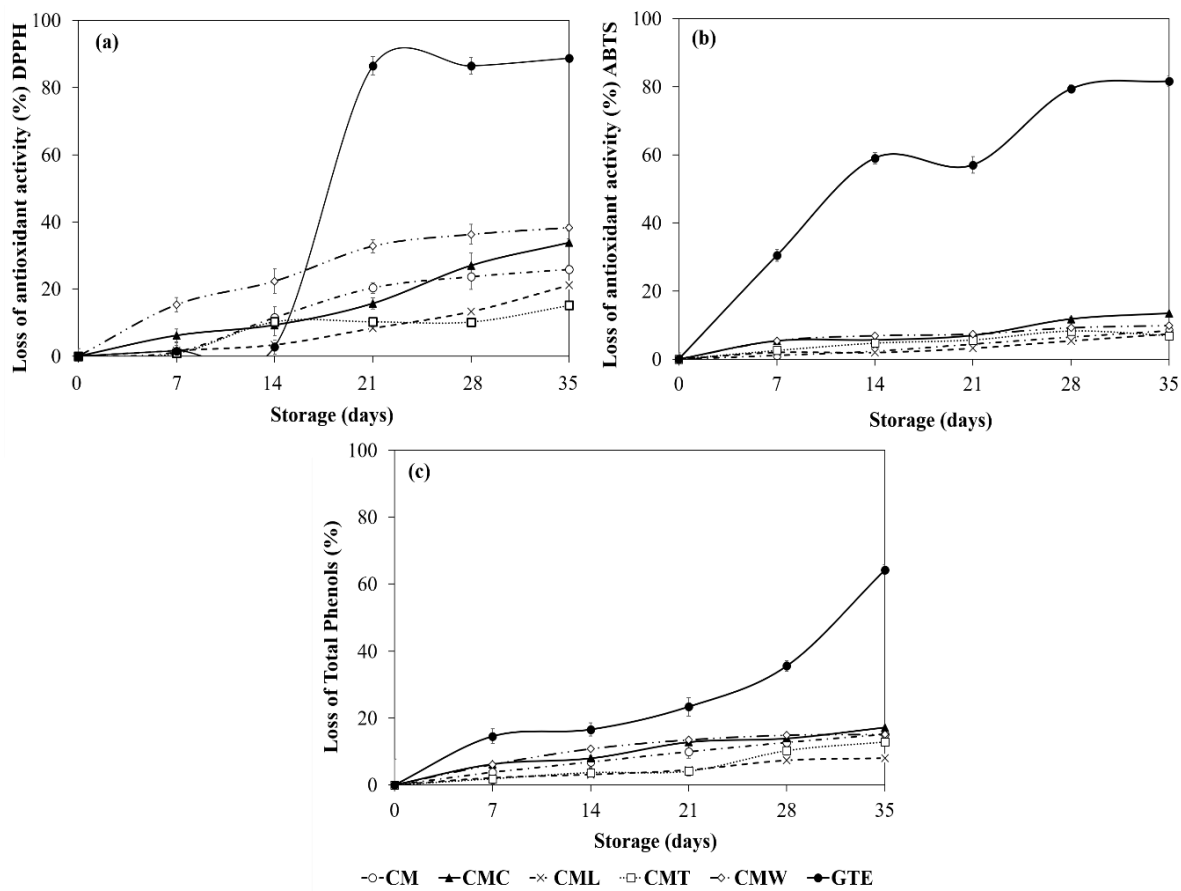


Figure 4. Antioxidant properties—(a) DPPH+ radical scavenging assay, (b) ABTS+ radical scavenging assay, and (c) total phenolic contents—of gelled double emulsions and GTE stored at 4 °C during 35 days of storage. Mean values \pm standard deviation ($n = 3$).

3.3.5. Digestibility (In Vitro) of Gelled Double Emulsions

- Bioavailability (In Vitro Digestion Process)

The release profiles of the gelled double emulsions loaded with GTE (day 0) during the in vitro digestion process are shown in Figure 5. Between 0 and 10 min a significant increase ($p < 0.05$) in the release of GTE was observed in CMC, CMT, CM (36.47–39.94%), followed by CMW (48.22%) and CML (8.47%), whose values were lower compared to the rest of the treatments. In addition, between 30 and 120 min a significant stability ($p < 0.05$) was observed in the release profile in both CML, CMT, CM and CMW emulsions (9.42%, 41.55%, 49.42% and 53.33% at 120 min, respectively). The CMC double emulsion was the most sensitive to the process of gastric digestion, presenting a constant release between 10 and 120 min (36.47%–50.05%). As reported by Lamothe et al. [9] and Namal [6], the effect of stability observed in the in vitro gastric digestion process can be attributed to the fact that some phenolic compounds of the GTE (e.g., catechins and gallic acid) are stable at pH acids similar to those reported in the stomach ($pH < 4$). In addition, these polyphenols can interact with the pepsin, resulting in a change in their molecular conformation and reducing their catalytic activity. On the other hand, in the transition from the gastric to the intestinal phase a rapid increase ($p < 0.05$) in the release profile was again observed in all treatments. CMC, CM and CMT gelled double emulsions were more easily digested and presented a higher release percentage at 160 min (67.98%) and 180 min (83.31% and 78.06%), respectively. In addition, CML and CMW showed their greatest release at 210 and 240 min with values of 64.57% and 74.58%, respectively. This effect may be associated with the instability of GTE catechins at alkaline pH (>6). These findings indicate that the gelled double emulsions can act as a protective barrier by modulating the polyphenol release process in a simulated

gastrointestinal environment, preserving its stability and allowing a controlled release of GTE in the small intestine [9,14,57]. Finally, antioxidant activity values of both gelled double emulsions and the GTE (free) throughout the in vitro digestion phases are shown in the following section.

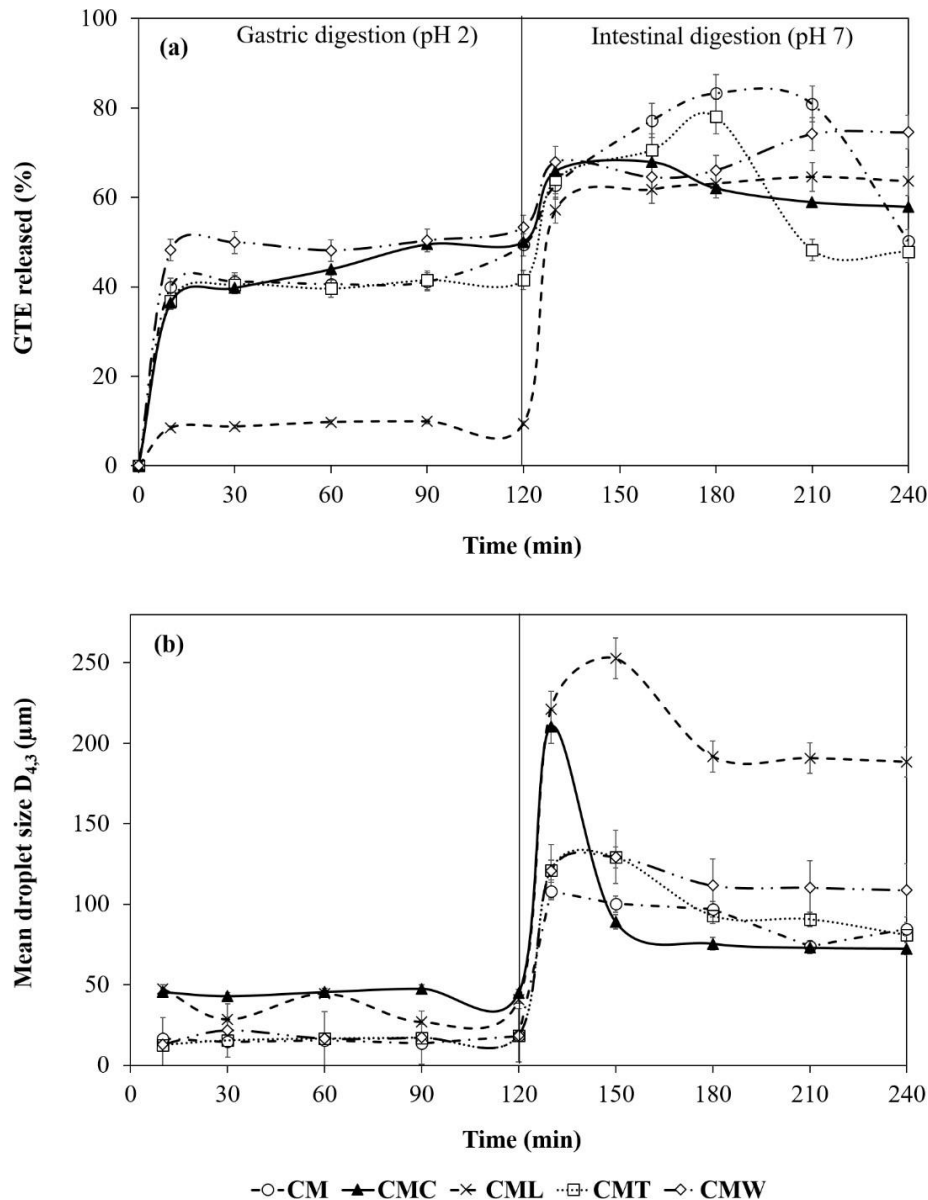


Figure 5. (a) Release profile of GTE, and (b) mean droplet diameter of gelled double emulsions—during the gastric and intestinal in vitro digestion process (day 0). Mean values \pm standard deviation ($n = 3$).

- **Antioxidant Activity during In Vitro Digestion Process**

Regarding the antioxidant activity throughout the in vitro digestion phases, significant differences were found between the treatments and among the phases of the digestion process ($p < 0.05$; Table 3). Antioxidant activity values in the initial phase (10 min) were higher for GTE free ($8984.24 \mu\text{mol TE mL}^{-1}$), followed by CMW ($7315.70 \mu\text{mol TE mL}^{-1}$). On the other hand, CMT, CM and CMC presented similar values fluctuating between 5059.73 and $5265.95 \mu\text{mol TE mL}^{-1}$, while the lowest value was for CML ($1466.48 \mu\text{mol TE mL}^{-1}$). Between 10 and 120 min of the gastric digestion phase, an increase in antioxidant activity was found for both free GTE and gelled double emulsions. At the end of this process, the antioxidant activity was higher for GTE ($9315.45 \mu\text{mol TE mL}^{-1}$) because it is free,

followed by CMW (8090.60 $\mu\text{mol TE mL}^{-1}$), CMC (7228.21 $\mu\text{mol TE mL}^{-1}$), CM (6353.32 $\mu\text{mol TE mL}^{-1}$), CMT (5697.15 $\mu\text{mol TE mL}^{-1}$) and CML (1631.46 $\mu\text{mol TE mL}^{-1}$; Table 3). The high activity values of the GTE with respect to double gelled emulsions are attributed to a controlled release process, consistent with that found in the GTE release profile (Figure 5). Finally, the values of antioxidant activity at the end of intestinal digestion (240 min) were lower for CM and CMT (6465.80–6565.79 $\mu\text{mol TE mL}^{-1}$), followed by CMC (8365.56 $\mu\text{mol TE mL}^{-1}$), CML and CMW (11,008.98–11,315.20 $\mu\text{mol TE mL}^{-1}$), similar to that found in the release profile (Figure 5), while the highest values were for free GTE (16,470.80 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$; Table 3).

Table 3. ABTS antioxidant activity ($\mu\text{mol TE mL}^{-1}$) of gelled double emulsions (day 0) during their vitro digestion process.

Gelled Double Emulsions	Initial Conditions (10min)	Gastric Conditions (120min)	Intestinal Conditions (240 min)
CM	^b 5134.72 \pm 107.15 ^A	^c 6353.32 \pm 353.86 ^B	^a 6465.80 \pm 479.39 ^B
CMC	^b 5265.95 \pm 19.36 ^A	^d 7228.21 \pm 96.81 ^B	^b 8365.56 \pm 413.47 ^C
CML	^a 1466.48 \pm 36.96 ^A	^a 1631.46 \pm 53.39 ^A	^c 11,008.98 \pm 294.04 ^B
CMT	^b 5059.73 \pm 290.84 ^A	^b 5697.15 \pm 161.56 ^A	^a 6565.79 \pm 836.07 ^B
CMW	^c 7315.70 \pm 294.28 ^A	^e 8090.60 \pm 479.39 ^B	^c 11,315.20 \pm 117.78 ^C
GTE	^d 8984.24 \pm 586.05 ^A	^f 9315.45 \pm 411.19 ^A	^d 16,470.80 \pm 152.61 ^B

Note: CM (chia mucilage), CMC (chia mucilage/ κ -carrageenan), CML (chia mucilage/locust bean gum), CMT (chia mucilage/thixogum), CMW (chia mucilage/whey protein concentrate) and GTE (green tea extract). Means within a row (A,B,C) and column (a-f) that do not have a common superscript letter are significantly different ($p < 0.05$).

- Droplet Size during In Vitro Digestion Process

On the other hand, in the simulated digestion process, only slight fluctuations in particle size were found during the gastric digestion phase in all treatments, in accordance with previous reports [58,59]. These slight fluctuations could be associated with the instability of double gelled emulsions due to the effect of acidic pH and pepsin. However, it has been reported that the addition of GTE significantly reduces the degradation of various food matrices during the gastric digestion process [9]. Furthermore, during the intestinal digestion process a significant increase ($p < 0.05$) was observed in the droplet size of CM (108.20 μm ; 130 min), CMC (210.40 μm ; 130 min), CMW (129.33 μm ; 150 min), CMT (129.20 μm ; 150 min) and CML (252.60 μm ; 150 min), due to the effect of basic pH, bile salts and pancreatin [60], followed by a gradual decrease in the size of the drop between 150 and 240 min, associated with the release of the GTE in the intestinal phase and consistent with that found in the release profile of the GTE (Figure 5).

- Optical Microscopy during In Vitro Digestion Process

In the microscopy of the gelled double emulsions at the end of the gastric digestion phase (120 min), the drops of the internal phase surrounded by oil droplets dispersed in the second aqueous phase were observed, indicating that the emulsions maintained the typical morphology of a double emulsion during this process (Figure 6.). On the contrary, in microscopy of the emulsions after the intestinal digestion phase (240 min) internal drops were evidenced in smaller quantity and size, indicating a partial migration from the internal phase (W_1) to the external phase (W_2), associated with the release of the GTE [61].

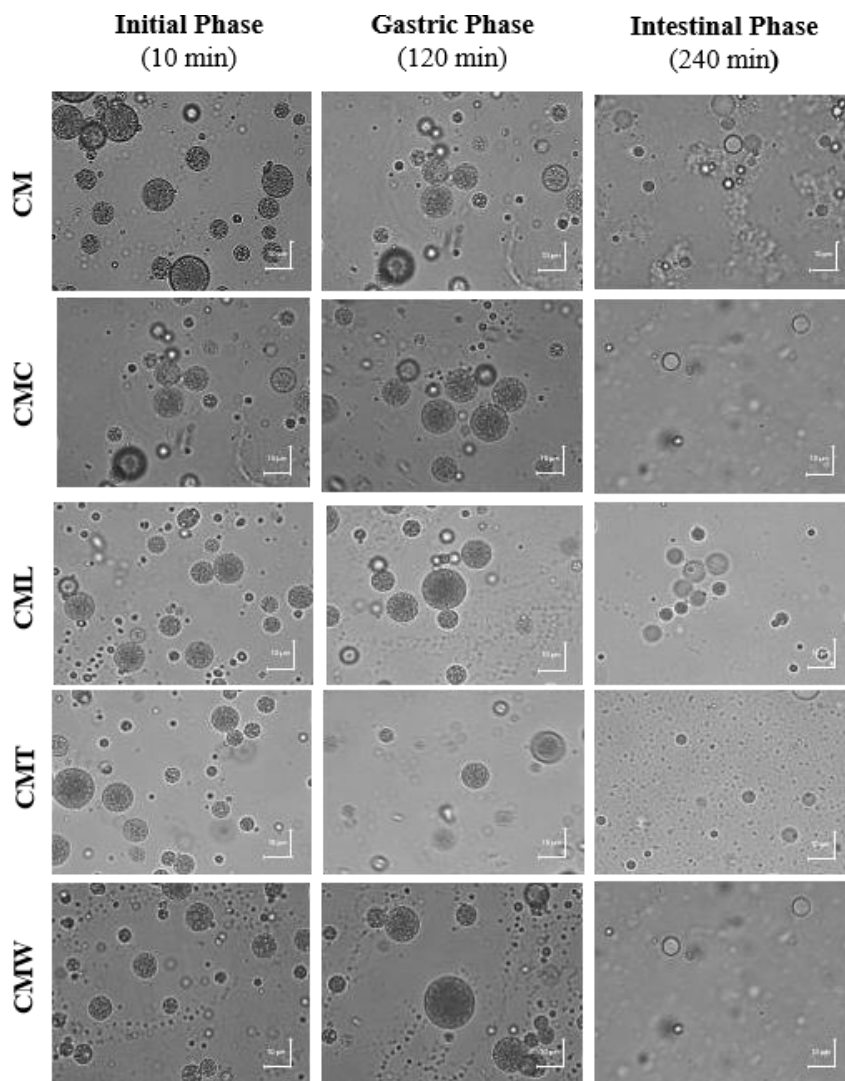


Figure 6. Microscopic images of the gelled double emulsions—before and after the gastric and intestinal *in vitro* digestion phases.

4. Conclusions

GTE and CM were obtained with yields of 28.2% and 5.31%, respectively. GTE presented a high antioxidant activity ($\text{DPPH}^+ = 1868.57$ and $\text{ABTS}^+ = 9164.30 \mu\text{M TE mL}^{-1}$) and a high total phenolic content ($1360.49 \mu\text{g CE g}^{-1}$), with an activity loss of up to 88.82%, 81.60% and 64.26%, respectively, in such parameters after 35 days of storage. Moreover, five gelled double emulsions based on CM and mixtures with different biopolymers (CMC, CML, CMT and CMW) loaded with GTE were obtained. Optical microscopy of emulsions clearly showed the drops of the internal phases surrounded by droplets of oil dispersed in the second aqueous phase, which are typical characteristics of double emulsions. The droplet size of the gelled double emulsions fluctuated between 2.42 and $3.02 \mu\text{m}$ ($D_{3,2}$) and 10.10 and $25.48 \mu\text{m}$ ($D_{4,3}$), and the lowest values were for CMW while the highest values were for CMT. In general, all gelled double emulsions were highly stable at creaming and were effective in reducing the loss of antioxidant activity (up to 25.86% for DPPH^+) and total phenols (15.13%) during 35 days of storage; CMT, CML and CM were the most effective. On the other hand, overall gelled double emulsions showed a protective effect by modulating the release of the GTE in a simulated gastrointestinal environment, allowing a controlled release during the gastric-intestinal digestion phases and reaching its maximum release in the intestinal phase (64.57–83.31%). Although

evaluations of the in vitro digestion process provide important information on the behavior of double gelled emulsions and GTE, it is necessary to continue with this research in order to determine the effect of the gastrointestinal environment on the gelled double emulsions and GTE during different storage times. Thus, gelled double emulsions are an alternative to preserve GTE and could be a potential alternative for their application in the development of functional foods.

Author Contributions: Conceptualization, J.G.B.-G. and D.A.G.-D.; methodology, D.A.G.-D. and B.A.R.-R.; formal analysis, J.G.B.-G., D.A.G.-D. and M.Z.T.-G.; investigation, D.A.G.-D., M.Z.T.-G., J.G.B.-G., C.A.A.-G. and C.T.G.-R.; resources, J.G.B.-G. and M.Z.T.-G.; data curation, D.A.G.-D., M.Z.T.-G. and J.G.B.-G.; writing—original draft preparation, D.A.G.-D., M.Z.T.-G. and J.G.B.-G.; writing—review and editing, M.Z.T.-G. and J.G.B.-G.; visualization, J.G.B.-G. and D.A.G.-D.; supervision, J.G.B.-G. and M.Z.T.-G.; project administration, J.G.B.-G.; funding acquisition, J.G.B.-G. and M.Z.T.-G.

Funding: This research was funded by Program of Support for Research, Science and Technology, PAICYT, UANL, CT736-19, and the grant CONACyT CB-157511.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Birch, S.C.; Bonwick, G.A. Ensuring the future of functional foods. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2018**, *54*, 1467–1485. [[CrossRef](#)]
- Castro, F.V.R.; Andrade, M.A.; Sanches Silva, A.; Vaz, M.F.; Vilarinho, F. The Contribution of a whey protein film incorporated with green tea extract to minimize the lipid oxidation of salmon (*Salmo salar* L.). *Foods* **2019**, *8*, 327. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Satoh, E.; Tohyama, N.; Nishimura, M. Comparison of the antioxidant activity of roasted tea with green, oolong, and black teas. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2009**, *56*, 551–559. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Jin, L.; Li, X.B.; Tian, D.Q.; Fang, X.P.; Yu, Y.M.; Zhu, H.Q.; Ge, Y.Y.; Ma, G.Y.; Wang, W.Y.; Xiao, W.F.; et al. Antioxidant properties and color parameters of herbal teas in China. *Ind. Crop. Prod.* **2016**, *87*, 189–209. [[CrossRef](#)]
- Ananingsih, V.K.; Sharma, A.; Zhou, W. Green tea catechins during food processing and storage: A review on stability and detection. *Food Res. Int.* **2011**, *50*, 469–479. [[CrossRef](#)]
- Namal, S.S.P.J. Green tea extract: Chemistry, antioxidant properties and food applications—A review. *J. Funct. Foods* **2013**, *5*, 1529–1541. [[CrossRef](#)]
- Phongnarisorn, B.; Orfila, C.; Holmes, M.; Marshall, L.J. Enrichment of biscuits with Matcha green tea powder: Its impact on consumer acceptability and acute metabolic response. *Foods* **2018**, *7*, 17. [[CrossRef](#)]
- Xiang, L.; Zhang, H.; Qi, R.; Tsao, R.; Mine, Y. Recent advances in the understanding of the health benefits and molecular mechanisms associated with green tea polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 1029–1043. [[CrossRef](#)]
- Lamothe, S.; Azimy, N.; Bazinet, L.; Couillard, C.; Britten, M. Interactions of green tea polyphenols with dairy matrices in a simulated gastrointestinal environment. *Food Funct.* **2014**, *5*, 2621–2631. [[CrossRef](#)]
- Bellés, M.; Alonso, V.; Roncalés, P.; Beltrán, J.A. Sulfite-free lamb meat: Antimicrobial and antioxidant properties of green tea and carvacrol. *J. Sci. Food Agric.* **2018**, *99*, 464–472. [[CrossRef](#)]
- Ortiz, J.; Ferruzzi, M.G.; Taylor, L.S.; Maurer, L.J. Interaction of Environmental Moisture with Powdered Green Tea Formulations: Effect on Catechin Chemical Stability. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 4068–4077.
- Cutrim, C.; Dutra, I.; Sloboda, M.A. Microencapsulation of green tea polyphenols by ionic gelation and spray chilling methods. *J. Food Sci. Technol.* **2019**, *56*, 3561–3570. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Zokti, J.A.; Baharim, B.S.; Mohammed, A.S.; Abas, F. Green tea leaves extract: Microencapsulation, physicochemical and storage stability study. *Molecules* **2016**, *21*, 940. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Pasrija, D.; Ezhilarasi, P.N.; Indrani, D.; Anandharamakrishnan, C. Microencapsulation of green tea polyphenols and its effect on incorporated bread quality. *LWT Food Sci. Technol.* **2015**, *64*, 289–296. [[CrossRef](#)]
- Bhushani, J.A.; Kurrey, N.K.; Anandharamakrishnan, C. Nanoencapsulation of green tea catechins by electrospinning technique and its effects on controlled release and *in-vitro* permeability. *J. Food Eng.* **2017**, *199*, 82–92. [[CrossRef](#)]

16. Rashidinejad, A.; Birch, E.J.; Sun-Waterhouse, D.; Everett, D.W. Delivery of green tea catechin and epigallocatechin gallate in liposomes incorporated into low-fat hard cheese. *Food Chem.* **2014**, *156*, 176–183. [[CrossRef](#)]
17. Wrona, M.; Nerin, C.; Alfonso, M.J.; Caballero, M.A. Antioxidant packaging with encapsulated green tea for fresh minced meat. *Food Sci. Emerg. Technol.* **2017**, *41*, 307–313. [[CrossRef](#)]
18. Kim, Y.J.; Houn, S.-J.; Kim, J.H.; Kim, Y.; Ji, H.G.; Lee, S. Nanoemulsified green tea extract shows improved hypocholesterolemic effects in C57BL/6 mice. *J. Nutr. Biochem.* **2012**, *23*, 186–191. [[CrossRef](#)]
19. Siripatrawan, U.; Noipha, S. Active film from chitosan incorporating green tea extract for shelf life extension of pork sausages. *Food Hydrocoll.* **2012**, *27*, 102–108. [[CrossRef](#)]
20. Von Staszewski, M.; Ruiz, H.; Vitor, M.P.; Pilosof, A.M.R. Green tea polyphenols- β -lactoglobulin nanocomplexes: Interfacial behavior emulsification and oxidation stability of fish oil. *Food Hydrocoll.* **2014**, *35*, 505–511. [[CrossRef](#)]
21. Mahmood, T.; Akhtar, N. Stability of a Cosmetic Multiple Emulsion Loaded with Green Tea Extract. *Sci. World J.* **2013**, *2013*, 1–7. [[CrossRef](#)]
22. Mahmood, T.; Akhtar, N.; Manickman, S. Interfacial film stabilized W/O/W nano multiple emulsions loaded with green tea and lotus extracts: Systematic characterization of physicochemical properties and shelf-storage stability. *J. Nanobiotechnol.* **2014**, *12*, 1–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Surh, J.; Vladisavljevic, G.T.; Mun, S.; McClements, D.J. Preparation and characterization of water/oil and water/oil/water emulsions containing biopolymer-gelled water droplets. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 175–184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Patel, A.R.; Dumlu, P.; Vermeir, L.; Lewille, B.; Lesaffer, A. Rheological characterization of gel-in-oil-in-gel type structured emulsions. *Food Hydrocoll.* **2015**, *46*, 84–92. [[CrossRef](#)]
25. Altunas, O.Y.; Sumnu, G.; Sahin, S. Preparation and characterization of W/O/W type double emulsion containing PGPR-Lecithin mixture as lipophilic surfactant. *J. Disp. Sci. Technol.* **2016**, *38*, 486–493. [[CrossRef](#)]
26. Mohammadi, A.; Mahdi, J.; Seid Assadpour, E.; Faridi Esfanjani, A. Nano-encapsulation of olive leaf phenolic compounds through WPC-pectin complexes and evaluating their release rate. *Int. J. Biol. Macromol.* **2015**, *82*, 816–822. [[CrossRef](#)]
27. Akhtar, M.; Murray, B.S.; Afeisume, E.I.; Khew, S.H. Encapsulation of flavonoid in multiple emulsion using spinning disc reactor technology. *Food Hydrocoll.* **2013**, *34*, 62–67. [[CrossRef](#)]
28. Capitani, M.I.; Nolasco, S.M.; Tomás, M.C. Stability of oil-in-water (O/W) emulsions with chia (*Salvia hispánica L.*) mucilage. *Food Hydrocoll.* **2016**, *61*, 546–573. [[CrossRef](#)]
29. De Campo, C.; Pereira dos Santos, P.; Hass Costa, T.M.; Paese, K.; Stanisquaski, S.; de Oliveira Rios, A. Hickmann Flôres, S. Nanoencapsulation of chia seed oil with chia mucilage (*Salvia hispánica L.*) as wall material: Characterization and stability evaluation. *Food Chem.* **2017**, *234*, 1–9. [[CrossRef](#)]
30. Xingú, L.A.; González, H.A.; De la Cruz, T.E.; Sangerman-Jarquín, D.M.; Orozco, D.R.G.; Rubí, A.M. Chía (*Salvia hispánica L.*) situación actual y tendencias futuras. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* **2017**, *8*, 619–631.
31. Ferrari, F.M.H.; Wahanik, A.L.; Rodrigues, G.C.; Pedrosa, S.C.M.T.; Kil, C.Y.; Steel, J.C. Use of chia (*Salvia hispánica L.*) mucilage gel to reduce fat in pound cakes. *LWT Food Sci. Technol.* **2015**, *63*, 1049–1055.
32. Avila-de la Rosa, G.; Alvarez-Ramirez, J.; Vernon-Carter, E.J.; Carrillo-Nava, H.; Pérez-Alonso, C. Viscoelasticity of chia (*Salvia hispánica L.*) seed mucilage dispersion in the vicinity of an oil-water interface. *Food Hydrocoll.* **2015**, *49*, 200–207. [[CrossRef](#)]
33. Druzyńska, B.; Stępniewska, A.; Wolosiak, R. The influence of time and type of solvent on efficiency of the extraction of polyphenols from green tea and antioxidant properties obtained extracts. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* **2007**, *6*, 27–36.
34. Thaipong, K.; Boonprakob, U.; Crosby, K.; Cisneros-Zevallos, L.; Hawkins Bryne, D. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J. Food Compos. Anal.* **2006**, *19*, 669–675. [[CrossRef](#)]
35. Timilsena, Y.P.; Adhikari, R.; Barrow, C.J.; Ahikari, B. Microencapsulation of chia seed oil using chia seed protein isolate-chia seed gum complex coacervates. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, *91*, 347–357. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Rodríguez-Huezo, M.E.; Pedroza-Islas, R.; Prado-Barragán, L.A.; Beristain, C.I.; Vernon-Carter, E.J. Microencapsulation by spray drying of multiple emulsions containing carotenoids. *J. Food Sci.* **2004**, *69*, 351–359. [[CrossRef](#)]

37. Aceituno-Medina, M.; Mendoza, S.; Rodríguez, B.A.; Lagaron, J.M.; López-Rubio, A. Improved antioxidant capacity of quercetin and ferulic acid during in-vitro digestion through encapsulation within food-grade electrospun fibers. *J. Funct. Foods* **2015**, *12*, 332–341. [[CrossRef](#)]
38. Unno, T.; Osakabe, N. Green tea extract and black tea extract differentially influence cecal levels of short-chain fatty acids in rats. *Food Sci. Nutr.* **2018**, *6*, 728–735. [[CrossRef](#)]
39. Wang, C.W.; Liang, C. Reductive lindane degradation with tea extracts in aqueous phase. *Chem. Eng. J.* **2018**, *338*, 157–165. [[CrossRef](#)]
40. Afify, A.E.-M.; Shalaby, E.A.; El-Beltagi, H.S. Antioxidant activity of aqueous extracts of different caffeine products. *Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj-Napoca* **2011**, *39*, 117–123. [[CrossRef](#)]
41. Gramza, A.; Pawlak-Lemańska, K.; Korczak, J.; Wąsowicz, E.; Rudzinka, M. Tea extracts as Free Radical Scavengers. *Pol. J. Environ. Stud.* **2005**, *6*, 861–867.
42. Kodama, D.H.; Gonçalves, A.E.; de Souza Schmidt, L.; Franco, M.; Genovese, M.I. Flavonoids, total phenolic and antioxidant capacity: Comparison between commercial Green tea preparations. *Ciênc. Technol. Aliment.* **2009**, *30*, 1077–1082. [[CrossRef](#)]
43. Friedman, M.; Levin, C.E.; Lee, S.U.; Kozukue, N. Stability of green tea catechins in commercial tea leaves during storage for 6 months. *J. Food Sci.* **2009**, *74*, 47–51. [[CrossRef](#)]
44. Campos, B.; Ruivo, T.D.; Scapim, M.; Madrona, G.; Bergamasco, R. Optimization of the mucilage extraction process from chia application in ice cream as a stabilizer and emulsifier. *LWT Food Sci. Technol.* **2016**, *65*, 874–883. [[CrossRef](#)]
45. Muñoz, L.A.; Cobos, A.; Diaz, O.; Aguilera, J.M. Chia seeds: Microstructure, mucilage extraction and hydration. *J. Food Eng.* **2012**, *108*, 216–224. [[CrossRef](#)]
46. Frascch-Melnik, S.; Spyropoulos, F.; Norton Ian, T. W₁/O/W₂ double emulsions stabilized by fat crystals – Formulation, stability and salt release. *J. Colloid. Interf. Sci.* **2010**, *350*, 178–185. [[CrossRef](#)]
47. Aditya, N.P.; Aditya, S.; Yang, H.-J.; Kim, H.W.; Park, S.O.; Lee, J.; Ko, S. Curcumin and catechin co-loaded water-in-oil-in-water emulsion and its beverage application. *J. Funct. Foods* **2015**, *15*, 35–43. [[CrossRef](#)]
48. Von Staszewski, M.; Pilosof, A.M.R.; Jagus, R.J. Antioxidant and antimicrobial performance of different Argentinean green tea varieties as affected by whey proteins. *Food Chem.* **2011**, *125*, 186–192. [[CrossRef](#)]
49. McClements, D. *Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques*, 3rd ed.; Taylor & Francis Group: Florida, FL, USA, 2015; pp. 304–306.
50. Kosegarten-Conde, C.E.; Jiménez, M. Factores que intervienen en la estabilidad de una emulsión doble. *Temas Sel. Ing. Aliment.* **2012**, *6*, 1–18.
51. Schuch, A.; Helfenritter, C.; Funck, M.; Schuchmann, H.P. Observations on the influence of different biopolymers on coalescence of inner water droplets in W/O/W (water-in-oil-in-water) double emulsions. *Colloid. Surf. A Phys. Eng. Asp.* **2015**, *475*, 2–8. [[CrossRef](#)]
52. Ye, A.; Hemar, Y.; Singh, H. Influence of polysaccharides on the rate of coalescence in oil-in-water emulsions formed with highly hydrolyzed whey proteins. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 5491–5498. [[CrossRef](#)]
53. Lizarraga, M.S.; Vicini, D.; González, A.; Rubiolo, A.; Santiago, L. Rheological behavior of whey protein concentrate and k-carrageenan aqueous mixtures. *Food Hydrocoll.* **2006**, *20*, 740–748. [[CrossRef](#)]
54. Manoi, K.; Rizvi, S.H. Rheological characterizations of texturized whey protein concentrate-based powders produced by reactive supercritical fluid extrusion. *Food Res. Int.* **2008**, *41*, 786–796. [[CrossRef](#)]
55. Siebert, K.J.; Troukhanova, N.V.; Lynn, P.Y. Nature of Polyphenol-Protein Interactions. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 80–85. [[CrossRef](#)]
56. Jakobek, L. Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. *Food Chem.* **2015**, *175*, 556–567. [[CrossRef](#)]
57. López de Lacey, A.M.; Pérez-Satín, E.; López-Caballero, M.E.; Montero, P. Survival and metabolic activity of probiotic bacteria in green tea. *LWT Food Sci. Technol.* **2014**, *55*, 314–322. [[CrossRef](#)]
58. Tokle, T.; Lesmes, U.; Andrew Decker, E.; Julian McClements, D. Impact of dietary fiber coatings on behaviors of protein-stabilized lipid droplets under simulated gastrointestinal conditions. *Food Funct.* **2012**, *3*, 58–66. [[CrossRef](#)]
59. Sreedhara, A.; Vegarud, G.E.; Ekeberg, D.; Devols, T.G.; Rukke, E.O.; Schüller, R.B. Rheological behavior and droplet size distribution of emulsions stabilized by whey proteins and chitosan during ex vivo digestion. *Annu. Trans. Nord. Rheol. Soc.* **2014**, *22*, 245–252.

60. Zou, L.; Peng, S.; Liu, W.; Gan, L.; Liu, W.; Liang, R.; Liu, C.; Niu, J.; Cao, Y.; Liu, Z. Improved in vitro digestion stability of (–)-epigallocatechin gallate through nanoliposome encapsulation. *Food Res. Int.* **2014**, *64*, 492–499. [\[CrossRef\]](#)
61. Kaimainen, M.; Marze, S.; Järvenpää, E.; Anton, M.; Huopalahti, R. Encapsulation of betalain into w/o/w double emulsion and release during in vitro intestinal lipid digestion. *LWT Food Sci. Technol.* **2015**, *60*, 899–904. [\[CrossRef\]](#)



© 2019 by the author. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).