



**Centro de Investigación en Alimentación  
y Desarrollo, A.C.**

**ESTABILIDAD TÉRMICA Y CAPACIDAD  
ANTIOXIDANTE DE EXTRACTO DE TÉ VERDE  
INCORPORADO EN MICROPARTÍCULAS DE  
MALTODEXTRINA**

---

Por

**Aimara Victoria de la Cruz Molina**

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

Como requisito parcial para obtener el grado de


**MAESTRÍA EN CIENCIAS**

Hermosillo, Sonora

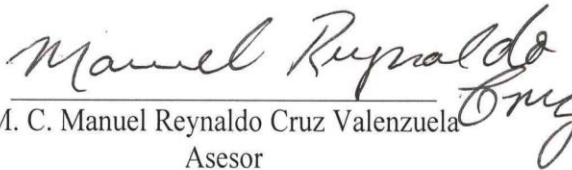
Agosto de 2017


## APROBACIÓN

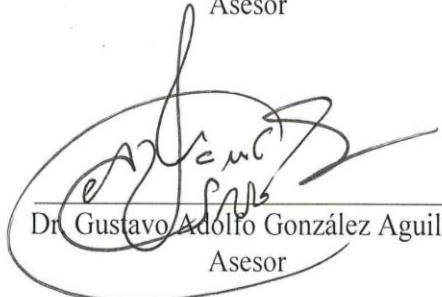
Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Aimara Victoria De La Cruz Molina, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias

  
M. C. Brenda Adriana Silva Espinoza  
Director de Tesis

  
Dr. Jesús Fernando Ayala Zavala  
Asesor

  
M. C. Manuel Reynaldo Cruz Valenzuela  
Asesor

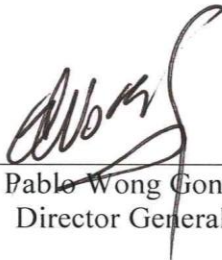
  
Dr. Jaime Lizardi Mendoza  
Asesor

  
Dr. Gustavo Adolfo González Aguilar  
Asesor

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis requiere la autorización escrita, del manuscrito en cuestión, del director o directora de tesis. En estos casos siempre se deberá dar los créditos al CIAD.



---

Dr. Pablo Wong González  
Director General

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico brindado durante la realización de mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. por permitirme realizar mis estudios de maestría y poder alcanzar una meta importante en mi formación.

Al proyecto ciencia básica 83412 “Inclusión molecular de compuestos bioactivos de aceites esenciales en  $\beta$ -ciclodextrina: caracterización fisicoquímica, actividad antimicrobiana y cinética de liberación”. Financiado del fondo de ciencia básica de CONACYT.

A la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal (CTAOV), por darme la oportunidad de realizar mi proyecto de investigación en esta área, facilitándome sus equipos y mis reiteradas gratificaciones para el personal que labora en esta coordinación.

Un especial agradecimiento a mi directora de tesis la M. C. Brenda Silva por su asesoría en la realización de mi tesis y enseñanzas brindadas.

Agradezco a mi comité de tesis integrado por la Dr. Fernando Ayala Zavala, M. C. Manuel Reynaldo Cruz Valenzuela, Dr. Gustavo Adolfo González Aguilar y Dr. Jaime Lizardi Mendoza, por la asesoría y apoyo brindado. Muchas Gracias.

Agradezco a Q.B. María del Carmen Granados del laboratorio de cereales, M.C. Karla Martínez del laboratorio de polímeros, M.C. Rosy Armenta de la coordinación de ciencia de los alimentos, Dr Ali Assaf, Dra Itzamná Baqueiro y M.C. Victor Jacquez del laboratorio de bioprocesos, M.C. Lisdeth Gutiérrez y el Dr Martín Valenzuela del laboratorio de carnes por los equipos prestados y su apoyo

Agradezco al Dr. Manuel Pérez Tello del departamento de metalurgia de la Universidad de Sonora, al Dr. Francisco Brown, Dr José Carmelo Encinas e Irela Saucedo del departamento de polímeros de la Universidad de Sonora por el apoyo brindado. Al Dr Francisco Castellón del CICESE por su apoyo con los equipos.

Agradezco a Alejandra Preciado, Jacqueline, Moni y Ramón del Laboratorio de Antioxidantes por todo el apoyo que me brindaron.

Agradezco a mis compañeros del Laboratorio de Tecnologías Emergentes Valeria, Thalía, Luis, Javier, Melissa y Melvin por todo el apoyo, las risas y todos los momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio.

Agradezco a Vale, Ceci, Thali, Jorge y Javier por todas las risas y su ayuda, son unas excelentes personas e hicieron los momentos difíciles menos desagradables.

Agradezco a Magda y Arnulfo por todo su apoyo, han sido una familia para mí, muchas gracias por todo.

.

## **DEDICATORIA**

A Dios por ser el guía en mi camino y darme fuerzas en todo momento.

A Mirta por enseñarme que siempre se puede dar más, que siempre se puede ser mejor y que no hay amor como el tuyo. Muchas gracias.

A mi Abuelita por siempre apoyarme y aconsejarme.

A mi Abuelito Gustavo (Q.E.D) por creer en mi.

A Guillermo por siempre estar para mi y darme todo su cariño.

## CONTENIDO

<b>APROBACIÓN</b> .....	2
<b>DECLARACIÓN INSTITUCIONAL</b> .....	3
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	4
<b>DEDICATORIA</b> .....	6
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	10
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	12
<b>RESUMEN</b> .....	13
<b>ABSTRACT</b> .....	14
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	15
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	18
2.1 Compuestos Fenólicos del Té Verde <i>Camellia sinensis</i> y sus Propiedades Bioactivas.....	18
2.2 Mecanismos de Acción Antioxidante de los Compuestos Fenólicos del Té Verde.....	22
2.3 Té Verde Aplicado en la Industria Alimentaria.....	25
2.4 Degradación de Compuestos Fenólicos del Té Verde en el Procesamiento de Alimentos.....	26
2.4.1 Epimerización por Temperatura .....	29
2.4.2 Pérdida de Catequinas por pH y Condiciones de Almacenamiento.....	30
2.5 Inmovilización de Extracto de Té Verde como Método de Protección de sus Propiedades Bioactivas .....	32
2.5.1 Protección de Compuestos Fenólicos Mediante la Generación de Micropartículas por el Método de Secado por Aspersión.....	34
2.5.2 Maltodextrina como Material de Barrera en la Protección de Compuestos Fenólicos.....	35
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	38
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	39
4.1 Objetivo General.....	39
4.2 Objetivos Específicos.....	39
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	40
5.1 Selección de la Materia Prima.....	40
5.2 Etapa I: Obtención y Caracterización del Extracto de Té Verde .....	40
5.2.1 Obtención de Extracto de Té Verde .....	40

## CONTENIDO (continuación)

5.2.2	Identificación de Compuestos Fenólicos presentes en Extracto de Té Verde por UPLC-PDA.....	41
5.2.3	Contenido de Compuestos Fenólicos Totales .....	42
5.2.4	Contenidos de Flavonoides Totales .....	42
5.2.5	Capacidad Antioxidante por la Prueba de Inhibición del Radical DPPH <sup>•</sup> .....	43
5.2.6	Capacidad Antioxidante por la Prueba de Inhibición del Radical ABTS <sup>•+</sup> .....	43
5.2.7	Análisis Estadístico .....	44
5.3	Etapa II: Obtención y Caracterización del Extracto de Té Verde Inmovilizado en Micropartículas de Maltodextrina .....	44
5.3.1	Inmovilización de Extracto de Té Verde y Maltodextrina .....	44
5.3.2	Morfología.....	45
5.3.3	Espectroscopia de Infrarrojo.....	46
5.4.2	Análisis Estadístico.....	46
5.4	Etapa III: Estabilidad Térmica de Extracto de Té Verde Incorporado en Micropartículas de Maltodextrina .....	47
5.4.1	Análisis Termogravimétrico (TGA) y Calorimétrico (CDB) .....	47
5.5	Etapa IV: Estabilidad de Extracto de Té Verde Incorporado en Micropartículas de Maltodextrina Almacenado por 60 Días a 25 °C .....	48
5.5.1	Ensayo de Almacenamiento a 25 °C .....	48
5.5.2	Análisis Estadístico .....	48
5.6	Etapa V: Estabilidad de Extracto de Té Verde Incorporado en Micropartículas de Maltodextrina a pH 6 y 7 Almacenado por 30 Días a 25 °C.....	49
5.6.1	A pH 6 y 7.....	49
5.6.2	Análisis Estadístico.....	49
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>50</b>
6.1	Etapa I: Obtención y Caracterización del Extracto de Té Verde.....	50
6.2	Etapa II: Obtención y Caracterización de Extracto de Té Verde Incorporado en Micropartículas de Maltodextrina.....	56
6.2.1	Contenido de Fenoles Totales, Flavonoides Totales y Capacidad Antioxidante.....	56
6.2.2	Identificación de Compuestos Fenólicos.....	58
6.2.3	Espectroscopia de Infrarrojo (FT-IR) .....	60
6.2.4	Caracterización y Morfología.....	63
6.3	Etapa III: Estabilidad Térmica de Extracto de Té Verde Incorporado en Micropartículas de Maltodextrina.....	66
6.4	Etapa IV: Estabilidad de Extracto de Té Verde Incorporado en Micropartículas de Maltodextrina Almacenado por 60 Días a 25 °C.....	70



## CONTENIDO (continuación)

6.5 Etapa V: Estabilidad de Extracto de Té Verde Incorporado en Micropartículas de Maltodextrina a pH 6 y 7 Almacenado por 30 días a 25 °C.....	76
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	89
<b>8. RECOMENDACIONES</b> .....	80
<b>9. REFERENCIAS</b> .....	91

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Estructura de las catequinas presentes en el té verde.....	21
2	Posible mecanismo de quelación de metales de compuestos fenólicos del té. Adaptado de Halake et al. (2016).....	24
3	Cambio en el enlace C-2 de forma <i>cis</i> a <i>trans</i> en galato de epigalocatequina.....	31
4	Esquema de cambios estructurales por pH y almacenamiento.....	33
5	Diagrama de secado por aspersion. Adaptado de Parisi et al. (2014).....	36
6	Compuestos identificados por UPLC-PDA en extracto acuoso a 70 °C.....	55
7	Espectro FT-IR del extracto de té verde, maltodextrina y extracto de té verde incorporado en micropartículas de maltodextrina.....	61
8	SEM de micropartículas de maltodextrina. A) 40% Maltodextrina + 6% Extracto de Té Verde; B) 25% Maltodextrina + 6% Extracto de Té Verde.....	64
9	Análisis termogravimétrico (TGA) de extracto de té verde libre, maltodextrina y extracto de té verde incorporado en micropartículas de maltodextrina.....	67
10	Calorimetría diferencial de barrido (CDB) de extracto de té verde y extracto de té verde incorporado en micropartículas de maltodextrina.....	69
11	Contenido de fenoles (A) y flavonoides toles (B) remanente en extracto de té verde libre e inmovilizado almacenado a 25 °C por 60 días.....	71
12	Capacidad antioxidante por inhibición del radical ABTS (A) y DPPH (B) remanente en extracto de té verde libre e inmovilizado almacenado a 25 °C por 60 días.....	73

## LISTA DE FIGURAS (continuación)

13	Contenido de fenoles totales del extracto de té verde libre e inmovilizado almacenado a pH 6 (A) y 7 (B) por 30 días a 25 °C.....	77
14	Contenido de flavonoides totales del extracto de té verde libre e inmovilizado almacenado a pH 6 (A) y 7 (B) por 30 días a 25 °C.....	79
15	Capacidad Antioxidante por radical ABTS remanente en extracto de té verde libre e inmovilizado almacenado a pH 6 (A) y 7 (B) por 30 días a 25 °C.....	82
16	Capacidad Antioxidante por radical DPPH remanente en extracto de té verde libre e inmovilizado almacenado a pH 6 (A) y 7 (B) por 30 días a 25 °C.....	83

## LISTA DE CUADROS

<i>Cuadro</i>		<b>Página</b>
1	Contenido de catequinas en algunos alimentos.....	19
2	Capacidad de catequinas y sus epímeros en la captación de radicales libres y especies reactivas de oxígeno .....	28
3	Contenido de fenoles y flavonoides totales de los diferentes métodos de extracción.....	51
4	Capacidad Antioxidante de las diferentes técnicas de extracción.....	53
5	Contenido de fenoles, flavonoides totales y capacidad antioxidante en micropartículas de maltodextrina y extracto de té verde.....	57
6	Compuestos identificados por UPLC-PDA en extracto de té verde libre e inmovilizado en micropartículas de maltodextrina.....	59
7	Compuestos identificados por UPLC-PDA en extracto de té verde inmovilizado en micropartículas de maltodextrina a los días 0 y 60.....	75
8	Porcentaje remanente de fenoles y flavonoides a pH 6 y 7 en el extracto de té verde y extracto de té verde en micropartículas de maltodextrina.....	80
9	Compuestos identificados en extracto libre e inmovilizado a pH 6 y 7 a los días 0 y 30 de almacenamiento a 25 °C.....	85
10	Correlaciones de compuestos fenólicos identificados a pH 6 y 7 sobre las variables de respuesta.....	87

## RESUMEN

El té verde es la segunda bebida de mayor consumo a nivel mundial debido a su composición química rica en compuestos fenólicos, siendo el galato de epigallocatequina (EGCG) el componente mayoritario. Este compuesto es de especial interés debido a sus propiedades benéficas a la salud; sin embargo, puede sufrir degradación y epimerización por efecto de las condiciones de procesamiento y tiempo de almacenamiento de los alimentos a los cuales es incorporado. Se plantea que la inmovilización de extracto de té verde en micropartículas de maltodextrina puede brindar protección ante procesos térmicos, aumentos de pH y almacenamiento. La inmovilización se llevó a cabo utilizando un extracto acuoso utilizando agua a 70 °C con un contenido de fenoles 125.69 mg EAG/g p.s. Se empleó el método de secado por aspersión para la obtención de las micropartículas utilizando una concentración de 5% p/v de extracto de té verde y 25 % p/v de maltodextrina, la eficiencia de inmovilización fue de 63 % y el tamaño de partícula fue menor a 30 µm. Las catequinas identificadas en las micropartículas fueron galato de epigallocatequina, galato de galocatequina, epigallocatequina, epicatequina y catequina. Se realizaron pruebas de termogravimetría y calorimetría para evaluar la estabilidad térmica, los resultados mostraron un desplazamiento en la temperatura de pérdida de peso, así como la ausencia de degradación. Las micropartículas fueron almacenadas por 60 días a 25 °C y por 30 días a pH 6 y 7. Después del periodo de almacenamiento las micropartículas conservaron entre un 25 y 15 % más el contenido de fenoles y flavonoides respectivamente. La capacidad antioxidante se conservó hasta un 10 y 30 % más en las micropartículas que el extracto libre por el método de DPPH y ABTS respectivamente. Las micropartículas de igual manera conservaron su estructura de mejor manera a diferencia del extracto libre en el cual se degradaron compuestos como EGCG y EGC. Estos resultados demuestran que la inmovilización es una barrera efectiva capaz de evitar la pérdida de compuestos fenólicos, cambios estructurales y conservación de la capacidad antioxidante de extracto de té verde.

**Palabras Clave:** inmovilización, degradación, epimerización, capacidad antioxidante.

## ABSTRACT

Green tea is the second most consumed drink worldwide due to its chemical composition rich in phenolic compounds, with epigallocatechin gallate (EGCG) being the major component. This compound is of special interest because of its beneficial properties to health; however, it may undergo degradation and epimerization by the effect of processing conditions and storage time of the foods to which it is incorporated. It is argued that the immobilization of green tea extract in maltodextrin microparticles can provide protection against thermal processes, pH increases and storage. Immobilization was carried out using an aqueous extract using water at 70 °C with a phenol content of 125.69 mg GAE/g p.s. The microparticles were obtained through spray drying method using 5% w/v concentration of green tea extract and 25% w/v maltodextrin. The immobilization efficiency was 63% and the particle size was less than 30 µm. The catechins identified in the microparticles were epigallocatechin gallate, gallic acid, epigallocatechin, epicatechin and catechin. Thermogravimetry and calorimetry tests were performed to evaluate the thermal stability, the results showed a displacement in the weight loss temperature, as well as the absence of degradation. The microparticles were stored for 60 days at 25 °C and for 30 days at pH 6 and 7. After the storage period the microparticles retained between 25 and 15% more the content of phenols and flavonoids respectively. The antioxidant capacity by ABTS was conserved up to 30% more in the microparticles than the free extract and 10% more by the DPPH method. The microparticles likewise retained their structure better than the free extract in which compounds such as EGCG and EGC were degraded. These results demonstrate that immobilization is an effective barrier capable of avoiding the loss of phenolic compounds, structural changes and preservation of the antioxidant capacity of green tea extract.

**Keywords:** immobilization, degradation, epimerization, antioxidant capacity.

## 1. INTRODUCCIÓN

El té preparado a partir de las hojas del árbol *Camellia sinensis*, es una de las bebidas con mayor consumo a nivel mundial (Chang, 2015). Según reportes de la FAO en el año 2013 el consumo y producción de té tuvieron un incremento del 5 y 6%, respectivamente. A partir del procesamiento de las hojas de té, este puede ser clasificado según el grado de fermentación, teniendo así tres clasificaciones de té: negro (fermentado totalmente), Oolong (semi fermentado) y verde (sin fermentar). De acuerdo al grado de fermentación de las hojas ocurre una variabilidad en su composición química principalmente en la cantidad y estructura de compuestos bioactivos encontrados en el té. Debido a la ausencia de fermentación el té verde posee una mayor cantidad de estos compuestos en comparación con los otros derivados de la misma hoja. Cabe agregar, que la presencia de los compuestos bioactivos es la razón principal del incremento en el consumo de té, ya que estos poseen propiedades benéficas en los consumidores (Khalaf et al., 2008).

Los compuestos bioactivos del té verde han demostrado tener un efecto benéfico en la salud, como lo es en tratamientos quimiopreventivos (Bettuzzi et al., 2006). Este efecto ha sido atribuido a los flavonoides que se encuentran abundantemente en las hojas de té verde. Los flavonoides principales encontrados en el té son catequinas como; epicatequina, epigallocatequina, galato de epicatequina y galato de epigallocatequina (Katalinic et al., 2006). Este último compuesto, representa del 50 al 80% del contenido total de catequinas presentes en el té, y es considerado el compuesto con mayor capacidad bioactiva. El galato de epigallocatequina ha sido ampliamente estudiado presentando efectos benéficos en diabetes, Alzheimer, infartos y obesidad (Khan et al. 2006). Además de las catequinas, también se encuentran presentes otros flavonoides como quercetina, kaempferol, miricetina, entre otros, que de igual manera proporcionan un efecto benéfico en la salud.

Si bien dichas propiedades son de gran importancia, la bioactividad de las catequinas se ve comprometida por la degradación que pueden sufrir. En la industria de alimentos las condiciones de almacenamiento y factores de procesamiento como temperatura y pH, son los principales causantes de degradación de dichos compuestos (Munin and Edwards-lévy, 2011). Los procesos de degradación consisten principalmente en cambios estructurales de las catequinas, donde por un desarreglo en la molécula se generan cambios en su capacidad antioxidante y transformación en diferentes compuestos (Fan et al., 2016). Ante esta problemática es necesario aplicar técnicas y métodos que brinden protección a las catequinas presentes en el té verde; permitiéndoles mantener sus propiedades funcionales al ser incluidos en diferentes matrices alimentarias (de Vos et al., 2010).

Una de las técnicas utilizadas es la inmovilización, donde como producto final se obtienen partículas utilizando un material de recubrimiento; dentro de los cuales se pueden introducir diferentes sustancias; por ejemplo, las catequinas presentes en el té verde (Dube, Nicolazzo, and Larson, 2010). Los materiales de recubrimiento utilizados en la inmovilización de compuestos fenólicos incluyen proteínas, carbohidratos, lípidos, así como también materiales de origen sintético (Dorati et al., 2013). A pesar de la amplia gama de materiales barrera, los más utilizados son los polisacáridos, como la maltodextrina. La cual ha mostrado eficiencias de inmovilización de compuestos fenólicos de té verde hasta de un 80% y una protección de dichos compuestos hasta de un 75% después del proceso de secado (Pai et al., 2015). No obstante, las partículas obtenidas por este método aún siguen siendo estudiadas con la finalidad de conocer su comportamiento en diferentes condiciones y alimentos. Y cómo este método puede ser una manera de conservar la capacidad antioxidante en diferentes condiciones del procesamiento de alimentos.



El presente trabajo pretende abrir una perspectiva sobre el uso de la inmovilización como una técnica de protección de los compuestos fenólicos del té verde ante su degradación por factores de temperatura, pH y almacenamiento utilizados en el procesamiento de alimentos. Por lo expuesto anteriormente se propone realizar un estudio que evalúe la estabilidad térmica, así como aumentos de pH y tiempo de almacenamiento de las catequinas presentes en un extracto de té verde incorporado en micropartículas de maltodextrina. De esta manera reducir su degradación por efectos del procesamiento de alimentos, generando oportunidades para ser agregadas a alimentos sin comprometer su funcionalidad.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Compuestos Fenólicos del Té Verde *Camellia sinensis* y sus Propiedades

#### Bioactivas.

El té preparado a partir de las hojas del árbol *Camellia sinensis*, a partir de estas hojas y la forma en la que son procesadas se pueden clasificar en tres tipos: té negro (fermentado totalmente), té Oolong (semi fermentado) y té verde (sin fermentar). Desde hace varios años se ha visto que el té proveniente de estas hojas es una de las bebidas con mayor consumo a nivel mundial. (Chang, 2015). Es importante mencionar que de acuerdo al grado de fermentación de las hojas ocurre una variabilidad en su composición química principalmente en la cantidad y estructura de compuestos bioactivos. Además de esto, se ha reportado que la composición nutrimental comprende diferentes macronutrientes, como proteínas y carbohidratos. Según reportes de la FAO en el año 2013 el consumo y producción de té tuvieron un incremento del 5 y 6%, respectivamente y según las proyecciones la producción y el consumo seguirán en aumentos en los próximos años.

Los compuestos bioactivos son la razón principal del incremento en el consumo de té verde, estos son moléculas bioactivas derivadas del metabolismo secundario de las plantas, las cuales están involucradas en su desarrollo fisiológico, reproducción y morfología (Del Rio et al., 2013; Khalaf et al., 2008). Las principales moléculas bioactivas presentes en el té verde pertenecen a la familia de los flavonoides, encontrados principalmente en forma de catequinas, las cuales se encuentran en diversos alimentos (Cuadro 1); sin embargo, el té verde presenta un mayor contenido en comparación con otros alimentos y derivados de la misma hoja. Se ha determinado que en una bebida utilizando 1 g de hojas de té verde en 100 mL de agua, seguido de un proceso de infusión por tres minutos, contiene aproximadamente de 250 a 350 mg de sólidos, de los cuales cerca del 70% son catequinas.

**Cuadro 1.** Contenido de catequinas en algunos alimentos.

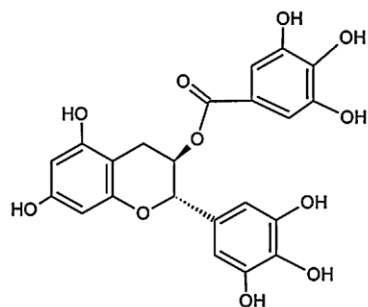
<b>Alimento</b>	<b>Catequinas <sup>a</sup></b>
Manzana	10-43
Frijol	35-55
Té Negro	6-50
Mora	9-11
Cereza	5-22
Chocolate	46-61
Uva	3-17.5
Té Verde	10-80
Frambuesa	2-48
Vino Tinto	8-30

Adaptado de Gadkari y Balaraman (2015).

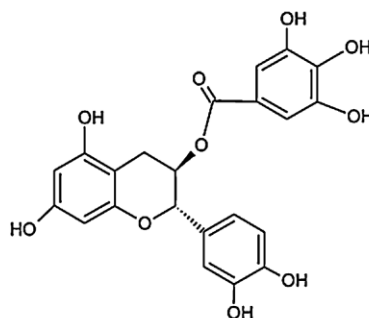
<sup>a</sup> Valores expresados en mg por 100 g de muestra fresca

Por su estructura pueden desempeñar funciones antioxidantes, antiinflamatorias, antimicrobianas entre otras. (Schieber et al., 2001). Las catequinas contienen un esqueleto benzopirano con un grupo fenilo sustituido en la posición dos y un grupo hidroxilo en la tercera posición. Se encuentran presentes como catequina, epicatequina (EC), Galocatequina (GC), epigalocatequina (EGC), catequina galato (CG), epicatequina galato (ECG), galocatequina galato (GCG) y epigalocatequina galato (EGCG); sus respectivas estructuras se muestran en la Figura 1 (de Mejia et al., 2009). Es importante mencionar que el contenido de catequinas presentes en el té verde varía de acuerdo a su origen condiciones de procesamiento y almacenamiento. Aproximadamente del contenido total de catequinas del té verde entre un 50% y 80% pertenecen a EGCG (Khan et al., 2006), y el 10 y 30% restante de los compuestos son quercetina, kaempferol y miricetina (Jayabalan et al., 2008). Estos compuestos encontrados en el té verde muestran una potente capacidad antioxidante, ya que son capaces de combatir las especies reactivas de oxígeno (EROS).

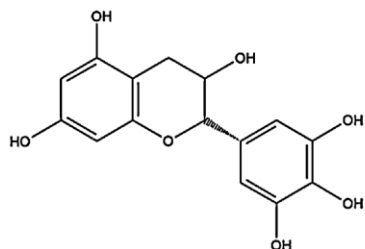
Las principales EROS son superóxido, peróxido de hidrógeno, peroxilo e hidroxilo, el exceso de estas moléculas puede llevar a un estrés oxidativo, presentando un riesgo para el organismo (Sies, 2010). Los daños provocados por dichas moléculas son dirigidos a las células, principalmente a las macromoléculas que las constituyen, afectando así procesos inmunológicos que desencadenan enfermedades como cáncer, envejecimiento, Parkinson y procesos inflamatorios (Cai et al., 2014). La capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos se da principalmente por inhibición o bien por atrapamiento de EROS. En algunos casos estos procesos ocurren al mismo tiempo complementándose entre sí, evitando oxidación y protegiendo de daños a las células (Shimada et al., 2004). La capacidad de la capacidad antioxidante de las catequinas está ligada a su estructura, siendo EGCG la molécula con mayor capacidad antioxidante gracias al galato en la posición C-3 del anillo C y el pirogalol del anillo B. Seguidamente se encuentran las moléculas las cuales cuentan con un grupo pirogalol en su estructura como EGC, GC, EC y C.



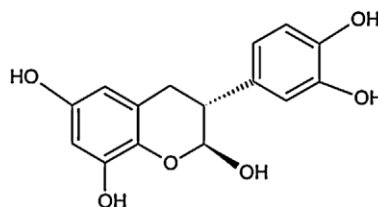
**Galocatequina galato (GCG)**



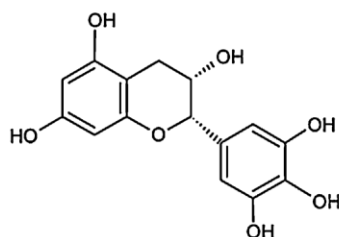
**Catequina galato (CG)**



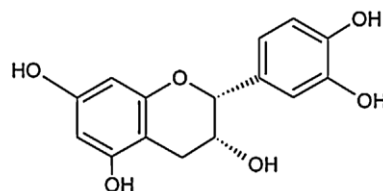
**Galocatequina (GC)**



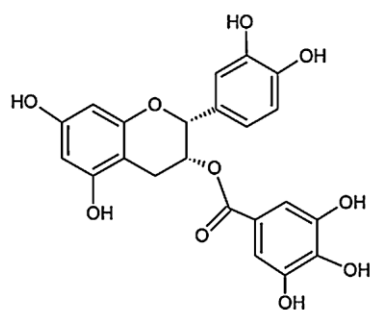
**Catequina (C)**



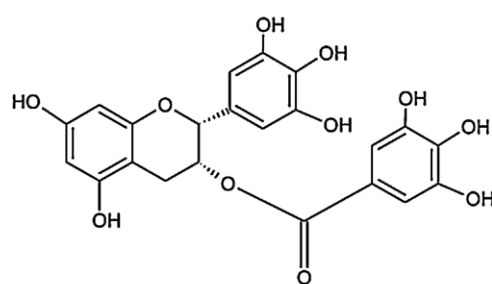
**Epigalocatequina (EGC)**



**Epicatequina (EC)**



**Epicatequina Galato (ECG)**



**Epigalocatequina Galato (EGCG)**

**Figura 1.** Estructura de las catequinas presentes en el té verde

Otra propiedad atribuida a los compuestos fenólicos del té, es su capacidad antimicrobiana. En un estudio realizado por Almajano et al. (2008), observaron que los compuestos fenólicos del extracto de té verde, presentaron una mayor capacidad inhibitoria de *Pseudomonas aeruginosa* en comparación con extractos de té blanco y rooibos. Cabe mencionar, que esta bacteria es una de las principales involucradas en infecciones de heridas en la piel, así también como úlceras e irritaciones. Por otra parte, se han realizado estudios dirigidos a la capacidad antimicrobiana del té verde, donde han comprobado su efectividad en la microflora oral. Demostrando que el compuesto mayoritario EGCG, presenta actividad en la disminución de bacterias como *Streptococcus mutans* (Gopal et al., 2016).

Además de las propiedades mencionadas anteriormente, la diana molecular de la catequinas tiene una dirección dirigida hacia mecanismos anticarcinogénicos. Estas propiedades relacionadas a la prevención del cáncer han sido estudiadas desde hace muchos años. En 1997 Toyoda et al., realizaron un estudio epidemiológico, donde evaluaron el consumo de té verde en una población de adultos en Japón que consumían un total de diez tazas de té verde en el día. Los resultados de dicho estudio demostraron que el consumo retrasaba la aparición de cáncer en 8.7 años para mujeres y 3 años en hombres. En la actualidad se siguen estudiando los mecanismos de acción de los compuestos fenólicos del té verde sobre el cáncer y enfermedades del corazón (Braicu et al., 2013). En el siguiente apartado se explicará el mecanismo de acción de estas moléculas y cómo son capaces de ejercer diferentes funciones biológicas

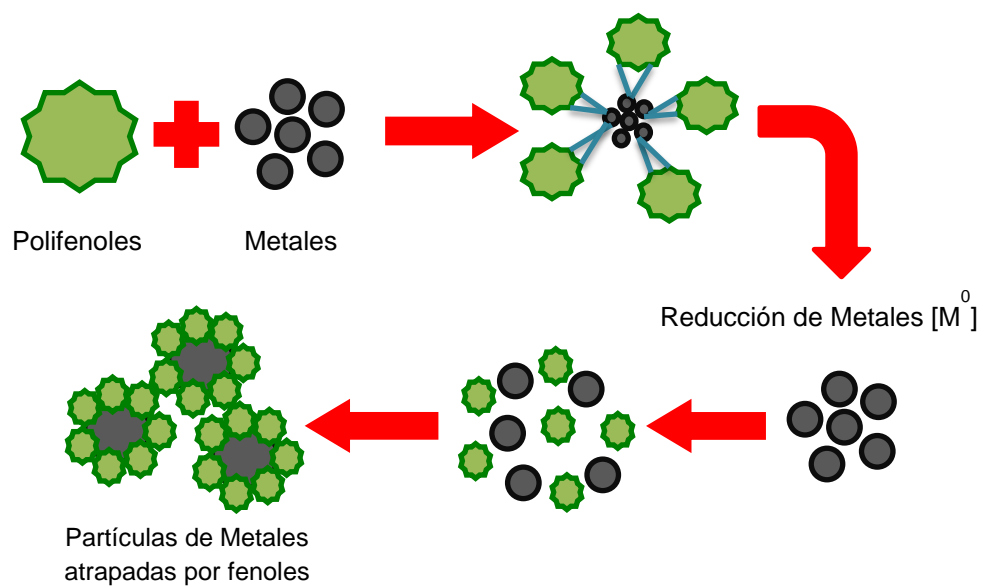
## 2.2 Mecanismos de Acción Antioxidante de los Compuestos Fenólicos del Té Verde.

La relevancia de las catequinas presentes en el té verde proviene principalmente de su mecanismo de acción en los sistemas biológicos, ya que a través de estos se les atribuyen funciones específicas. Una de ellas es la capacidad antioxidante, la cual se basa principalmente en la capacidad de respuesta que tienen las catequinas ante el estrés

oxidativo producido por radicales libres (RL). Los RL actúan como mensajeros en la célula, activando una producción en cadena de los mismos; cuando existe una sobreproducción de RL se genera un desbalance conocido como estrés oxidativo. Se ha demostrado que las catequinas son capaces de atrapar e inhibir los RL que se encuentran en los organismos, a través de la inducción de enzimas y quelación de metales pesados, como se muestra en la Figura 2 (Chedea et al., 2010). De esta manera, la producción de radicales libres está en balance con el sistema de defensa, impidiendo efectos dañinos en la salud.

El atrapamiento de RL por parte de los compuestos fenólicos es debido a la estructura química que poseen, específicamente los anillos aromáticos y su abundancia de grupos hidroxilo (Gramza and Korczak, 2005). Dicha estructura les permite actuar como antioxidantes a través de dos mecanismos, puede ser por transferencia de electrones (TE), o transferencia de átomos de hidrógeno (TAH). Durante la TE el compuesto fenólico dona un electrón para estabilizar al RL de esta manera los radicales completan sus valencias, formando un radical estable ( $\text{ArOH}^+$ ). En el segundo mecanismo antioxidante (TAH), los compuestos fenólicos reaccionan con el radical libre como se describe en el primer mecanismo. Dando lugar a la formación de nuevos radicales libres, los cuales son estabilizados por la transferencia del átomo de hidrógeno de los compuestos fenólicos. En este sentido cabe agregar que a pesar de la formación de nuevos radicales libres, su estabilización es posible debido a la deslocalización de su electrón desapareado sobre el anillo aromático por resonancia o bien por conjugación (Leopoldini et al., 2011).

El estudio de las catequinas, específicamente EGCG, ha mostrado que tienen dos mecanismos de acción en las células; el primero está directamente relacionado con la producción de peróxido de hidrógeno. La producción de dicha ERO presenta toxicidad específica a las células cancerígenas, cabe agregar, que la combinación de radicales hidroxilo y el peróxido de hidrógeno necesaria para presentar dicho efecto es a partir de los 50  $\mu\text{M}$  (Kim et al., 2014). EGCG de igual manera ha mostrado la capacidad de interactuar e iniciar algunas señales a nivel celular debido a la cualidad de unirse a componentes de la membrana celular como proteínas y lípidos (Nakagawa et al., 2004).



**Figura 2.** Posible mecanismo de quelación de metales de compuestos fenólicos del té.  
Adaptado de Halake et al. (2016).



Se han realizado estudios para conocer más a fondo el mecanismo de acción sugiriendo que este compuesto puede entrar por difusión pasiva y es metabolizado en la célula, encontrándose mayormente en el citosol (Hong et al., 2002). Otros estudios confirman que las catequinas influyen en la inhibición de señalización del NF- $\kappa$ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas). El NF- $\kappa$ B es un complejo de proteínas que controla la transcripción de ADN, además de estar implicado en la respuesta ante el estrés oxidativo (Singh et al., 2011).

La regulación defectuosa de dicho complejo está ligado con enfermedades como cáncer, inflamaciones, e infecciones virales (Farhan et al., 2016). Por otra parte, la quercetina presente en el té verde, ha demostrado ser un agente efectivo eliminando totalmente radicales superóxido, óxido nítrico y peroxinitrito. Las catequinas son utilizadas como terapia contra el cáncer, incrementando la capacidad de los medicamentos utilizados en quimioterapia, así como reduciendo las dosis de dichos medicamentos (Chacko et al., 2010). Más adelante se explicará cómo esta capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos del té verde son afectados por diversas condiciones.

### 2.3 Té Verde Aplicado en la Industria Alimentaria

Debido a las propiedades bioactivas de las catequinas del té verde, el mercado de alimentos y bebidas, ubica dichos compuestos como potenciales ingredientes en el sector de alimentos funcionales (Augustin and Sanguansri, 2014). Los compuestos fenólicos provenientes del té verde han sido aplicados en diferentes alimentos: e.g. productos cárnicos, lácteos, panificación, frutas y bebidas de origen vegetal. Ahmad et al. (2015) elaboraron galletas de harina de trigo y té verde en polvo, observando que la combinación favorecía las propiedades viscoelásticas y otras propiedades físicas de la harina de trigo.

Tappi et al. (2017) añadieron dosis de extracto de té verde por el método de vacío en manzanas mínimamente procesadas con la finalidad de obtener un producto con un mejor valor nutricional. Los resultados de dicho estudio mostraron que al aplicar soluciones de extracto de té verde al 1% obtenían efectos sinérgicos sobre los compuestos fenólicos presentes de manera natural en la manzana. Aumentando el contenido de fenoles totales (CFT) 5 veces más comparado con el CFT encontrados en la manzana fresca.

Por otra parte, Dominguez-Perles et al. (2011) desarrollaron una bebida funcional utilizando té verde y subproductos de brócoli. En las diferentes formulaciones analizadas obtuvieron el mayor CFT en la mezcla que contenía una relación 1:2 (té verde: brócoli). La formulación mencionada anteriormente contenía un 50% y un 70% más de CFT en comparación con el té verde y el concentrado de brócoli respectivamente. Estos estudios mencionados son algunos ejemplos de las aplicaciones del té verde en la industria alimentaria, sin embargo, aún es necesario realizar más estudios para aprovechar el potencial de estas hojas. Y de esta manera crear alimentos funcionales capaces de mejorar la salud de los consumidores.

## 2.4 Degradación de Compuestos Fenólicos del Té Verde en el Procesamiento de Alimentos.

Como se menciona en el apartado anterior, los compuestos bioactivos del té son de gran interés para la industria de alimentos funcionales; sin embargo, es un proceso que aún se encuentra en desarrollo. Esto se debe a que los compuestos fenólicos del té verde son susceptibles a la degradación resultando en la pérdida de su funcionalidad (Munin and Edwards-lévy, 2011). La degradación de las catequinas se da generalmente en dos formas, la primera es la epimerización.

Esta se refiere a un cambio estérico de la molécula en la posición C-2, mayormente las catequinas poseen dicho enlace en forma *cis* y la epimerización se da cuando este enlace cambia a su forma *trans* (Ananingsih et al., 2013). Provocando un cambio estérico de la molécula haciendo que tenga menor capacidad de interactuar con el medio, por tanto una menor bioactividad (Wang et al., 2008). Es importante mencionar que ambas estructuras ocurren de forma natural en el té verde; sin embargo, la epimerización influye en la relación en la cual se encuentran. Debido al impacto de la epimerización se han realizado investigaciones donde se ha evaluado la capacidad antioxidante de las estructuras epicatequina y no epicatequina.

En el Cuadro 2 se observa el orden de captación de radicales, donde EGCG y ECG (estructuras epi) presentan una mayor captación de radicales hidroxilo y peroxilo en comparación con sus epímeros. El segundo factor de degradación de las catequinas está dado por hidrólisis, esta se da cuando son sometidas a cambios de pH o periodos prolongados de almacenamiento (Castaneda-Ovando et al., 2009). Las catequinas que se encuentran en mayor abundancia son aquellas que se encuentran polimerizadas con pirogalol, ácido gálico o ambas como lo es EGCG. La hidrólisis de igual manera que la epimerización puede ser crucial en la degradación de las catequinas, principalmente porque ésta favorece la conversión de las catequinas en otros compuestos nuevos (Li et al., 2013). Estudios reportan que la hidrólisis es una reacción que ocurre principalmente en catequinas polimerizadas con ácido gálico.

Fan et al. (2016) realizaron un estudio en el cual evaluaron el comportamiento de las catequinas y su conversión a oligómeros no enzimáticos bajo procesos térmicos. En el estudio aplicaron temperaturas de 30 a 90 °C, dentro de los resultados observaron que la hidrólisis de EGCG ocurría a los 90 °C. A esta temperatura la hidrólisis era mayor en un 13% en comparación de un 2% de hidrólisis en ECG; por estos resultados los autores sugieren que el OH adicional en la posición B-5 promueve la hidrólisis en el enlace éster del anillo D. Cabe agregar que en dicho estudio se aplicaron temperaturas menores a las aplicadas en el procesamiento de alimentos, es por esto que aún se necesita investigar sobre los cambios que pueden ocurrir a temperaturas más altas.

**Cuadro 2.** Capacidad de catequinas y sus epímeros en la captación de radicales libres y especies reactivas de oxígeno.

Radicales Libres / EROS	Orden de capacidad de captación de radicales	Referencias
Oxígeno singlet	EGCG>ECG>EGC>EC>C	Mukai, Nagai, and Ohara, 2005
Radical Hidroxilo	ECG>EGCG>EC >GC>EGC>C	Wiseman, Balentine, and Frei, 1997
Radical Peroxilo	ECG=EGCG=EC=C>EGC	Salah et al., 1995
Radical ABTS <sup>+</sup>	ECG>EGCG>EGC>EC=C	Salah et al., 1995
DPPH	EGCG=ECG>EGC>EC	Nanjo et al., 1996

Adaptado de Ananingsih, Sharma and Zhou, 2013 .

### 2.4.1 Epimerización por Temperatura

En el procesamiento de los alimentos el principal factor de degradación de las catequinas del té verde es la temperatura, esto se debe a que la epimerización es un proceso que se activa a partir de los 80 °C (Figura 3). Para asegurar la calidad e inocuidad de los alimentos es necesario emplear temperaturas que oscilan entre los 100 y 200 °C. Song et al. (2015) realizaron un estudio, en el cual fueron agregadas catequinas en un modelo de bebida láctea y fueron sometidas a diferentes temperaturas y concentraciones de grasa. Los resultados indicaron que al someterse a temperaturas de 37 y 62 °C los niveles de EGCG decrecieron significativamente.

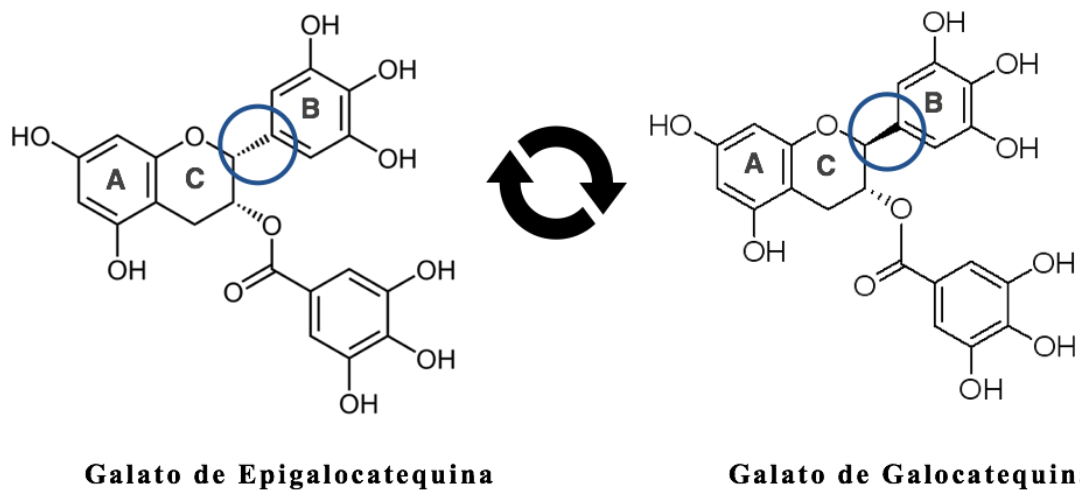
Por otra parte, Volf et al. (2014) determinaron el porcentaje de degradación en diferentes compuestos fenólicos (catequina, ácido gálico y vanílico) utilizando radiación ultravioleta C (UV-C). Los resultados demostraron que después de 480 min de radiación UV-C la catequina fue el único compuesto en degradarse totalmente en comparación con los otros compuestos expuestos. Otros estudios aplicando temperaturas más elevadas muestran el comportamiento a través del tiempo en relación con la formación de epímeros. Aplicando una temperatura de 120 °C por 100 minutos se ha observado que la formación de epímeros empieza a partir de los 5 minutos, teniendo una relación cercana al 50% entre estructuras *cis* y *trans* a los 60 minutos de calentamiento (Li, Taylor, Ferruzzi, & Mauer, 2012).

Los estudios mencionados anteriormente, si bien se han evaluado los perfiles de degradación y la epimerización. No evaluaron como esto afecta la capacidad antioxidante una vez son aplicados, por lo que aún hace falta investigar como estos cambios afectan la bioactividad de las catequinas del té verde.

#### **2.4.2 Pérdida de Catequinas por pH y Condiciones de Almacenamiento**

Estudios previos han demostrado que la estabilidad de las catequinas se encuentra ligada fuertemente a los cambios de pH del medio acuoso en el cual están contenidas (Ortiz et al., 2008). Ya que este favorece el proceso de hidrólisis y autooxidación, ambos procesos ocurren de manera natural; sin embargo, su efecto en pH ácidos (1 a 5) es más retardado que en pH neutro-alcálinos ( $\text{pH} > 5$ ). Ambos procesos conllevan a una degradación estructural, seguido de formación de dímeros y polimerización, resultando así en una reducción en el contenido de catequinas y aumentos de otros compuestos (Pirker et al., 2009). Li et al. (2012), observaron el comportamiento de degradación de catequinas por cambios de pH en una bebida a base de té verde. En la evaluación del pH, EGCG, EGC, ECG y EC, mantenían su estabilidad en un rango de pH de 4 a 5.2, arriba de este pH la degradación de dichos compuestos aumentaba en un 30%. Los cambios en el pH pueden ser ocasionados ya sea por la naturaleza del alimento o por ingredientes adicionados en la formulación de alimentos. Por ejemplo, agentes alcalinizantes como el bicarbonato y polvo para hornear, los cuales son utilizados en la industria de panificación.

En un estudio llevado a cabo por Friedman et al. (2009) observaron que EGCG en las hojas secas de té se degradó un 28% en un periodo de seis meses a una temperatura de 20 °C. Por otra parte, estudios realizados en bebidas de té verde enlatadas a pH 5 y almacenadas por seis meses, mostraron degradación de catequinas del 90%, así mismo, se ha observado que la degradación puede ocurrir en menor tiempo cuando el pH es más alto. En una bebida con pH 6 en un periodo de 4 meses las catequinas se degradaron en su totalidad (Chen et al., 2001). Cabe mencionar que los estudios mencionados anteriormente no evaluaron como estos cambios estaban relacionados con la capacidad antioxidante; sin embargo, evidencian como el almacenamiento en conjunto con el pH y temperatura, son de suma importancia en la degradación de catequinas.



**Figura 3.** Cambio en el enlace C-2 de forma *cis* a *trans* en galato de epigallocatequina

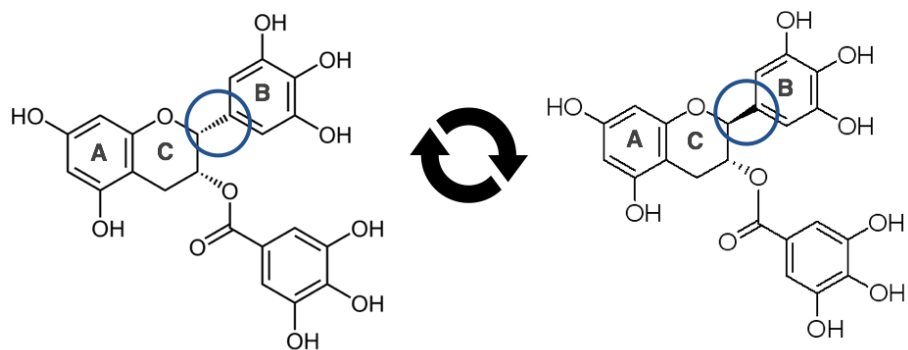
En la Figura 4 se muestra un diagrama de los factores descritos en esta sección y como estos afectan la estructura química de las catequinas. Por lo anterior podemos decir que si estos factores no son debidamente controlados durante el procesamiento, se puede llegar a perder en su totalidad el contenido de catequinas. Por lo tanto, el reto de la industria alimentaria es poder incorporar dichos compuestos sin comprometer su estructura química así como su capacidad antioxidante. Es importante investigar como estos cambios en la estructura están relacionados con la pérdida en la capacidad antioxidante, y más importante aún como se puede conservar; asegurando que desde el momento de su procesamiento hasta el momento de su consumo, el producto conserve su funcionalidad.

## 2.5 Inmovilización de Extracto de Té Verde como Método de Protección de sus Propiedades Bioactivas

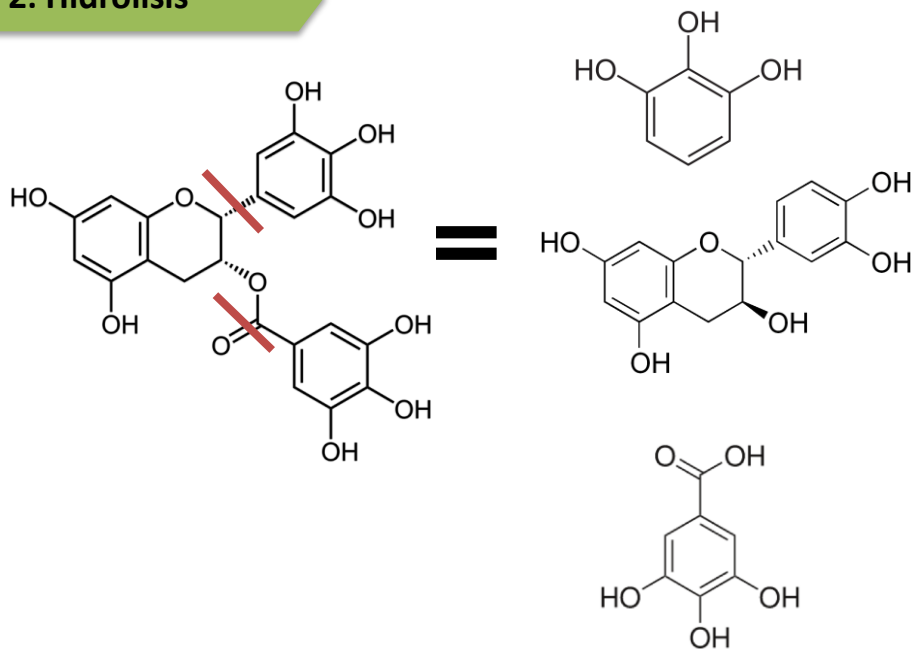
Por las razones mencionadas en el apartado anterior es necesario aplicar técnicas de protección, que reduzcan o inhiban el daño provocado por el procesamiento de alimentos, así como enmascarar los sabores astringentes de las catequinas. Entre las técnicas más utilizadas se encuentra la inmovilización, la cual tiene una de sus grandes aplicaciones en alimentos (Augustin and Sanguansri, 2014). Algunas de ellas se han realizado en probióticos, colorantes, aromas, antioxidantes entre otros (Vos et al., 2010), este proceso se lleva a cabo a través de diferentes métodos para obtener, micro y nano partículas incorporadas con el compuesto deseado (Shanthi et al., 2010). La inmovilización se lleva a cabo en tres pasos esenciales: (i) la formación de la pared alrededor del compuesto a inmovilizar, (ii) asegurar que no existe fuga del compuesto bioactivo, (iii) y que el material de barrera se mantenga en las paredes de la partícula (Fang, 2010).



## 1: Epimerización



## 2: Hidrólisis



**Figura 4.** Esquema de cambios estructurales por pH y almacenamiento

Una parte considerable de los productos de la inmovilización de catequinas está destinado al mercado farmacéutico (Dudhani and Kosaraju, 2010); donde son utilizados métodos, como la gelificación iónica. Este método consiste en la extrusión de la emulsión, haciéndola pasar por una boquilla y las gotas obtenidas son dispersadas en un surfactante, dando como resultado geles esféricos (Liang et al., 2011). Otro ejemplo son las emulsiones de polisacáridos como quitosano y catequina dispersas en soluciones de tripolifosfato, esta mezcla ha sido probada en estudios *in vivo*. Los resultados muestran que la interacción entre las catequinas y el quitosano producen un efecto benéfico en la absorción intestinal (Dube et al., 2010).

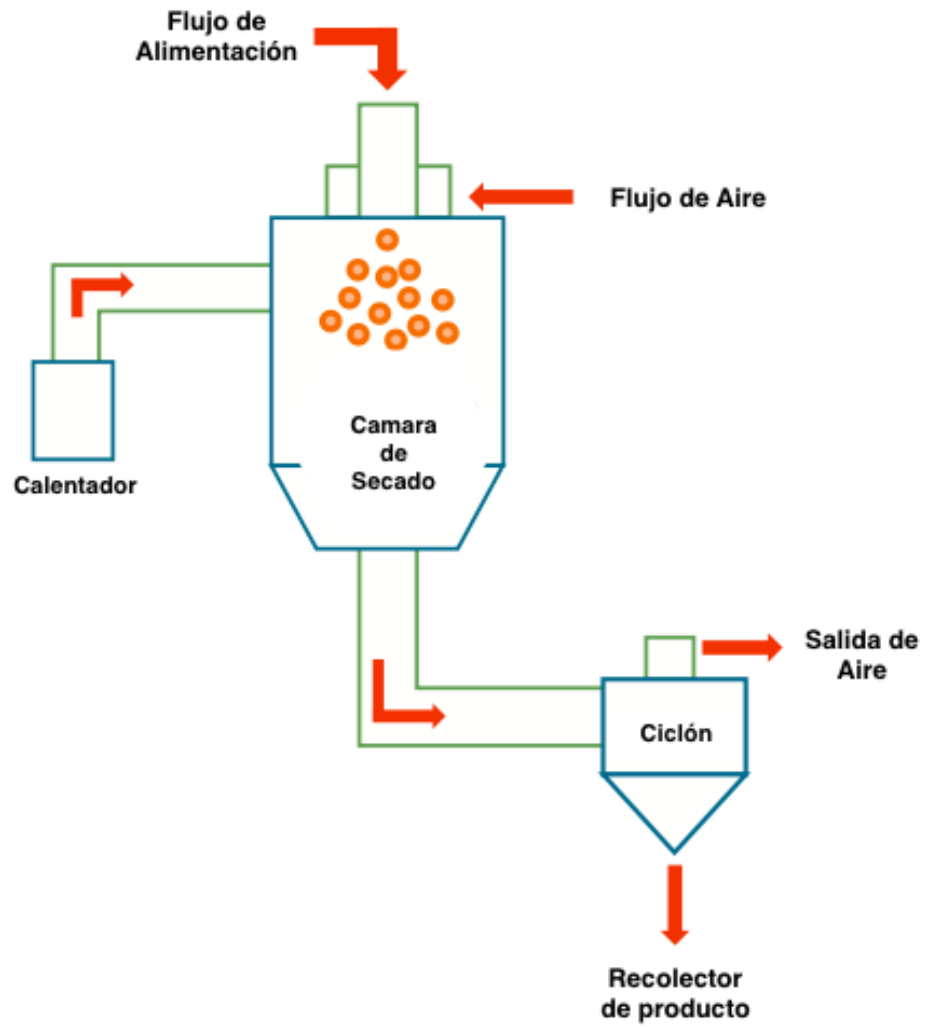
### **2.5.1 Protección de Compuestos Fenólicos Mediante la Generación de Micropartículas por el Método de Secado por Aspersión**

Uno de los métodos más utilizados para la generación de micropartículas en la industria de alimentos es el secado por aspersión, por su flexibilidad y rendimiento (Nedovic et al., 2011). Para este método es necesario tomar en consideración la emulsión formada entre el compuesto a inmovilizar y el material barrera así como las condiciones del aparato utilizado (Gadkari and Balaraman, 2015). En el proceso la emulsión es atomizada, resultando en la formación de gotas, estas son formadas utilizando una boquilla y la presión de un gas o bien un atomizador giratorio de alta velocidad. Una vez formadas las gotas son calentadas a altas temperaturas (>150°C) a través de un gas (aire o nitrógeno), a manera de que la fase líquida sea evaporada y se formen partículas secas. Las partículas resultantes son de un tamaño entre 10 y 100  $\mu\text{m}$  (Munin and Edwards-lévy, 2011). El método en conjunto con el material de inmovilización serán los determinantes en la calidad y características fisicoquímicas de las partículas formadas (Peres et al., 2011).

El diagrama del proceso de secado por aspersión se puede observar en la Figura 5. En la protección de compuestos fenólicos alrededor del 80-90% son inmovilizados por este método utilizando principalmente biopolímeros como materiales de barrera. El resto de compuestos fenólicos (20-30%) son inmovilizados utilizando otros métodos como liofilización, aspersión en frío y extrusión entre otros (Milanovic et al., 2010). Los polisacáridos utilizados en el secado por aspersión deben cumplir ciertas características, por ejemplo soportar las altas temperaturas (160-180 °C), ejemplo de ellos es la maltodextrina. Dicho polisacárido ha demostrado ser una defensa contra las altas temperaturas en la inmovilización de antocianinas (Calvo et al., 2010).

### **2.5.2 Maltodextrina como Material de Barrera en la Protección de Compuestos Fenólicos**

La elección del material barrera para la inmovilización es de gran importancia, ya que al ser añadidos a los alimentos estos no deben de presentar ninguna toxicidad para el cuerpo humano. A diferencia de la industria farmacéutica, donde en algunos casos son utilizados polímeros sintéticos (Augustin and Sanguansri, 2014), en la inmovilización de compuestos fenólicos en alimentos, los materiales de barrera más utilizados son los polisacáridos. E.g. EGCG ha reportado eficiencias de inmovilización de 85% en matrices de carbohidratos (Gadkari and Balaraman, 2015). Algunos de los polisacáridos, como los almidones, son utilizados como agentes inmovilizantes; entre ellos están amilopectina, dextrina, maltodextrina entre otros. Así mismo, son utilizados polisacáridos de fuentes animales, vegetales y microbiológicas como quitosano, goma arábica y la goma xantana (Nedovic et al., 2011). En un estudio realizado por Peres et al. (2011) demostraron que al utilizar una combinación de goma arábica y maltodextrina como materiales barrera en la inmovilización de EGCG por el método de secado por aspersión, fue capaz de conservar las propiedades y capacidad antioxidante de EGCG en un 95%.



**Figura 5.** Diagrama de secado por aspersión. Adaptado de Parisi et al. (2013)

La maltodextrina (MD) es un polisacárido obtenido de la hidrólisis del almidón, resultando en cadena de 2 a 20 monómeros de glucosa (Chronakis, 1998). La funcionalidad MD como material barrera se atribuye principalmente a su temperatura de transición vítrea (Tg), este polisacárido reporta una Tg de hasta 170 °C (Bhandari and Howes, 1999). El uso de MD ha reportado hasta un 75% de eficiencia en la pérdida de peso de compuestos fenólicos al ser sometido a temperaturas altas (>200°C). El efecto fue atribuido a que MD al ser combinado con otros compuestos aumenta la transición vítrea de ambos compuestos evitando la pérdida de peso (Pai et al., 2015).

### **3. HIPÓTESIS**

La incorporación de extracto de té verde en micropartículas de maltodextrina confiere estabilidad a las catequinas presentes, expuestas a diferentes temperaturas, cambios de pH y tiempos de almacenamiento a 25°C, conservando su conformación estructural y capacidad antioxidante.

## **4. OBJETIVOS**

### 4.1 Objetivo General

Evaluar la estabilidad, cambios conformacionales y capacidad antioxidante de catequinas presentes en extracto de té verde incorporado en micropartículas de maltodextrina ante cambios de temperatura, pH y tiempo de almacenamiento a 25 °C.

### 4.2 Objetivos Específicos

- Evaluar el perfil de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante presentes en extracto de té verde.
- Caracterizar la morfología, capacidad antioxidante y rendimiento de inmovilización de las micropartículas de extracto de té verde incorporado en maltodextrina.
- Analizar el efecto del aumento de temperatura en cambios conformacionales y capacidad antioxidante del extracto de té verde incorporado en micropartículas de maltodextrina.
- Determinar el efecto del aumento de pH en cambios conformacionales y capacidad antioxidante del extracto de té verde incorporado en micropartículas de maltodextrina almacenadas durante 60 días a 25 °C.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Selección de la Materia Prima

El té verde (*Camellia sinensis*) cultivado en la región de Fujian, China fue obtenido de un centro comercial de la ciudad de Hermosillo, Sonora. La maltodextrina se obtuvo de la casa comercial SERCO (MEX) con un valor de 20 equivalentes de dextrosa, grado alimenticio especificado por el fabricante.

### 5.2 Etapa I: Obtención y Caracterización del Extracto de Té Verde

#### 5.2.1 Obtención de Extracto de Té Verde.

Las hojas de té verde fueron molidas utilizando un procesador (Nutribullet<sup>®</sup>) y posteriormente tamizadas por mallas de 60 y 80 mesh, con la finalidad de obtener un tamaño de partícula menor a 400  $\mu\text{m}$ . Se obtuvieron tres diferentes extractos, obtenidos de la siguiente manera. Para la primera extracción, se colocó 1 g de muestra con 50 mL de etanol (25% v/v) en un agitador de baño de agua (LAB LINE 4682) a 120 rpm y temperatura de 26 °C durante 2.5 h. Después de la extracción se recogió el sobrenadante y se filtró doblemente a través de papel de filtro Whatman #1 y se aforó hasta 50 mL (Hu et al., 2016). Para la segunda extracción se utilizaron 8 g de té verde molido, extraídos con 100 mL de agua a 70 °C por 15 min en un agitador magnético. Posteriormente fue filtrado y los sólidos fueron resuspendidos bajo las condiciones mencionadas anteriormente.



Después de la segunda extracción se filtró doblemente utilizando papel Whatman #1, el sobrenadante fue aforado a 200 mL (Belščak-Cvitanović et al., 2015). En la tercera extracción se utilizó una muestra de 5 g de té verde molido suspendidos con 100 mL de agua destilada a temperatura ambiente (26 °C) durante 4 h, posteriormente se filtró dos veces a través de papel Whatman #1 y se aforó a 100 mL (Preciado, 2016). De las extracciones realizadas se eligió aquella que presentara un mayor contenido de fenoles y flavonoides totales, así como mayor capacidad antioxidante. Cada extracción se realizó por triplicado y se almacenó a -20 °C para análisis posteriores.

### **5.2.2 Identificación de Compuestos Fenólicos presentes en Extracto de Té Verde por UPLC-PDA**

La identificación de compuestos fenólicos del extracto de té verde se realizó por cromatografía líquida de ultra resolución con un detector de arreglo de fotodiodos (UPLC-PDA) a 280 nm. Se utilizó un equipo ACQUITY, clase H, de la marca Waters™, EUA. Equipado con un horno de columna (60 °C), muestreador automático con flujo de 0.4 mL/min y una inyección de 1 µL. Acoplado con una columna BEH C18™, de dimensiones 3.0 mm × 100 mm. Se empleó un gradiente de agua y ácido fórmico al 0.5% (Fase A) y metanol 100% (Fase B). El tiempo de corrida fue de 30 min y todas las muestras fueron filtradas con acrodiscos de 0.22 µm previo a la inyección. La identificación se realizó por la comparación de espectros UV, utilizando una base de datos previamente realizada con sustancias de referencia. Para la cuantificación se utilizaron curvas estándar de los compuestos correspondientes, los datos se reportaron como mg del compuesto/g de peso seco.

### **5.2.3 Contenido de Compuestos Fenólicos Totales**

El contenido de fenoles totales de cada muestra se determinó de acuerdo al método Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965) con algunas modificaciones. Las mediciones se realizaron por triplicado en un lector de microplacas (FLUOSTAR OMEGA, BMG LABTECH). Se agregaron 75  $\mu\text{L}$  de Folin [1:10], 15  $\mu\text{L}$  de la muestra y 60  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 7.5%, cada muestra se realizó por triplicado. Después se dejó reposar en la oscuridad durante 30 min. La lectura fue tomada a una longitud de onda de 765 nm. Los resultados fueron cuantificados a partir de una curva de calibración de ácido gálico y reportados como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto en peso seco (mg EAG/g p.s).

### **5.2.4 Contenidos de Flavonoides Totales**

La determinación de flavonoides totales se realizó por el método descrito por Zhishen et al. (1999), con algunas modificaciones. Se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de la muestra, 430  $\mu\text{L}$  de la solución A (1.8 mL de  $\text{NaNO}_2$  al 5% con 24 mL de agua destilada) y se dejaron reposar durante 5 min. Posteriormente se adicionaron 30  $\mu\text{L}$  de  $\text{AlCl}_3$  al 10% y se dejó en reposo por 1 min. Después se agregaron 440  $\mu\text{L}$  de la solución B (12 mL de  $\text{NaOH}$  1M con 14.4 mL de agua destilada). De esta reacción se tomaron 150  $\mu\text{L}$  por triplicado y fueron colocados en el lector de microplacas (FLUOSTAR OMEGA, BMG LABTECH), la medición de las muestras se determinó a una longitud de onda de 496 nm. La absorbancia se comparó con una curva estándar de catequina. Los resultados fueron expresados como mg de equivalentes de catequina por gramo de extracto en peso seco (mg EC/g p.s). La determinación se realizó por triplicado.

### **5.2.5 Capacidad Antioxidante por la Prueba de Inhibición del Radical DPPH<sup>•</sup>**

En este método se midió la capacidad del extracto para inactivar al radical estable DPPH<sup>•</sup>. Se preparó el radical DPPH diluyendo 1.97 mg del DPPH en 50 mL de metanol puro y se ajustó a una absorbancia de 0.7. Se agregaron 140  $\mu$ L del radical ajustado y 10  $\mu$ L del extracto. La determinación se realizó por triplicado. Se dejó reposar 30 min en oscuridad y se leyó en un lector de microplacas a 518 nm (FLUOSTAR OMEGA, BMG LABTECH). Se elaboró una curva estándar con Trolox y los resultados se expresaron en micromoles de equivalentes trolox por gramo de extracto en peso seco ( $\mu$ mol ET/g p.s) (Robles-Sánchez et al., 2009).

### **5.2.6 Capacidad Antioxidante por la Prueba de Inhibición del Radical ABTS<sup>•+</sup>**

Este método se basa en la capacidad de los antioxidantes para inactivar el radical ABTS<sup>•+</sup>. Se pesaron 19.3 mg de ABTS y se disolvieron en 5 mL de agua destilada. Además se agregaron 37.8 mg de K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> en 1 mL de agua destilada; 88  $\mu$ L de esta solución se adicionaron a la solución de 5 mL de ABTS. Esta mezcla se dejó reposar en la oscuridad y a temperatura ambiente durante 16 h. Después se agregaron 0.5 mL de este radical en 35 mL de etanol puro, ajustándose a la absorbancia de 0.7 y se realizó la lectura a una longitud de onda de 754 nm. Posteriormente en una microplaca se añadieron 245  $\mu$ L del radical ajustado y 5  $\mu$ L de la muestra. Cada muestra se realizó por triplicado. Se dejó reposar en la oscuridad por 5 min y se leyó la densidad óptica de las muestras a 754 nm (FLUOSTAR OMEGA, BMG LABTECH). Los resultados se reportaron en micromoles de equivalentes trolox por gramo de extracto en peso seco ( $\mu$ mol ET/g p.s) (Re et al., 1999).

### **5.2.7 Análisis Estadístico**

Se realizó un diseño completamente al azar donde el factor fue el tipo de extracción (acuosa, etanólica; acuosa de dos etapas) y las variables respuesta el contenido de fenoles totales, contenido de flavonoides totales y capacidad antioxidante. Se realizó una comparación de media por Tukey Kramer al 95% de confiabilidad para encontrar las diferencias en los tres métodos de extracción. Los datos fueron analizados utilizando el programa NCSS versión 2011.

## 5.3 Etapa II: Obtención y Caracterización del Extracto de Té Verde Inmovilizado en Micropartículas de Maltodextrina

### **5.3.1 Inmovilización de Extracto de Té Verde y Maltodextrina**

Para la incorporación de extracto de té verde en micropartículas de maltodextrina se realizaron dos soluciones utilizando el método de extracción acuosa de dos etapas. La primera solución se preparó a partir de extracto de té verde acuoso al 4% p/v y 40% p/v de maltodextrina. La mezcla fue homogenizada por una hora a 1200 rpm en un agitador magnético (VWR<sup>®</sup>). Para el segundo tratamiento se preparó una solución a partir de extracto de té verde al 6% p/v y 25% p/v de maltodextrina. La mezcla fue homogenizada por una hora a 1200 rpm en un agitador magnético. Posteriormente las soluciones fueron inmovilizadas utilizando el método de secado por aspersion utilizando un secador escala laboratorio de la marca Yamato (Modelo ADL311).

La temperatura de aire de entrada fue de 140 y 150 °C respectivamente para las soluciones, una temperatura de aire de salida de  $60 \pm 2$  °C para ambas soluciones y un flujo de alimentación de 5.5 mL/min para ambas soluciones. Este proceso se realizó siguiendo una metodología combinada adaptada de Peres et al. (2011) y Pasrija et al. (2015). La eficiencia de inmovilización fue obtenida, a través de la ecuación = (Contenido de compuestos EGCG en polvo / Contenido de EGCG en solución) x 100, y los datos fueron expresados en porcentaje.

Para la extracción de los compuestos fenólicos en las micropartículas se siguió la metodología descrita por Nunes et al. (2016); donde 200 mg de muestra fueron disueltos en 1 mL de una solución etanol:ácido acético:agua (50:2:48); para asegurar la solubilidad completa de las micropartículas se agitó durante 1 min en vortex, posteriormente fueron sonicadas por 40 min y centrifugadas a 11600 rpm por 10 min. A los sobrenadantes recolectados se les realizaron análisis para conocer el contenido de fenoles y flavonoides totales, así como capacidad antioxidante por DPPH y ABTS. Para dichos análisis se aplicará la metodología descrita anteriormente en la caracterización del extracto de té verde.

### **5.3.2 Morfología**

La morfología de las micropartículas de extracto de té verde y maltodextrina secadas por aspersion fueron examinadas por medio de un microscopio electrónico de barrido (SEM) marca JEOL (modelo JSM-5410LV). Las muestras en estado sólido, se fijaron previamente en un trozo de latón con cinta adhesiva de doble cara. Posteriormente se recubrieron con una capa delgada de oro en vacío para ser eléctricamente conductivas. Se tomaron microfotografías a un voltaje de excitación de 20 kV (Peres et al., 2011).

Las mediciones del tamaño de partícula se realizaron mediante dispersión de luz (DLS) a 25 °C en un equipo Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Ltd, UK), por triplicado, para ello las cápsulas se suspendieron en agua milliQ y se agitaron ligeramente con el fin de esparcirlas sin que se disolvieran, los resultados se expresaron en  $\mu\text{m}$ . De la misma forma se determinó el potencial zeta el cual brinda información sobre la estabilidad de la partículas en suspensión debido a las cargas adquiridas, entre mayor sean estas cargas más resistencia a la aglomeración tendrán las partículas, los datos fueron expresados como mV.

### **5.3.3 Espectroscopia de Infrarrojo**

Se realizaron pruebas de espectroscopia de infrarrojo (IR) de las micropartículas obtenidas y el extracto de té verde libre con el propósito de identificar interacciones entre los compuestos utilizados Se analizaron empleando un FT-IR (Nicolet Protegé 460). Los espectros fueron medidos en un rango de frecuencias entre 4000 y 450  $\text{cm}^{-1}$  con una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$  y 64 escaneos a una velocidad de 0.63.

### **5.4.2 Análisis Estadístico**

Para esta etapa se realizó un diseño completamente al azar, los factores fueron las combinaciones de maltodextrina y té verde y las variables respuesta: la pérdida de compuestos fenólicos, cambios conformacionales y capacidad antioxidante.

Se realizó un ANOVA y una comparación de medias por Tukey Kramer con un 95 % de confiabilidad, los datos obtenidos fueron analizados en el programa NCSS versión 2011.

## 5.4 Etapa III: Estabilidad Térmica de Extracto de Té Verde Incorporado en Micropartículas de Maltodextrina

### 5.4.1 Análisis Termogravimétrico (TGA) y Calorimétrico (CDB)

Los cambios de peso de los tratamientos se midieron por análisis de termogravimetría (TGA) de la marca Perkin Elmer modelo TGA-7. Se utilizaron aproximadamente 20 mg de muestra por ensayo, los cuales fueron introducidos en un crisol de alúmina y se calentaron a una velocidad de 10 °C / min desde 50 a 500 °C. Se utilizó aire como gas de purga con caudal de 100 mL/min (García-Sotelo, 2014), los datos fueron expresados como pérdida de peso y su derivada. La Calorimetría Diferencial de Barrido es utilizada para medir la capacidad de calentamiento de las moléculas de interés es un método para medir directamente el cambio de estado de la muestra. El análisis térmico de las muestras se realizó utilizando calorimetría diferencial de barrido (CDB) de la marca Perkin Elmer (DSC 8500), se colocaron 5 mg de cada muestra en una bandeja de aluminio cerrada herméticamente. Las muestras fueron calentadas desde 25 a 400 °C a una velocidad de 10 °C/ min después se equilibraron a 25 °C durante 10 min. Finalmente fueron purgadas con una corriente de flujo de nitrógeno de 25 mL/min (Pai et al., 2015).

## 5.5 Etapa IV: Estabilidad de Extracto de Té Verde Incorporado en Micropartículas de Maltodextrina Almacenado por 60 Días a 25 °C

### 5.5.1 Ensayo de Almacenamiento a 25 °C

Para este ensayo se pesaron 200 mg (polvos extracto de té verde libre e inmovilizado) de muestra en eppendorfs ámbar de 2 mL, por cada día de muestreo (7, 15, 30, 45, 60) seguidamente fueron almacenados a 25 °C. Finalizado el periodo de almacenamiento se realizó la extracción de compuestos fenólicos de las micropartículas. Los sobrenadantes fueron almacenados a -20 °C para análisis posteriores de contenido de fenoles totales, flavonoides totales y capacidad antioxidante por DPPH y ABTS. Cada muestra se realizó por triplicado y los compuestos fueron identificados por UPLC-PDA con la metodología indicada en la sección anterior.

### 5.5.2 Análisis Estadístico

Para esta etapa se realizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial AxB, donde los factores fueron: A: Extracto libre e inmovilizado; B: tiempo de almacenamiento (0, 7, 15, 30, 45, 60) Y las variables respuesta: la pérdida de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante. Se realizó un ANOVA y comparación de medias por Tukey Kramer con un 95% de confiabilidad, los datos obtenidos fueron analizados en el programa NCSS versión 2011.



## 5.6 Etapa V: Estabilidad de Extracto de Té Verde Incorporado en Micropartículas de Maltodextrina a pH 6 y 7 Almacenado por 30 Días a 25 °C

### 5.6.1 A pH 6 y 7

Para este ensayo se siguió la metodología descrita por Li et al. (2012) con algunas modificaciones. Se pesaron 200 mg de la muestra en eppendorfs ámbar de 2 mL y se añadió 1 mL de agua ajustada a pH 6 y 7. Seguidamente fueron almacenadas a 25 °C en la oscuridad y cerrados herméticamente. Finalizado el periodo de almacenamiento se realizó la extracción de compuestos fenólicos de las micropartículas. Los sobrenadantes fueron almacenados a -20 °C para análisis posteriores. Los análisis realizados fueron: contenido de fenoles totales, flavonoides totales, capacidad antioxidante e identificación por UPLC-PDA, cada muestra se realizó por triplicado.

### 5.6.2 Análisis Estadístico

Para esta etapa se realizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial AxBxC, donde los factores son A) Extracto libre e inmovilizado; B) Tiempo de almacenamiento (2, 4, 6, 10, 20 y 30 días); C) pH 6 y 7. Las variables respuesta son la pérdida de compuestos fenólicos, y capacidad antioxidante. Se realizó un ANOVA y comparación de medias por Tukey Kramer con un 95% de confiabilidad, así como correlaciones entre los compuestos identificados y las variables de respuesta. Los datos obtenidos fueron analizados en el programa NCSS versión 2011.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Etapa I: Obtención y Caracterización del Extracto de Té Verde

Dado que la extracción es un paso clave para la utilización integral de los componentes del té, se evaluaron los diferentes tratamientos mencionados anteriormente. Los valores de contenido fenólico total y flavonoides totales se muestran en el Cuadro 3. El mayor contenido de ambos parámetros se obtuvieron usando agua caliente a 70 °C durante 30 min (Acuoso 70 °C) en comparación con el extracto obtenido a 26 °C x 4 horas (Acuoso 26 °C), donde los valores de fenoles y flavonoides totales fueron un 61% y 32% menores

Este resultado puede atribuirse al aumento de la polaridad de las catequinas en el agua caliente, ya que el uso de etanol al 50% (etanólico) no mostró diferencias en cuanto a la extracción de dos etapas y temperatura de 70 °C. Estudios previos confirman que las temperaturas óptimas de extracción con agua caliente son alrededor de 80 °C; sin embargo, se recomiendan temperaturas por debajo de los 100 °C para evitar la epimerización de las catequinas (Row and Jin, 2006; Vuong et al., 2011).

De igual manera, se reportan valores similares a los obtenidos en este estudio para el contenido de fenoles totales en extractos acuosos de diferentes variedades de té verde, obteniendo valores entre 57.91 y 179.48 mg EAG/g p.s, con un promedio de 168.9 mg EAG/g p.s. (Jin et al., 2016). Se sabe que la variedad, la región de cosecha y las condiciones de procesamiento desempeñan un papel importante en el contenido final de compuestos fenólicos que se pueden encontrar en la composición del té verde (Botten et al., 2015).

**Cuadro 3.** Contenido de fenoles y flavonoides totales de los diferentes métodos de extracción.

<b>Extracto</b>	<b>Fenoles totales</b> ( mg EAG/g p.s.)	<b>Flavonoides totales</b> (mg EC/ g p.s)
<b>Acuoso 70 °C</b>	125.69 ± 21.50 <sup>a</sup>	60.28 ± 3.14 <sup>a</sup>
<b>Acuoso 26 °C</b>	60.43 ± 17.00 <sup>b</sup>	37.80 ± 0.52 <sup>b</sup>
<b>Etanólico</b>	105.37 ± 21.00 <sup>c</sup>	53.93 ± 1.13 <sup>a</sup>

Cabe agregar que el uso de solventes como el etanol puede ayudar en una mayor extracción de catequinas, lo cual puede corroborarse en el estudio reportado por Hu et al. (2016); sin embargo, en este estudio los resultados muestran que es posible obtener un extracto similar en contenido de fenoles totales utilizando agua a 70 °C como solvente. Para determinar el impacto de múltiples etapas de extracción en el contenido de fenoles y flavonoides totales, en comparación con un único paso, se aplicaron todas las condiciones de extracción óptimas anteriores. Los resultados mostraron que un mayor rendimiento se obtuvo cuando el té verde se extrajo con múltiples pasos en comparación con una sola etapa de extracción. Por lo tanto, al extraer la misma muestra de té verde dos veces con 100 mL de agua, la concentración de flavonoides en la solución de extracción fue mayor (63.28 mg EC/g p.s) que con una sola extracción en ambos tipos acuoso y etanólico (38.66 y 57.33 mg EC/g p.s., respectivamente).

Por otra parte, la interacción entre el tiempo y temperatura de extracción, encontrándose que influyen directamente en el contenido de fenoles y flavonoides totales que se pueden extraer. El extracto sometido a temperatura de 70 °C por 15 min presentó un mayor contenido de fenoles y flavonoides totales comparado con aquellos extractos obtenidos a temperatura ambiente. Los resultados de este estudio son similares a los resultados obtenidos por Perva-Uzunalić et al. (2006), donde observaron que los extractos acuosos sometidos a tiempos más largos de hasta 120 min presentaban un menor contenido de fenoles con respecto a aquellos sometidos a tiempos más cortos. De igual manera Vuong et al. (2011) evaluaron el rendimiento de extracción de EGCG, mostrando que la aplicación de 25 °C durante 30 min únicamente extraía el 12% de dicho compuesto.

Los resultados de la inhibición DPPH y ABTS se muestran en el Cuadro 4. El extracto acuoso 1 presentó mayor capacidad antioxidante (685.08  $\mu\text{mol ET/g p.s}$  2771.69  $\mu\text{mol ET/g p.s}$ . para DPPH y ABTS respectivamente) en comparación con los otros métodos de extracción evaluados en este estudio. Los valores obtenidos en este estudio son mayores a los resultados reportados por Gerolis et al. (2017), donde obtuvieron valores de DPPH y ABTS de 280  $\mu\text{m ET/g p.s}$  y 259.25  $\mu\text{m ET/g p.s}$ ., respectivamente, por el método de infusión.

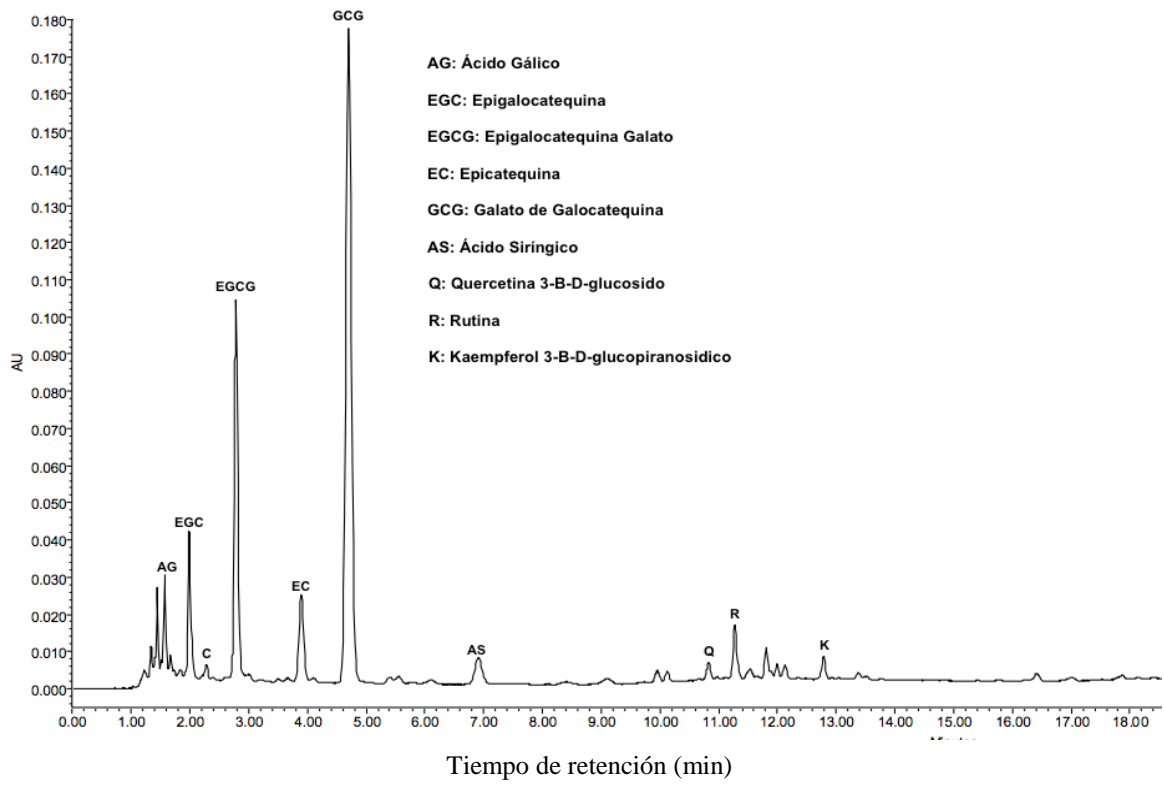
**Cuadro 4.** Capacidad Antioxidante de las diferentes técnicas de extracción.

<b>Extracto</b>	<b>DPPH</b> ( $\mu\text{m ET/ g p.s}$ )	<b>ABTS</b> ( $\mu\text{m ET/ g p.s}$ )
<b>Acuoso 70 °C</b>	685.08 $\pm$ 110.58 <sup>a</sup>	2771.69 $\pm$ 303.81 <sup>a</sup>
<b>Acuoso 26 °C</b>	280.21 $\pm$ 48.99 <sup>b</sup>	2274.29 $\pm$ 171.73 <sup>b</sup>
<b>Etanólico</b>	341.92 $\pm$ 141.37 <sup>b</sup>	1420.67 $\pm$ 140.13 <sup>c</sup>

Datos representados como media  $\pm$  desviación estándar. Cada valor representa la media de tres repeticiones. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

Los resultados obtenidos en este estudio son similares con los valores reportados por Komes et al. (2010), aplicando un tiempo más corto y un rango de temperatura entre 60 °C y 80 °C durante un tiempo de 3 a 30 min. Los métodos de extracción de compuestos fenólicos del té han sido ampliamente estudiados, sin embargo, aún no se ha determinado realmente cual es la más efectiva. Esto se debe principalmente a la composición química de las hojas de té utilizadas, ya que como se mencionó anteriormente, existen muchos factores que pueden afectar el contenido de las moléculas de interés. Por los resultados obtenidos en cuanto contenido de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante de la materia prima seleccionada se decidió utilizar el extracto acuoso con agua a 70 °C para su inmovilización. Debido a que la extracción se lleva a cabo con agua el costo de extracción es de menor en comparación con la extracción con solventes. Además del tiempo de extracción el cual es en promedio dos veces menor que el tiempo requerido en las otras extracciones evaluadas.

Los compuestos identificados en el extracto de té verde acuoso a 70 °C son mostrados en la Figura 6, los cuales fueron ácido gálico (2.82 %), epigallocatequina (5.76 %), catequina (0.5 %) galato de epigallocatequina (19.74 %), epicatequina (6.32 %), galato de galocatequina (58.08 %), ácido siríngico (2.84 %), rutina (0.92 %), quercetina 3 glucuronido (3.02 %) y kaempferol (%). Los compuestos identificados son similares a los reportados en la literatura a través de cromatografías de alta y ultra resolución (Jing et al., 2017; Tao et al., 2016; Zhao et al., 2011). Se puede observar de igual manera que se encontraron todas las catequinas tanto las epi como no epi, de igual manera se observa que se encontró una mayor concentración de GCG en comparación con EGCG. Cabe mencionar que compuestos como la miricetina, cafeína y teobromina no fueron identificados en el extracto acuoso. Este resultado se utilizará para contrastar con los compuestos y porcentajes encontrados después del proceso de inmovilización.



**Figura 6.** Compuestos identificados por UPLC-PDA en extracto de té verde acuoso a 70 °C

## 6.2 Etapa II: Obtención y Caracterización de Extracto de Té Verde Incorporado en Micropartículas de Maltodextrina

### 6.2.1 Contenido de Fenoles Totales, Flavonoides Totales y Capacidad Antioxidante

Para evaluar la influencia de la concentración de maltodextrina en el contenido de fenoles y flavonoides totales se evaluaron diferentes mezclas de maltodextrina y té verde. Las cuales fueron 25:6 y 40:4 % (maltodextrina : extracto de té verde) en relación peso/volumen. Los valores obtenidos de estas combinaciones se muestran en el Cuadro 5, donde podemos observar que el contenido de fenoles totales para los tratamientos 25 % MD + 6 % ETV y 45 % MD + 4 % ETV fueron de 11.48 y 5.01 mg EAG/g p.s respectivamente. Estos valores son menores a los reportados por Tengse et al. (2016) estos autores realizaron un estudio donde optimizaron las condiciones de secado por aspersión para extracto de té verde y maltodextrina a diferentes concentraciones, ellos obtuvieron valores entre 33.48 y 58.19 mg EAG/ g p.s.

Del estudio anterior los autores pudieron concluir que la concentración del extracto de té verde tiene un impacto mayor en el contenido de fenoles totales que el impacto generado por la concentración de maltodextrina. No obstante las concentraciones utilizadas de los materiales de barrera tienen un efecto en el contenido de fenoles y flavonoides obtenidos. Lo cual se demuestra en este estudio, ya que el tratamiento donde se utilizó un 25% de maltodextrina fue superior en un 56% en el contenido de fenoles totales en comparación con el tratamiento en el cual se utilizó 40% de maltodextrina.



**Cuadro 5.** Contenido de fenoles, flavonoides totales y capacidad antioxidante en micropartículas de maltodextrina y extracto de té verde

<b>Muestra</b>	<b>Fenoles totales</b> (mg EAG/g p.s.)	<b>Flavonoides totales</b> (mg EC/g p.s.)	<b>ABTS</b> ( $\mu$ mol ET/ g p.s)	<b>DPPH</b> ( $\mu$ mol ET/ g p.s)
<b>25 % MD + 6 % ETV</b>	11.48 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	5.87 $\pm$ 0.006 <sup>a</sup>	211.54 $\pm$ 15.4 <sup>a</sup>	81.76 $\pm$ 8.8 <sup>a</sup>
<b>40 % MD + 4 % ETV</b>	5.01 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>	4.72 $\pm$ 0.33 <sup>b</sup>	90.47 $\pm$ 17.2 <sup>b</sup>	38.29 $\pm$ 6.3 <sup>b</sup>

Datos representados como media  $\pm$  desviación estándar. Cada valor representa la media de tres repeticiones. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (P<0.05).

MD: maltodextrina; ETV: extracto de té verde

Se ha reportado que el uso de maltodextrina para la inmovilización de extracto de té verde son óptimos al utilizar rangos entre 7 y 25 %, donde se han obtenido valores entre 14.78 y 20.37 mg/ EAG g p.s al usar una concentración máxima del 7% de maltodextrina (Susantikarn and Donlao, 2016). Los valores de capacidad antioxidante por inhibición del radical ABTS y DPPH se muestran en el Cuadro 5. La capacidad antioxidante de 25 % MD + 6 % ETV fue dos veces mayor en comparación con el tratamiento 45 % MD + 6 % ETV en la inhibición de ambos radicales. Los resultados se pueden atribuir principalmente a que un menor contenido de material de barrera propicia a una mayor disponibilidad de los compuestos fenólicos.

Esto concuerda con la inferencia realizada en el apartado anterior, donde un menor contenido de maltodextrina es mejor para la inmovilización de compuestos fenólicos. Este comportamiento se ha visto de igual manera en el uso de otros materiales de barrera, como la gelatina donde las concentraciones por arriba de 2 mg/mL son menos efectivas que aquellas donde se utilizan entre 1 y 0.5 mg/ mL (Y. C. Chen et al., 2010). En este contexto cabe agregar que la capacidad antioxidante de los extractos inmovilizados es mucho menor que los valores presentes en el extracto libre. Esto se debe principalmente al proceso térmico del secado por aspersion el cual afecta compuestos fenólicos, así como las proporciones utilizadas (Pasrija et al., 2015; Routray and Orsat, 2012). A partir de los resultados se seleccionó el tratamiento MD 25 para las etapas siguientes por tener un mayor contenido de fenoles y flavonoides totales así como una mayor capacidad antioxidante.

### **6.2.2 Identificación de Compuestos Fenólicos**

Mediante la identificación por UPLC-PDA (Cuadro 6) se observa que los compuestos identificados fueron los mismos encontrados en el extracto acuoso utilizado para la inmovilización. Como era de esperarse, el uso de temperaturas mayores a los 80 °C favorecería la epimerización, sin embargo, esta afectó únicamente la proporción de

**Cuadro 6.** Compuestos identificados por UPLC-PDA en extracto de té verde libre e inmovilizado en micropartículas de maltodextrina.

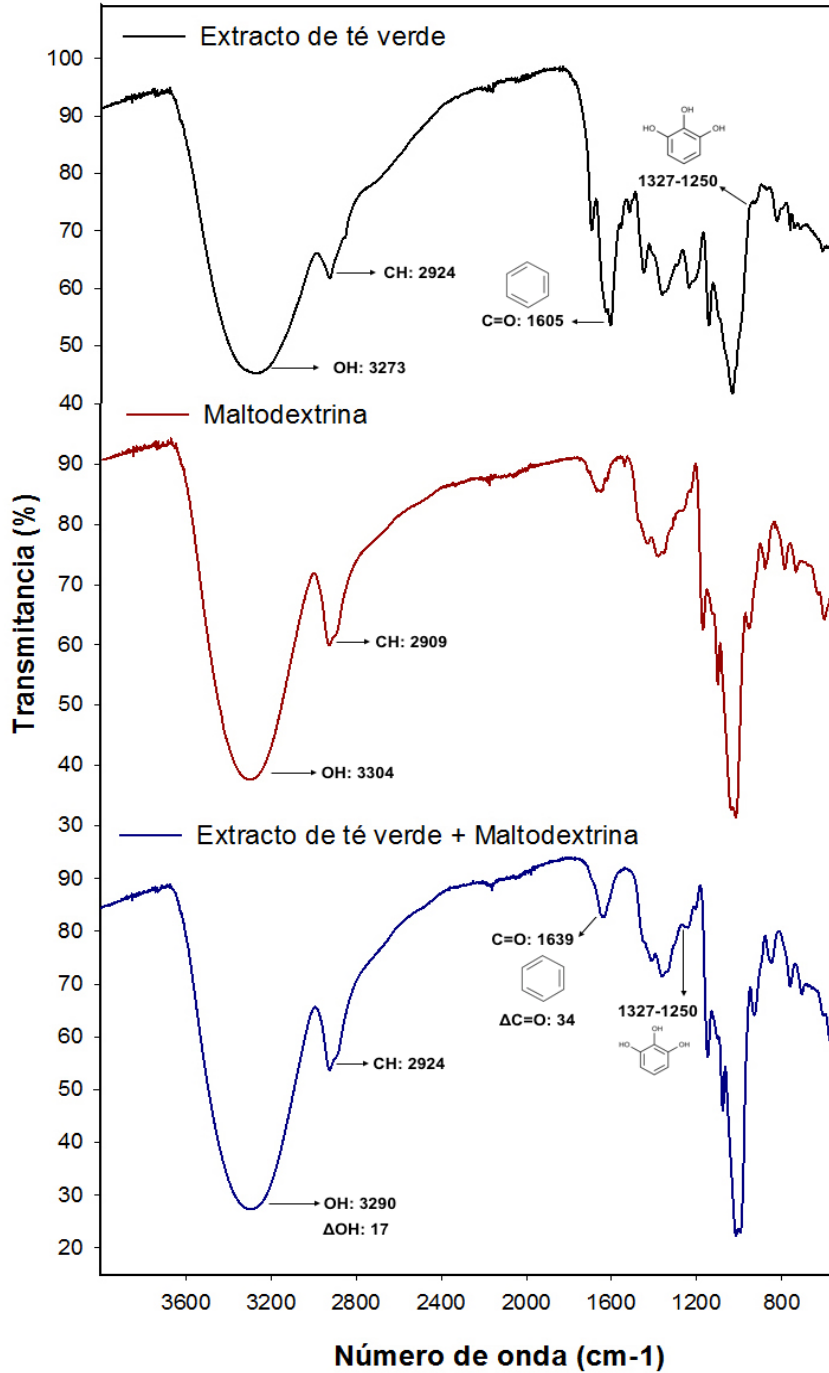
<b>Compuesto</b>	<b>Libre (%)</b>	<b>Inmovilizado (%)</b>
Ácido Gálico	2.8	2.3
Epigalocatequina	5.8	4.5
Catequina	0.5	0.2
Epigalocatequina Galato	19.7	28.5
Epicatequina	6.3	4.8
Galocatequina Galato	58.1	46.4
Ácido Siríntrico	2.8	8.1
Quercetina $\beta$ -D Glucosido	0.9	1.0
Rutina	3.0	3.1
Kaempferol $\beta$ -D Glucopiranosido	1.1	1.1

EGC y EC. En cuanto al contenido de EGCG y GCG se encontró un 28.54 y 46.44 % respectivamente en el extracto de té verde incorporado en micropartículas de maltodextrina. Estos valores fueron mayores a los encontrados en el extracto acuoso el cual contenía un 25.38 % y 48.63 % para EGCG y GCG respectivamente en el extracto de libre. De estos resultados obtenidos en la identificación podemos decir que las condiciones utilizadas permitieron una protección de los compuestos de interés. Ya que la proporción de la mayoría de compuestos y especialmente los de mayor interés EGCG y GCG se mantuvieron muy similares de acuerdo a la identificación

Del proceso de secado por aspersión se pudo obtener un porcentaje de eficiencia de inmovilización de EGCG del 63 %. Este valor es menor al reportado por Peres et al. (2011) dichos autores obtuvieron un 92 % de eficiencia de encapsulación de EGCG utilizando secado por aspersión y maltodextrina como material de barrera. Si bien la eficiencia de encapsulación es menor a la reportada por dichos autores, este valor es mayor a otros reportados en otros polímeros. Reportes muestran eficiencias de encapsulación de EGCG de 30 % de inmovilización de té blanco en policaprolactona (Sanna et al., 2015). De igual manera se han reportado eficiencias de inmovilización menores utilizando biopolímeros como goma guar y goma xantana presentando valores de 27 y 28 % respectivamente (Belščak-Cvitanović et al., 2015).

### **6.2.3 Espectroscopia de Infrarrojo (FT-IR)**

En la Figura 7 se muestran los espectros de infrarrojo del extracto de té verde secado por aspersión, la maltodextrina y el extracto de té verde inmovilizado en micropartículas de maltodextrina. Como se puede observar el FTIR del extracto de té verde muestra las bandas características, alrededor de los  $3300\text{ cm}^{-1}$  se encuentra el estiramiento en el grupo O-H; el pico en la banda de los 2900 corresponde a la vibración en el enlace C-H; y en los 1600 a la vibración del enlace C=O (Szymczycha-Madeja et al., 2013).



**Figura 7.** Espectro FT-IR del extracto de té verde, maltodextrina y extracto de té verde incorporado en micropartículas de maltodextrina donde se muestran interacciones entre los grupos O-H y C=O de la maltodextrina y los compuestos fenólicos del extracto de té verde.

Cabe mencionar que la banda correspondiente a las micropartículas presenta un desfase en la banda de absorción correspondiente al estiramiento del grupo O- H ( $\Delta OH= 17$ ) hacia frecuencias más altas (efecto hipsocrómico). La señal de mayor interés es la correspondiente al grupo O-H, ya que el cambio en este grupo está relacionado directamente con cambios en las propiedades de barrera. Es importante mencionar que los cambios en la frecuencia y la forma de la señal en los espectros de absorción están relacionados con interacciones entre los componentes (Kazarian et al., 1996). Algunos de estos cambios están dados por interacciones intermoleculares como los puentes de hidrógeno, la teoría para explicar esta formación de puentes de hidrógeno se puede explicar a través de la Ley de Planck. Esta se relaciona con la energía vibracional del enlace causado por la incidencia del haz infrarrojo y al darse un desfase en la frecuencia de la señal de los grupos O-H del té verde y la maltodextrina.

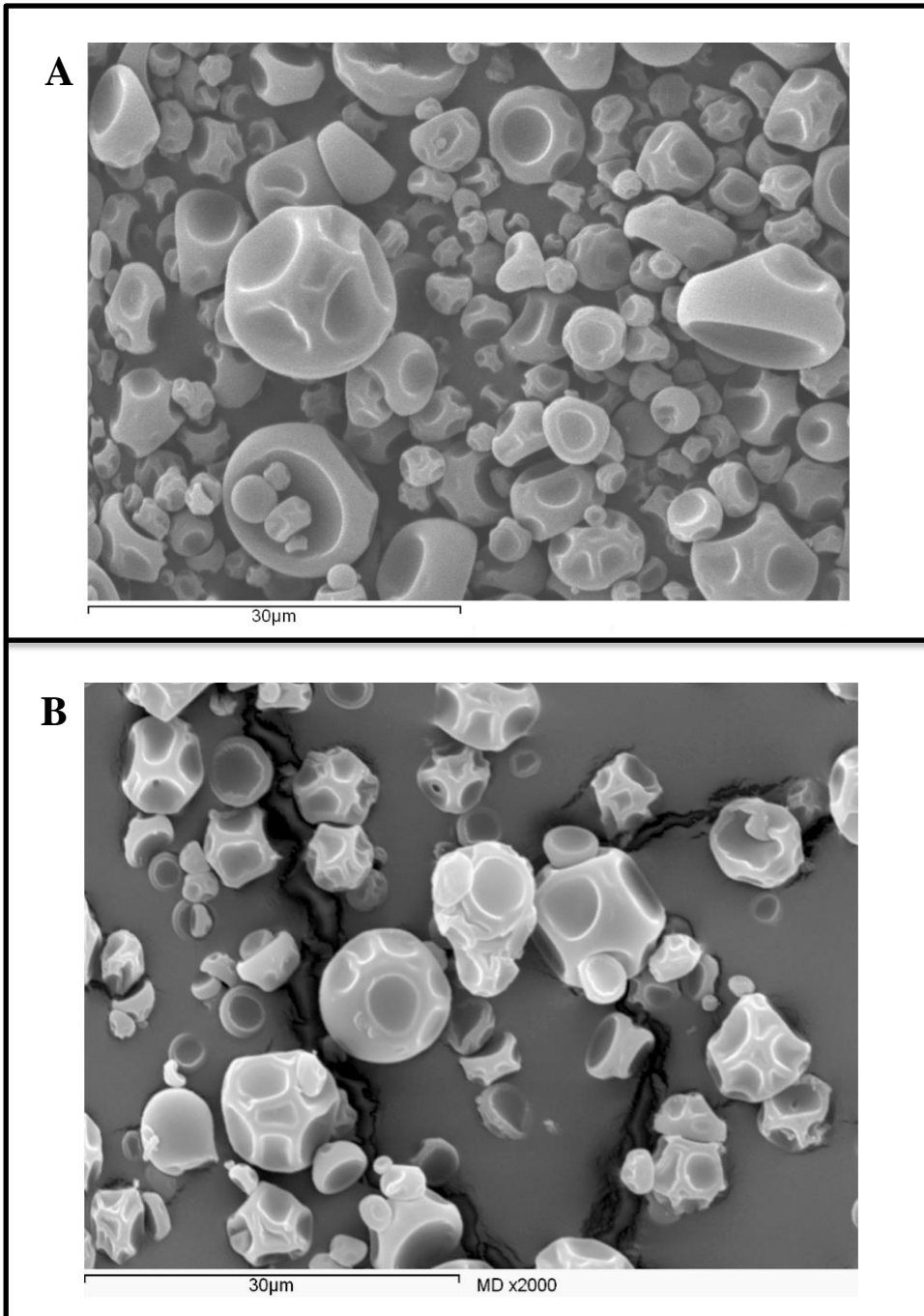
Un puente de hidrógeno es la interacción entre un átomo de hidrógeno con carga parcialmente y un átomo de oxígeno con carga electronegativa. Debido a la naturaleza de los compuestos que son moléculas con abundantes grupos hidroxilo se asume que estos grupos están siendo compartidos formando dichas interacciones. Por otra parte, también podemos observar que en las bandas alrededor de los 1600 se observan picos que corresponden a los dobles enlaces. Los cuales por la naturaleza de las moléculas están asociados a los enlaces que unen los anillos aromáticos del extracto de té verde. Si bien el pico no es de gran intensidad en la micropartículas, este puede estar asociado por la concentración en la que se encuentra el extracto de té verde en relación con la maltodextrina. Donde el contenido de maltodextrina es 5 veces mayor que la del extracto de té verde.

Otras bandas asociadas con los compuestos del extracto de té verde se observan en la región de los 1300 y 1200, donde los picos observados en esta región son atribuidos a la unión de OH en la posición R1 de la molécula de catequina. Esta unión es específica del grupo OH hace referencia a la formación del grupo pirogalol, el cual da lugar a la formación de compuestos como epigalocatequina, galocatequina. Así como puede ser un precursor para la formación de otras catequinas polimerizadas como epigalocatequina galato y galocatequina galato.

#### 6.2.4 Caracterización y Morfología

El análisis de morfología de las micropartículas de maltodextrina cargadas con extracto de té verde fue realizado por microscopia electrónica de barrido (SEM). Las micropartículas mostraron un rango de tamaño menor a los  $26 \pm 1.12 \mu\text{m}$  y una estructura semiesférica dentada (Figura 8). Dicha estructura es atribuida principalmente al material de inmovilización, en el caso particular de los polisacáridos, se ha reportado que en el secado por aspersión las micropartículas tienden a presentar hendiduras (Peres et al. 2011). Por otra parte las condiciones de secado, específicamente la temperatura y el flujo de alimentación utilizados en el proceso de evaporación de la solución influyen directamente sobre la estructura de las micropartículas. Si la tasa de evaporación es baja, las partículas tardaran más tiempo en alcanzar una concentración crítica, por lo tanto se obtendrán partículas dentadas (Vehring, 2008). En un estudio realizado por Fu et al. (2011) reportaron que utilizando temperaturas entre 90 y 130 °C en la inmovilización de EGCG por secado por aspersión, las micropartículas oscilaban entre los 20 y 40  $\mu\text{m}$ .

Estos reportes coinciden con los resultados obtenidos en este estudio donde las partículas obtenidas fueron de un tamaño menor a 30  $\mu\text{m}$ . Además de la temperatura, se ha reportado que el tamaño de las micropartículas está relacionado con la presión de atomización. Al aplicar mayor presión se crea un mayor radio de dispersión de la muestra por tanto una mayor área superficial de contacto con el aire caliente, propiciando así un tamaño de partícula más pequeño (Munin y Edwards-Lévy, 2011). La importancia de conocer tanto el tamaño de partícula y el potencial Z radica en su aplicación, a partir del tamaño podemos inferir sobre su comportamiento en diferentes medios. Por ejemplo del área superficial, entre menor sea el tamaño de partícula una mayor interacción con el medio y las reacciones químicas que se puedan llevar a cabo. También el tamaño está relacionado con la efectividad y disponibilidad de los compuestos fenólicos que se encuentran inmovilizado en las micropartículas.



**Figura 8.** SEM de micropartículas de maltodextrina. A) 40% Maltodextrina + 4% Extracto de Té Verde; B) 25% Maltodextrina + 6% Extracto de Té Verde.



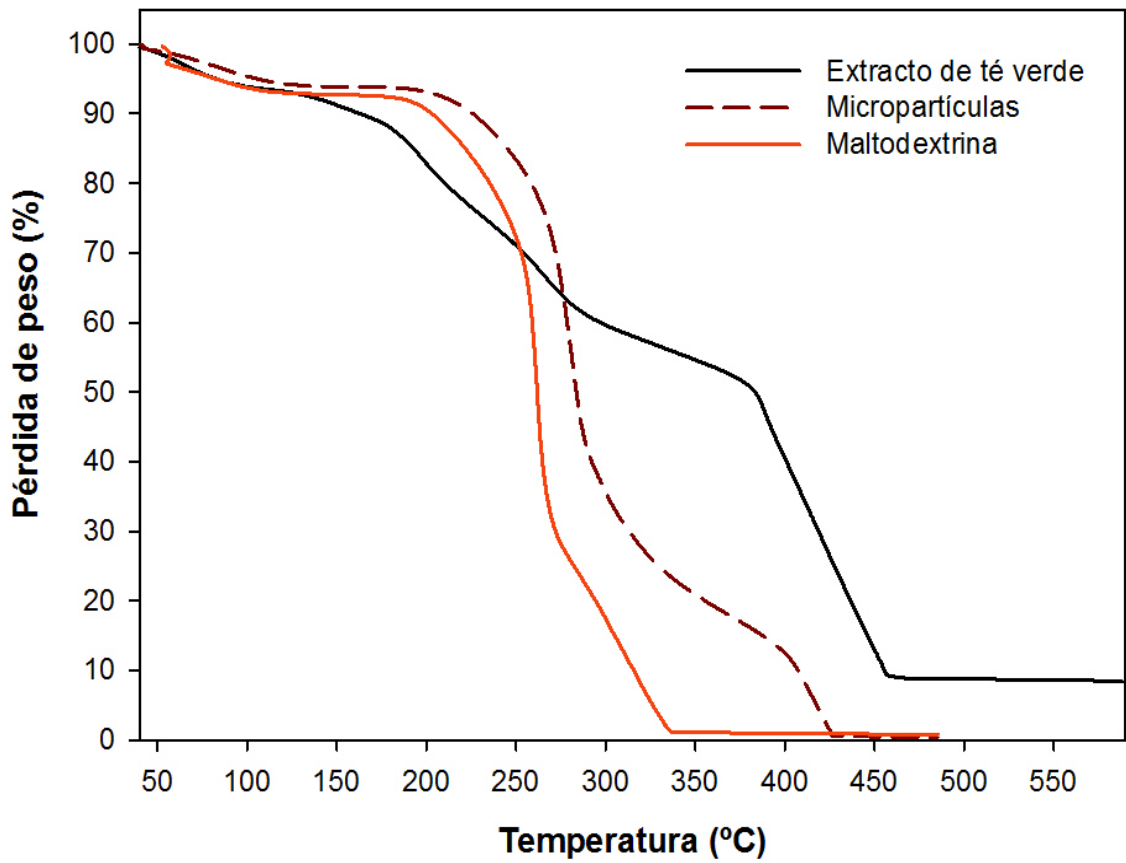
Igual que en caso anterior, entre menor sea el tamaño es más efectivo en la liberación y el acarreamiento de este en el sistema. Así como en otros casos el tamaño influye en la apariencia y textura del producto, donde es deseable alterar lo menos posible la percepción de los consumidores ante alimentos de los cuales se tiene una percepción predeterminada. Para evaluar la estabilidad de las micropartículas en suspensión se realizó el análisis de potencial Z: el cual es considerado como el potencial eléctrico entre el medio fluido y la capa de fluido estacionaria asociada a una partícula coloidal. Los valores se presentan como la carga de las partículas acompañadas de un valor numérico que hace referencia a su comportamiento en solución. Donde la escala está dada de la siguiente manera: 0 a 5: coagulación o floculación; 10 a 30: tendencia a la inestabilidad; 30 a 40: moderadamente estables; 40 a 60 estable; más de 61: excelente estabilidad.

El potencial zeta de las micropartículas obtenidas fue de  $-50 \pm 1.4$  mV este valor es mayor al reportado por Gomes et al. (2010) donde inmovilizaron EGCG por secador por aspersion utilizando una mezcla de maltodextrina y goma arábica obtuvieron un potencial Z de -15. El valor negativo es atribuido a la carga parcial negativa de los grupos carbonilos de las maltodextrina influyendo así en la carga superficial de las micropartículas. Tanto la morfología de las micropartículas como su potencial Zeta nos dan una idea de cómo se encuentra atrapado el compuesto de interés en el material de inmovilización y la estabilidad que estas presentarán en una matriz fluida (Hunter, 2013). Este parámetro también es importante ya que de él depende la solubilidad y sedimentación que se puedan presentar al ser incorporado en los alimentos. Para este caso el potencial Z nos permite inferir que las micropartículas se disolverán fácilmente en medios acuosos y no habrá sedimentación o precipitación.

### 6.3 Etapa III: Estabilidad Térmica de Extracto de Té Verde Incorporado en Micropartículas de Maltodextrina

Se evaluó el comportamiento de degradación térmica de las micropartículas por medio de termogravimetría (TGA) las curvas se observan en la Figura 9. Se puede observar que el extracto de té verde posee varias pérdidas a medida que aumenta la temperatura. Esto se debe principalmente a la composición química del extracto ya que en él también se encuentran algunos carbohidratos y proteínas. De estas curvas también podemos observar como ocurre una primera pérdida de peso para ambos compuestos a los 120 °C; a esta temperatura las pérdidas están asociada a la humedad que aún pudiera estar en los materiales. En segunda instancia podemos observar de una serie de pérdidas desde los 175 °C hasta los 390 °C en el extracto de té verde, comportamiento diferente al presentado a las micropartículas. A pesar de estar diferencias se observar claramente como a medida aumenta la temperatura la pérdida de peso en las micropartículas es desplazada alrededor de 20 a 30 °C en comparación con el extracto libre.

El desplazamiento de la temperatura en la pérdida de peso por efecto de la maltodextrina ha sido reportado en otros alimentos; por ejemplo en la estabilidad térmica de extracto de hierba maté. Donde la inmovilización de dicho extracto en diferentes concentraciones de maltodextrina genera un desplazamiento de 70 °C. Esto en comparación con el extracto de hierba maté sin inmovilizar el cual presentó pérdida de peso a partir de los 130 °C (Nunes et al., 2015). De igual manera Pai et al. (2015) reportaron que el uso de maltodextrina favoreció en el desplazamiento de la temperatura de aproximadamente 50 °C en la pérdida de compuestos volátiles de toronja. El comportamiento termogravimétrico de las micropartículas nos permite inferir sobre el efecto de la maltodextrina como barrera de difusión del calor hacía los compuestos fenólicos presentes en el extracto de té verde.

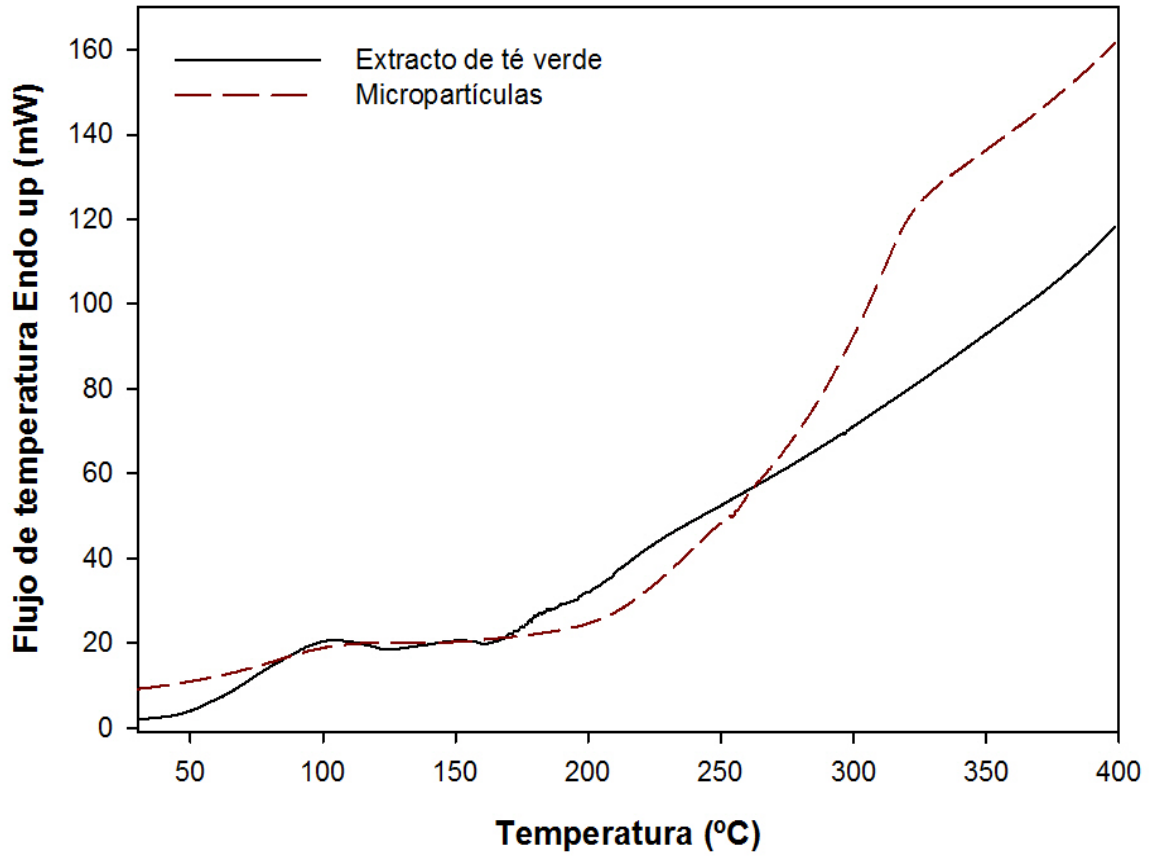


**Figura 9.** Análisis termogravimétrico (TGA) de extracto de té verde libre, maltodextrina y extracto de té verde inmovilizado en micropartículas de maltodextrina.

Las curvas de la Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB) del extracto de té verde e inmovilizado son mostradas en la Figura 10. Los parámetros analizados fueron las temperaturas de inicio de la transición, la transición vítrea y la temperatura de degradación. Se puede observar que el inicio de la transición para ambos compuestos fue a 50 °C, seguida de la temperatura de transición vítrea a los 110 °C. Finalmente se puede observar que la temperatura de degradación para el extracto de té verde inicia alrededor de los 160 °C y a los 190 °C en el caso de las micropartículas. Esto es 30 °C después de la degradación ocurrida en el extracto libre; además de esto, en la parte inicial y final de la calorimetría se observó que las micropartículas requieren mayor energía para sufrir cambios de estado en comparación con el extracto libre.

Este comportamiento mencionado anteriormente, puede estar atribuido a los puentes de hidrógeno formados mencionados anteriormente. a pesar de ser interacciones débiles, al estar en gran cantidad la energía para degradar los compuestos será mayor. Los resultados obtenidos concuerdan con el estudio realizado por Istenič et al. (2016) donde evaluaron la estabilidad de EGCG incorporado en liposomas, alginato y quitosano. Estos autores reportaron un desplazamiento de 50 °C en la temperatura de fusión de EGCG, así como su protección total a la degradación. Por otra parte se han realizado estudios donde la inmovilización de maltodextrina tiene un efecto positivo en la estabilidad térmica. Diferentes formulaciones de este polímero en conjunto con naringenina, han mostrado un desplazamiento de 20 °C en la transición de naringenina (Pai et al., 2015).

Se puede observar como existe una relación entre la pérdida de peso y el cambio en el estado de la materia en las curvas de CDB y TGA. Ya que la diferencia entre la temperatura donde se encuentran las mayores pérdidas de peso y donde existe un cambio en el estado son similares en el extracto de té verde libre. Los resultados en el extracto inmovilizado nos permiten inferir sobre la estabilidad térmica de los compuestos de interés debido al desplazamiento en la temperatura de pérdida de peso y una intensidad menor en el cambio de estado. La inestabilidad del extracto libre está dada por posibles interacciones en función de la temperatura. a través de cambios endotérmicos, los cuales pueden indicar disociación de interacciones o ruptura de enlaces (Poklar Ulrih, 2017).

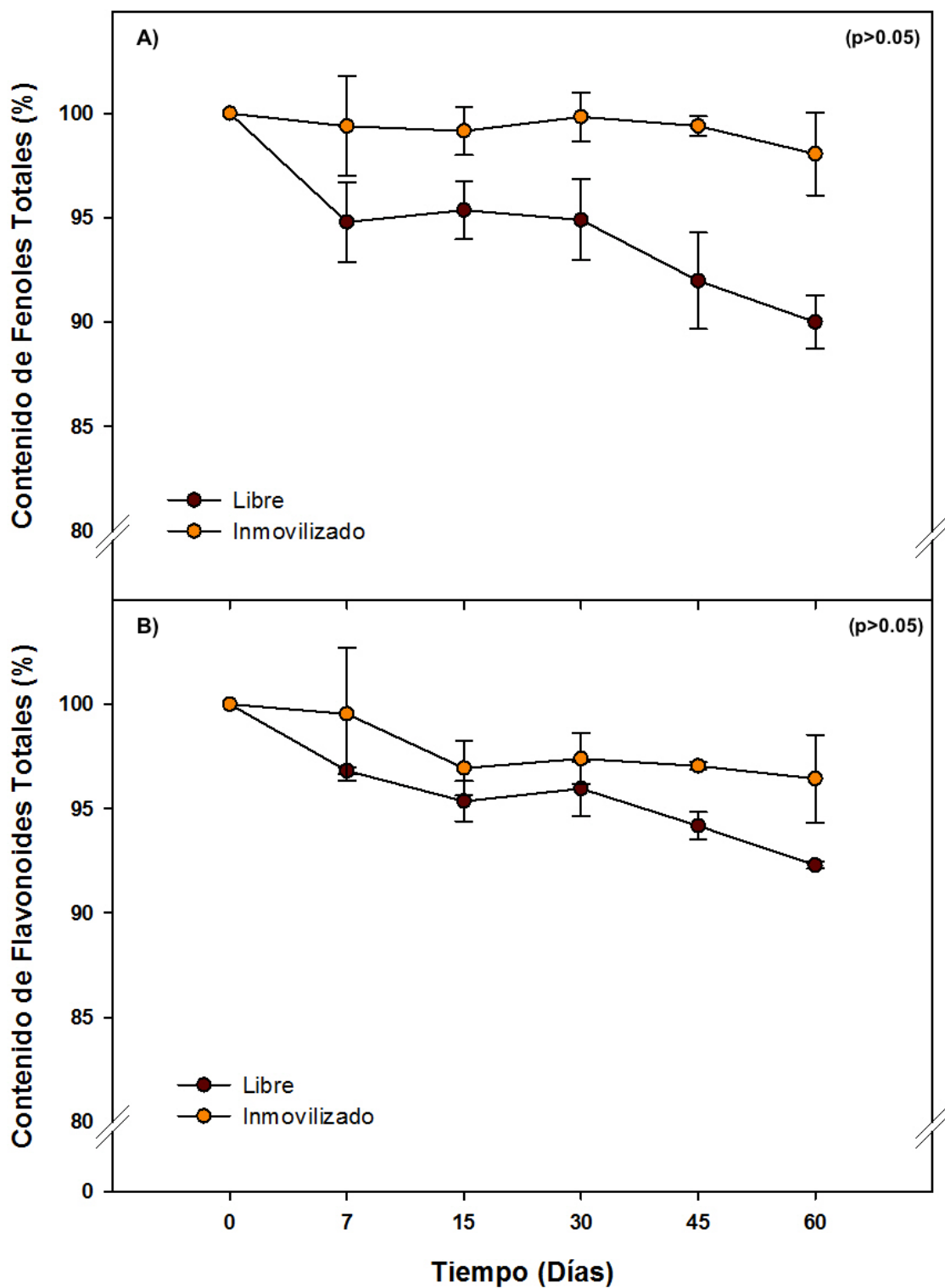


**Figura 10.** Calorimetría diferencial de barrido (CDB) de extracto de té verde y extracto de té verde inmovilizado en micropartículas de maltodextrina.

#### 6.4 Etapa IV: Estabilidad de Extracto de Té Verde Incorporado en Micropartículas de Maltodextrina Almacenado por 60 Días a 25 °C

Este estudio fue realizado con la finalidad de conocer la influencia del tiempo de almacenamiento sobre la materia prima obtenida después del proceso de secado. En la Figura 11 A se observan los cambios en el contenido de fenoles totales durante los 60 días de almacenamiento en el extracto libre e inmovilizado. Se puede observar el contenido de fenoles se conservó entre valores del 99 al 98 % a través del tiempo en comparación con el extracto libre. El cual entre el día 7 y 30 mantuvieron el 95 % de su contenido de fenoles totales, sin embargo en los 45 y 60 presentaron un 5 % más de pérdida en comparación con los días anteriores. No obstante estas diferencias en los días de almacenamiento de este estudio no fueron significativas ( $p > 0.05$ ).

Por otra parte al evaluar únicamente el efecto de los tratamientos, el extracto inmovilizado conservó en promedio un 99.4 % el contenido de fenoles mientras que el extracto libre conservó un 93.3 % ( $p < 0.05$ ). Estos resultados son similares a los reportados por Zokti et al. (2016) reportando valores de conservación del 97 % de compuestos fenólicos de té verde utilizando maltodextrina como material de inmovilización y un 79 % de conservación en extracto libre. Los resultados obtenidos confirman porque biopolímeros como la maltodextrina son utilizados en la inmovilización de fenoles encontrados en diversas fuentes vegetales como zanahoria, nopal, casis y hierba mate (Negrão-Murakami et al., 2017; Wang et al., 2016; Bakowska-Barczak y Kolodziejczyk, 2011).



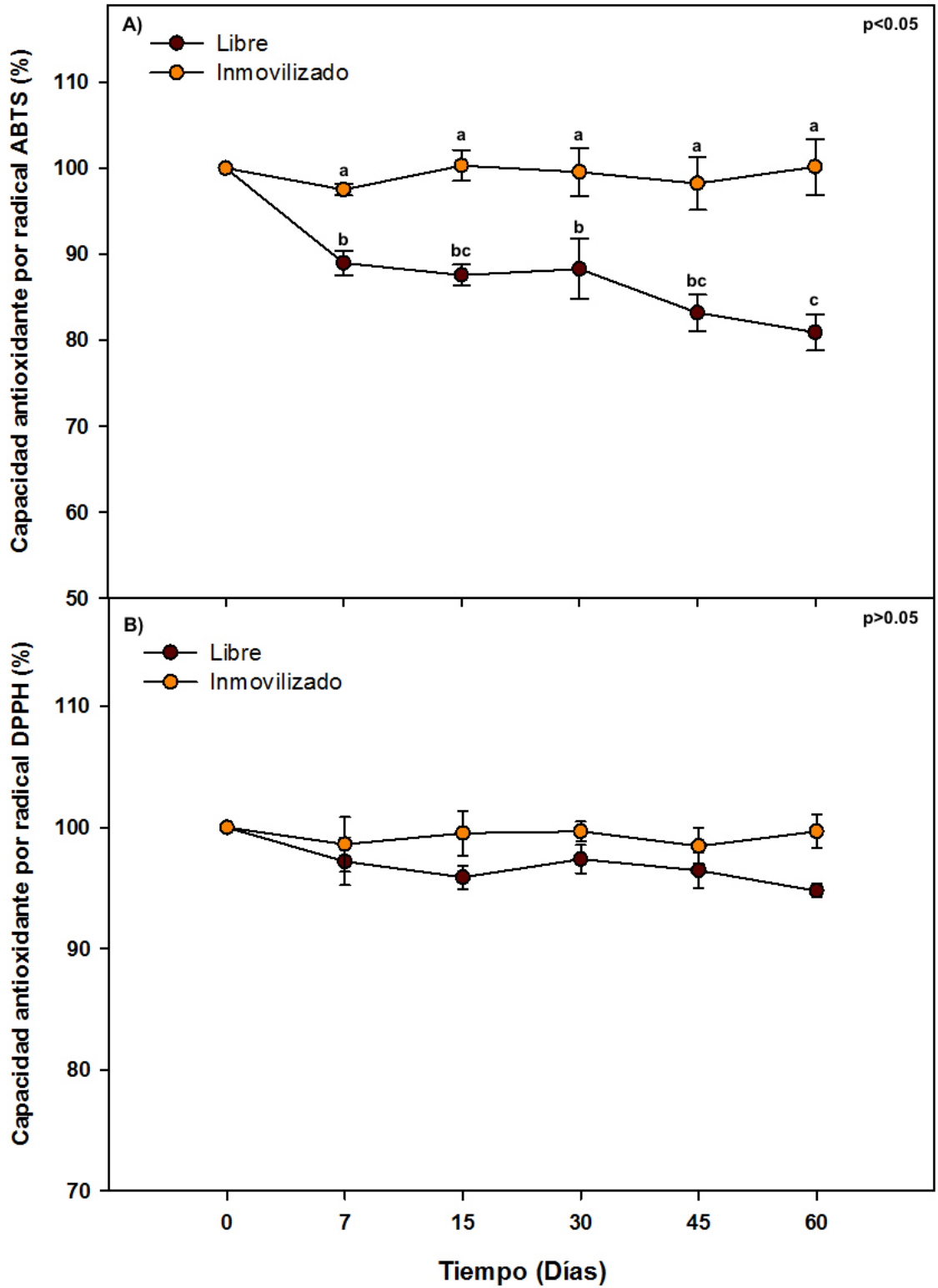
**Figura 11.** Contenido de fenoles (A) y flavonoides toles (B) remanente en extracto de té verde libre e inmovilizado almacenado a 25 °C por 60 días.

El contenido de flavonoides totales se muestra en la Figura 11 B, donde se puede observar un comportamiento similar al mostrado en el contenido de fenoles totales en el extracto libre. Por otra parte en el extracto inmovilizado se observa una inestabilidad mayor en el contenido de flavonoides versus el contenido de fenoles. Los valores iniciales tanto para el extracto libre como para el inmovilizado al día 7 fueron de 96.82 y 99.55 % respectivamente. Por otra parte, la diferencia en el contenido de flavonoides totales entre el extracto inmovilizado y el extracto libre osciló entre un 3 y 6 %. En este contexto es importante mencionar que no se detectaron diferencias significativas en cuanto al tiempo ni los tratamientos en el contenido de flavonoides totales ( $p > 0.05$ ). De la Figura 11 en general podemos decir que el efecto del tiempo de almacenamiento no es significativo en cuanto al contenido de fenoles y flavonoides totales.

La capacidad antioxidante por inhibición del radical ABTS y DPPH de los tratamientos se puede observar en la Figura 12. Los resultados muestran la capacidad antioxidante por ABTS (Figura 12 A) se conservó de mejor manera a través de los días en el extracto de té verde inmovilizado (97.5-100 %). En el extracto libre este comportamiento no fue similar, se puede observar que la pérdida fue igual entre el día 7 y el 45; sin embargo, al día 60 se observó la mayor pérdida (18 %) con respecto los días anteriores. Además de esto, el extracto inmovilizado conservó entre un 10 y 20 % la capacidad antioxidante en comparación con el extracto libre ( $p < 0.05$ ). Los valores obtenidos en este ensayo son mayores a los reportados por otros autores que han evaluado la estabilidad del extracto de té verde en almacenamiento; donde en periodos de 3 y 6 meses se encuentra un rango de pérdida entre el 6 y 26 % capacidad antioxidante por ABTS (Jiménez-Zamora et al., 2016).

La capacidad antioxidante por inhibición del radical DPPH se muestra en la Figura 12 B, se puede observar que ambos tratamientos presentan un comportamiento similar respecto al tiempo. Únicamente se observa un cambio en el día 15 de ambos tratamientos, donde el extracto inmovilizado conserva un 4 % más que el tratamiento libre; sin embargo, ninguno de los tratamientos presentaron diferencias significativas con respecto al tiempo ( $p > 0.05$ ).





**Figura 12.** Porcentaje de capacidad antioxidante por A) ABTS, y B) DPPH, de extracto de té verde libre e inmovilizado almacenado a 25 °C por 60 días.

Por otra parte, el extracto de té verde inmovilizado conservó el 99.2% de su capacidad y el extracto de té verde libre un 96% al final del periodo de almacenamiento ( $p < 0.05$ ). Estudios realizados en hierba mate han mostrado efectos similares, donde a lo largo de 90 días de almacenamiento en extracto de hierba mate inmovilizado en diferentes concentraciones de maltodextrina no han presentado cambios en la capacidad antioxidante por el radical DPPH (Negrão-Murakami et al., 2017). Los cambios conformacionales del extracto de té verde libre e inmovilizado se observan en el Cuadro 7. En primera instancia se puede observar que al día 60 de ambos tratamientos el contenido de EGCG fue similar; mostró un contenido de este compuesto del 27.59 y 27.73 % para el extracto e inmovilizado respectivamente. En este sentido es importante mencionar que de los 10 compuestos identificados en ambos extractos el contenido mayoritario es atribuido a la familia de las catequinas.

En este estudio es de especial interés evaluar el comportamiento de los epímeros de las catequinas. En los resultados se encontró que el contenido de GCG, presenta una variación mínima a lo largo del periodo de almacenamiento alrededor de 1 % para ambos tratamientos. Estos resultados en conjunto con los obtenidos del contenido de fenoles y flavonoides totales, así como la capacidad antioxidante, nos permiten inferir sobre lo que podría estar pasando en este ensayo. Primeramente podemos decir que la diferencia en el contenido de fenoles entre el extracto libre e inmovilizado pudiera estar relacionado con la capacidad antioxidante de los tratamientos evaluados. De igual manera los resultados del contenido de flavonoides totales concuerdan con lo encontrado en la identificación de los compuestos.

Si bien en su mayoría ambos compuestos presentan un mayor contenido de catequinas, esta diferencia no es marcada ni respecto al tiempo ni el tratamiento de este ensayo. Por otra parte, los resultados obtenidos en cambios conformacionales son reveladores en cuanto a la capacidad antioxidante de los tratamientos. A que a pesar del aumento en la concentración de compuestos fenólicos en el extracto de té verde libre, la capacidad antioxidante fue mejor en el extracto inmovilizado, este comportamiento se vio tanto para la inhibición del radical DPPH como para ABTS.

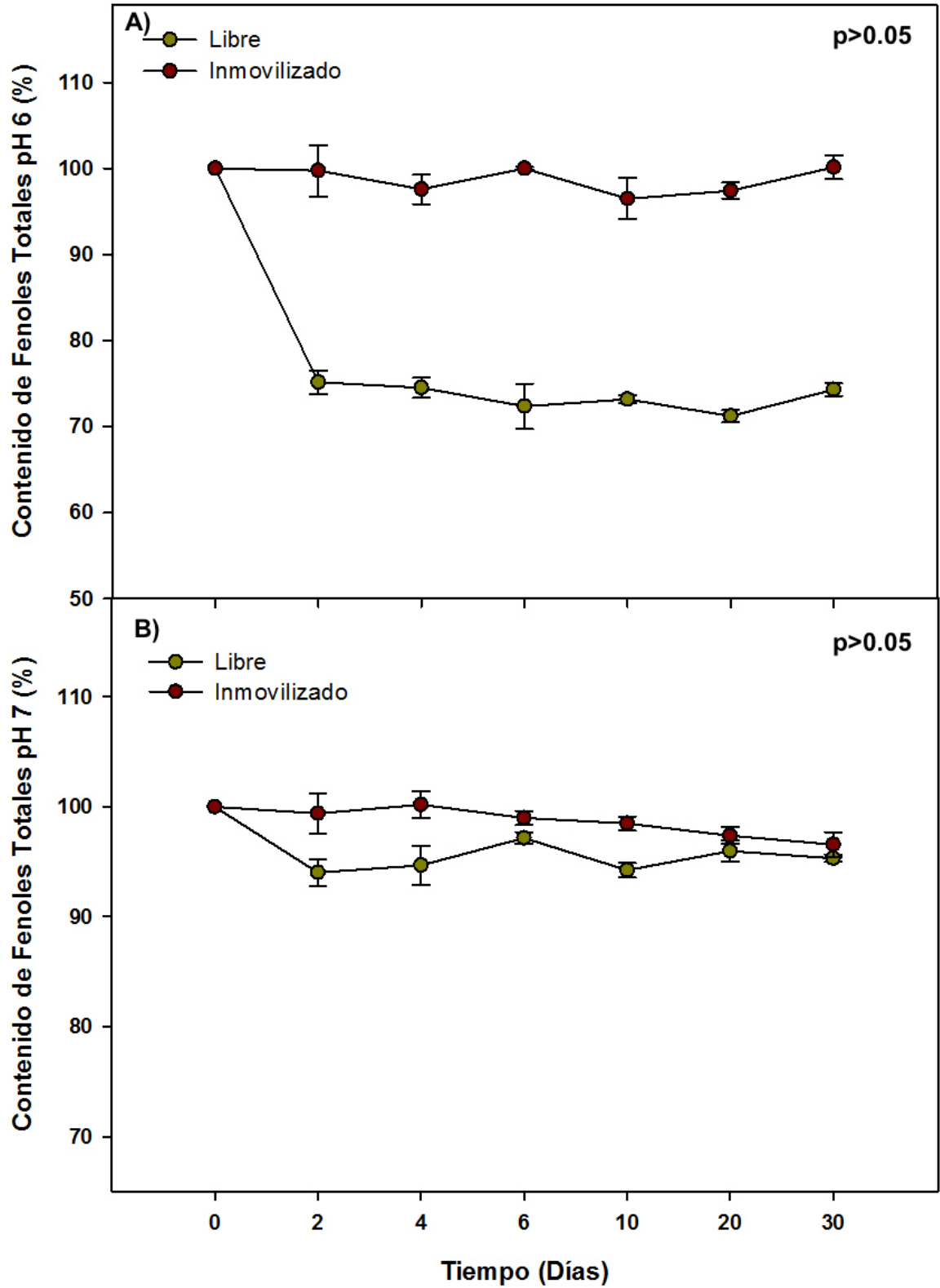
**Cuadro 7.** Compuestos identificados por UPLC-PDA en extracto de té verde inmovilizado en micropartículas de maltodextrina al día 0 y 60.

Compuesto	Libre (%)		Inmovilizado (%)	
	Día		Día	
	0	60	0	60
Ácido Gálico	2.4	2.3	2.3	2.3
Epigallocatequina	4.9	5.2	4.5	4.9
Catequina	0.5	0.4	0.2	0.3
Epigallocatequina Galato	25.4	27.6	28.5	27.7
Epicatequina	5.6	5.4	4.8	5.2
Galocatequina Galato	48.5	46.6	46.4	47.7
Ácido Siríngico	6.4	7.6	8.1	7.0
Quercetina $\beta$ -D Glucosido	1.1	1.0	1.0	0.9
Rutina	1.2	2.9	3.1	3.0
Kaempferol $\beta$ -D Glucopiranodiso	1.1	1.1	1.1	1.0

Una de las razones por las cuales se puede observar este comportamiento es por las pérdidas y recuperaciones que ocurren en ambos tratamientos en cuanto al contenido, y dichos cambios tienen un impacto sobre la capacidad antioxidante. En conjunto estos resultados muestran que las variaciones en cuanto al contenido de compuestos fenólicos en ambos tratamientos son similares; sin embargo, la inmovilización logra proteger de una mejor manera la capacidad antioxidante de estas moléculas.

#### 6.5 Etapa V: Estabilidad de Extracto de Té Verde Incorporado en Micropartículas de Maltodextrina a pH 6 y 7 Almacenado por 30 días a 25 °C

El contenido de fenoles totales en los diferentes pH's se muestra en la Figura 13, se puede observar que a pH 6 (Figura 13 A) el extracto libre pierde alrededor de un 25 % su contenido de fenoles desde el día 2 de almacenamiento respecto al día 0. Además de una pérdida entre el 25 y el 30 % en los días posteriores de almacenamiento, este comportamiento, no obstante es diferente al presentado por el extracto inmovilizado. Donde la mayor pérdida de compuesto se vio al día 10, con una pérdida de 4 % con respecto al día 0. En cuanto al pH 7 (Figura 13 B) se observa que tanto el extracto libre como el inmovilizado presentaron una mejor estabilidad, ya que para ambos tratamientos la conservación estuvo por encima del 90 %. Si bien ambos conservaron de mejor manera el contenido de fenoles con respecto al pH 6, el extracto inmovilizado tuvo pérdidas menores al 3 % con respecto al día 0. Esto en comparación con el extracto libre el cual perdió hasta un 6 % el contenido de fenoles totales en los 30 días de almacenamiento.

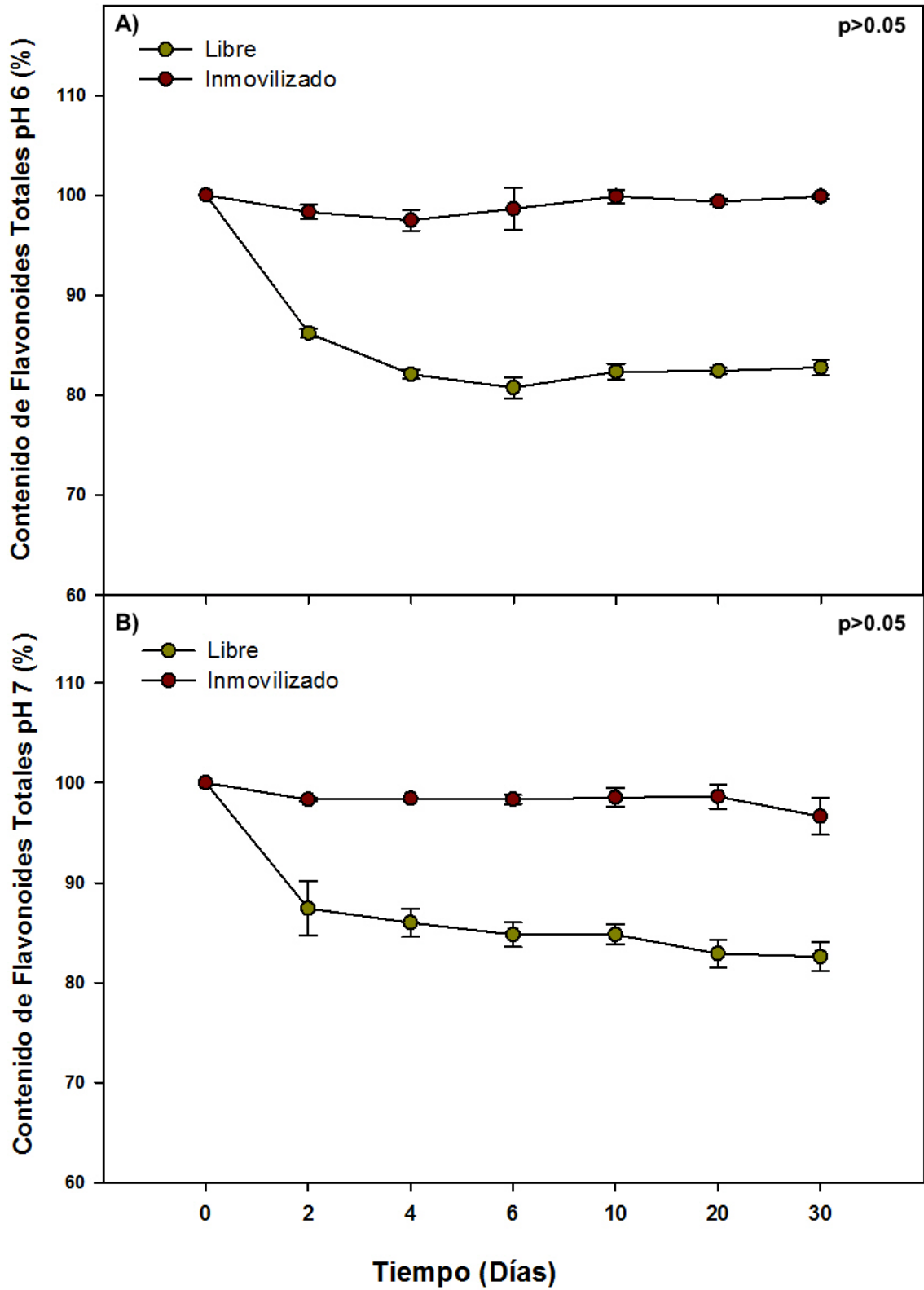


**Figura 13.** Contenido de fenoles totales del extracto de té verde libre e inmovilizado almacenado a pH 6 (A) y 7 (B) por 30 días a 25 °C

Por otra parte, se puede observar el impacto del pH en el contenido de flavonoides a través del tiempo en la Figura 14. En cuanto al pH 6 se puede observar que respecto al día 0 existe una pérdida entre el 20 y 18 % en el contenido de flavonoides en el extracto libre. A diferencia de lo que se observa en el extracto inmovilizado donde las pérdidas son alrededor del 1 al 3 %, en ambos casos la mayor pérdida se observa en los primeros 6 días de almacenamiento. Pasado ese periodo se empieza a observar un comportamiento más estable en cuanto al contenido de flavonoides totales. El extracto libre a pH 7 (Figura 14 B) presentó un comportamiento similar a pH 6 donde la mayor pérdida de flavonoides fue de 18 %. Cabe agregar que a diferencia del pH 6, este comportamiento fue observado al día 30 de almacenamiento. En cuanto al extracto inmovilizado a pH 7 se observa que la mayor pérdida fue del 4 % y en un comportamiento similar al extracto libre, esta pérdida fue observada al día final del almacenamiento.

Los resultados de ambos pH's muestran que el contenido de flavonoides se conserva de mejor manera en el extracto de té verde inmovilizado, conservando aproximadamente un 98 % el contenido de fenoles totales en todos los días de almacenamiento. En comparación con el extracto libre donde únicamente en el día dos se conserva el 87 % de los flavonoides y en los días 4 al 30 un 83 %. Es decir que a través del tiempo sin importar el pH el extracto inmovilizado conserva en un 11 % más el contenido de flavonoides totales con respecto al extracto libre ( $p < 0.05$ ). Estos resultados, en contraste con los mostrados en el contenido de fenoles no permiten inferir sobre la diferencia en la estabilidad del contenido de fenoles totales versus el contenido de flavonoides totales. Mostrando que los fenoles son más estables al pH en comparación con los flavonoides encontrados en el extracto de té verde.

Los resultados del efecto del pH con relación a los tratamientos se muestran en el Cuadro 8. De este cuadro es importante resaltar que el extracto de té verde inmovilizado presentó el mismo contenido de fenoles (98 %) para pH 6 y 7. A diferencia del extracto libre el cual presentó 25 % menos el contenido de fenoles a pH 6 respecto al extracto inmovilizado ( $p < 0.05$ ); sin embargo a pH 7 se observó que la pérdida fue menor, ya que fue 3 % menor respecto al extracto inmovilizado a pH 7.



**Figura 14.** Contenido de flavonoides totales del extracto de té verde libre e inmovilizado almacenado a pH 6 (A) y 7 (B) por 30 días a 25 °C.

**Cuadro 8.** Porcentaje remanente de fenoles y flavonoides a pH 6 y 7 en el extracto de té verde y extracto de té verde en micropartículas de maltodextrina almacenados por 30 días

<b>pH</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Contenido de Fenoles Totales (%)</b>	<b>Contenido de Flavonoides Totales (%)</b>
6	Libre	73.44 ± 1.81 <sup>c</sup>	82.76 ± 1.79 <sup>c</sup>
	Inmovilizado	98.37 ± 2.08 <sup>a</sup>	98.93 ± 1.25 <sup>a</sup>
7	Libre	95.24 ± 1.41 <sup>b</sup>	84.77 ± 2.20 <sup>b</sup>
	Inmovilizado	98.49 ± 1.64 <sup>a</sup>	98.14 ± 1.09 <sup>a</sup>

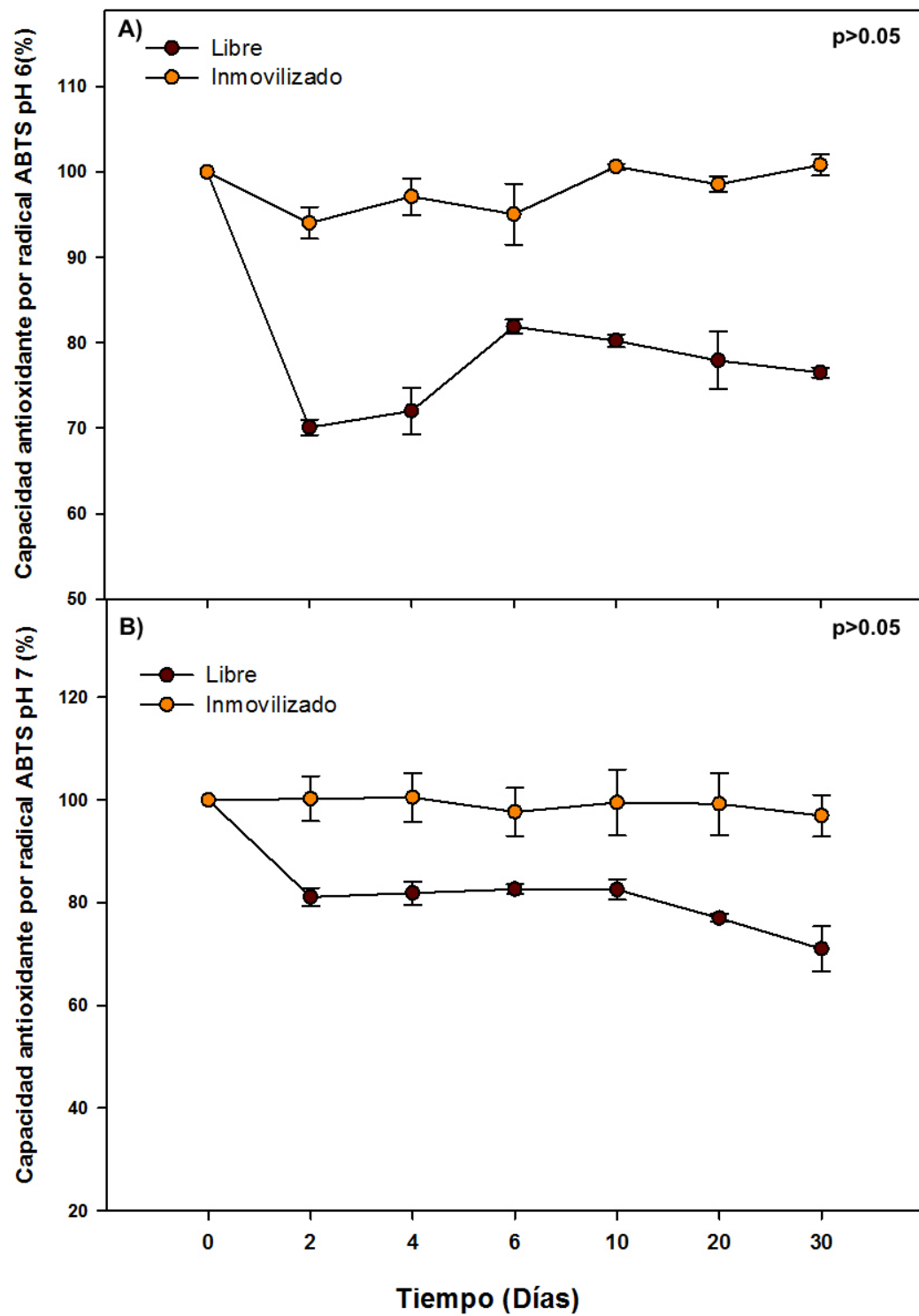
Datos representados como media ± desviación estándar. Cada valor representa la media de tres repeticiones. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (P<0.05).



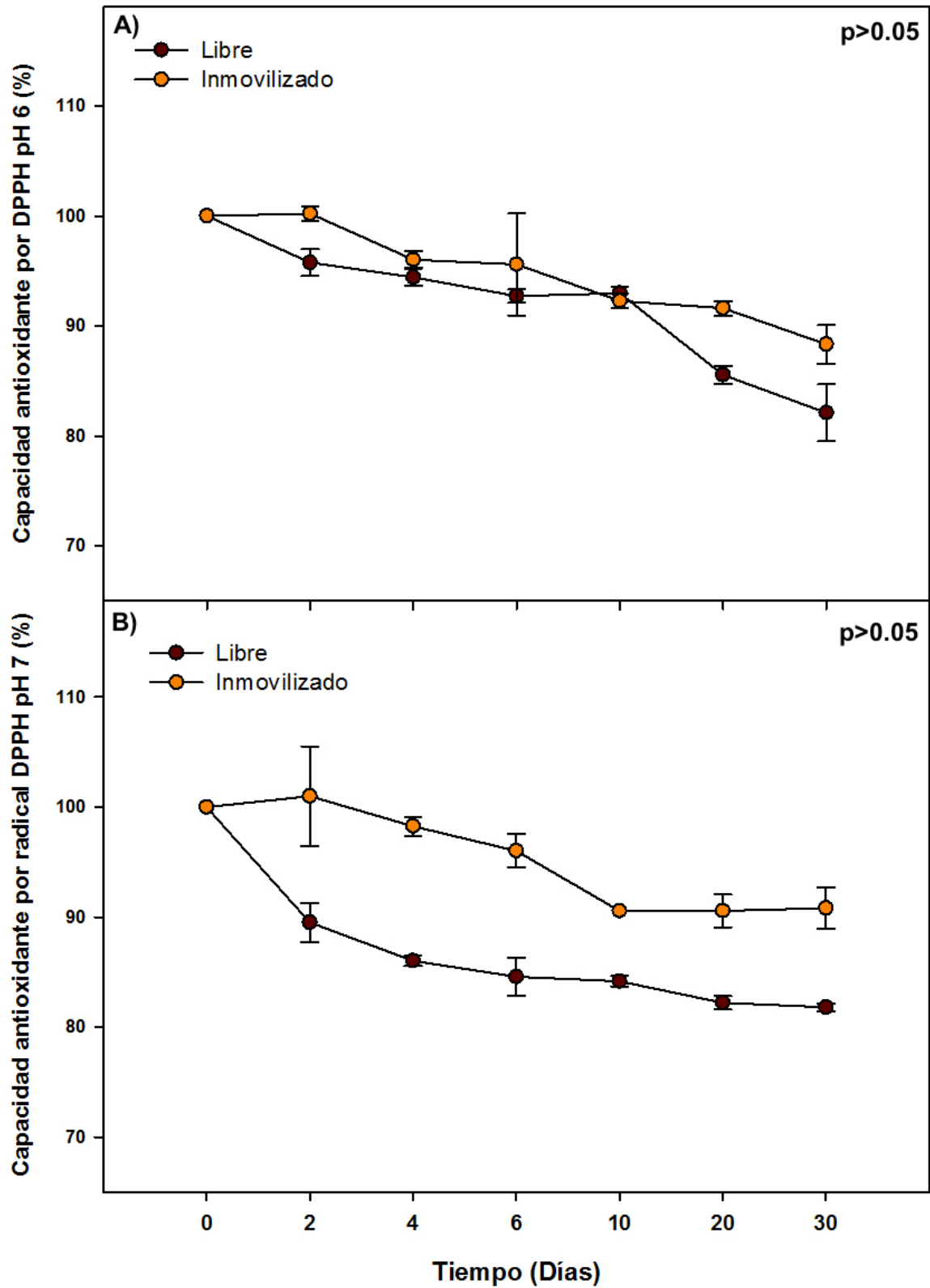
En cuanto al contenido de flavonoides totales en el extracto inmovilizado los valores a pH 7 fueron un 16 % mayores en el contenido de flavonoides totales respecto al extracto libre a dicho pH, y un 13 % mayores a pH 7 en comparación con el extracto libre a pH 7 ( $p < 0.05$ ). La diferencia de pérdida entre pH 6 y 7 en el extracto libre fue de un 22 % y un 0.79 % en el extracto inmovilizado. Cabe agregar que estos resultados son mayores a los valores reportados en otros estudios donde se ha observado que pH's mayores a 5.5 afectan la estabilidad de las catequinas presentes en el té verde al menos en un 50 % (Istenič et al., 2016; Li et al., 2012). En la Figura 15 A se muestra la capacidad antioxidante por inhibición del radical ABTS a pH 6, los resultados obtenidos muestran que la capacidad antioxidante se ve reducida en el extracto libre.

Esta pérdida es entre un 20 y 30 % a lo largo de los días con respecto al día 0 de almacenamiento, mientras que en el extracto inmovilizado la pérdida oscila entre un 2 y 6 %. Es decir que la pérdida en el extracto libre es aproximadamente 5 veces mayor en comparación con el extracto inmovilizado. En cuanto al pH 7 (Figura 15 B) la pérdida de capacidad antioxidante tuvo un comportamiento similar en cuanto lo observado a pH 6, sin embargo, la mayor pérdida en ambos tratamientos ocurrió en los días finales de almacenamiento. Ya que al día 60 se conservó un 71 % de capacidad antioxidante en el extracto libre y un 97 % en el extracto inmovilizado, en comparación con lo ocurrido en el pH 6 en ambos tratamientos. Donde la mayor pérdida se reportó al día 2, el contenido a este día fue de 70 y 94 % para el extracto libre e inmovilizado respectivamente, si estos datos son comparados en cuanto al contenido se puede inferir que no existen diferencias en cuanto al contenido al pH 6 y 7 en los días evaluados ( $p > 0.05$ ).

Por otra parte la capacidad antioxidante por inhibición del radical DPPH a pH 6 (Figura 16 A) mostró un comportamiento similar entre ambos tratamientos, donde la pérdida se dio en manera gradual. Reportando una mayor pérdida al día 30, se encontró un 18 y 12 % menos en extracto libre e inmovilizado respectivamente con respecto al día 0. En cuanto al pH 7 (Figura 16 B), se observa que el extracto libre tuvo una menor estabilidad desde el inicio del periodo de almacenamiento.



**Figura 15.** Capacidad Antioxidante por radical ABTS remanente en extracto de té verde libre e inmovilizado almacenado a pH 6 (A) y 7 (B) por 30 días a 25 °C



**Figura 16.** Capacidad Antioxidante por radical DPPH remanente en extracto de té verde libre e inmovilizado almacenado a pH 6 (A) y 7 (B) por 30 días a 25 °C

La pérdida registrada al día 2 fue del 11 % y en los días posteriores se presentó una pérdida constante hasta terminar con un 20 % en la capacidad antioxidante con respecto al día 0. En este mismo pH el extracto de té verde inmovilizado presentó una pérdida menor respecto al extracto libre, ya que entre el día inicial y final la pérdida fue del 9 %. Es decir un 11 % menos que la pérdida presentada en el extracto libre. Cabe mencionar que en la capacidad antioxidante por inhibición del radical DPPH el tiempo no fue significativo en cuanto a la pérdida ( $p > 0.05$ ), sin embargo, el pH si tuvo influencia en los tratamientos evaluados. El menor contenido de capacidad antioxidante por DPPH se observó en el extracto libre a pH 6 y 7, con un 91 y 85 % para cada pH respectivamente, por otra parte el contenido en el extracto inmovilizado fue de un 94 y 96 % a pH 6 y 7 respectivamente.

De estos resultados la mayor estabilidad se presentó en el extracto inmovilizado a pH 7 el cual fue un 11 % mayor con respecto al extracto libre a este mismo pH. Es importante mencionar que los datos presentados también mostraron diferencias tanto dentro de los tratamientos, como entre tratamientos. El extracto inmovilizado presentó mejores resultados de ambos tratamientos, y el extracto inmovilizado a pH 7 fue el más estable en comparación con el resto ( $p < 0.05$ ). La identificación de compuestos y sus porcentajes durante los días de almacenamiento y pH's se muestran en el Cuadro 9. Se puede observar que el contenido de compuestos fenólicos en el extracto libre a pH 6 el contenido mayoritario al día 0 fue EC (68.12 %) seguido de CGC (12.38 %) y C (9.42 %).

El resto de los compuestos presentó menos del 5 % en contenido en este día, sin embargo, el contenido al día final de almacenamiento mostró una ausencia del compuesto EC. Además de un aumento del 31 y 29 % en GCG y C respectivamente, y un aumento en promedio del 2 % en los compuestos restantes. Si bien se esperaba una degradación de los compuestos, se observó un alto incremento en epímeros. Se observó un aumento de C en un 30 % y la ausencia de su epímero EC, así como un aumento del 31 % en GCG y la ausencia de EGC con respecto al día 0.

**Cuadro 9.** Compuestos identificados en extracto libre e inmovilizado a pH 6 y 7 al día 0 y 30 de almacenamiento a 25 °C.

Compuesto Identificado	Libre (%)				Inmovilizado (%)			
	pH 6		pH 7		pH 6		pH 7	
	Día				Día			
	0	30	0	30	0	30	0	30
Ácido Gálico	4.6	5.4	5.2	35.5	2.4	2.7	4.6	5.6
Epigallocatequina	1.3	N/D	0.3	N/D	0.6	0.5	0.3	0.4
Catequina	9.4	38.4	0.7	1.7	4.9	4.2	1.5	1.8
Epigallocatequina Galato	0.9	2.2	17.1	N/D	32.1	35.3	12.3	27.2
Epicatequina	68.1	N/D	5.7	4.7	5.4	5.2	1.4	5.6
Galocatequina Galato	12.4	43.4	69.6	56.8	52.8	49.9	78.7	57.5
Quercetina $\beta$ -D Glucosido	1.3	3.8	0.6	0.5	0.7	0.9	0.3	0.9
Rutina	0.9	2.8	0.4	0.3	0.5	0.6	0.7	0.7
Kaempferol $\beta$ -D Glucopiranosido	1.0	3.9	0.4	0.5	0.6	0.7	0.4	0.4

El ácido siríntrico (AS) es el único compuesto que no fue identificado en el ensayo de pH en ninguno de los tratamientos, a partir de la ausencia de AS se puede inferir que este compuesto es altamente susceptible a la degradación por pH. Por otra parte los resultados obtenidos en la cromatografía del extracto inmovilizado a pH 6 (Cuadro 9); donde se puede observar que al finalizar los 30 días de almacenamiento se lograron identificar los 9 compuestos presentes al día 0 en comparación con los 7 encontrados en el extracto libre al día 30. Únicamente se presentaron ligeros cambios ( $\pm 3\%$ ) en la concentración de algunos compuestos identificados, lo cual indica un efecto protector tanto a la degradación como a la epimerización en estas condiciones en comparación con el extracto libre.

Para conocer la asociación que existe entre los compuestos identificados y las variables de respuesta (contenido de fenoles y flavonoides totales y capacidad antioxidante) se realizaron correlaciones, las cuales se muestran en el Cuadro 10. En este estudio se encontró una fuerte evidencia del efecto en el aumento de pH principalmente en el extracto libre. Ya que a pH 7 los compuestos mayoritarios en este tratamiento fueron GCG (69.64 %). Seguido de EGCG (17.10 %), EC (5.70 %) y AG (5.20 %). De los 9 compuestos iniciales únicamente 7 fueron identificados al día 30, el hallazgo más importante fue primeramente la ausencia de EGCG seguido de EGC, así como un aumento de 6 veces en el contenido de AG. Por otra parte el extracto de té verde inmovilizado y sometido a pH 7 tuvo un comportamiento interesante, principalmente que igual que a pH 7 se encontraron los 9 compuestos tanto al día inicial como al final.

En segunda instancia hubo un aumento en el contenido de ciertos compuestos, como el caso de EGCG el cual aumentó un 15%. Además de esto GCG se redujo en un 22 % y lo que resultó en el aumento de EC del 4 % y un mínimo aumento de los otros compuestos identificados. La identificación de los compuestos es de suma importancia, ya que a partir de ellos y los datos obtenidos en el contenido de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante, nos permiten conocer su influencia sobre cada uno de ellos. En primera instancia uno de los hallazgos de mayor importancia es el cambio drástico en el contenido de AG en el extracto libre a pH 7.

Cuadro 10. Correlaciones de compuestos fenólicos identificados a pH 6 y 7 sobre las variables de respuesta.

Compuesto	R
	0.82 : DPPH
	0.85 : ABTS
Epigallocatequina Galato (EGCG)	0.85 : Flavonoides Totales
	-0.82 : EC
Galato de Galocatequina (GCG)	-0.70 : EGC
	-0.51: DPPH
	-0.58 : ABTS
	-0.51 : EGCG
Ácido Gálico (AG)	-0.43 : EGC

(p<0.05)

EC: Epicatequina; EGC: Epigallocatequina

El aumento de AG en el extracto libre podría estar dado por la correlación negativa que existe entre dicho compuesto y catequinas como EGCG y EGC, donde en este estudio presentaron un  $R= 0.51$  y  $0.43$  respectivamente con el AG. Dicha relación puede ser atribuida a la hidrólisis que se da en los compuestos polimerizados con AG. Este dato concuerda con lo mencionado en la sección de antecedentes, donde establecen que a pH's neutros-alcalinos los ácidos fenólicos son más estables. Por otra parte, en este estudio también se determinó que el aumento de GCG está relacionado con la disminución de EC y EGC ( $R= -0.82$  y  $-0.70$ ) esto se pudo observar principalmente en el pH 6 del extracto libre. No obstante, otro hallazgo importante está ligado a su epímero EGCG, el cual se relaciona positivamente con el aumento del contenido de flavonoides ( $R=0.85$ ). Esta relación concuerda con lo mostrado en la Figura 14. Por otra parte también se observó que el contenido de C está directamente relacionado ( $R=0.98$ ) con el aumento de algunos ácidos fenólicos identificados, como Q, R, K.

En cuanto a la capacidad antioxidante se observó que tanto para ABTS como DPPH el AG está relacionado con la disminución en la capacidad antioxidante ( $R= -0.51$  y  $-0.58$ ). Contrario al compuesto EGCG, donde el incremento de este está asociado con el aumento de la capacidad antioxidante por ABTS ( $R= 0.82$ ) y DPPH ( $R= 0.85$ ). Todas las correlaciones realizadas presentaron una  $p<0.05$ . Es por esto que podemos decir que debido a una mayor estabilidad de EGCG en el extracto inmovilizado este conservó de mejor manera su capacidad antioxidante. Los datos presentados evidencian la efectividad de la inmovilización, ya que dicho tratamiento tuvo un efecto protector en la degradación de los compuestos fenólicos, especialmente de las catequinas presentes en el extracto de té verde sometidas a un pH neutro.



## 7. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que la inmovilización de extracto de té verde en micropartículas de maltodextrina conservan las propiedades antioxidantes y conformación de los compuestos fenólicos del té verde. La eficiencia de inmovilización de EGCG fue mayor al 50 %, además el tamaño y valor Z de las micropartículas indica que estas serán estables en solución. El extracto de té verde inmovilizado presentó una mayor estabilidad térmica disminuyendo su pérdida de peso en presencia de temperaturas mayores a los 100 °C. De igual manera la inmovilización favoreció la inhibición de la degradación y desplazamiento del punto de fusión de los compuestos fenólicos en el té verde. En cuanto a la estabilidad al almacenamiento a temperatura ambiente y diferentes pH's, las micropartículas conservaron de mejor manera el contenido de fenoles y flavonoides. Así como su capacidad antioxidante por inhibición del radical DPPH y ABTS además de ser menos susceptibles a cambios conformacionales provocados tanto por la temperatura como por el pH.

## 8. RECOMENDACIONES

Para futuros estudios como continuación de este trabajo se recomienda lo siguiente:

- Evaluar cambios conformacionales y capacidad antioxidantes en rangos de pH menores a 2 para hacer una comparación en la estabilidad a pHs ácidos versus pH's neutros.
- Evaluar estabilidad térmica a diferentes velocidades de calentamiento y su relación en los cambios estructurales y capacidad antioxidante.
- Aplicar el extracto de té verde inmovilizado a matrices alimentarias que requieran un tratamiento térmico mayor a 100 °C y pH mayor a 6.

## 9. REFERENCIAS

- Ahmad, M., Baba, W. N., A.Wani, T., Gani, A., Gani, A., Shah, U., Masoodi, F. A. 2015. Effect of green tea powder on thermal, rheological & functional properties of wheat flour and physical, nutraceutical & sensory analysis of cookies. *Journal of Food Science and Technology*, 52(9), 5799–5807.
- Almajano, M. P., Carbó, R., Jiménez, J. A. L., and Gordon, M. H. 2008. Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chemistry*, 108(1), 55–63.
- Ananingsih, V. K., Sharma, A., and Zhou, W. 2013. Green tea catechins during food processing and storage : A review on stability and detection. *FRIN*, 50(2), 469–479.
- Augustin, M. A., and Sanguansri, L. 2014. Challenges and solutions to incorporation of nutraceuticals in foods. *Annual Review of Food Science and Technology*, 6(November 2014), 1–15.
- Bakowska-Barczak, A. M., and Kolodziejczyk, P. P. 2011. Black currant polyphenols: Their storage stability and microencapsulation. *Industrial Crops and Products*, 34(2), 1301–1309.
- Belščak-Cvitanović, A., Lević, S., Kalušević, A., Špoljarić, I., Đorđević, V., Komes, D., Nedović, V. 2015. Efficiency Assessment of Natural Biopolymers as Encapsulants of Green Tea (*Camellia sinensis* L.) Bioactive Compounds by Spray Drying. *Food and Bioprocess Technology*, 2444–2460.
- Bettuzzi, S., Brausi, M., Rizzi, F., Castagnetti, G., Peracchia, G., and Corti, A. 2006. Chemoprevention of human prostate cancer by oral administration of green tea catechins in volunteers with high-grade prostate intraepithelial neoplasia: A preliminary report from a one-year proof-of-principle study. *Cancer Research*, 66(2), 1234–1240.
- Bhandari, B. R., and Howes, T. 1999. Implication of glass transition for the drying and stability of dried foods. *Journal of Food Engineering*, 40(1), 71–79.
- Botten, D., Fugallo, G., Fraternali, F., and Molteni, C. 2015. Structural Properties of Green Tea Catechins. *The Journal of Physical Chemistry B*, 119(40), 12860–12867.
- Braicu, C., Lodomery, M. R., Chedea, V. S., Irimie, A., and Berindan-Neagoe, I. 2013. The relationship between the structure and biological actions of green tea catechins. *Food Chemistry*, 141(3), 3282–3289.

- Cai, H., Xie, Z., Liu, G., Sun, X., Peng, G., Lin, B., and Liao, Q. 2014. Isolation, identification and activities of natural antioxidants from *Callicarpa kwangtungensis* Chun. PLoS ONE, 9(3), 1-14.
- Calvo, P., Hernández, T., Lozano, M., and González-Gómez, D. 2010. Microencapsulation of extra-virgin olive oil by spray-drying: Influence of wall material and olive quality. European Journal of Lipid Science and Technology, 112(8), 852–858.
- Castaneda-Ovando, A., Galan-Vidal, C. A., Pacheco-Hernandez, M. D., Rodriguez, J. A., and Paez-Hernandez, M. E. 2009. Evaluacion del contenido de metales y su efecto en la estabilidad de antocianinas Metal content evaluation and its effect on the stability of anthocyanins. Cyta-Journal of Food, 7(3), 225–232.
- Chacko, S. M., Thambi, P. T., Kuttan, R., and Nishigaki, I. 2010. Beneficial effects of green tea: A literature review. Chinese Medicine, 5(1), 3-9.
- Chang, K. 2015. World tea production and trade Current and future development. Food and Agriculture Organisation, 1–17.
- Chedea, V. S., Braicu, C., and Socaciu, C. 2010. Antioxidant/prooxidant activity of a polyphenolic grape seed extract. Food Chemistry, 121(1), 132–139.
- Chen, Y. C., Yu, S. H., Tsai, G. J., Tang, D. W., Mi, F. L., and Peng, Y. P. 2010. Novel technology for the preparation of self-assembled Catechin/Gelatin nanoparticles and their characterization. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58(11), 6728–6734.
- Chen, Z., Zhu, Q. Y., Tsang, D., and Huang, Y. 2001. Degradation of Green Tea Catechins in Tea Drinks. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49(1), 477-482.
- Chronakis, I. S. 1998. On the molecular characteristics, compositional properties, and structural-functional mechanisms of maltodextrins: a review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 38(7), 599–637.
- de Mejia, E. G., Ramirez-Mares, M. V., and Puangpraphant, S. 2009. Bioactive components of tea: Cancer, inflammation and behavior. Brain, Behavior, and Immunity, 23(6), 721-731.
- Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P. E., Tognolini, M., Borges, G., and Crozier, A. 2013. Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. Antioxidants & Redox Signaling, 18(14), 1818–92.

- Dominguez-Perles, R., Moreno, D. A., Carvajal, M., and Garcia-Viguera, C. 2011. Composition and antioxidant capacity of a novel beverage produced with green tea and minimally-processed byproducts of broccoli. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12(3), 361–368.
- Dorati, R., Genta, I., Modena, T., and Conti, B. 2013. Microencapsulation of a hydrophilic model molecule through vibration nozzle and emulsion phase inversion technologies. *Journal of Microencapsulation*, 30(6), 559–70.
- Dube, A., Nicolazzo, J. A., and Larson, I. 2010. Chitosan nanoparticles enhance the intestinal absorption of the green tea catechins (+)-catechin and (-)-epigallocatechin gallate. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 41(2), 219–225.
- Dudhani, A. R., and Kosaraju, S. L. 2010. Bioadhesive chitosan nanoparticles: Preparation and characterization. *Carbohydrate Polymers*, 81(2), 243–251.
- Fan, F. Y., Shi, M., Nie, Y., Zhao, Y., Ye, J. H., and Liang, Y. R. 2016. Differential behaviors of tea catechins under thermal processing: Formation of non-enzymatic oligomers. *Food Chemistry*, 196, 347–354.
- Fang, Z. 2010. Encapsulation of polyphenols: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(10), 510–523.
- Farhan, M., Khan, H. Y., Oves, M., Al-Harrasi, A., Rehmani, N., Arif, H., ... Ahmad, A. 2016. Cancer therapy by catechins involves redox cycling of copper ions and generation of reactive oxygen species. *Toxins*, 8(2), 37–51.
- Friedman, M., Levin, C. E., Lee, S. U., and Kozukue, N. 2009. Stability of green tea catechins in commercial tea leaves during storage for 6 months. *Journal of Food Science*, 74(2), 47–51.
- Fu, N., Zhou, Z., Jones, T. B., Tan, T. T. Y., Wu, W. D., Lin, S. X., ... Chan, P. P. Y. 2011. Production of monodisperse epigallocatechin gallate (EGCG) microparticles by spray drying for high antioxidant activity retention. *International Journal of Pharmaceutics*, 413(1–2), 155–166.
- Gadkari, P. V., and Balaraman, M. 2015. Catechins: Sources, extraction and encapsulation: A review. *Food and Bioproducts Processing*, 93(August 2013), 122–138.
- Gomes, J. F. P. S., Rocha, S., Pereira, M. do C., Peres, I., Moreno, S., Toca-Herrera, J., and Coelho, M. A. N. 2010. Lipid/particle assemblies based on maltodextrin-gum arabic core as bio-carriers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 76(2), 449–455.
- Gopal, J., Muthu, M., Paul, D., Kim, D.-H., and Chun, S. 2016. Bactericidal activity of green tea extracts: the importance of catechin containing nano particles. *Scientific Reports*, 6(1), 19710.

- Gramza, A., and Korczak, J. 2005. Tea constituents (*Camellia sinensis* L.) as antioxidants in lipid systems. *Trends in Food Science & Technology*, 16(8), 351–358.
- Hong, J., Lu, H., Meng, X., Ryu, J.-H., Hara, Y., and Yang, C. S. 2002. Stability, Cellular Uptake, Biotransformation, and Efflux of Tea Polyphenol (–)-Epigallocatechin-3-Gallate in HT-29 Human Colon Adenocarcinoma Cells. *Cancer Research*, 62(24), 7241 LP-7246.
- Hu, C. J., Gao, Y., Liu, Y., Zheng, X. Q., Ye, J. H., Liang, Y. R., and Lu, J. L. 2016. Studies on the mechanism of efficient extraction of tea components by aqueous ethanol. *Food Chemistry*, 194, 312–318.
- Hunter, R. J. 2013. *Zeta potential in colloid science: principles and applications (Vol. 2)*. Academic press.
- Istenič, K., Cerc Korošec, R., and Poklar Ulrih, N. 2016. Encapsulation of (–)-epigallocatechin gallate into liposomes and into alginate or chitosan microparticles reinforced with liposomes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, (December 2015), 4623–4632.
- Jayabalan, R., Subathradevi, P., Marimuthu, S., Sathishkumar, M., and Swaminathan, K. 2008. Changes in free-radical scavenging ability of kombucha tea during fermentation. *Food Chemistry*, 109(1), 227–234.
- Jiménez-Zamora, A., Delgado-Andrade, C., and Rufián-Henares, J. A. 2016. Antioxidant capacity, total phenols and color profile during the storage of selected plants used for infusion. *Food Chemistry*, 199, 339–346.
- Jing, J., Shi, Y., Zhang, Q., Wang, J., and Ruan, J. 2017. Prediction of Chinese green tea ranking by metabolite profiling using ultra-performance liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC–Q-TOF/MS). *Food Chemistry*, 221, 311–316.
- Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T., and Jukic, M. 2006. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry*, 94(4), 550–557.
- Kazarian, S. G., Vincent, M. F., Bright, F. V, Liotta, C. L., and Eckert, C. A. 1996. Specific intermolecular interaction of carbon dioxide with polymers. *Journal of the American Chemical Society*, 118(7), 1729–1736.
- Khalaf, N. A., Shakya, A. K., Al-Othman, A., El-Agbar, Z., and Farah, H. 2008. Antioxidant activity of some common plants. *Turkish Journal of Biology*, 32(1), 51–55.

- Khan, N., Afaq, F., Saleem, M., Ahmad, N., and Mukhtar, H. 2006. Targeting Multiple Signaling Pathways by Green Tea Polyphenol (-)-Epigallocatechin-3-Gallate. *Cancer Research*, 66(5), 2500 LP-2505.
- Kim, H. S., Quon, M. J., and Kim, J. a. 2014. New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate. *Redox Biology*, 2(1), 187–195.
- Leopoldini, M., Russo, N., and Toscano, M. 2011. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*, 125(2), 288–306.
- Li, N., Taylor, L. S., Ferruzzi, M. G., and Mauer, L. J. 2012. Kinetic study of catechin stability: Effects of pH, concentration, and temperature, 60(51), 12531-12539.
- Li, N., Taylor, L. S., Ferruzzi, M. G., and Mauer, L. J. 2013. Color and chemical stability of tea polyphenol (-) -epigallocatechin-3-gallate in solution and solid states, 53(2), 909–921.
- Liang, J., Li, F., Fang, Y., Yang, W., An, X., Zhao, L., ... Hu, Q. 2011. Synthesis, characterization and cytotoxicity studies of chitosan-coated tea polyphenols nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 82(2), 297–301.
- Mahmoud, K. F., Amin, A. A., Salama, M. F., and Seliem, E. I. 2015. Encapsulation of nano beta-glucan for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food component. *International Journal of ChemTech Research*, 8(11), 587–598.
- Milanovic, J., Manojlovic, V., Levic, S., Rajic, N., Nedovic, V., and Bugarski, B. 2010. Microencapsulation of flavors in carnauba wax. *Sensors*, 10(1), 901–912.
- Munin, A., and Edwards-lévy, F. 2011. Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds; a Review, 3(4), 793–829.
- Nakagawa, H., Hasumi, K., Woo, J. T., Nagai, K., and Wachi, M. 2004. Generation of hydrogen peroxide primarily contributes to the induction of Fe(II)-dependent apoptosis in Jurkat cells by (-)-epigallocatechin gallate. *Carcinogenesis*, 25(9), 1567–1574.
- Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S., and Bugarski, B. 2011. An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*, 1, 1806–1815.
- Negrão-Murakami, A. N., Nunes, G. L., Pinto, S. S., Murakami, F. S., Amante, E. R., Petrus, J. C. C., ... Amboni, R. D. M. C. 2017. Influence of DE-value of maltodextrin on the physicochemical properties, antioxidant activity, and storage stability of spray dried concentrated mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). *LWT - Food Science and Technology*, 79, 561–567.

- Nunes, G. L., Boaventura, B. C. B., Pinto, S. S., Verruck, S., Murakami, F. S., Prudêncio, E. S., and De Mello Castanho Amboni, R. D. 2015. Microencapsulation of freeze concentrated *Ilex paraguariensis* extract by spray drying. *Journal of Food Engineering*, 151, 60–68.
- Ortiz, J., Ferruzzi, M. G., Taylor, L. S., and Mauer, L. J. 2008. Interaction of environmental moisture with powdered green tea formulations: Effect on catechin chemical stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(11), 4068–4077.
- Pai, D. A., Vangala, V. R., Ng, J. W., Ng, W. K., and Tan, R. B. H. 2015. Resistant maltodextrin as a shell material for encapsulation of naringin: Production and physicochemical characterization. *Journal of Food Engineering*, 161, 68–74.
- Parisi, O. I., Puoci, F., Restuccia, D., Farina, G., Iemma, F., and Picci, N. 2013. Polyphenols and Their Formulations: Different Strategies to Overcome the Drawbacks Associated with Their Poor Stability and Bioavailability. In *Polyphenols in Human Health and Disease* (Vol. 1, pp. 29–45).
- Pastrija, D., Ezhilarasi, P. N., Indrani, D., and Anandharamakrishnan, C. 2015. Microencapsulation of green tea polyphenols and its effect on incorporated bread quality. *LWT - Food Science and Technology*, 64(1), 289–296.
- Peres, I., Rocha, S., Gomes, J., Morais, S., Pereira, M. C., and Coelho, M. 2011. Preservation of catechin antioxidant properties loaded in carbohydrate nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 86(1), 147–153.
- Pirker, K. F., Kay, C. W. M., Stolze, K., Tunega, D., Reichenauer, T. G., and Goodman, B. A. 2009. Free radical generation in rosmarinic acid investigated by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Free Radical Research*, 43(1), 47–57.
- Poklar Ulrich, N. 2017. Analytical techniques for the study of polyphenol–protein interactions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(10), 2144–2161.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., and Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231–1237.
- Robles-Sánchez, R. M., Rojas-Graü, M. A., Odriozola-Serrano, I., González-Aguilar, G. A., and Martín-Belloso, O. 2009. Effect of minimal processing on bioactive compounds and antioxidant activity of fresh-cut “Kent” mango (*Mangifera indica* L.). *Postharvest Biology and Technology*, 51(3), 384–390.
- Routray, W., and Orsat, V. 2012. Microwave-Assisted Extraction of Flavonoids: A Review. *Food and Bioprocess Technology*, 5(2), 409–424.
- Row, K. H., and Jin, Y. 2006. Recovery of catechin compounds from Korean tea by solvent extraction. *Bioresource Technology*, 97(5), 790–793.



- Sanna, V., Lubinu, G., Madau, P., Pala, N., Nurra, S., Mariani, A., and Sechi, M. 2015. Polymeric nanoparticles encapsulating white tea extract for nutraceutical application. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(7), 2026–2032.
- Schieber, A., Stintzing, F. ., and Carle, R. 2001. By-products of plant food processing as a source of functional compounds — recent developments. *Trends in Food Science & Technology*, 12(11), 401–413.
- Shanthi, C. N., Gupta, R., and Mahato, A. K. 2010. Traditional and emerging applications of microspheres: A review. *International Journal of PharmTech Research*, 2(1), 675–681.
- Shimada, K., Kawarabayashi, T., Tanaka, A., Fukuda, D., Nakamura, Y., Yoshiyama, M., ... Yoshikawa, J. 2004. Oolong tea increases plasma adiponectin levels and low-density lipoprotein particle size in patients with coronary artery disease. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 65(3), 227–234.
- Sies, H. 2010. Polyphenols and health: Update and perspectives. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 501(1), 2–5.
- Singh, B. N., Shankar, S., and Srivastava, R. K. 2011. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): Mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochemical Pharmacology*, 82(12), 1807–1821.
- Singleton, V. L., and Rossi, J. A. 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144 LP-158.
- Song, B. J., Manganais, C., and Ferruzzi, M. G. 2015. Thermal degradation of green tea flavan-3-ols and formation of hetero- and homocatechin dimers in model dairy beverages. *Food Chemistry*, 173, 305–312.
- Susantikarn, P., and Donlao, N. 2016. Optimization of green tea extracts spray drying as affected by temperature and maltodextrin content. *International Food Research Journal*, 23(3), 1327–1331.
- Szymczycha-Madeja, A., Welna, M., and Zyrnicki, W. 2013. Multi-element analysis, bioavailability and fractionation of herbal tea products. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 24(5), 777–787.
- Tao, W., Zhou, Z., Zhao, B., and Wei, T. 2016. Simultaneous determination of eight catechins and four theaflavins in green, black and oolong tea using new HPLC–MS–MS method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 131, 140–145.

- Tappi, S., Tylewicz, U., Romani, S., Dalla Rosa, M., Rizzi, F., and Rocculi, P. 2017. Study on the quality and stability of minimally processed apples impregnated with green tea polyphenols during storage. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 39, 148–155.
- Tengse, D. D., Priya, B., and Kumar, P. A. R. 2016. Optimization for encapsulation of green tea (*Camellia sinensis* L.) extract by spray drying technology. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11(1), 85–92
- Toyoda, M., Tanaka, K., Hoshino, K., Akiyama, H., Tanimura, A., and Saito, Y. 1997. Profiles of Potentially Antiallergic Flavonoids in 27 Kinds of Health Tea and Green Tea Infusions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(7), 2561–2564.
- Vehring, R. 2008. Pharmaceutical Particle Engineering via Spray Drying. *Pharmaceutical Research*, 25(5), 999–1022.
- Volf, I., Ignat, I., Neamtu, M., and Popa, V. I. 2014. Thermal stability, antioxidant activity, and photo-oxidation of natural polyphenols. *Chemical Papers*, 68(1), 121–129.
- Vos, P. De, Faas, M. M., Spasojevic, M., Sikkema, J., and De Vos, P. 2010. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components.(Report). *International Dairy Journal*, 20(4), 292.
- Vuong, Q. V., Golding, J. B., Stathopoulos, C. E., Nguyen, M. H., and Roach, P. D. 2011. Optimizing conditions for the extraction of catechins from green tea using hot water. *Journal of Separation Science*, 34(21), 3099–3106.
- Wang, J., Li, H., Chen, Z., Liu, W., and Chen, H. 2016. Characterization and storage properties of a new microencapsulation of tea polyphenols. *Industrial Crops and Products*, 89, 152–156.
- Zhao, Y., Chen, P., Lin, L., Harnly, J. M., Lucy, L., and Li, Z. 2011. Tentative identification, quantitation, and principal component analysis of green pu-erh, green, and white teas using UPLC / DAD / MS. *Food Chemistry*, 126(3), 1269–1277.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., and Jianming, W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), 555–559.
- Zokti, J., Sham Baharin, B., Mohammed, A., and Abas, F. 2016. Green Tea Leaves Extract: Microencapsulation, Physicochemical and Storage Stability Study. *Molecules*, 21(8), 940.

