



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS MAESTRÍA EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

**Estabilidad de compuestos bioactivos y
actividad antidiabética *in vitro* de un extracto
de xoconostle encapsulado dentro de
emulsiones dobles de tipo *agua-en-aceite-en-
agua* ($W_1/O/W_2$)**

T E S I S

Que para obtener el título de Maestro en Ciencia de los
Alimentos

P R E S E N T A

José Antonio Estefes Duarte

Bajo la Dirección de:

Dr. Rafael Germán Campos Montiel

Co-Dirección:

Dr. Salvador Omar Espino Manzano

Asesores:

Dra. Alma Delia Hernández Fuentes

Dr. Gabriel Aguirre Álvarez



Tulancingo de Bravo Hidalgo, México, 2020



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
Instituto de Ciencias Agropecuarias
School of Forestry and Environmental Studies

COORDINACION DE INVESTIGACION Y POSGRADO DEL ICAP

Actas de la reunión del Comité de Tesis de Maestría en Ciencia de los Alimentos
Apertura:

La reunión ordinaria para evaluar los avances de la tesis intitulada: “**Estabilidad de compuestos bioactivos y actividad antidiabética in vitro de un extracto de xoconostle encapsulado dentro de emulsiones dobles de tipo agua-en-aceite-en-agua (W1/O/W2)**”, que desarrolla el estudiante José Antonio Estefes Duarte

Asistentes:

Dr. Rafael Germán Campos Montiel

Dr. Salvador Omar Espino Manzano

Dra. Alma Delia Hernández Fuentes

Dr. Gabriel Aguirre Álvarez

A. Revisión de Trabajo de Tesis

Observaciones:

El comité revisó con antelación el trabajo de tesis en extenso propuesto por el estudiante, comunicando a el estudiante, José Antonio Estefes Duarte, oportunamente las correcciones, adiciones y/o modificaciones que debería considerar para mejorar su trabajo y poder continuar con el proceso de obtención de grado. El estudiante atendió de forma conveniente las sugerencias del comité.

B. Acuerdos

En esta fecha, se comunica atentamente que el comité conformado por los profesores firmantes, otorgamos nuestra autorización para que el estudiante imprima su trabajo final de tesis, y continúe con los trámites necesarios para la obtención del grado de maestría respectivo.

ATENTAMENTE

“AMOR, ORDEN Y PROGRESO”

Tulancingo de Bravo, Hidalgo a 13 de julio de 2020

Dr. Rafael Germán Campos Montiel

Dr. Salvador Omar Espino Manzano

Dra. Alma Delia Hernández Fuentes

Dr. Gabriel Aguirre Álvarez



Reconocimientos

Un especial reconocimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada al alumno José Antonio Estefes Duarte (No. de CVU: 929116) para la realización del proyecto “Estabilidad de compuestos bioactivos y actividad antidiabética *in vitro* de un extracto de xoconostle encapsulado dentro de emulsiones dobles de tipo agua-en-aceite-en-agua ($W_1/O/W_2$)”.

Agradecimientos

Al Dr. Rafael Campos por aceptarme en su equipo de trabajo y por su sólido apoyo durante todo mi proceso de formación.

Al Dr. Rubén Jiménez Alvarado por su orientación disciplinar en la formulación y caracterización de los sistemas de microencapsulación.

Al Mtro. Néstor Santos por apoyarme sin conocerme al inicio de mi proyecto.

A mis compañeros y amigos de laboratorio Toño Cenobio, Uriel y Adriana por darme opiniones profesionales y objetivas acerca del proyecto cuando se los pedí.

A la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo por mi formación como maestro en ciencias.

Dedicatoria

A mis compañeros y amigos de maestría Iridiam, Gil y Andony, por hacerme la estancia en el posgrado muy amena y divertida. Su amistad es muy valiosa para mí.

A Dany, por ser un pilar muy importante en este logro. Tu eres increíble.

A mis hermanas Merari y Lucy por apoyarme todos los días de cualquier manera que les fue posible. Gracias.

A mi papa, mis tíos Luis y Vero y mis primos Oscar y Luis por darme inspiración para avanzar.

A mi amigo pepe por compartir el gusto por la ciencia conmigo.

A la ciencia, por enseñarme lecciones todos los días y por darme un proyecto de vida.

Pero muy especialmente, le dedico este documento a mi madre, Lucía, por ser el más grande ejemplo que alguien pudo tener.

A hombros de gigantes

Isaac Newton

Índice General

I. Índice de figuras.....	i
II. Índice de tablas	iii
III. Resumen.....	iv
IV. Abstract	v
1. Introducción	1
2. Marco teórico	3
2.1 Diabetes	3
2.1.1 Fisiopatología	3
2.1.2 Clasificación	4
2.1.3 Epidemiología.....	5
2.1.4 Tratamiento de la diabetes mellitus tipo II	5
2.2 Inhibidores de la α -amilasa y α -glucosidasa.....	6
2.3 Medicina tradicional contra la diabetes	7
2.4 Xoconostle	8
2.4.1 Composición química del xoconostle	10
2.4.2 Consumo de xoconostle en México	10
2.4.3 Uso tradicional del xoconostle	11
2.4.4 Actividad antidiabética del xoconostle.....	11
2.5 Principales compuestos bioactivos del xoconostle	12
2.5.1 Compuestos fenólicos.....	12
2.5.2 Flavonoides	13
2.5.3 Betalaínas.....	13
2.5.4 Taninos.....	16
2.6 Microencapsulación de compuestos bioactivos.....	17
2.6.1 Definición.....	17
2.6.2 Funciones de la microencapsulación	18
2.6.3 Métodos de microencapsulación.....	19
2.7 Emulsiones	19
2.7.1 Clasificación de emulsiones.....	20
2.8 Emulsiones dobles.....	21
2.8.1 Clasificación de las emulsiones dobles con base en su composición ...	21

2.8.2 Clasificación de las emulsiones dobles con base en su estructura interna	22
2.8.3 Ventajas de las emulsiones dobles W/O/W.....	23
2.8.4 Problemas de inestabilidad de las emulsiones dobles	24
2.8.5 Estabilizantes de emulsiones.....	25
2.8.6 Preparación de emulsiones dobles W/O/W.....	27
2.8.7 Investigación en torno a emulsiones dobles.....	28
3. Planteamiento del problema y justificación.....	32
4. Objetivos.....	34
4.1 Objetivo general.....	34
4.2 Objetivos específicos	34
5. Materiales y métodos	35
5.1 Material vegetal y reactivos.....	35
5.2 Obtención del extracto de xoconostle	35
5.3 Preparación de emulsiones dobles	36
5.4 Caracterización de los sistemas de emulsión doble	37
5.4.1 Morfología y tamaño de gota	37
5.4.2 Eficiencia de encapsulación.....	37
5.4.3 Viscosidad	38
5.4.4 Determinación de pH	38
5.5 Estabilidad de compuestos bioactivos durante el almacenamiento	39
5.5.1 Obtención del extracto de emulsiones (EME)	39
5.5.2 Contenido de fenoles totales	39
5.5.3 Contenido de flavonoides totales	40
5.5.4 Contenido de betalaínas	41
5.5.5 Contenido de taninos	41
5.6 Actividad antioxidante durante el almacenamiento.....	42
5.6.1 Inhibición de radical DPPH'	42
5.6.2 Inhibición de radical ABTS ⁺⁺	43
5.7 Actividad antidiabética durante el almacenamiento.....	43
5.7.1 Inhibición de α -amilasa	43
5.7.2 Inhibición de α -glucosidasa.....	44

5.8 Digestión <i>in vitro</i>	45
5.8.1 Actividad antioxidante y antidiabética durante la digestión.....	45
5.8.2 Liberación de ácidos grasos	46
5.9 Análisis estadístico	46
6. Resultados y discusión.....	47
6.1 Caracterización de los sistemas de emulsiones dobles	47
6.1.1 Morfología y tamaño de gota	47
6.1.2 Eficiencia de encapsulación.....	51
6.1.3 Viscosidad Aparente	52
6.1.4 Evaluación del pH.....	54
6.2 Estabilidad de compuestos bioactivos encapsulados durante el almacenamiento	55
6.3 Actividad antioxidante durante el almacenamiento.....	59
6.4 Actividad antidiabética durante el almacenamiento.....	61
6.5 Digestión <i>in vitro</i> de emulsiones dobles	62
6.5.1 Actividad antioxidante durante la digestión	62
6.5.2 Actividad antidiabética durante la digestión	64
6.5.3 Liberación de ácidos grasos durante la digestión	67
7. Conclusiones	69
8. Referencias.....	70

I. Índice de figuras

Fig. 1	Esquema del fruto de xoconostle. Se muestra (a) el fruto entero y (b) sus partes (Osorio-Esquivel et al., 2011).	9
Fig. 2	Estructuras moleculares de los flavonoides: kaempferol (1), quercetina (2), kaempferol 3-O- β -glucopiranosido (3), quercetina 3-O- β -glucopiranosido (4), quercetina 3-O- β -galactopiranosido (5), isoramnetina 3-O- β -glucopiranosido (6), quercetina 3-O-(6"-O-galoil) β -galactopiranosido (7), quercetina 3-O-(3"-O-galoil) - β galactopiranosido (8), quercetina 3-O-(6"-O-galloyl) - β -glucopiranosido (9), kaempferol 3-O-vicianosido (10), quercetina 3-O-vicianosido (11). La base de nomenclatura de los flavonoides se muestra en 1 como ejemplo (Şöhretoğlu et al., 2018).	14
Fig. 3	Estructura general de (a) ácido betalámico, (b) betacianinas y (c) betaxantinas. (Azeredo, 2009).	15
Fig. 4	Diagrama de dos tipos de microcápsulas. (A) Estructura de una sola partícula (B) Estructura agregada. Adaptado de Desai y Park (2007).	18
Fig. 5	Principales materiales y técnicas empleados en la microencapsulación de ingredientes funcionales y algunos métodos de liberación de componentes. Modificado de Corstens et al. (2017).	19
Fig. 6	Esquema de los dos principales tipos de emulsiones dobles. A Emulsión W/O/W y B Emulsión O/W/O. Adaptado de Khan, Talegaonkar, Iqbal, Ahmed y Khar (2006).	22
Fig. 7	Tipos de emulsiones dobles según el tamaño y distribución de las gotas internas. A Microcápsulas. B Multivesículas. C Microesferas. (Garti, 1997).	23
Fig. 8	Representación esquemática de las principales vías de desestabilización de las emulsiones dobles: A Coalescencia de las gotas externas. B Coalescencia de las gotas internas. C Coalescencia de las gotas internas con las gotas externas y D encogimiento o hinchamiento de las gotas internas (Dickinson, 2011).	25
Fig. 9	Representación esquemática de la preparación de emulsiones dobles por el método de dos etapas. Adaptado de Garti (1997).	28

Fig. 10	Curva patrón de ácido gálico empleada en la determinación de fenoles totales.	40
Fig. 11	Curva patrón de quercetina empleada en la determinación de flavonoides totales.	40
Fig. 12	Curva patrón de catequina empleada en la determinación de taninos.	42
Fig. 13	Fotomicrografías del Control : emulsión doble con el 40% de agua desionizada en la fase acuosa interna, ED20% : emulsión doble con el 20% de extracto de xoconostle en la fase acuosa interna, ED40% : emulsión doble con el 40% de extracto de xoconostle en la fase acuosa interna, ED60% : emulsión doble con el 60% de extracto de xoconostle en la fase acuosa interna a los días 0, 24 y 48 de almacenamiento a temperatura ambiente (20°C). Aumento: 100x.	50
Fig. 14	Eficiencia de encapsulación (%EE) de los tratamientos ED20%, ED40% y ED60%.	51
Fig. 15	Inhibición del radical DPPH [•] del extracto de xoconostle encapsulado durante la digestión.	63
Fig. 16	Inhibición del radical ABTS ^{•+} del extracto de xoconostle encapsulado durante la digestión.	64
Fig. 17	Inhibición de α -amilasa del extracto de xoconostle encapsulado durante digestión.	65
Fig. 18	Inhibición de α -glucosidasa del extracto de xoconostle encapsulado durante digestión.	66
Fig. 19	Comportamiento de la digestión de la fase lipídica de los tratamientos de emulsiones dobles durante la fase intestinal.	67

II. Índice de tablas

Tabla 1	Composición nutricional de frutos de xoconostle. ^A	10
Tabla 2	Propiedades de los diferentes tipos de emulsiones preparadas a partir de fases de agua y aceite.	20
Tabla 3	Aplicaciones recientes de emulsiones dobles en la encapsulación de compuestos funcionales.	30
Tabla 4	Tamaño de gota de los tratamientos de emulsiones dobles durante el almacenamiento.	48
Tabla 5	Viscosidad aparente de los tratamientos de emulsiones dobles durante el almacenamiento.	53
Tabla 6	Valores de pH de los tratamientos de emulsiones dobles durante el almacenamiento.	54
Tabla 7	Contenido de compuestos bioactivos (fenoles totales, flavonoides totales, betacianinas, betaxantinas y taninos) de emulsiones dobles W/O/W con extracto de xoconostle, durante el almacenamiento.	56
Tabla 8	Actividad antioxidante (DPPH [·] y ABTS ^{·+}) de emulsiones dobles W/O/W con extracto de xoconostle, durante el almacenamiento.	60
Tabla 9	Actividad antidiabética (inhibición de α -amilasa y α -glucosidasa [%]) de emulsiones dobles W/O/W con extracto de xoconostle, durante el almacenamiento.	62

III. Resumen

La diabetes es un padecimiento que afecta a millones de personas en el mundo. Recientemente los tratamientos naturales basados en plantas han cobrado interés debido a que no producen efectos secundarios como los fármacos. El xoconostle es un fruto ácido del cactus (*Opuntia* spp.) que posee fitoquímicos con actividad antidiabética, sin embargo, estos compuestos se degradan por factores externos lo cual limita su uso terapéutico. La técnica de microencapsulación mediante emulsiones dobles (ED) se utiliza para la protección de compuestos bioactivos. El objetivo de este trabajo fue evaluar la estabilidad de los compuestos bioactivos, actividad antioxidante y la actividad antidiabética de extractos de xoconostle encapsulados dentro de ED de tipo $W_1/O/W_2$ durante el almacenamiento y la digestión *in vitro*. Se prepararon emulsiones $W_1/O/W_2$ con diferentes fracciones másicas de extracto de xoconostle (20%, 40% y 60%). Se evaluaron la morfología, tamaño de gota, eficiencia de encapsulación, viscosidad, pH, fenoles totales, flavonoides totales, betalaínas, taninos, actividad antioxidante (DPPH[•] y ABTS^{•+}) y actividad antidiabética (inhibición de α -amilasa y α -glucosidasa) durante 48 días de almacenamiento y durante la digestión simulada. El tamaño de gota y la viscosidad de las muestras incrementaron proporcionalmente a la cantidad de extracto encapsulado. La eficiencia de encapsulación (EE) y la protección de la mayoría de compuestos bioactivos, actividad antioxidante y antidiabética fue mejor en el tratamiento ED40%. Aunque la digestión *in vitro* no impactó negativamente sobre la actividad antioxidante de los tratamientos, si disminuyó su efecto antidiabético significativamente ($p < 0.05$). Las ED protegieron los compuestos bioactivos, la actividad antioxidante y actividad antidiabética del xoconostle para ser utilizadas como alternativas de tratamiento de personas diabéticas.

Palabras clave: xoconostle, compuestos bioactivos, actividad antioxidante, actividad antidiabética, microencapsulación, emulsiones dobles $W_1/O/W_2$.

IV. Abstract

Diabetes is a chronic disease that affects millions of people worldwide. Natural plant-based treatments have recently gained interest because they do not produce side effects like drugs. Xoconostle is a cactus acidic fruit (*Opuntia* spp.) that has phytochemicals with antidiabetic activity, however, these compounds are degraded by external factors which limits their therapeutic use. The microencapsulation technique using double emulsions (DE) is used for protection of bioactive compounds. The objective of this work was to evaluate the stability of bioactive compounds, antioxidant activity and antidiabetic activity of xoconostle extracts encapsulated within $W_1/O/W_2$ DE during storage and in *in vitro* digestion. $W_1/O/W_2$ emulsions were prepared with different mass fractions of xoconostle extract (20%, 40% and 60%). Morphology, droplet size, encapsulation efficiency, viscosity, pH, total phenols, total flavonoids, betalains, tannins, antioxidant activity (DPPH[•] and ABTS^{•+}) and antidiabetic activity (inhibition of α -amylase and α -glucosidase) were evaluated for 48 days of storage and during simulated digestion. The droplet size and viscosity of the samples increased proportionally to the amount of encapsulated extract. The encapsulation efficiency (EE) and the protection of most bioactive compounds, antioxidant and antidiabetic activity resulted better in the ED40% treatment. Although *in vitro* digestion did not impact negatively on antioxidant activity of the treatments, its antidiabetic effect decreased significantly ($p < 0.05$). The ED protected the bioactive compounds, the antioxidant activity and antidiabetic activity of xoconostle extract. This method could be used as an alternative treatment for diabetic patients.

Key words: xoconostle, bioactive compounds, antioxidant activity, antidiabetic activity, microencapsulation, $W_1/O/W_2$ double emulsions.

1. Introducción

El término diabetes mellitus (DM) hace referencia a grupo de padecimientos metabólicos y endócrinos caracterizado por niveles crónicos y anormalmente altos de glucosa en la sangre (Soto-Estrada, Moreno, García-García, Ochoa y Silberman, 2018). Actualmente la diabetes mellitus es el padecimiento endócrino más común del planeta (Chinsebu, 2019). Las personas que padecen diabetes son más vulnerables a la aparición de otros problemas de salud que comprometen su calidad de vida (Cho et al., 2018). Debido a su alta prevalencia y al elevado gasto público que requiere su tratamiento (Chatterjee, Khunti, y Davies, 2017), la diabetes se considera un problema de salud pública mundial que requiere la disponibilidad de tratamientos efectivos novedosos y a bajo costo (Soni et al., 2018). La administración de fármacos conocidos como antidiabéticos orales es el principal tratamiento para la DM hoy en día. Existen diferentes fármacos que ejercen efecto hipoglucemiante por medio de distintos mecanismos de acción entre los que se encuentran los inhibidores de la glucosidasa (Arulselvan et al., 2014). Todos estos fármacos se han relacionado con la aparición de efectos secundarios, lo cual limita su aplicación (Soni et al., 2018). A pesar de los fármacos disponibles, todavía existe una gran parte de la población diabética sin acceso a la farmacoterapia o que, incluso con la disponibilidad de fármacos, busca opciones de tratamiento en la medicina tradicional (Salgueiro et al., 2018). En este sentido, el consumo de alimentos basados en plantas y en extractos de plantas (Alongi, Verardo, Gorassini y Anese, 2018) se ha reconocido como una estrategia atractiva para el tratamiento alternativo de la DM quizá debido a su bajo costo, sus menores efectos secundarios o su efectividad probada a lo largo de las generaciones.

El xoconostle (*Opuntia* spp.) es un fruto que se ha empleado tradicionalmente como tratamiento alternativo de la diabetes mellitus (González-Stuart y Rivera, 2019) y otros padecimientos (Morales, Ramírez-Moreno, Sánchez-Mata, Carvalho y Ferreira, 2012). Sus efectos antidiabéticos se han relacionado con su contenido de metabolitos secundarios como los compuestos fenólicos (Morales, Barros, Ramírez-Moreno, Santos-Buelga y Ferreira, 2015), los cuales han sido estudiados por su

capacidad de inhibir enzimas digestivas como la α -amilasa y la α -glucosidasa (Parada, Pérez-Correa y Pérez-Jiménez, 2019). Desafortunadamente, los polifenoles y en general los antioxidantes son moléculas susceptibles a la degradación por condiciones propias del almacenamiento o del tracto gastrointestinal, lo cual limita su actividad y compromete sus potenciales efectos benéficos a la salud (Fang y Bhandari, 2010). Teniendo en cuenta esto, la microencapsulación es una técnica efectiva que puede mejorar la conservación de estos compuestos bioactivos durante el almacenamiento (Ye, Georges y Selomulya, 2018) y la digestión (Fang y Bhandari, 2010).

Entre los diferentes métodos de encapsulación, las emulsiones dobles (ED) son sistemas con gran número de aplicaciones en la industria farmacéutica, cosmética y de alimentos (Dickinson, 2011). Existen varios tipos de emulsiones dobles pero las emulsiones dobles de tipo *agua-en-aceite-en-agua*, además de proteger compuestos bioactivos contra la degradación (Martins et al., 2020), ofrecen algunas ventajas atractivas adicionales. Las ED en general son sistemas inestables (Yildirim, Sumnu y Sahin, 2017) que deben ser cuidadosamente formulados para mantenerlos fisicoquímicamente estables y funcionales durante el almacenamiento. Por ello, en este proyecto se investigó el impacto de la fracción de extracto de xoconostle encapsulado dentro de emulsiones dobles sobre la estabilidad de los sistemas y los compuestos bioactivos responsables de su actividad antioxidante y antidiabética, con la finalidad de ofrecer alternativas para el desarrollo de ingredientes y alimentos con características funcionales.

2. Marco teórico

2.1 Diabetes

La diabetes, también conocida como diabetes mellitus, es probablemente una de las enfermedades más antiguas conocidas por el hombre. Fue reportado por primera vez en un manuscrito egipcio hace unos 3000 años (Olokoba, Obateru y Olokoba, 2012). Los términos "Diabetes" y "Mellitus" se derivan del griego "Diabetes" que denota "un transeúnte; un sifón", mientras que "Mellitus" denota "dulce". Se cree que los griegos lo llamaron así debido a las cantidades excesivas de orina producidas por los diabéticos (Piero, Nzaro y Njagi, 2014).

2.1.1 Fisiopatología

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica que se ha convertido en un problema de salud pública a nivel mundial (Chen, Wu, Zou y Gao, 2016). Este desorden es causado por un metabolismo anormal de los carbohidratos con un consecuente estado de hiperglicemia crónico que ocurre debido a deficiencias en la secreción de insulina, su acción, o ambas. La insulina es una hormona pancreática responsable de regular los niveles de glucosa en sangre como parte del metabolismo energético. Cuando hay hiperglicemia, el cerebro la detecta y envía un mensaje a través de impulsos nerviosos al páncreas y a otros órganos involucrados en el metabolismo de carbohidratos, a fin de que disminuyan su actividad. La homeostasis de la glucosa depende de la regulación hormonal del consumo de glucosa y la producción endógena de ésta, principalmente en el hígado, músculo y tejido adiposo. Una alteración en la homeostasis de la glucosa puede ocurrir por la combinación de uno o más factores que incluyen ocho mecanismos patofisiológicos (Santos, Freitas y Fernandes, 2018):

- Disminución en la secreción de insulina por las células β del páncreas
- Aumento en la secreción de glucagón por las células α del páncreas
- Aumento en la producción de glucosa en el hígado
- Disfunción de neurotransmisores y resistencia a la insulina
- Aumento de la lipólisis
- Incremento de la reabsorción renal de glucosa

- Disminución del efecto de las incretinas en el intestino delgado
- Deterioro o disminución de la captación de glucosa en tejidos periféricos como el musculo esquelético, tejido adiposo e hígado, que resulta en una condición de hiperglicemia.

2.1.2 Clasificación

La diabetes mellitus puede clasificarse con base en diferentes criterios, sin embargo, según la Asociación Americana de Diabetes, la clasificación más común es la siguiente (Asmat, Abad e Ismail, 2016; Crawford, 2017):

- **Diabetes tipo I (insulinodependiente):** Causada por la destrucción autoinmune de las células β del páncreas, ocasionando deficiencia de insulina.
- **Diabetes idiopática:** Es la diabetes tipo I sin etiología conocida y es un tipo de diabetes altamente heredada.
- **Diabetes tipo II (no-insulinodependiente):** Causada por un defecto en la secreción de insulina y resistencia a la insulina.
- **Diabetes mellitus gestacional:** Es cualquier forma de intolerancia a la glucosa con inicio o primer reconocimiento en el embarazo

Sin embargo, generalmente la diabetes se clasifica en dos tipos principales: diabetes tipo I y diabetes tipo II (Asmat et al., 2016). La diabetes tipo II propiamente ocurre cuando el cuerpo no puede utilizar la insulina que produce, disminuyendo la capacidad de regular el metabolismo de la glucosa, en un mecanismo conocido como resistencia a la insulina (Crawford, 2017). Con la progresión de la enfermedad el páncreas eventualmente disminuye la producción de insulina (deficiencia de insulina) promoviendo la hiperglicemia y otras complicaciones y daños como la disfunción y falla multiorgánica o de tejidos, y complicaciones metabólicas importantes como la neuropatía, retinopatía, nefropatía, enfermedades cardiovasculares y amputación de extremidades (Santos et al., 2018; Vilcacundo, Martínez-Villaluenga y Hernández-Ledesma, 2017). La diabetes mellitus tipo II es la más frecuente (90%) y es el tipo de diabetes asociada con la obesidad (Paiz et al., 2010). La obesidad a su vez es una enfermedad crónica de etiología multifactorial

que se desarrolla a partir de la interacción de la influencia de factores sociales, de comportamiento, psicológicos, metabólicos, celulares y moleculares. En general, se define como el exceso de grasa (tejido adiposo) en relación con el peso (Soto-Estrada et al., 2018).

2.1.3 Epidemiología

La Federación Internacional de Diabetes (FID) estimó que la diabetes mellitus impacta a 415 millones de personas en el mundo y que 315 millones de personas más viven con cierto grado de intolerancia a la glucosa, lo cual los pone en riesgo para desarrollar diabetes en un futuro (Chávez-Silva et al., 2018). En México, la diabetes mellitus es la segunda causa de muerte y la enfermedad crónico-degenerativa más importante (Paiz et al., 2010). Según datos de la misma FID, en 2015, México ocupó el sexto lugar mundial en prevalencia de diabetes con un estimado de 11.4 millones de mexicanos afectados, cifra que podría aumentar hasta los 17.5 millones en 2040 (Soto-Estrada et al., 2018). La Encuesta Nacional de Salud (ENSA) y la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2006, 2012 y 2016 señalan que la prevalencia de diabetes en México presenta un patrón de distribución heterogéneo, es decir, mayor en áreas urbanas (8.2%, 15.5%, 9.7% y 9.4%, respectivamente) que en áreas rurales (5.6%, 10.4%, 7% y 9.2%, respectivamente). De acuerdo con estas mismas encuestas, la ceguera adquirida por complicaciones de la diabetes también incrementó de 6.4 a 9.9% entre 2006 y 2016 y la tasa de amputación de extremidades inferiores de 1.9% a 5.5%. Debido a que la diabetes tipo II se asocia con la obesidad, no es de extrañar que la prevalencia de sobrepeso y obesidad en la población mexicana adulta refleje un incremento de 71.2% en 2012 a un 72.5% en 2016 (Pablo-Gutierrez et al., 2012; Shamah-Levy et al., 2018).

2.1.4 Tratamiento de la diabetes mellitus tipo II

Las estrategias terapéuticas para el control eficaz de la diabetes mellitus tipo II en sus primeras etapas se basan en la modificación de los hábitos dietéticos, pautas para la realización de ejercicio físico y la administración de agentes

hipoglucemiantes (fármacos) (Ahmad y Crandall, 2010; Paiz et al., 2010; Vilcacundo et al., 2017).

El tratamiento farmacológico de la diabetes tipo II consiste en diferentes grupos de fármacos que muestran diferentes mecanismos de acción, debido a que actúan en distintos objetivos terapéuticos; sin embargo, todos se enfocan en la reducción y control de los niveles de glucosa en sangre y por lo tanto en sus complicaciones. Estos fármacos se clasifican de acuerdo con sus efectos biológicos como: secretagogos de insulina (sulfonilureas, meglitinidas, inhibidores de la dipeptidil peptidasa 4 [DPP-4] e incretinomiméticos), sensibilizadores de insulina (biguanidas, tiazolindinedionas), antihiperlipemiantes (acarbose), inhibidores de la recaptura de glucosa (glifozina) (Chávez-Silva et al., 2018), inhibidores del cotransportador sodio-glucosa e inhibidores de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa (Olokoba et al., 2012; Santos et al., 2018; Şöhretoğlu, Sari, Barut y Özel, 2018). A pesar de la diversidad de fármacos, con frecuencia un solo fármaco no es suficiente para el control eficiente de la enfermedad y una vez que la diabetes alcanza su etapa degenerativa, el tratamiento se vuelve costoso y generalmente inaccesible para la mayoría de las personas de países en vías de desarrollo (Paiz et al., 2010).

2.2 Inhibidores de la α -amilasa y α -glucosidasa

La α -amilasa es una enzima que hidroliza los polisacáridos de la dieta y los transforma en oligosacáridos, mientras que la α -glucosidasa es una enzima que cataliza el paso final en la hidrólisis de los carbohidratos para la obtención de monosacáridos a partir de los disacáridos y oligosacáridos liberados por α -amilasa (de Melo, Silveira y Carvalho, 2006; Xu et al., 2018). Los inhibidores de estas enzimas entonces previenen la transformación de polisacáridos, oligosacáridos y disacáridos en monosacáridos absorbibles, lo que a su vez conduce a una digestión o absorción retardada de los carbohidratos intestinales reduciendo la hiperglicemia posprandial (Chen et al., 2016). Sin embargo, los fármacos inhibidores comercializados actualmente son de elevado costo y han sido comúnmente asociados con efectos secundarios como hepatotoxicidad, atrofia cerebral, anorexia nervosa, etc. (Soni et al., 2018). Además, la mayoría de los inhibidores sintéticos

como la acarbosa o el miglitol tienen fuertes propiedades inhibitorias, lo que causa una fermentación anormal de sacáridos no digeridos en el colon (Herrera, del Hierro, Fornari, Reglero y Martin, 2019) ocasionando dolor abdominal y flatulencia.

Por ello, es importante buscar nuevos potenciales inhibidores con menores efectos adversos (Şöhretoğlu et al., 2018). En este sentido, los medicamentos de origen natural han despertado gran interés. El consumo de inhibidores de la α -glucosidasa análogos naturales y derivados de alimentos o suplementos de origen vegetal ofrece una estrategia atractiva para controlar la hiperglucemia posprandial debido a su bajo costo y baja incidencia de los principales efectos secundarios indeseables (Chen et al., 2016). De hecho, La Organización Mundial de la Salud reconoce el uso de productos naturales como tratamientos baratos y efectivos contra la diabetes, sin embargo, el mal uso terapéutico de estas opciones naturales también podría acarrear consigo alteraciones en la salud, por lo que la evaluación científica de los riesgos y beneficios de este tipo de terapias adquiere relevancia (Paiz et al., 2010).

2.3 Medicina tradicional contra la diabetes

Existen actualmente buena cantidad de estudios científicos que confirman la actividad farmacológica de ciertos extractos naturales de fuentes muy diversas contra algunos padecimientos de tipo crónico. Por ejemplo, se ha reportado que el extracto de arándano (*Vaccinium* spp.) posee actividad biológica en padecimientos oftalmológicos, presión arterial y colesterol, así como propiedades antidiabéticas y protección contra el estrés oxidativo, siendo estos beneficios atribuidos principalmente a compuestos fenólicos como las antocianinas, ácidos fenólicos y proantocianidinas, los cuales se encuentran ampliamente distribuidos en muchas plantas y frutos como metabolitos secundarios (Wu et al., 2017).

También se ha reportado que el consumo de manzana o extracto de manzana reduce el riesgo de padecer enfermedades crónicas como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y diabetes tipo II. Estos efectos protectores son principalmente atribuidos, de igual manera, a compuestos antioxidantes como los polifenoles, y en particular a los compuestos químicos de las familias de los flavones, flavonoles,

ácidos hidroxicinámicos y antocianidinas. Igualmente, se cree que los compuestos fenólicos inhiben la enzima α -glucosidasa, la cual tiene implicaciones importantes en el metabolismo de los carbohidratos (Alongi et al., 2018).

En otro estudio se demostró que ciertos flavonoides como la fisetina (FS), presentes en alimentos como la fresa, la manzana, el caqui o palosanto (*Diospyros kaki*), la uva, la cebolla y el pepino, poseen múltiples actividades farmacológicas incluyendo propiedades antidiabéticas al regular la glucogenólisis y la gluconeogénesis *in vitro*. Estos efectos se atribuyen a su capacidad antioxidante (Prasath y Subramanian, 2011).

Debe destacarse que la mayoría de estos potenciales efectos benéficos a la salud son atribuibles a diversos compuestos antioxidantes presentes en los especímenes descritos, sin embargo, el tipo de público que se vería mayormente beneficiado del consumo de estos extractos son personas con padecimientos crónicos como la diabetes, en los cuales el consumo de extractos de frutos y en general de alimentos ricos en azúcares, debe ser regulado. Debido a esto, este proyecto se ha orientado a un fruto con menor contenido de azúcares en su composición, pero con los mismos compuestos biológicos deseables. Este fruto se conoce como xoconostle (*Opuntia* spp.). El uso tradicional de plantas del género *Opuntia* para tratar la diabetes mellitus ha estimulado varias investigaciones destinadas a determinar las cualidades atribuidas a esta especie (Paiz et al., 2010).

2.4 Xoconostle

El xoconostle (*Opuntia* spp.) pertenece a la familia de las cactáceas y es una especie endémica de México con distribución en la región centro occidental, en los estados de Durango, Zacatecas, Aguascalientes, San Luis Potosí, Jalisco, Michoacán, Querétaro e Hidalgo (Arreola, 1988). México tiene alrededor de 15 especies reconocidas de xoconostle, pero hay otras 20 o más especies endémicas no reconocidas (Espinosa-Muñoz et al., 2016).

El xoconostle es un fruto que posee un color rojo-rosado por fuera y amarillo-rosado por dentro, mientras que las semillas son de color rojo intenso (Osorio-Esquivel,

Ortiz-Moreno, Álvarez, Dorantes-Álvarez y Giusti, 2011). Existen diferentes especies y variedades de xoconostle, sin embargo, en todas ellas se pueden distinguir tres partes principales: el epicarpio (cáscara de la fruta delgada, 0.18 ± 0.05 cm de grosor), el mesocarpio (pulpa del xoconostle, 1.21 ± 0.14 cm de grosor) y el endocarpio (parte mucilaginosa que contiene las semillas) (Fig. 1), de las cuales el pericarpio y el endocarpio son generalmente desechados antes del consumo (Osorio-Esquivel et al., 2011; Pérez-Alonso et al., 2015).

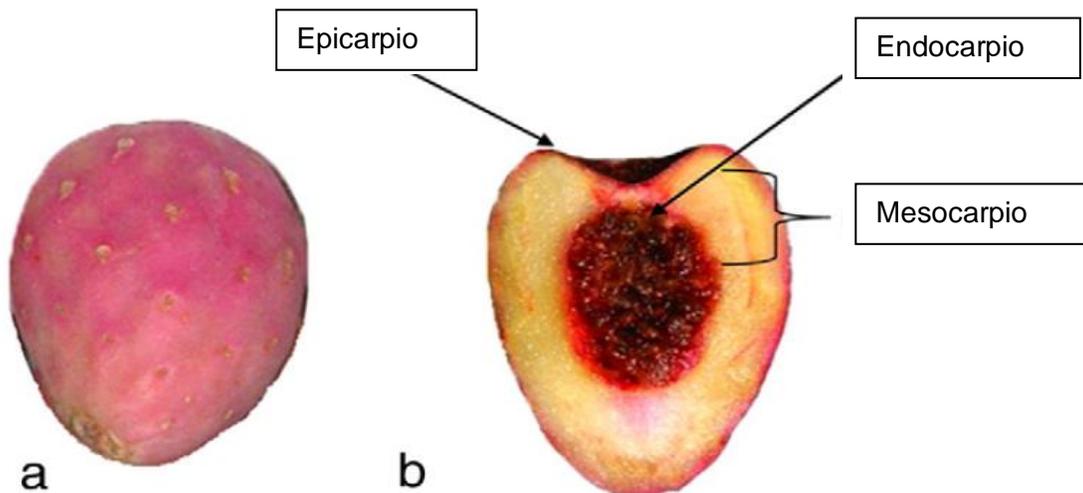


Fig. 1. Esquema del fruto de xoconostle. Se muestra (a) el fruto entero y (b) sus partes. (Osorio-Esquivel et al., 2011).

El xoconostle típicamente crece en áreas semiáridas en el centro y norte de México, donde prospera igualmente bien en “nopaleras” silvestres (comunidades de plantas dominadas por *Opuntia* spp.); huertos y plantaciones comerciales. Es un arbusto que mide hasta 2,0 m de altura, con un tallo bien definido. Los cladodios obovados, ovados o romboides miden hasta 28 cm de largo por 21 cm de ancho; la epidermis es glabra (ocasionalmente cerosa), verde claro (ligeramente amarillenta) con manchas púrpuras debajo de las areolas en invierno; Los frutos presentan formas globosas a subglobosas y cilíndricas, de 3.5 cm de largo y hasta 5.5 cm de diámetro, con una cicatriz floral de color verde amarillento hundido, fácilmente reconocible por una cáscara gruesa con una consistencia blanda y sabor ácido (Paiz et al., 2010). El xoconostle tiene gran relevancia debido a que crece en zonas áridas y semiáridas, donde la accesibilidad a otros vegetales es baja (Morales et al., 2012).

2.4.1 Composición química del xoconostle

El xoconostle contiene azúcares de rápida digestibilidad, fibra dietética, ácido ascórbico, polifenoles, carotenoides y betacianinas (Espinosa-Muñoz et al., 2016; Hernández-Fuentes et al., 2015), los cuales se sabe que poseen actividad como hipoglucemiantes o hipolipemiantes y antioxidantes (Morales et al., 2012). En la Tabla 1 se muestra la composición proximal de la pulpa y las semillas de dos variedades de xoconostle.

Tabla 1

Composición nutricional de frutos de xoconostle. ^A

Parámetros nutricionales	<i>Opuntia joconostle</i> cv. Cuaresmeño		<i>Opuntia matudae</i> cv. Rosa	
	Pulpa	Semillas	Pulpa	Semillas
Humedad	93.24±0.02	73.95±1.09	94.11±0.00	60.44±0.66
Proteína	0.66±0.01	2.12±0.00	0.56±0.00	3.45±0.02
Grasa	0.03±0.0	2.45±0.05	0.04±0.00	3.52±0.12
Carbohidratos totales ^B	3.69	1.71	3.93	1.56
Azúcares solubles	2.02±0.09	0.95±0.09	1.56±0.17	1.47±0.19
Fructosa	1.38±0.03	0.71±0.07	0.87±0.03	0.99±0.12
Glucosa	0.37±0.05	0.15±0.01	0.35±0.13	0.34±0.05
Sacarosa	0.27±0.01	0.09±0.00	0.34±0.01	0.14±0.02
Fibra dietética total	2.31±0.12	19.22±0.15	1.74±0.07	30.1±0.64
Fibra insoluble	1.45±0.07	18.85±0.12	1.16±0.01	29.04±0.57
Fibra soluble	0.86±0.05	0.36±0.03	0.58±0.07	1.13±0.07
Cenizas	0.07±0.00	0.54±0.01	0.11±0.00	0.85±0.04

^A Los resultados se expresan como g/100g de peso fresco. La media ± DE, n=3.

^B Los carbohidratos totales se calcularon como la diferencia de los valores de humedad, proteína, grasa, cenizas y fibra. (Morales et al., 2012).

2.4.2 Consumo de xoconostle en México

El consumo típico de xoconostle en la dieta de una población rural mexicana es realmente bajo (0.62 g de materia fresca de porción comestible / día / persona) en comparación con el consumo de verduras convencionales tales como los tomates o las papas (24.67 y 16.64 g de materia fresca de porción comestible / día / persona respectivamente). El consumo bajo de xoconostle se atribuye, entre otras cosas, a la falta de conocimiento del potencial del fruto o bien al desplazamiento de estos productos regionales por productos con bajo valor nutricional (Hervert-Hernández, García, Rosado y Goñi, 2011; Morales et al., 2015).

2.4.3 Uso tradicional del xoconostle

Es una fruta ácida ampliamente consumida fresca o procesada en mermeladas, dulces, polvos, jugos, salsas picantes y bebidas alcohólicas (Hernández-Fuentes et al., 2015; Morales et al., 2012; Morales et al., 2015; Osorio-Esquivel et al., 2011; Pérez-Alonso et al., 2015).

En México, el uso de especies de *Opuntia* (pertenecientes a la familia *Cactaceae*) es un tratamiento alternativo que se usa comúnmente para la diabetes desde tiempos antiguos. Esta planta se puede tomar antes del desayuno preparando un batido hecho con el mesocarpio. Las especies más utilizadas para este propósito incluyen *O. joconostle* silvestre, *O. leucotricha* y *O. streptacantha*, y *O. ficus indica* Mill y *O. matudae* Scheinvar, esta última cultivada comercialmente en el Estado de México (Paiz et al., 2010).

El consumo de xoconostle, debido a su contenido de polifenoles, puede ayudar a mejorar la salud humana; contribuyendo a la prevención de enfermedades crónicas y otros problemas en los seres humanos, como diabetes, obesidad y enfermedades respiratorias (Morales et al., 2012). Pimienta-Barrios, Méndez-Morán, Ramírez-Hernández, García de Alba-García y Domínguez-Arias (2008) reportaron que el pericarpio de frutos de xoconostle ayuda a disminuir los niveles de colesterol en la sangre y a aumentar la insulina. De hecho, tradicionalmente se utiliza este fruto para tratar empíricamente algunas de estas enfermedades desde hace ya muchos años.

2.4.4 Actividad antidiabética del xoconostle

El efecto antidiabético del xoconostle ha sido confirmado científicamente en algunos ensayos *in vitro* e *in vivo*. Medina-Pérez et al. (2019) evaluaron la actividad antidiabética *in vitro* de distintas partes morfológicas del fruto de xoconostle (endocarpio, mesocarpio, pericarpio y fruto completo), en términos de poder de inhibición de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa. Los autores reportaron un poder antidiabético mayor en el fruto completo dependiente de la concentración, que se mantuvo incluso después de la digestión simulada ($\approx 50\%$ de inhibición de las 2 enzimas). Paiz et al. (2010) administraron un extracto acuoso liofilizado de

mesocarpio y cladodios de xoconostle a un modelo biológico de 40 ratas macho de la cepa Wistar durante 12 semanas, demostrando que los animales que habían sido suplementados con 100 mg de extracto liofilizado / kg de peso mostraban una disminución estadística ($p < 0.01$) de la glucosa en comparación con el grupo control (animales suplementados con agua).

La importante actividad antidiabética y antioxidante que exhiben los frutos de xoconostle se han relacionado con cantidades importantes de polisacáridos, además de lignanos, flavonoles y ácidos fenólicos presentes en su composición (Aruwa, Amoo y Kudanga, 2018).

2.5 Principales compuestos bioactivos del xoconostle

Este fruto ha sido estudiado por la presencia de compuestos bioactivos como betacianinas y diversos compuestos fenólicos. Los efectos benéficos de este fruto, al igual que los de otros frutos, se han atribuido a su actividad antioxidante relacionada con la composición y concentración de compuestos fenólicos (Osorio-Esquivel et al., 2011). Algunos autores han estudiado el valor de los subproductos del xoconostle como lo son el pericarpio (cáscara) y el endocarpio (semillas) y han reportado cantidades importantes de otros nutrimentos como el α -tocoferol y ácido ascórbico (Morales et al., 2015).

2.5.1 Compuestos fenólicos

El xoconostle es un fruto rico en compuestos fenólicos. Los compuestos fenólicos se pueden definir como sustancias que poseen un anillo aromático, que llevan uno o más grupos hidroxilo, incluidos sus derivados funcionales (Andrés-Lacueva et al., 2010). Las plantas pueden contener una gran variedad de derivados fenólicos que incluyen fenoles simples, fenilpropanoides, derivados de ácidos benzoicos, flavonoides, estilbenos, taninos, lignanos y ligninas. Los ácidos fenólicos constituyen aproximadamente un tercio de los fenoles dietéticos, que pueden estar presentes en las plantas en forma libre y unida. Los compuestos fenólicos tienen funciones como antibióticos, pesticidas naturales, agentes protectores contra la luz ultravioleta (UV), materiales aislantes para hacer que las paredes celulares sean

impermeables al gas y al agua, y como materiales estructurales para dar estabilidad a las plantas. Muchas propiedades de las plantas, como la astringencia, los efectos benéficos para la salud o sus posibles propiedades antinutricionales están asociadas con la presencia, el tipo y el contenido de sus compuestos fenólicos (Osorio-Esquivel et al., 2011). Los compuestos fenólicos del xoconostle son de particular interés en esta investigación puesto que se cree que pueden tener efecto inhibitorio sobre la α -glucosidasa intestinal reduciendo la glicemia posprandial.

2.5.2 Flavonoides

Los flavonoides comprenden un amplio grupo de metabolitos secundarios producidos por las plantas. Son polifenoles derivados de la benzo-4H-pirona los cuales en general contienen dos anillos aromáticos (A y B) unidos a través de un anillo 4H-pirano (C) y se clasifican según el estado de oxigenación y la instauración de la unidad C3. Las principales subclases de flavonoides son las flavonas, flavonoles, flavanonas, flavan-3-oles e isoflavonas. En la naturaleza se encuentran como glucósidos y sus residuos glucosídicos pueden tener sustituyentes unidos a ellos. Son parte importante de la dieta humana ya que se encuentran en alimentos como las verduras, frutas, el té, el cacao, el vino (Şöhretoğlu et al., 2018) y el xoconostle (Aruwa et al., 2018). Recientemente, Ng y See (2019) reportaron que los flavonoides de las plantas tienen potencial antidiabético mediante la inhibición de enzimas que hidrolizan carbohidratos, incluso después de la digestión. La estructura molecular de algunos flavonoides comunes se muestra en la Fig. 2.

2.5.3 Betalaínas

Los frutos de xoconostle deben su color a la presencia de betalaínas, que son pigmentos N-heterocíclicos solubles en agua depositados en vacuolas. El ácido betalámico es el precursor común de estos compuestos que consiste en un sistema de 1,7 diazaheptametina, un sistema extendido de electrones π que exhibe un color amarillo canario. El ácido betalámico se puede condensar con ciclo-Dopa para producir betanidina, el aglicón precursor común de las betacianinas rojas. La beta-

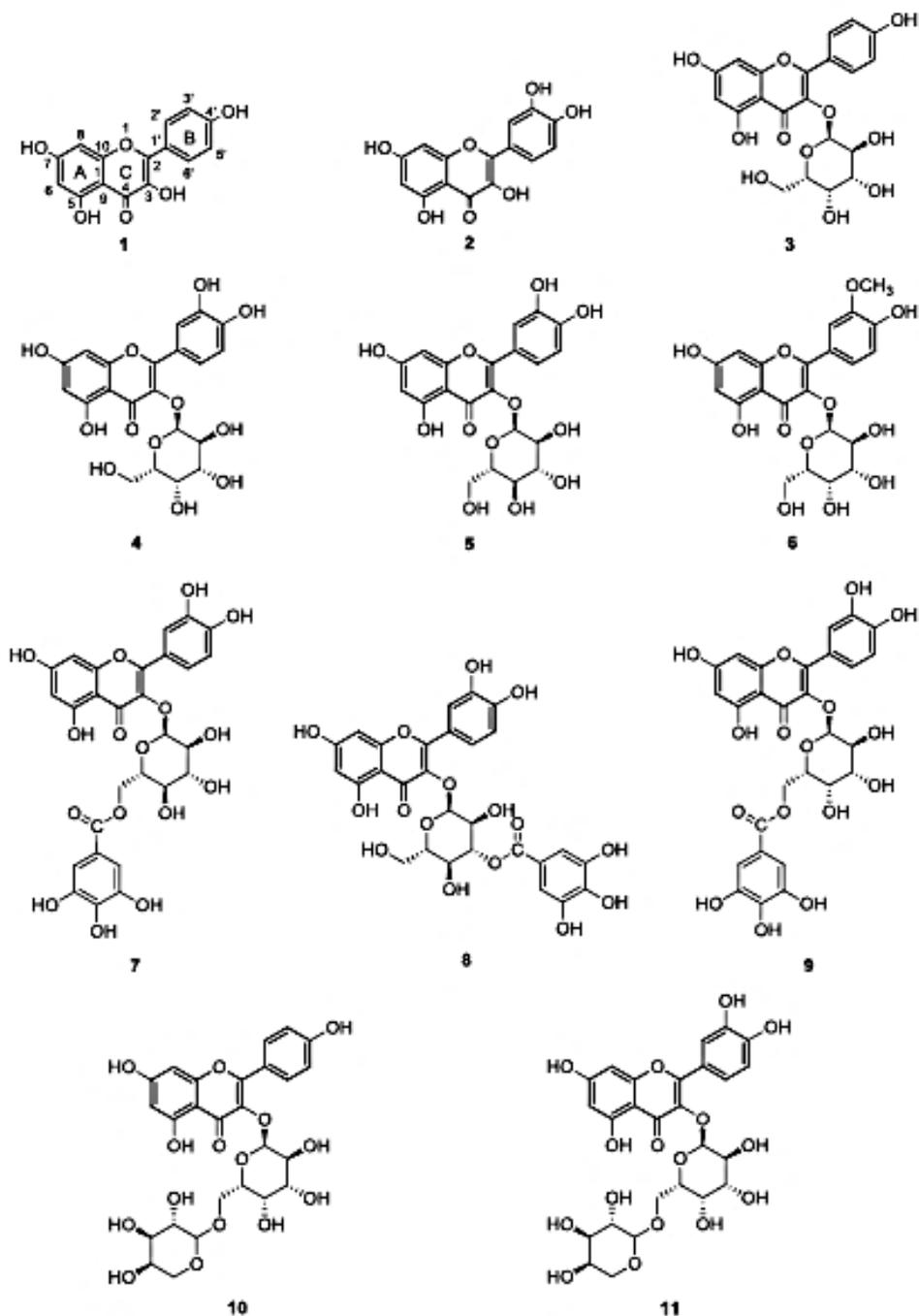


Fig. 2. Estructuras moleculares de los flavonoides: kaempferol (1), quercetina (2), kaempferol 3-O- β -glucopiranosido (3), quercetina 3-O- β glucopiranosido (4), quercetina 3-O- β -galactopiranosido (5), isoramnetina 3-O- β -glucopiranosido (6), quercetina 3-O-(6"-O-galoil) β -galactopiranosido (7), quercetina 3-O-(3"-O-galoil) - β galactopiranosido (8), quercetina 3-O-(6"-O-galloil) - β -glucopiranosido (9), kaempferol 3-O-vicianosido (10), quercetina 3-O-vicianosido (11). La base de nomenclatura de los flavonoides se muestra en el número 1 como ejemplo (Şöhretoğlu et al., 2018).

nidina a su vez puede estar glicosilada y / o acilada, produciendo 29 estructuras genuinas conocidas hasta la fecha. Debido al estereoisomerismo en C15, su número se duplica, a excepción de la neobetaina (14,15 dehidrobetaina) que está desprovista del centro quiral en C-15.

Las betalaínas más importantes de los frutos de cactus son las betacianinas (de color rojo) y betaxantinas (de color amarillo), las cuales han demostrado ser potentes pigmentos antioxidantes (Osorio-Esquivel et al., 2011). Diversos estudios han demostrado que las betalaínas presentes en la dieta son capaces de inhibir la formación de tumores *in vivo* en modelos de ratones y la proliferación de células cancerosas en ensayos con líneas celulares (Gandía-Herrero y García-Carmona, 2013). No obstante, la estabilidad de las betalaínas se ve afectada por factores como la actividad de agua, la exposición al oxígeno, la luz y la temperatura, por lo que su biodisponibilidad en productos adicionados se ve comprometida por las condiciones de almacenamiento o manipulación (Otálora, Carriazo, Iturriaga, Nazareno y Osorio, 2015). La Fig. 3 muestra la estructura química general de las betalaínas.

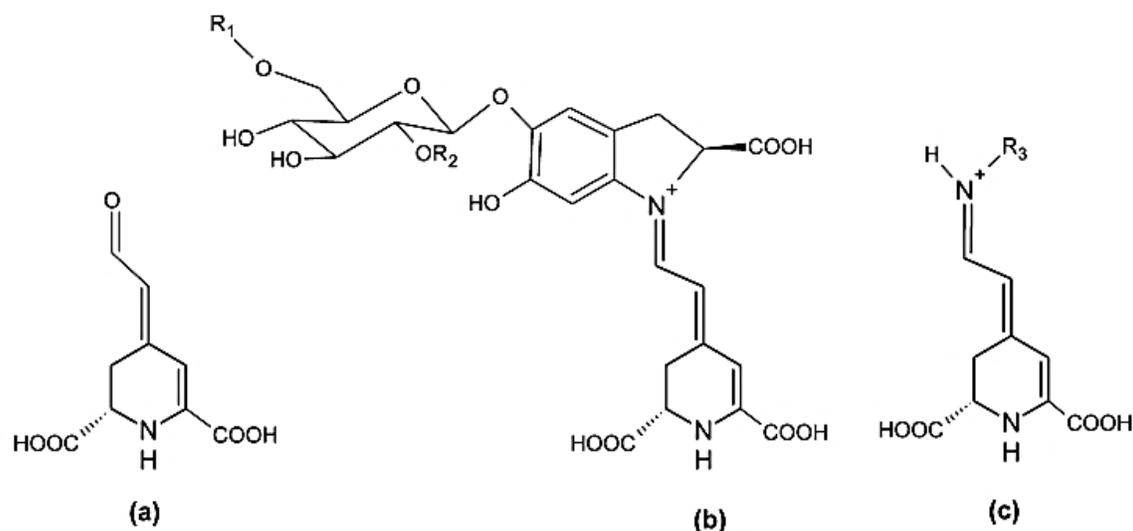


Fig. 3. Estructura general de (a) ácido betalámico, (b) betacianinas y (c) betaxantinas. (Azeredo, 2009).

2.5.4 Taninos

El xoconostle contiene otro tipo de compuestos bioactivos conocidos como taninos (Guzmán-Maldonado et al., 2010), los cuales se ha reportado que poseen actividad inhibitoria contra las enzimas α -amilasa y glucoamilasa (Links, Taylor, Kruger y Taylor, 2015). Los taninos se definen como compuestos fenólicos solubles en agua que tienen pesos moleculares de entre 500 y 5000 D. Son compuestos conocidos por su capacidad de unión con otras moléculas como alcaloides, gelatina y otras proteínas, entre otros. Se pueden clasificar en dos categorías: taninos hidrolizables y no hidrolizables o condensados. Los taninos hidrolizables contienen un núcleo central de alcohol polihídrico como la glucosa y los grupos hidroxilo, los cuales están esterificados parcial o totalmente con el ácido gálico (galotaninos) o con el ácido hexahidroxi-difenico (elagitaninos). De este modo, la hidrólisis química o enzimática de los galotaninos produce glucosa y ácido gálico, mientras que la lactonización del ácido hexahidroxi-difenico presente en los elagitaninos se emplea para producir el ácido elágico. Por otro lado, la estructura de los taninos condensados es más compleja. Son principalmente productos polimerizados de flavan-3-oles y flavan-3,4-dioles, o una mezcla de ambos. Los taninos condensados se encuentran presentes en gran variedad de frutos, vegetales, cacao, vino tinto, sorgo, mijo y las leguminosas (Chung, Wong, Wei, Huang y Lin, 1998).

Los taninos, al igual que los flavonoides y otros compuestos relacionados, son compuestos fenólicos antioxidantes capaces de sufrir reacciones de oxidación y perder su actividad biológica con rapidez, especialmente cuando se encuentran en medios acuosos como el intestino (de Souza et al., 2018). Sechi et al. (2016) señalan que, a pesar de los efectos beneficiosos de antioxidantes en la prevención y el tratamiento de enfermedades, su baja solubilidad en agua, su inestabilidad química, su absorción deficiente y su metabolismo extenso y rápido contribuyen dramáticamente a su baja biodisponibilidad, lo que limita su aplicación clínica. En este contexto, la encapsulación de estos compuestos puede ayudar a superar estas limitaciones fisicoquímicas y farmacocinéticas.

2.6 Microencapsulación de compuestos bioactivos

Los compuestos de los alimentos se han clasificado en diferentes categorías según su estructura química y funciones: compuestos bioactivos solubles en agua que incluyen citratos, norbixina, betalainas, la mayoría de los compuestos fenólicos, flavonoides y antocianinas, y componentes solubles en lípidos como carotenoides, tocoferoles, terpenoides y vitamina E (Carocho, Morales y Ferreira, 2018). No obstante, la actividad antioxidante de las sustancias bioactivas puede verse obstaculizada debido a su degradación provocada por la luz, el oxígeno, la temperatura, la humedad y la existencia de enlaces insaturados en las estructuras moleculares (Ozkan, Franco, De Marco, Xiao y Capanoglu, 2019; Pimentel-González, et al., 2015). Por lo tanto, la microencapsulación es una tecnología alternativa para mejorar la estabilidad de los compuestos bioactivos durante el almacenamiento y la digestión, permitiéndoles mantener su potencial biológico como antioxidantes (Fang y Bhandari, 2010) o, en este caso, como inhibidores naturales de las enzimas α -glucosidasa y α -glucosidasa (efecto antidiabético).

2.6.1 Definición

La microencapsulación de componentes funcionales es un proceso de atrapamiento de compuestos bioactivos (material del núcleo) dentro de una o más clases de materiales de cubierta (material de pared) para fabricar una cápsula, típicamente de unos pocos micrones de diámetro, denominada microcápsula (Fig. 4). Por lo general, varias propiedades de las microcápsulas como su forma final y el tamaño de partícula pueden modificarse dependiendo del modo e ingredientes de preparación, por lo que la clasificación de su arquitectura es, en la mayoría de los casos arbitraria (Desai y Park, 2007). El proceso de microencapsulación consiste en recubrir uniformemente los ingredientes funcionales con materiales de grado alimentario y biodegradables para separar la fase interna y la matriz circundante.

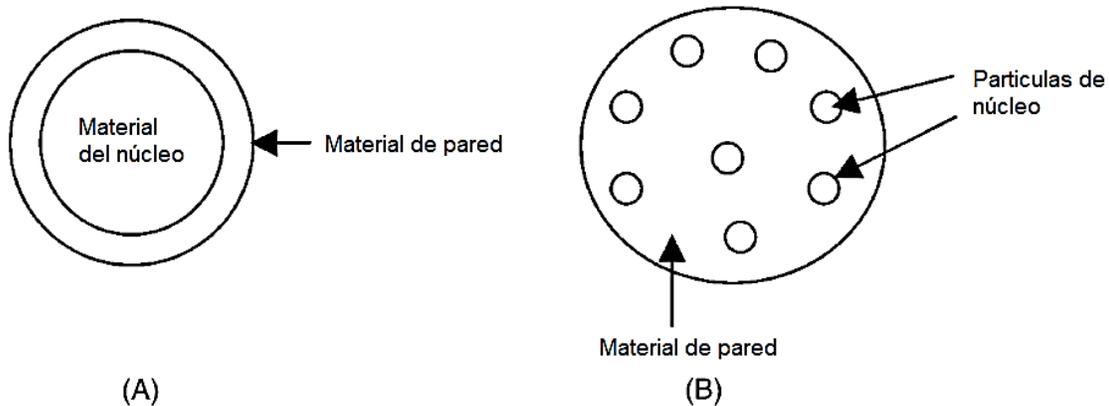


Fig. 4. Diagrama de dos tipos de microcápsulas. **(A)** Estructura de una sola partícula **(B)** Estructura agregada. Adaptado de Desai y Park (2007).

2.6.2 Funciones de la microencapsulación

El objetivo principal de la encapsulación de componentes funcionales es proteger un material de condiciones adversas que pueden dañarlos como la luz, el oxígeno y la humedad; sin embargo, en la industria de alimentos, la encapsulación puede realizarse con una mayor variedad de propósitos (Fang y Bhandari, 2010):

- Protección de un material de la degradación mediante la reducción de la interacción con el ambiente externo.
- Reducción de la evaporación o transferencia del material al ambiente
- Modificación de las características físicas de un material para facilitar la manipulación.
- Control de la liberación de un material en el tiempo o en un momento en particular.
- Enmascaramiento de sabores o texturas desagradables de un material.
- Dilución de un material que se requiere en cantidades muy pequeñas, a la vez que se consigue una distribución uniforme del material en un excipiente.
- Separación de componentes de una mezcla que de otra forma reaccionarían entre sí.

2.6.3 Métodos de microencapsulación

La microencapsulación se puede realizar a través de secado por aspersion (Li, Woo, Patel y Selomulya, 2017), con el potencial de ajustar las propiedades coloidales y de la superficie del material de alimentación y su comportamiento de liberación controlada. Otras técnicas comunes que se han utilizado ampliamente para fabricar microcápsulas en la industria alimentaria son el revestimiento de lecho fluidizado, polimerización, coacervación interfacial (Ozkan et al., 2019; Ye et al., 2018), formación de liposomas, separación por suspensión centrifuga, cocrystalización y la encapsulación mediante emulsiones (Fang y Bhandari, 2010). La Fig. 5 muestra algunas de las principales características de los microencapsulados comúnmente utilizados en la industria de alimentos.

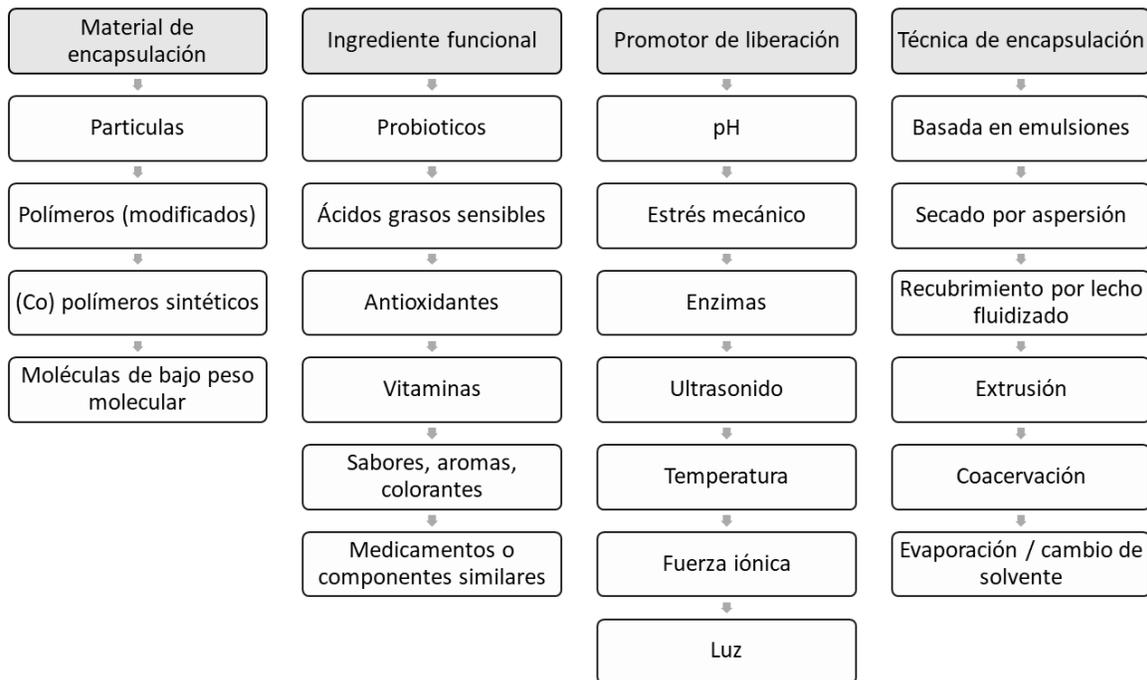


Fig. 5. Principales materiales y técnicas empleados en la microencapsulación de ingredientes funcionales y algunos métodos de liberación de componentes. Modificado de Corstens et al. (2017).

2.7 Emulsiones

Algunos métodos de encapsulación se basan en emulsiones. En general, una emulsión es un sistema que se compone de por lo menos dos líquidos inmiscibles (típicamente agua y aceite, aunque no siempre), en el cual uno de esos dos líquidos

se ha dispersado en el otro en forma de pequeñas gotas esféricas con ayuda de un emulsificante y fuerza mecánica (Kale y Deore, 2017). Una macroemulsión (emulsión convencional), contiene gotas con diámetros promedio de entre 100 nm y 100 μm . Estas emulsiones son termodinámicamente inestables y suelen ser turbias u opacas a la vista debido a que las gotas de ese tamaño poseen un tamaño similar a la longitud de onda de la luz y suelen dispersarla fuertemente. Así mismo, una nanoemulsión (de igual composición que una macroemulsión, pero con gotas bastante más pequeñas) posee gotas de entre 20-100 nm, lo que las vuelve mucho menos opacas o casi transparentes, sin embargo, siguen siendo termodinámicamente inestables debido a que las fases separadas tienen una energía libre más baja que las fases de aceite y agua emulsionadas. En contraste, una microemulsión es un sistema termodinámicamente estable con diámetros de gota de entre 5-50 nm, lo que las vuelve ópticamente transparentes (McClements, 2010). Las principales características de las emulsiones se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2

Propiedades de los diferentes tipos de emulsiones preparadas a partir de fases de agua y aceite.

Tipo de emulsión	Rango de diámetro	Estabilidad termodinámica	Relación superficie /masa(m^2/g)	Apariencia
Macroemulsión	0.1-100 μm	Inestable	0.07-70	Turbia/opaca
Nanoemulsión	20-100 nm	Inestable	70-330	Transparente
Microemulsión	5-50 nm	Estable	130-1300	Transparente

(McClements, 2010)

2.7.1 Clasificación de emulsiones

Las emulsiones se suelen clasificar con base en su distribución espacial de fases oleosa y acuosa entre sí. De este modo, un sistema que consiste de gotas de aceite dispersas dentro de una fase acuosa se conoce como emulsión aceite-en-agua (O/W por sus siglas en inglés *Oil in Water*). El líquido que se encuentra en menor medida y que compone las pequeñas gotas se llama fase dispersa o discontinua, mientras que el líquido que rodea esas gotas, y que además es el componente mayoritario de ese sistema, se conoce como fase continua o dispersante. Ahora

bien, si en un sistema la fase dispersa consiste en gotas de agua y la fase continua corresponde a un material oleoso, entonces estaríamos hablando de una emulsión agua-en-aceite (W/O por sus siglas en inglés *Water in Oil*) (McClements, 2010). También se han desarrollado otro tipo de emulsiones conocidas como emulsiones múltiples o emulsiones dobles (Bakry et al., 2016).

2.8 Emulsiones dobles

Las emulsiones dobles (ED) se reportaron por primera vez en el año de 1925 por William Seifriz, en un grupo de trabajos de investigación que reportaban el impacto de la densidad del aceite sobre el tipo de emulsión formada. El autor observó que, si se empleaba el aceite de paja como fase dispersa en una emulsión simple O/W, se obtenía un comportamiento atípico y complejo donde las gotas de aceite de paja (de 1 mm de diámetro aprox.) contenían gotas más pequeñas de agua en su interior. También reportó que este sistema se separó rápidamente dando lugar a emulsiones individuales, por lo que las consideró sistemas de transición inestables entre las emulsiones W/O y O/W. Esto en realidad era el primer modelo de emulsiones dobles reportado (Ding, Serra, Vandamme, Yu y Anton, 2018).

2.8.1 Clasificación de las emulsiones dobles con base en su composición

Las emulsiones dobles (ED) son sistemas multicompartimentales que contienen gotas pequeñas dentro de gotas más grandes. Los dos principales tipos de emulsiones dobles son emulsiones de agua-en-aceite-en-agua (W/O/W por sus siglas en inglés *Water in Oil in Water*) y emulsiones de aceite-en-agua-en-aceite (O/W/O por sus siglas en inglés *Oil in Water in Oil*) (Dickinson, 2011), aunque otro tipo de emulsiones como las O/W/W (*Oil in Water in Water*) también han sido reportadas (McClements, 2010).

2.8.1.1 Emulsiones dobles de tipo O/W/O

Las emulsiones de tipo aceite en agua en aceite (O/W/O) son sistemas con una fase continua de aceite que contiene gotas de agua como fase dispersa, las cuales, a su vez, contienen gotas más pequeñas de aceite en su interior (Fig. 6B). La investigación actual sobre este tipo de emulsiones se ha centrado principalmente

en la encapsulación de aceite de pescado en productos para untar y en la preparación de materiales en polvo a base de aceite de pescado (Muschiolik y Dickinson, 2017)

2.8.1.2 Emulsiones dobles de tipo W/O/W

Las emulsiones dobles de tipo agua en aceite en agua (W/O/W) se componen de un sistema continuo de agua que contiene gotas de aceite con pequeñas gotitas de agua dentro de ellas (Fig. 6A). Debido a que, por lo general, la composición química de las fases acuosas de una emulsión W/O/W es diferente, en algunos casos es conveniente abreviar $W_1/O/W_2$ para hacer distinción entre las dos fases acuosas W_1 y W_2 de las emulsiones (Muschiolik y Dickinson, 2017).

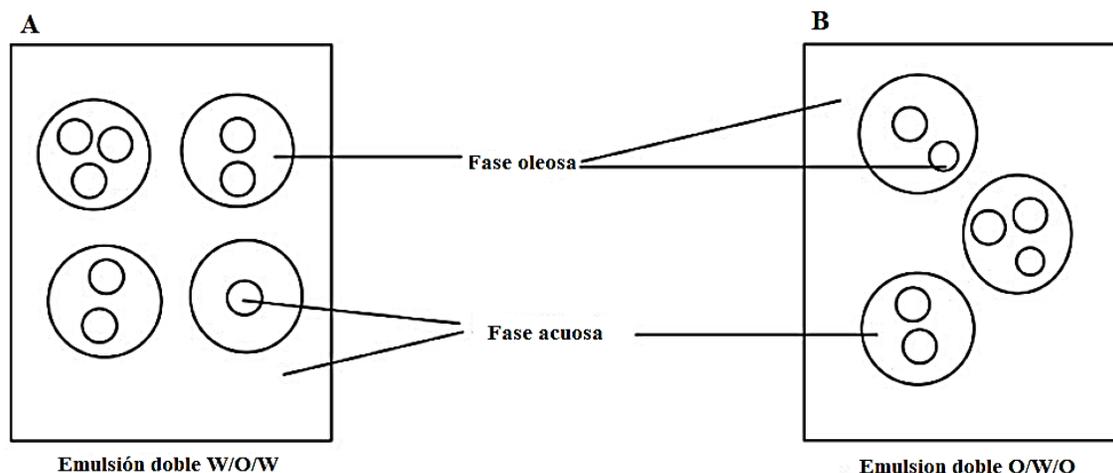


Fig. 6. Esquema de los dos principales tipos de emulsiones dobles. **A** Emulsión W/O/W y **B** Emulsión O/W/O. Adaptado de Khan, Talegaonkar, Iqbal, Ahmed y Khar (2006).

2.8.2 Clasificación de las emulsiones dobles con base en su estructura interna

Las emulsiones dobles también se han clasificado con base en el número y disposición de las gotas internas dentro de las gotas más grandes, distinguiéndose tres tipos principales (Ding et al., 2018):

- **Microcápsulas:** En este tipo de emulsiones las gotas que conforman la fase dispersa contienen solo una gota interna del compuesto encapsulado (Fig. 7A).

- **Multivesículas:** Las gotas de la fase dispersa encapsulan gran cantidad de gotas internas (Fig. 7B).
- **Microesferas:** Las gotas que conforman la fase dispersa contienen gotas heterogéneas distribuidas de una forma compleja (Fig. 7C).

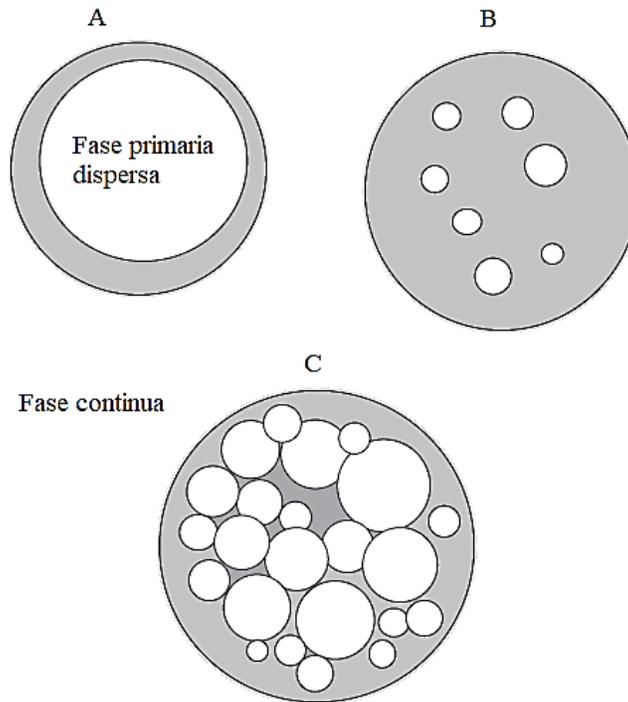


Fig. 7. Tipos de emulsiones dobles según el tamaño y distribución de las gotas internas. **A** Microcápsulas. **B** Multivesículas. **C** Microesferas. (Garti, 1997).

2.8.3 Ventajas de las emulsiones dobles W/O/W

Las emulsiones dobles W/O/W han tenido un creciente interés por parte de los científicos y tecnólogos de alimentos debido a tres razones principales. En primer lugar, las emulsiones W/O/W permiten desarrollar alimentos reducidos en grasa mediante el remplazo de una emulsión convencional O/W por una emulsión W/O/W. Esto disminuye de forma importante el contenido de grasa de un alimento, pero permite al consumidor mantener una percepción oleosa al gusto. En segundo lugar, las emulsiones W/O/W permiten encapsular y proteger compuestos afines al agua como saborizantes o componentes bioactivos, y después liberarlos durante la alimentación o la digestión (Muschiolik y Dickinson, 2017). Además, las emulsiones

dobles W/O/W, en general, poseen una menor viscosidad con respecto a las emulsiones convencionales debido a la presencia de una fase acuosa externa, lo que facilita su manipulación en áreas como el soporte nutricional (Khan et al., 2016).

Desde su creación / descubrimiento hasta hoy en día, se conoce que las emulsiones dobles son más difíciles de preparar que las emulsiones simples, además de que su estabilidad es más difícil de conseguir y mantener (Dickinson, 2011).

2.8.4 Problemas de inestabilidad de las emulsiones dobles

Los mecanismos de desestabilización de una ED pueden ser muy diversos y, en general, dependen de su composición y microestructura. Dickinson (2011) sugirió 4 mecanismos principales de desestabilización de las emulsiones dobles (Fig. 8):

- El **mecanismo A** tiene que ver con la coalescencia de las gotas externas, lo cual es muy similar a lo que ocurre en una emulsión convencional.
- El **mecanismo B** se refiere a la coalescencia de las gotas internas sin que haya ningún cambio en la interface de las gotas externas.
- El **mecanismo C** es la unión o coalescencia de las gotas internas (W_1) con la interface externa, esto permite la transferencia de parte del componente interno encapsulado a la fase continua de las emulsiones o W_2 .
- El **mecanismo D** es el encogimiento o hinchamiento de las gotas internas debido al intercambio de materia entre la fase interna y la fase externa a través de la fase que mantiene separadas las otras dos fases de la misma naturaleza. Es decir, en una emulsión W/O/W, parte de la masa de W_1 atraviesa la fase oleosa (O) y se incorpora a la fase continua (W_2), ocasionando una contracción de las gotas. Si, por el contrario, parte de la masa de W_2 atraviesa la fase oleosa que funciona como una membrana y se incorpora a W_1 , el fenómeno que se observa es un hinchamiento de los glóbulos grasos y una posterior ruptura de los mismos.

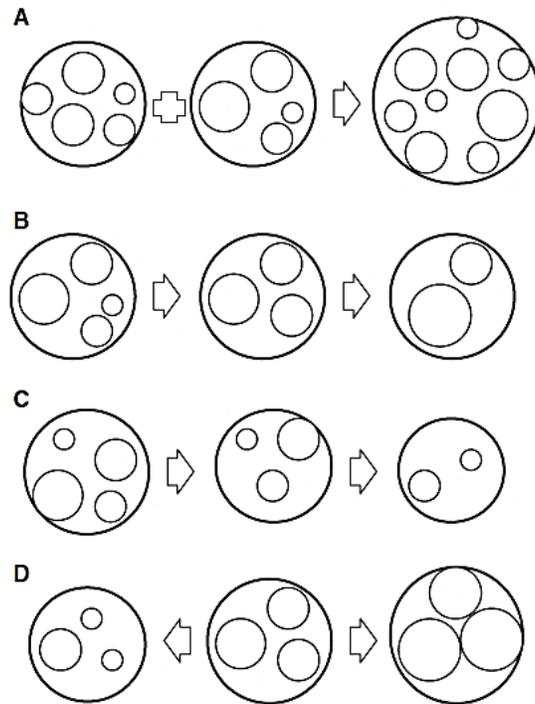


Fig. 8. Representación esquemática de las principales vías de desestabilización de las emulsiones dobles: **A** Coalescencia de las gotas externas. **B** Coalescencia de las gotas internas. **C** Coalescencia de las gotas internas con las gotas externas y **D** encogimiento o hinchamiento de las gotas internas (Dickinson, 2011).

Otros mecanismos de desestabilización pueden ser muy similares a los mecanismos que provocan la inestabilidad en las emulsiones convencionales como separación gravitacional, floculación, coalescencia, coalescencia parcial y/o maduración de Ostwald; sin embargo, debido a las múltiples ventajas que ofrecen con respecto a las emulsiones convencionales, las ED son sistemas con gran potencial en la industria de alimentos que vale la pena investigar y conocer.

2.8.5 Estabilizantes de emulsiones

Gran parte de la ciencia y la tecnología de las emulsiones tiene que ver con la creación de emulsiones que tengan una estabilidad cinética suficientemente larga. En la industria de alimentos, se acostumbra incorporar sustancias llamadas “estabilizadores” como emulsionantes, modificadores de textura, agentes de peso y retardadores de maduración, los cuales mejoran el pronóstico de estabilidad cinética durante el almacenamiento (McClements, 2010). Algunas características de estos estabilizadores son las siguientes:

Emulsionante: un emulsionante, emulsificante, tensioactivo o surfactante (*surface active agent*), es una molécula de superficie activa que se adsorbe a la superficie de las gotas formadas durante el proceso de homogeneización. Su propósito es facilitar la ruptura de las gotas durante la homogenización y evitar la agregación de las gotas ya formadas (McClements, 2010). El emulsionante lipofílico que se ha utilizado ampliamente para la preparación de emulsiones dobles W/O/W de grado alimenticio es el poliricinooleato de poliglicerol (PGPR) en un rango del 4-6% en peso, aunque se ha demostrado reiteradamente que estos valores pueden modificarse si se utiliza un emulsionante hidrofílico disuelto en la fase W_2 (Muschiolik y Dickinson, 2017). En la práctica, se debe cuidar que el contenido de PGPR sea lo suficientemente alto como para ser efectivo, y, al mismo tiempo, lo suficientemente bajo como para evitar la percepción desagradable del sabor y para que sea compatible con los niveles máximos establecidos por la reglamentación alimentaria de cada país, los cuales, son generalmente bajos (Dickinson, 2015).

Modificador de textura: un modificador de textura es una sustancia que espesa o gelifica la fase continua o incluso la fase interna. Su propósito es mejorar la estabilidad de la emulsión retardando o evitando el movimiento de las gotas (McClements, 2010). El uso de biopolímeros de grado alimenticio (gomas, caseína, proteína de suero lácteo, etc.) como agentes de peso, se ha reportado como una estrategia eficaz para la estabilización de sistemas de emulsión doble (Dickinson, 2011).

Agente de peso: Un agente de peso es una sustancia que se agrega a las gotitas para hacer coincidir su densidad con la fase continua circundante. Su propósito es reducir la fuerza de la gravedad que promueve la separación y, por lo tanto, prevenir o retrasar el cremado o la sedimentación (McClements, 2010).

Retardador de maduración: un retardador de maduración es un material altamente hidrófobo que se agrega a las gotas de lípidos con la finalidad de ralentizar o evitar la maduración de Ostwald (McClements, 2010).

Como se ha descrito anteriormente, las emulsiones W/O/W también pueden desestabilizarse por el encogimiento o hinchamiento de los glóbulos grasos como consecuencia de la difusión de masa entre las fases acuosas interna y externa. En teoría, este fenómeno puede controlarse utilizando una fase oleosa de baja solubilidad en agua y equilibrando cuidadosamente la diferencia de presión osmótica entre las fases, empleando solutos como azúcares o electrolitos. No obstante, lograr un equilibrio osmótico óptimo para la estabilización a largo plazo de emulsiones incorporadas a productos alimenticios ya elaborados es un reto, en muchas ocasiones, desafiante (Dickinson, 2015).

2.8.6 Preparación de emulsiones dobles W/O/W

Es posible obtener emulsiones dobles mediante emulsificación en una o dos etapas, sin embargo, debido a que en algún momento el método de una sola etapa se consideró difícil de controlar, el método de dos etapas se volvió más popular, de tal manera que, en la actualidad, una buena parte de los sistemas de emulsiones dobles reportados en la literatura científica se preparan bajo este método. En general, en el primer paso se prepara una emulsión simple de tipo W/O. Esta emulsión primaria típicamente se realiza con un exceso de emulsificante hidrofóbico mediante homogenización mecánica intensa a fin de obtener gotas del menor tamaño posible. Después, para obtener la emulsión W/O/W, parte de la emulsión primaria previamente formada (ahora llamada emulsión interna) se agrega de forma suave a una fase acuosa continua en la cual se ha disuelto previamente un emulsificante hidrofílico (Garti, 1997) (Fig. 9). Suele ser apropiado preparar la emulsión primaria (W_1/O) empleando condiciones de homogenización más energéticas que la segunda, puesto que un proceso de emulsificación suave en la segunda etapa de formación de emulsiones dobles evita la ruptura de los glóbulos internos formados en el primer paso. Es conveniente mencionar que, si este proceso es demasiado suave, los sistemas obtenidos serán altamente polidispersos. Por el contrario, si la homogenización es demasiado intensa, podría reducirse la eficiencia de encapsulación (Jiménez-Colmenero, 2013).

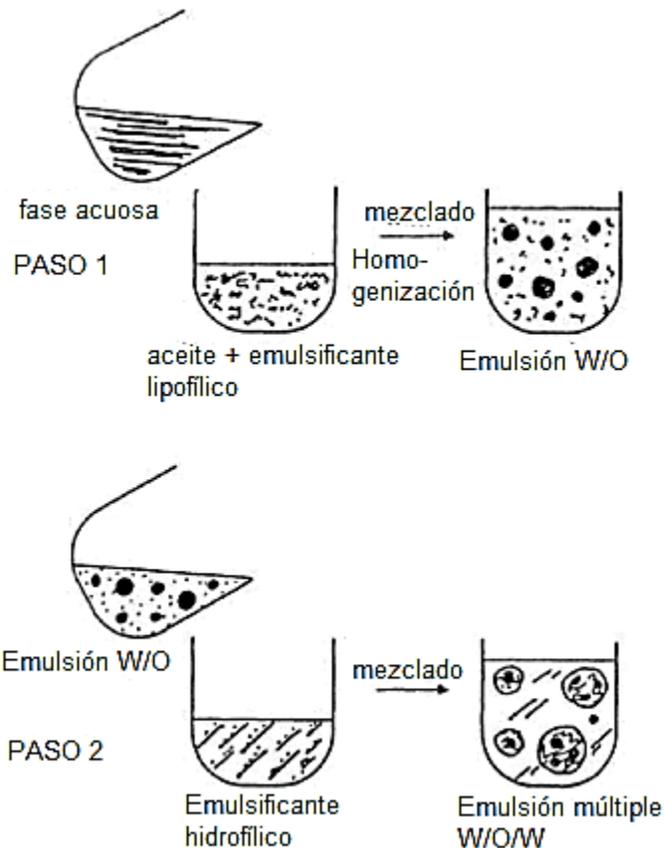


Fig. 9. Representación esquemática de la preparación de emulsiones dobles por el método de dos etapas. Adaptado de Garti (1997).

2.8.7 Investigación en torno a emulsiones dobles

2.8.7.1 Estabilidad de los sistemas

Las emulsiones dobles W/O/W se han investigado con distintas finalidades y bajo distintos enfoques, siendo la estabilidad de estos sistemas, uno de los aspectos más estudiados y reportados en la literatura. Por ejemplo, Balcaen, Vermier, Declerck y Van der Meeren (2016) evaluaron la influencia de la gelificación de la fase interna en la estabilidad osmótica y de cizalla de emulsiones W/O/W. Ellos concluyeron que la gelación interna no pudo prevenir el encogimiento de los glóbulos grasos después de la dilución de las ED en una solución hipertónica, sin embargo, la gelificación si disminuyó significativamente el hinchamiento de las gotas, atribuyendo este efecto al incremento de la coalescencia de las gotas internas con las gotas externas que ocurrió al gelificar la fase acuosa interna. Iqbal, Baloch, Hameed y McClements

(2013) desarrollaron emulsiones dobles controladas mediante hinchamiento osmótico y gelificación de la fase interna y concluyeron que, después de los tratamientos, los parámetros reológicos incrementaron considerablemente con respecto a emulsiones convencionales con similares contenidos de grasa, lo cual puede ser útil para crear alimentos con nuevas texturas o modificados en el contenido de grasa. Recientemente, Khadem, Khellaf y Sheibat-Othman (2020) investigaron el efecto de diferentes condiciones de operación (fracción de fase interna, velocidad de agitación en la segunda etapa de preparación, la concentración de sales y la fracción de emulsión primaria) sobre las propiedades de las emulsiones dobles durante la preparación y el almacenamiento. Descubrieron, entre otras cosas, que, durante la preparación en dos etapas, la ruptura masiva de las gotas controla el tamaño de glóbulo externo y la tasa de liberación del compuesto encapsulado, mientras que, durante el almacenamiento, el hinchamiento en una primera etapa y el sobre hinchamiento y ruptura de los glóbulos en segundo lugar, condicionan la estabilidad de las emulsiones. Este es uno de los pocos reportes científicos que describen el impacto de la fracción encapsulada sobre la estabilidad de los sistemas de emulsiones dobles, sin embargo, este reporte no se relaciona con el uso de ED en alimentos funcionales.

2.8.7.2 Encapsulación de compuestos bioactivos

El desarrollo de sistemas alimenticios más saludables basados en emulsiones dobles ha sido abordado, entre otros, por los autores Silva et al. (2018). Ellos prepararon emulsiones dobles con cantidades optimas de ácido gálico y quercetina en las fases acuosa interna y externa y evaluaron su estabilidad durante el almacenamiento. Sus resultados demostraron que los compuestos bioactivos mejoraron la estabilidad oxidativa y la estabilidad física de las emulsiones dobles durante 28 días a 4°C, sugiriendo este tipo de preparaciones como sustitutos de grasa y fuente de ácidos grasos esenciales en la formulación de alimentos estables durante el almacenamiento.

La encapsulación de compuestos bioactivos dentro de emulsiones dobles ha sido investigada desde hace ya algún tiempo, sin embargo, hasta el momento y según

el conocimiento actual, la viabilidad de las emulsiones dobles W/O/W para encapsular y proteger la actividad antidiabética de un extracto de xoconostle durante el almacenamiento, no ha sido reportada. Algunos trabajos sobresalientes actuales sobre encapsulación de compuestos bioactivos se han resumido en la Tabla 3.

Tabla 3

Aplicaciones recientes de emulsiones dobles en la encapsulación de compuestos funcionales.

Tipo	Objetivo de la investigación	Referencia
W/O/W	Evaluación de la viabilidad de las emulsiones dobles para encapsular resveratrol	(Hemar, Cheng, Oliver, Sanguansri y Augustin, 2010)
W/O/W	Efecto protector de emulsiones dobles contra la degradación de antocianinas y cambios de color inducidos por pH	(Liu, Tan, Zhou, Muriel y McClements, 2019)
W/O/W	Formulación de emulsiones dobles estables cargadas con hierro viable para el enriquecimiento de alimentos	(Buyukkestelli y El, 2019)
W/O/W + coacervación compleja	Encapsulación de antocianinas de frambuesa y evaluación de distintos parámetros fisicoquímicos de las ED, así como la estabilidad del material encapsulado	(Shaddel et al., 2017)
W/O/W	Desarrollo de emulsiones dobles capaces de conservar la capacidad antioxidante de ácido gálico encapsulado en W ₁ , modificando el emulsificante, el electrolito de la fase interna y los polisacáridos disueltos en la fase externa	(Martins et al., 2020)

W/O/W: Emulsiones tipo agua en aceite en agua. ED: emulsiones dobles. W₁: fase acuosa interna.

2.8.7.3 Emulsiones dobles bajo condiciones de digestión in vitro

Se ha sugerido que las emulsiones dobles también podrían proteger y liberar de manera controlada los compuestos bioactivos durante los procesos digestivos (Andrade, Wright y Corredig, 2018), además de sufrir modificaciones a lo largo del proceso. Por ejemplo, las interacciones proteína-polifenol que ocurren comúnmente en sistemas de emulsiones dobles, generalmente reducen la actividad antioxidante de los compuestos, sin embargo, el proceso de digestión también libera otras macromoléculas capaces de mostrar efecto antioxidante (Flores y Kong, 2017).

Dependiendo del componente encapsulado y los materiales empleados en su encapsulación, los reportes científicos ofrecen una variedad de resultados con tendencias diferentes. Andrade et al. (2018) investigaron el efecto del estado físico de la fase interna de emulsiones dobles sobre el comportamiento digestivo y la liberación de moléculas bioactivas como fitoesteroles, vitamina D3 y vitamina B12. Su estudio demostró que las propiedades físicas de la fase interna de las emulsiones dobles W/O/W influyen en la digestión de los lípidos y las cinéticas de liberación de compuestos bioactivos durante la digestión *in vitro*. Por otra parte, Gasa-Falcon, Odriozola-Serrano, Oms-Oliu y Martín-Belloso (2017) reportaron que la adición de biopolímeros (1 g de fibra de mandarina / 100 g ED) a la fase acuosa externa de nanoemulsiones dobles W/O/W, puede mejorar la bioaccesibilidad del β -caroteno durante la digestión simulada. Más recientemente, Dima y Dima (2020) observaron que la presencia de iones calcio en el fluido intestinal simulado disminuye el contenido de ácidos grasos libres por precipitación, y disminuye la bioaccesibilidad de la vitamina D3 encapsulada dentro de emulsiones W/O/W. Estos reportes científicos demuestran el impacto variable (positivo o negativo), que la digestión humana simulada puede tener sobre los compuestos bioactivos encapsulados bajo el método de emulsiones dobles, por lo tanto, la necesidad de investigación en torno a los cambios en la cantidad y actividad de moléculas biológicamente activas del xoconostle atrapadas dentro de ED, durante la digestión simulada, queda de manifiesto.

3. Planteamiento del problema y justificación

La diabetes es un padecimiento metabólico crónico que se ha convertido en un problema de salud pública a nivel mundial. En México, la prevalencia de diabetes es de aprox. 10%. Actualmente, la terapia más eficaz para el tratamiento de la diabetes mellitus es el control glucémico mediante fármacos (Blonde, 2012). Estos fármacos ejercen su acción mediante distintos mecanismos entre los cuales se encuentra la inhibición de las enzimas digestivas α -amilasa y α -glucosidasa (Chávez-Silva et al., 2018). Aunque existen varios medicamentos que ejercen esta actividad farmacológica, recientemente gran cantidad de pacientes están optando por el uso de alimentos o componentes naturales de alimentos en el control glicémico de la diabetes, lo cual, a su vez, ha despertado gran interés médico y científico (Benalla, Bellahcen y Bnouham, 2010). Algunos potenciales beneficios de la utilización de tratamientos naturales basados en plantas contra la diabetes podrían girar en torno a su bajo costo y baja incidencia de efectos secundarios indeseables que llegan a ocasionar los fármacos. En México se han empleado tradicionalmente las estructuras vegetativas y reproductivas de las plantas de *Opuntia* ssp. como tratamiento alternativo de la diabetes mellitus y otras enfermedades (Pimienta-Barrios et al., 2008). El xoconostle es un fruto que pertenece al género *Opuntia* y es endémico de México con distribución en la región centro-occidental. Entre los principales beneficios a la salud que se la atribuyen al xoconostle destacan las propiedades antioxidantes y antidiabéticas, las cuales han sido confirmadas científicamente.

Los compuestos fenólicos y en general los compuestos antioxidantes del xoconostle se han relacionado con su poder antidiabético, sin embargo, la integridad de estas moléculas bioactivas puede verse obstaculizada debido a su degradación por la luz, oxígeno, humedad y procesos de digestión. En este sentido, la microencapsulación es una tecnología que puede ayudar a superar estas limitaciones fisicoquímicas y farmacocinéticas. Existen varios métodos de encapsulación de compuestos bioactivos, sin embargo, la encapsulación mediante emulsiones dobles es una técnica novedosa que permite desarrollar alimentos con bajo contenido graso y a la

misma vez proteger compuestos acuosos en su interior. Las emulsiones dobles actualmente son objeto riguroso de estudio científico debido a su baja estabilidad cinética y su conveniente uso como ingredientes alimenticios, no obstante, la encapsulación de bioactivos de xoconostle mediante emulsiones dobles con la finalidad de preservar su actividad biológica durante el almacenamiento y la digestión no ha sido reportada todavía.

Esta investigación puede, en primera instancia, promover el uso y recomendación de consumo de extracto de xoconostle como tratamiento alternativo de la diabetes mellitus. Después, el estudio de la estabilidad de compuestos bioactivos y la actividad antidiabética del extracto de xoconostle encapsulado mediante emulsiones dobles podría contribuir al desarrollo de ingredientes y alimentos funcionales estables basados en esta tecnología. Además, los resultados de este estudio podrían tener futura aplicación en la incorporación de extractos bioactivos del xoconostle a matrices alimenticias ricas en carbohidratos hidrolizables que sean estables durante el almacenamiento y que resistan los procesos digestivos, disminuyendo el aporte neto de glucosa de esos alimentos al paciente con diabetes o al público en general.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

- Evaluar los compuestos bioactivos y la actividad antidiabética de un extracto de xoconostle encapsulado dentro de emulsiones dobles de tipo agua-en-aceite-en-agua, así como la estabilidad física de los sistemas durante condiciones de almacenamiento y digestión simulada.

4.2 Objetivos específicos

- Desarrollar un sistema de encapsulación del extracto con diferentes cantidades de fase acuosa interna mediante el método de emulsiones dobles.
- Conocer la estabilidad física de los sistemas de emulsiones dobles mediante la determinación de parámetros físico-químicos como morfología, tamaño de gota, eficiencia de encapsulación, viscosidad y pH durante 48 días de almacenamiento.
- Evaluar la estabilidad del extracto encapsulado mediante la determinación de compuestos bioactivos y actividad antioxidante durante 48 días de almacenamiento.
- Determinar el poder antidiabético del extracto durante el almacenamiento mediante ensayos de inhibición de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa durante 48 días de almacenamiento.
- Probar el poder protector del encapsulado sobre la actividad biológica de los compuestos bioactivos de xoconostle durante la digestión en un *ensayo in vitro*.

5. Materiales y métodos

5.1 Material vegetal y reactivos

Xoconostles de la variedad *Opuntia oligacantha* C. F. Först en estado de madurez fisiológica fueron adquiridos en el municipio de Tezontepec de Aldama, Hidalgo, México. Los emulsificantes poliricinoleato de poliglicerol (PGPR 90, GRINDSTED®) y DATEM (ésteres de mono y diglicéridos de ácido diacetil tartárico, PANODAN®) fueron adquiridos de Danisco S. A. (México, S.A. de C.V. [México, D.F. México]). El aislado proteico de suero lácteo (WPI, 9410) se adquirió de Hilmar™ y el aceite de canola (Capullo®, Unilever de México, S.A. de C.V., Tultitlán, Edo. de México, México) se compró en un establecimiento local de Tulancingo, Hidalgo. Las enzimas α -amilasa de *Saccharomyces cerevisiae* (EC 3.2.1.1), alfa α -glucosidasa de *Bacillus licheniformis* (EC 3.2.1.20), pepsina de mucosa gástrica porcina (EC 3.4.23.1), pancreatina de páncreas porcino (4 x USP), las sales biliares y los reactivos Folin-Ciocalteu, p-nitrofenil-a-D-glucopiranosido, 4-nitrofenol, ácido 3-5 dinitrisalicílico (DNS), ácido gálico, ácido ascórbico, quercetina, catequina, 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) sal de diamonio (ABTS⁺), 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH[·]) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo., U.S.A.). La solución enzimática de pectinasas y hemicelulasas fue de Rohapect®B1L, Paniplus, S.A., Querétaro, México. Los solventes orgánicos metanol y etanol fueron de grado analítico y se adquirieron de Fermont® (PA Cert.). El ácido clorhídrico (HCl), el hidróxido de sodio (NaOH) y demás sales y reactivos empleados para la preparación de buffers y soluciones digestivas fueron adquiridos de J.T Baker® (Fisher Scientific SL).

5.2 Obtención del extracto de xoconostle

Se empleó la metodología descrita por Pérez-Alonso et al. (2015) con algunas adecuaciones. Los frutos enteros se seleccionaron y lavaron con agua destilada. Después, se dejaron secar para posteriormente ser pesados y molidos empleando una licuadora industrial (BLENDER). La pulpa se filtró con ayuda de un tamiz No. 100 (0.149 mm) y el filtrado obtenido se incubó durante 3 h a 20°C en total oscuridad con una solución enzimática de pectinasas y hemicelulasas en una proporción de

100 μ L de solución por cada 200 mL de filtrado de xoconostle. Para eliminar sólidos, el filtrado se centrifugó (centrífuga HERMLE Z36HK) a 8 000 rpm durante 10 min a 4°C y se filtró nuevamente con papel Whatman No. 4 con ayuda de una bomba de vacío (BÜCHI Labortechnik AG). El extracto se almacenó en tubos de centrifuga de 50 mL a -75°C en ultracongelación hasta su posterior utilización en la preparación de los sistemas de emulsiones dobles.

5.3 Preparación de emulsiones dobles

La preparación de las emulsiones dobles se llevó a cabo por el método general de dos etapas descrito por Martins et al. (2020), con modificaciones. En la primera etapa se formó una emulsión simple agua-en-aceite (W_1/O) empleando extracto de xoconostle como fase acuosa (W_1) y aceite de canola como fase oleosa (O) y en la segunda etapa se re-emulsificó parte de la emulsión simple en una segunda fase acuosa (W_2) para formar los sistemas de emulsión doble agua-en-aceite-en-agua o $W_1/O/W_2$.

Las emulsiones simples W_1/O se prepararon en proporciones de 20:80 (p/p), 40:60 (p/p) y 60:40 (p/p) (extracto de xoconostle: aceite de canola) y un tratamiento control con una proporción de 40:60 (p/p) de agua destilada y aceite de canola, respectivamente. El 10% (p/p) de la fase oleosa de todos los tratamientos se sustituyó con 4 partes de emulsificante lipofílico (PGPR) y 1 parte de emulsificante hidrofílico (DATEM), según lo descrito por Pimentel-González et al. (2015). Previamente a la formación de las emulsiones simples, el PGPR se disolvió en el aceite de canola y el DATEM en el extracto de xoconostle durante 3 min a 4000 rpm en oscuridad mediante homogenización. Las emulsiones W_1/O se formaron empleando un homogenizador Ultra-Turrax IKA T25 a 13000 rpm durante 15 minutos en baño de hielo.

Para la obtención de las emulsiones dobles $W_1/O/W_2$, se tomó el 30% (p/p) de cada emulsión simple W_1/O y se re-emulsificó en 70% (p/p) de una dispersión acuosa (W_2) de aislado proteico de suero (WPI) al 40% (p/v) previamente preparado (se dispersó el polvo lentamente en agua destilada mediante agitación magnética moderada durante 4 h y se almacenó durante 48 horas a 4°C. Antes de su utilización

se disolvió el 2.5% [p/p] de emulsificante hidrofílico PGPR en la dispersión). Las emulsiones dobles se obtuvieron mediante homogenización de baja energía empleando un Ultra-Turrax IKA T25 a 4000 rpm durante 15 min en baño de hielo.

Para la presentación de los resultados, debido a que la proporción de emulsión simple (W_1/O) y fase acuosa externa (W_2) fue la misma para todas las muestras (70:30 [p/p]), el tratamiento cuya proporción de emulsión primaria fue de 20:80 (extracto de xoconostle:aceite de canola) se abrevió como “ED20%”, el tratamiento 40:60 (extracto de xoconostle:aceite de canola) como “ED40%” y el tratamiento 60:40 (extracto de xoconostle:aceite de canola) como “ED60%”. El tratamiento 40:60 (agua destilada:aceite de canola) fue considerado como “Control”. Todos los tratamientos se almacenaron a temperatura ambiente ($\approx 20^\circ\text{C}$) y durante los días 0, 3, 6, 12, 24 y 48 de almacenamiento se tomaron alícuotas para la evaluación de los diferentes parámetros.

5.4 Caracterización de los sistemas de emulsión doble

5.4.1 Morfología y tamaño de gota

La morfología y tamaño de gota se analizaron de acuerdo con la metodología reportada por Pimentel-González, Campos-Montiel, Lobato-Calleros, Pedroza-Islas y Vernon-Carter (2009). Brevemente, se tomaron 100 μL de emulsión doble y se dispersaron en 900 μL de agua destilada. Después se tomaron 10 μL de la mezcla, se colocaron en un portaobjetos y se analizaron en un microscopio óptico Olympus CX 31 (Olympus Optical Co. Ltd, Tokyo, Japan) a un aumento de 100x. Se tomaron fotomicrografías con una cámara LUMENERA® acoplada al microscopio y para la determinación del diámetro de gota se midieron 30 glóbulos al azar con ayuda del procesador de imagen Image-Pro Plus (versión 4.5, Media Cybernetics, Inc., Silver Springs, MD, USA).

5.4.2 Eficiencia de encapsulación

La eficiencia de encapsulación (EE) de las emulsiones dobles se calculó según la metodología reportada por Velderrain-Rodríguez, Acevedo-Fani, González-Aguilar y Martín-Belloso (2019) y se consideró como la cantidad de compuestos fenólicos

totales del extracto de xoconostle que se encontró en las emulsiones simples (W_1/O) después de un proceso de separación de la fase acuosa externa (W_2) en el día 0 de almacenamiento. Para la separación de W_2 se siguió el principio de Hemar et al. (2010), con algunas adaptaciones pertinentes. Se tomaron 10 mL de cada tratamiento incluyendo el control y se centrifugaron (centrífuga HERMLE Z36HK) a 8000 rpm durante 15 minutos a 4°C. La fase acuosa externa (W_2) subnadante se retiró cuidadosamente, se filtró con papel Whatman No. 4 y se determinó el contenido de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu descrito más adelante. El contenido de fenoles totales de la fase acuosa externa (W_2) de cada tratamiento se ajustó con el control empleando la ecuación (1):

$$FT = [FT_{Tratamiento} - FT_{Control}] \quad (1)$$

donde FT es el contenido de fenoles en la fase acuosa externa, $FT_{Tratamiento}$ es el contenido fenólico en W_2 de cada tratamiento y $FT_{Control}$ es el contenido de fenólicos en W_2 del control. Después, el valor de la ecuación (1) se sustituyó en la ecuación (2) para determinar el porcentaje de eficiencia de encapsulación ($EE\%$):

$$EE (\%) = \left[1 - \frac{FT}{FT_{Extracto}} \right] \quad (2)$$

donde $FT_{Extracto}$ es el contenido de fenólicos totales en el extracto no encapsulado.

5.4.3 Viscosidad

Según Velderrain-Rodríguez, Acevedo-Fani et al. (2019), se tomaron 10 mL de cada tratamiento a 4°C, se colocaron en viales de plástico y se determinó la viscosidad aparente usando un vibro-viscosímetro SV-10 (A&D Company, Limited, Tokyo, Japan) ajustado a 30 Hz y amplitud constante de 0.4 mm. Los resultados se obtuvieron en centipoise y fueron transformados a mPa•s.

5.4.4 Determinación de pH

Se tomaron 10 mL de emulsión doble a 20 °C y se determinó el pH empleando un potenciómetro con medidor de temperatura integrada (HANNA HI2211).

5.5 Estabilidad de compuestos bioactivos durante el almacenamiento

5.5.1 Obtención del extracto de emulsiones (EME)

Para la determinación de los compuestos bioactivos durante los días de almacenamiento, previamente se obtuvo el extracto de xoconostle encapsulado dentro de las emulsiones dobles (extracto de emulsiones [EME]), para lo cual se empleó el fundamento reportado por Guzmán-Díaz et al. (2019) con modificaciones mayores. Primeramente, se tomaron 10 mL de cada tratamiento de emulsión doble y se depositaron en tubos de centrifuga de 50 mL. A cada tubo se le añadieron 12 mL de una solución de etanol/metanol (50:50) y se agitaron enérgicamente en vórtex durante 30 min en oscuridad y a temperatura ambiente ($\approx 20^{\circ}\text{C}$). Finalmente, la mezcla se centrifugó (HERMLE Z36HK) a 10,000 rpm durante 30 minutos a 4°C y se descartó el residuo. Para eliminar la turbidez, se centrifugaron nuevamente las muestras durante 15 min a 2°C y se descartó el residuo. El extracto de emulsiones (EME) entonces se filtró con papel Whatman No. 4, se colectó en tubos limpios y se almacenó a -75°C hasta su posterior análisis de compuestos bioactivos y actividad antioxidante y antidiabética.

5.5.2 Contenido de fenoles totales

El contenido de fenoles totales se cuantificó por el método Folin-Ciocalteu, según lo descrito por Morales et al. (2012), con modificaciones menores. Se tomaron 0.5 mL del extracto etanólico/metanólico de emulsiones (EME) y se mezcló con 2.5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu diluido con agua destilada en una proporción 1:10 (v/v). Las muestras se dejaron reaccionar durante 7 min y se añadieron 2 mL de Na_2CO_3 al 0.7 M. Se dejó desarrollar el color azul característico durante 2 h en total oscuridad y se determinó el contenido de fenoles totales como mg EAG/100 mL emulsión doble por interpolación de la absorbancia a 765 nm en una curva patrón de ácido gálico previamente preparada (Fig. 10) usando un espectrofotómetro JENWAY 6715.

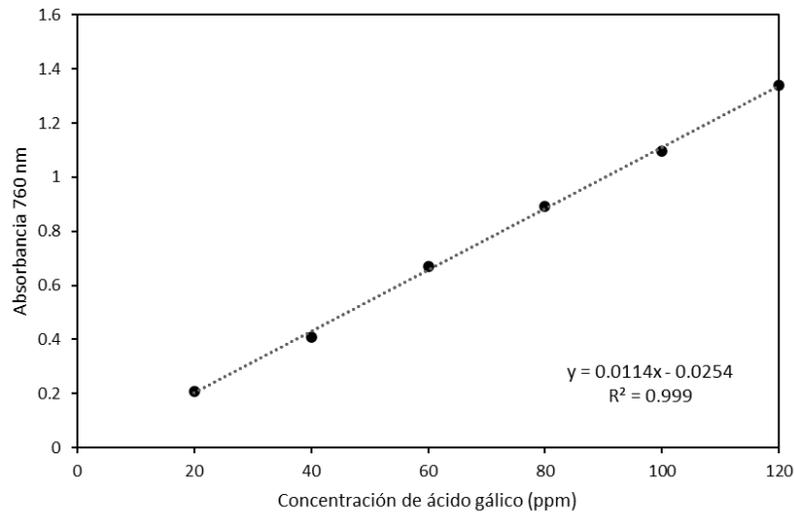


Fig. 10. Curva patrón de ácido gálico empleada en la determinación de fenoles totales.

5.5.3 Contenido de flavonoides totales

El contenido de flavonoides totales se estimó empleando el método de Arvouet-Grand, Vennat, Pourrat y Legret (1994), reportado por Espinoza-Muñoz et al. (2016). Rápidamente, se preparó una solución metanólica de AlCl_3 al 2% (p/v) y se agregaron 2 mL en tubos de ensayo + 2 mL de EME. Los tubos se agitaron durante 15 s y se dejaron en oscuridad durante 10 min más. El contenido de flavonoides se determinó como mg equivalentes de quercetina (EQ)/100 mL emulsión doble por interpolación de la absorbancia a 415 nm en una curva patrón de quercetina (Fig. 11) preparada usando un espectrofotómetro JENWAY 6715.

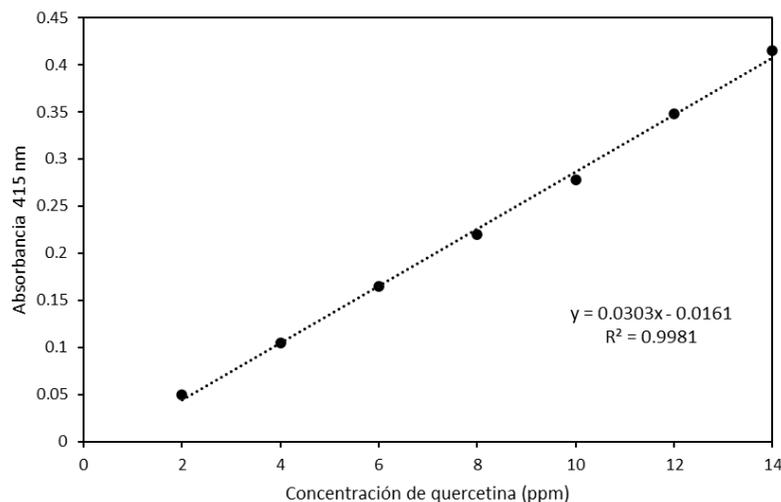


Fig. 11. Curva patrón de quercetina empleada en la determinación de flavonoides totales.

5.5.4 Contenido de betalaínas

El contenido de betalaínas se determinó por el método espectrofotométrico reportado por Castellanos-Santiago y Yahia (2008) con algunas adaptaciones. Se tomó 1 mL de extracto de emulsiones y se colocó en celdas fotométricas de 1.5 mL con reducción. Cada muestra se leyó a 538 y 483 nm para la determinación de betacianinas y betaxantinas, respectivamente. La cuantificación de cada compuesto se realizó mediante la transformación de la absorbancia en unidades de concentración (mg/mL extracto de xoconostle), para lo cual se empleó la ecuación (3).

$$B_{CX} [mg/mL] = \frac{(Abs)(FD)(PM)(V)}{(\epsilon)(P)(L)} \quad (3)$$

donde B_{CX} es el contenido de betacianinas o betaxantinas, Abs es la absorbancia a 538 o 483 nm, FD es el factor de dilución a la hora de realizar la lectura, PM es el peso molecular promedio (betanina = 550 g/mol e indicaxantina = 308 g/mol), V es el volumen del extracto, ϵ es el coeficiente de extinción molar (betanina = 60 000 L/mol.cm, e indicaxantina = 48 000 L/mol.cm) y L es la longitud de la celda de lectura (1 cm).

5.5.5 Contenido de taninos

El contenido de taninos se determinó mediante el método propuesto por Price y Butler (1977) con ligeras variaciones. En tubos de ensayo, se agregaron 200 μ L de extracto de emulsiones y 600 μ L de $FeCl_3$ preparado al 0.1 M en HCl al 0.1 N y se dejaron reaccionar por 5 minutos en oscuridad. Después, se adicionaron 600 μ L de $K_3Fe(CN)_6$ al 8 mM, se dejó desarrollar el color durante 10 minutos y se realizó la lectura de las muestras a 720 nm en un espectrofotómetro JENWAY 6715, ajustado a cero con agua destilada. Se preparó un tratamiento de igual composición, donde el EME fue sustituido por 200 μ L de solución metanólica/etanólica, el cual se analizó y su resultado se sustrajo a las demás lecturas. Las absorbancias se interpolaron en una curva patrón de catequina (EC) preparada previamente (Fig. 12).

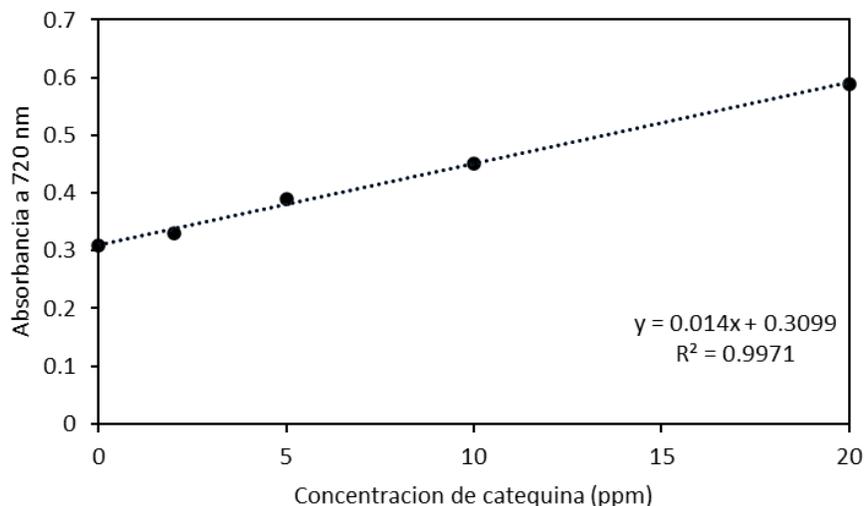


Fig. 12. Curva patrón de catequina empleada en la determinación de taninos.

5.6 Actividad antioxidante durante el almacenamiento

La actividad antioxidante del extracto encapsulado de xoconostle durante el almacenamiento se evaluó en términos de capacidad de inhibición de los radicales DPPH[·] y ABTS^{•+} y fue expresado como porcentaje (%).

5.6.1 Inhibición de radical DPPH[·]

La inhibición del radical libre DPPH[·] se realizó de acuerdo con el método propuesto por Brand-Williams, Cuvelier y Berset (1995). Se agregaron 0.5 mL de EME y 2.5 mL de una solución metanólica (80%) de DPPH[·] (6×10^{-5} mol/L) en tubos de ensayo de 10 mL. Se dejó transcurrir la reacción durante 1 h en oscuridad y se leyó la densidad óptica a 515 nm en un espectrofotómetro JENWAY 6715, empleando una solución de metanol al 80% (v/v) como blanco. El poder de inhibición de DPPH[·] de los tratamientos ($Abs_{muestra}$) se calculó con base en el decaimiento de la absorbancia de un control estabilizado a 0.70 ± 0.02 y 0.90 ± 0.02 unidades sin presencia de antioxidante ($Abs_{control}$), usando la ecuación (4) propuesta por Osorio-Esquivel et al. (2011):

$$\% \text{ inhibición de DPPH}^{\cdot} = \frac{(Abs_{control} - Abs_{muestra})}{(Abs_{control})} \times 100 \quad (4)$$

5.6.2 Inhibición de radical ABTS^{•+}

La inhibición del radical ABTS^{•+} se realizó siguiendo la metodología de Re, Pellegrini, Proteggente, Pannala, Yang y Rice-Evans (1999) con ligeras modificaciones. Se preparó una solución stock de ABTS^{•+} 7mM con agua destilada y se hizo reaccionar con persulfato de potasio (K₂S₂O₈ [2.45 mM]) en proporción 1:1 durante 16 horas con agitación magnética leve y en completa oscuridad (generación *in situ* del radical). Después, la solución de ABTS^{•+} se diluyó con etanol absoluto y se ajustó su absorbancia entre 0.70 ± 0.02 y 0.90 ± 0.02 unidades a 734 nm. De esta solución diluida con absorbancia conocida, se tomaron 3.9 mL y se mezclaron con 100 µL de cada extracto encapsulado (EME) por triplicado. La reacción se dejó ocurrir durante 10 min en completa oscuridad y se midió la absorbancia a 734 nm. El porcentaje de inhibición de ABTS^{•+} de los diferentes tratamientos ($Abs_{muestra}$) se determinó con respecto a la solución ajustada a 0.7 unidades ($Abs_{control}$) empleando la ecuación (5) reportada por Gowd et al. (2018).

$$\% \text{ inhibición de ABTS}^{\bullet+} = \frac{(Abs_{control} - Abs_{muestra})}{(Abs_{control})} \times 100 \quad (5)$$

5.7 Actividad antidiabética durante el almacenamiento

La capacidad de inhibición de las enzimas digestivas α -amilasa y α -glucosidasa del extracto encapsulado dentro de emulsiones dobles se consideró como actividad antidiabética *in vitro*.

5.7.1 Inhibición de α -amilasa

El ensayo de inhibición de α -amilasa se realizó empleando la técnica reportada por Abirami, Nagarani y Siddhuraju (2014). Primeramente, se preparó una solución de almidón de papa al 1% (p/v) y se sometió a ebullición durante 15 minutos con agitación magnética (gelatinización del almidón). Además, se preparó una solución stock de ácido 3, 5 dinitrosalicílico (DNS) disolviendo 0.1 g de reactivo DNS y 30 g de tartrato de sodio y potasio (KNaC₄H₄O₆·4H₂O) en 20 mL de NaOH 2 mol/L y se aforó el volumen a 100 mL con agua destilada. Después, en tubos de ensayo se mezclaron 100 µL de extracto de emulsiones con 100 µL de buffer de fosfatos (pH 6.9) y 100 µL de una solución de α -amilasa (4-6 U/mL) y se incubaron a 37°C

durante 10 min. Entonces, se agregaron 100 μL de solución de almidón y se incubaron por 30 minutos más. Para detener la actividad enzimática, a cada tubo se le agregó 1 mL de solución stock de DNS previamente preparada ($\text{pH} \approx 13$) y se introdujeron en un baño de agua en ebullición durante 5 min para posteriormente ser enfriados en un baño de hielo por 8 min. Por último, se realizó una dilución 1:10 de cada muestra y se midió la absorbancia a 540 nm. El porcentaje de inhibición de cada tratamiento ($Abs_{muestra}$) se calculó con respecto a un control sin inhibidor ($Abs_{control}$) usando la ecuación (6) reportada por Nyambe-Silavwe et al. (2015). Además, se usó acarbosa (Glucobay® Comp. 50 mg) como referencia.

$$\% \text{ inhibición de } \alpha - \text{amilasa} = \frac{(Abs_{control} - Abs_{muestra})}{(Abs_{control})} \times 100 \quad (6)$$

5.7.2 Inhibición de α -glucosidasa

El ensayo de inhibición de α -glucosidasa se basó en la liberación de 4-nitrofenol a partir del sustrato p-nitrofenil- α -D-glucopiranosido por la actividad de esta enzima, y se realizó conforme a lo descrito por Gondi y Rao (2015) con ciertas modificaciones. Brevemente, se mezclaron 100 μL de una solución stock de p-nitrofenil- α -D-glucopiranosido (10 mg en 2 mL de buffer de fosfato, pH 6.9) y 200 μL de extracto de emulsiones con 5.660 mL de buffer de fosfatos (pH 6.9) y se incubaron a 37°C por 10 min. Posteriormente se añadieron 40 μL de una solución de α -glucosidasa (5.7 U/mg, 2 mg en 1 mL de buffer de fosfatos, pH 6.9) y se dejó reaccionar durante 20 minutos. Para interrumpir la actividad enzimática, se agregaron 4 mL de Na_2CO_3 al 1M y 5 mL de agua destilada para posteriormente leer la absorbancia a 405 nm. La absorbancia de cada tratamiento ($Abs_{muestra}$) se comparó con un control (sin inhibidor, $Abs_{control}$) y el % de inhibición se calculó empleando la ecuación (7) (Santos et al., 2018). La acarbosa (Glucobay® Comp. 50 mg) se usó como inhibidor farmacéutico de referencia:

$$\% \text{ inhibición } \alpha - \text{glucosidasa} = \frac{(Abs_{control} - Abs_{muestra})}{(Abs_{control})} \times 100 \quad (7)$$

5.8 Digestión *in vitro*

Los ensayos de digestión *in vitro* constaron de la simulación de una fase gástrica y una fase intestinal y en general, se llevaron a cabo con base en el método reportado por Velderrain-Rodríguez, Salvia-Trujillo, Wall-Medrano, González-Aguilar y Martín-Belloso (2019) realizando algunas modificaciones. Primeramente, se preparó un fluido gástrico simulado (FGS) basado en las concentraciones de electrolitos y recomendaciones de Minekus et al. (2014). La concentración final de electrolitos en FGS fue la siguiente: KCl (6.9 mmol L⁻¹), KH₂PO₄ (0.9 mmol L⁻¹), NaHCO₃ (25 mmol L⁻¹), NaCl (47.2 mmol L⁻¹), MgCl₂(H₂O)₆ (0.1 mmol L⁻¹) y (NH₄)₂CO₃ (0.5 mmol L⁻¹). Después, se mezclaron 14.2 mL de solución FGS con 1.8 mL de HCl (0.02 M), se ajustó el pH a 3.0 con HCl 1 M (aprox. 4 mL) y se utilizó esta mezcla para disolver la pepsina porcina (≈2000 U mL⁻¹ en la mezcla final de digestión gástrica) mediante agitación en magnética moderada durante 1 min. Entonces se agregaron 20 mL de emulsión doble y se incubó la mezcla durante 2 h con agitación continua, utilizando un agitador lineal de mesa con baño maría a 37°C. Una vez terminada la simulación gástrica, se tomaron 20 mL de la mezcla digerida anteriormente (quimo) y se mezclaron con 11 mL de fluido intestinal simulado (FIS), el cual tuvo la siguiente composición electrolítica: KCl (6.8 mmol L⁻¹), KH₂PO₄ (0.8 mmol L⁻¹), NaHCO₃ (85 mmol L⁻¹), NaCl (38.4 mmol L⁻¹) y MgCl₂(H₂O)₆ (0.33 mmol L⁻¹). Se agregaron además 2.5 mL de sales biliares (disueltas en FIS, 10 mM en la mezcla final de digestión intestinal), 40 µL de CaCl₂ (0.3 M) y ≈4 mL de NaOH (1 M) para ajustar el pH a 7.0. Por último, para iniciar la simulación intestinal se agregaron 2.46 mL de pancreatina (2000 U mL⁻¹ de actividad de lipasa en la mezcla final de digestión intestinal) y se incubaron las muestras a 37°C durante 2 h con agitación lineal.

5.8.1 Actividad antioxidante y antidiabética durante la digestión

Para evaluar el efecto protector de las emulsiones dobles sobre la actividad biológica de los compuestos y como parámetro de liberación de W₁, se evaluó la actividad antidiabética y antioxidante del extracto antes y después de la digestión. Para ello, dentro de bolsas de diálisis se depositaron 7.5 mL de emulsiones sin digestión, emulsiones después de la digestión gástrica y emulsiones después de la

digestión intestinal. Se agregaron 12 mL de etanol/metanol (1:1) y los extractos se colectaron por fuera de las bolsas. Los extractos fueron llevados hasta los 18 mL en todos los casos. Estos extractos se emplearon para la determinación de actividad antioxidante y antidiabética de la misma forma que se describió en las secciones 5.6 y 5.7. Los factores de dilución implicados en las fases gástrica e intestinal por la adición de FGS y FIS fueron considerados.

5.8.2 Liberación de ácidos grasos

Durante la digestión intestinal, el pH de las muestras descendió progresivamente a causa de la liberación de ácidos grasos libres (AGL) mediada por la actividad de la lipasa presente en la pancreatina. Para mantener el pH a 7.0 durante los 120 min de digestión intestinal, se agregó una solución de NaOH (0.25 M) en forma de gotas con ayuda de una bureta. El volumen de NaOH gastado al min 0, 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100 y 120 fue monitoreado y se utilizó como un indicador de comportamiento digestivo de la fase lipídica de las emulsiones, según lo descrito por Gasa-Falcon et al. (2017).

5.9 Análisis estadístico

Se diseñó un arreglo experimental completamente al azar. Los resultados fueron procesados por análisis de varianza (ANOVA). Las diferencias entre las medias muestrales se analizaron mediante una prueba de comparación de medias Tukey cuando se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$). La expresión de resultados se dio como media \pm desviación estándar de ensayos realizados por triplicado. Todos los análisis se realizaron empleando el software IBM® SPSS Statistics versión 24.

6. Resultados y discusión

6.1 Caracterización de los sistemas de emulsiones dobles

6.1.1 Morfología y tamaño de gota

En la Tabla 4 se muestran los resultados de tamaño de gota de los diferentes tratamientos y en la Fig. 13 se encuentran las micrografías obtenidas a lo largo del almacenamiento. La presencia de gotas esféricas de fase oleosa (aceite de canola) dispersas en una fase continua que a su vez contienen gotas más pequeñas de extracto en su interior, además del movimiento Browniano observado al microscopio, confirman la exitosa formación de emulsiones dobles de tipo agua-en-aceite-en-agua ($W_1/O/W_2$) (Santos, Bozza, Thomazini, y Favaro-Trindade, 2015). Con respecto a su morfología, se han reportado 3 tipos principales de emulsiones dobles (Fig. 7) de acuerdo con el tipo y cantidad de gotas presentes en la fase acuosa interna: 1) microcápsulas, las cuales contienen únicamente una gota de fase acuosa interna, 2) multivesículas, las cuales contienen varias gotas definidas en su fase más interna (W_1) y 3) microesferas, en las cuales, a diferencia de las anteriores, su estructura interna es muy compleja (Ding et al. 2018). Estos resultados sugieren la formación de emulsiones dobles de tipo microesfera debido a la complejidad que se muestra en la fase acuosa interna de todos los tratamientos (Fig. 13). Se han reportado observaciones similares al encapsular compuestos fenólicos (Kim, Kang, Suh y Oh, 2003) y otros materiales (Buyukkestelli y El, 2019)

Las emulsiones dobles empleadas tanto en la industria de los alimentos como en otras áreas son sistemas que pueden mostrarse altamente inestables si no se preparan adecuadamente. Existen muchos fenómenos de desestabilización de emulsiones dobles, siendo uno de los más comunes la separación gravitacional de fases (cremado o sedimentación). Para contrarrestar este fenómeno, la disminución del tamaño de gota se ha reportado como una estrategia efectiva (Berton-Carabin et al. 2018). Por lo tanto, se acepta que existe una relación inversa entre el tamaño de gota inicial y el pronóstico de estabilidad de las emulsiones dobles, de igual manera, cambios en el tamaño de gota durante el almacenamiento se relacionan

con pérdida de estabilidad (Garti, 1997), y, por ende, una menor protección de los compuestos bioactivos encapsulados.

Tabla 4

Tamaño de gota de los tratamientos de emulsiones dobles durante el almacenamiento.

	Días	Control	ED20%	ED40%	ED60%
Tamaño de gota (μm)	0	1.93 \pm 0.58 ^{aB}	1.90 \pm 0.05 ^{abB}	2.41 \pm 0.24 ^{dB}	5.71 \pm 0.36 ^{aA}
	3	1.54 \pm 0.08 ^{aC}	1.65 \pm 0.23 ^{abBC}	2.52 \pm 0.06 ^{cdB}	4.37 \pm 0.63 ^{abA}
	6	1.48 \pm 0.03 ^{aC}	1.75 \pm 0.11 ^{abBC}	2.50 \pm 0.17 ^{cdB}	4.63 \pm 0.59 ^{abA}
	12	1.63 \pm 0.26 ^{aC}	1.97 \pm 0.16 ^{aC}	3.12 \pm 0.10 ^{abB}	4.61 \pm 0.78 ^{abA}
	24	1.42 \pm 0.23 ^{aC}	1.79 \pm 0.03 ^{abC}	2.96 \pm 0.02 ^{bcB}	4.61 \pm 0.38 ^{abA}
	48	1.63 \pm 0.21 ^{aC}	1.59 \pm 0.02 ^{bcC}	3.49 \pm 0.30 ^{aB}	4.01 \pm 0.07 ^{bA}

Los resultados se muestran como media \pm DE de ensayos realizados por triplicado (n=3).

Medias con letras minúsculas iguales en una misma columna no muestran diferencias estadísticas (Tukey, $p > 0.05$) entre los días de almacenamiento de un mismo tratamiento. Medias con letras mayúsculas iguales en la misma fila no muestran diferencias estadísticas entre tratamientos en un mismo día (Tukey, $p > 0.05$). **Control:** Emulsión doble con el 40% de agua desionizada en la fase acuosa interna. **ED20%:** Emulsión doble con el 20% de extracto de xoconostle en la fase acuosa interna. **ED40%:** Emulsión doble con el 40% de extracto de xoconostle en la fase acuosa interna. **ED60%:** Emulsión doble con el 60% de extracto de xoconostle en la fase acuosa interna.

En esta investigación, el tamaño de gota de los tratamientos fue proporcional al porcentaje de xoconostle encapsulado (W_1). Los tamaños más pequeños se observaron en ED20% y el control, y no hubo diferencias estadísticas ($p > 0.05$) entre estos tratamientos; sin embargo, el tratamiento control tenía un 40% de fase acuosa interna mientras que ED20% tenía el 20%, lo cual indica que, incluso a bajas concentraciones de fase acuosa interna (W_1), los compuestos del extracto de xoconostle tuvieron cierta interacción con los demás materiales de encapsulación (surfactantes, fase oleosa y WPI [aislado proteico de suero]), ocasionando cambios en el tamaño de gota con respecto al control (con agua destilada como fase acuosa interna [W_1]). Esto se puede corroborar al observar diferencias estadísticas entre ED40% y el control, los cuales tienen el mismo porcentaje de W_1 . En general, los tratamientos ED40% y ED60% mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre ellos y con respecto a ED20% y el tratamiento control, encontrándose el mayor tamaño de gota en ED60% al día 0 de almacenamiento ($5.71 \pm 0.36 \mu\text{m}$) y el menor en el tratamiento control ($1.48 \pm 0.03 \mu\text{m}$ al día 6). El tamaño de gota de todos los tratamientos disminuyó significativamente ($p < 0.05$) con el tiempo de

almacenamiento con excepción de ED40% el cual mostró un ligero aumento de tamaño entre el día cero y el día 48 de almacenamiento (2.41 ± 0.24 y 3.49 ± 0.30 μm , respectivamente). La fase (O) oleosa de las emulsiones dobles de tipo $W_1/O/W_2$ funciona como una membrana que regula el gradiente osmótico entre las dos fases acuosas de la emulsión (W_1 y W_2). Así, la disminución del tamaño de gota en estos sistemas se debe generalmente a una migración parcial de fase acuosa interna (W_1) hacia la fase continua (W_2), mientras que un aumento de tamaño de gota evidenciaría la difusión de moléculas de agua en sentido contrario (Lutz, Aserin, Wicker y Gardi, 2009). Lutz et al. (2009) sugirieron que la tendencia al aumento o disminución del tamaño de gota durante el almacenamiento puede verse influenciada por factores como el pH de la fase continua de las emulsiones dobles.

Los resultados obtenidos en ED40% (3.49 ± 0.30 μm) fueron similares a los reportados por Velderrain-Rodriguez, Acevedo-Fani et al. (2019) al encapsular polifenoles de piel de mango (3.68 ± 0.16 μm), y el máximo tamaño de gota observado en nuestro estudio (ED60%, 5.71 ± 0.36 μm) fue congruente con el tamaño de gota obtenido por Almeida et al. (2017), al encapsular y estabilizar antocianinas dentro de emulsiones dobles (5.5 y 5.1 μm). A pesar de que hubo cambios significativos en los tratamientos a lo largo del tiempo, éstos no fueron tan drásticos como para desestabilizar los sistemas puesto que no se observó separación física de fases en ninguna de las muestras evaluadas.

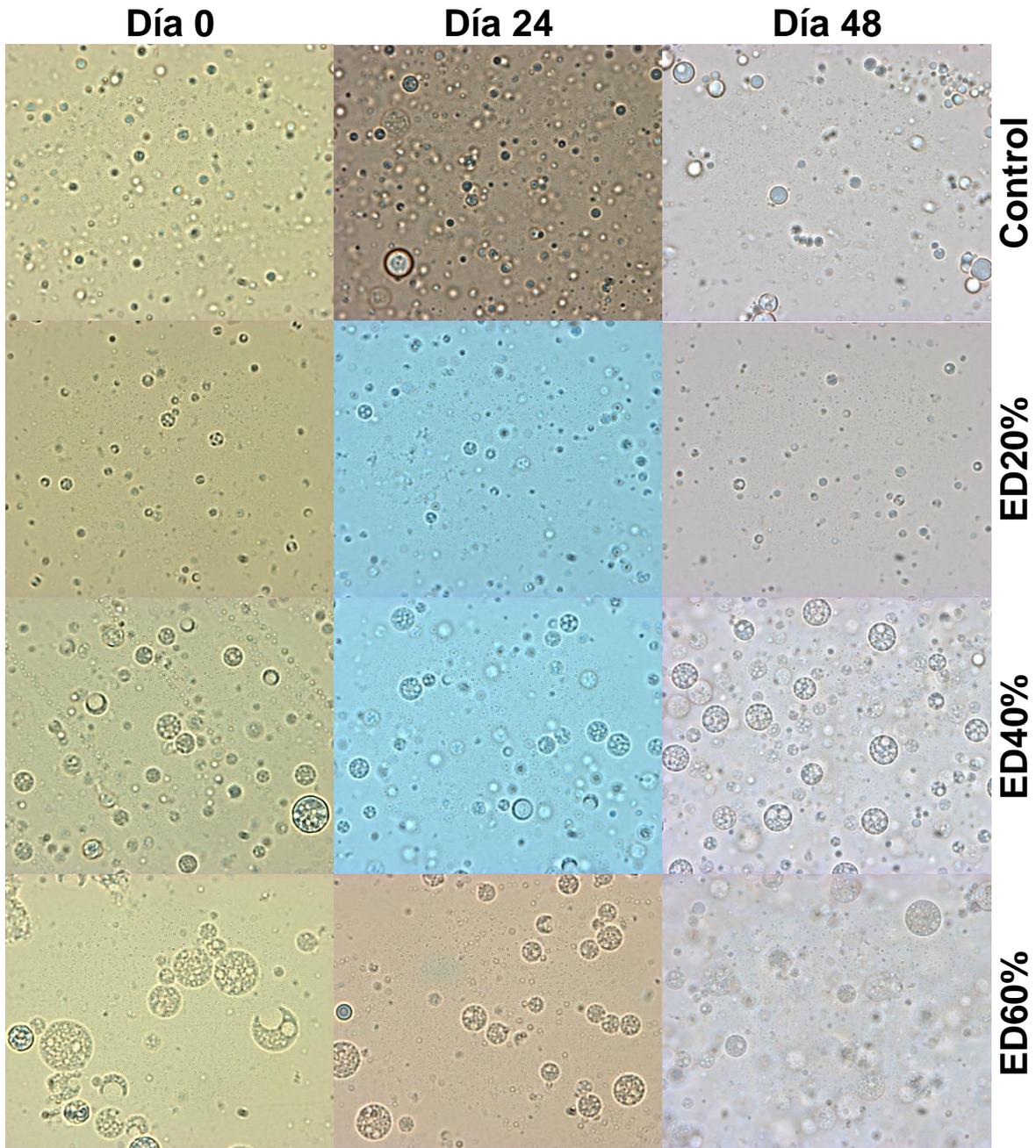


Fig. 13. Fotomicrografías del **Control**: emulsión doble con el 40% de agua desionizada en la fase acuosa interna, **ED20%**: emulsión doble con el 20% de extracto de xoconostle en la fase acuosa interna, **ED40%**: emulsión doble con el 40% de extracto de xoconostle en la fase acuosa interna, **ED60%**: emulsión doble con el 60% de extracto de xoconostle en la fase acuosa interna a los días 0, 24 y 48 de almacenamiento a temperatura ambiente (20°C). Aumento: 100x.

6.1.2 Eficiencia de encapsulación

La encapsulación de compuestos bioactivos susceptibles al daño ocasionado por factores ambientales es una técnica eficiente ampliamente utilizada, sin embargo, se ha reportado que el éxito de la encapsulación depende en gran medida del material de pared empleado (Lekshmi et al., 2019) y la adecuada selección y proporción de tensioactivos de la emulsión primaria. Además, se ha sugerido que una elevada eficiencia de encapsulación (EE) es una consecuencia directa de una buena estabilidad de las emulsiones dobles (Ding et al., 2018).

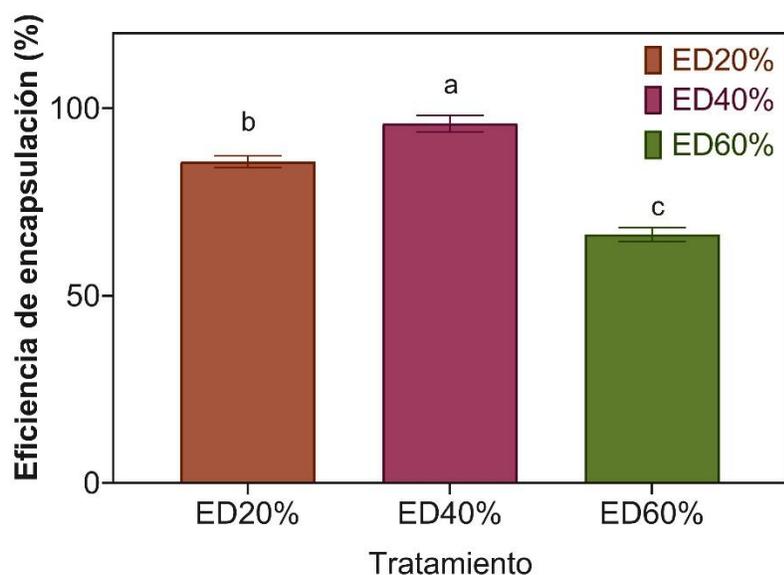


Fig. 14. Eficiencia de encapsulación (%EE) de los tratamientos ED20%, ED40% y ED60%. Barras con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, $p < 0.05$). **ED20%**: Emulsión doble con el 20% de extracto de xoconostle en la fase acuosa interna. **ED40%**: Emulsión doble con el 40% de extracto de xoconostle en la fase acuosa interna. **ED60%**: Emulsión doble con el 60% de extracto de xoconostle en la fase acuosa interna.

En esta investigación, la mayor eficiencia de encapsulación se observó en ED40% ($95.91 \pm 2.26\%$) y la más baja en ED60% ($66.32 \pm 1.85\%$). ED20% mostró una EE intermedia ($85.77 \pm 1.57\%$) y estadísticamente diferente ($p < 0.05$) a los demás tratamientos (Fig. 14). La baja EE de ED60% se puede explicar debido al hecho de que, en emulsiones con altas concentraciones de fase interna, las gotas de W_1 suelen unirse entre sí y formar gotas más grandes que disminuyen la estabilidad de las emulsiones múltiples (Chouaibi, Mejri, Rezig, Abdelli y Hamdi, 2018). Shaddel et

al. (2017) sugirieron que emulsiones dobles con más del 50% de fase interna son desfavorables para la protección de compuestos puesto que, a medida que aumenta el volumen encapsulado, la matriz protectora disminuye. Valores de EE similares a los calculados para ED20% fueron reportados por Silva et al. (2018) al encapsular ácido gálico dentro de emulsiones dobles (80%). ED40% mostró una EE parecida a la reportada por Almeida et al. (2017) en emulsiones dobles con antocianinas como W_1 (90.6%). También se han reportado valores de EE ($\approx 62\%$) similares a ED60% ($\approx 66\%$) al encapsular materiales distintos a los antioxidantes (Santos et al., 2015).

6.1.3 Viscosidad Aparente

De acuerdo con Velderrain-Rodríguez, Acevedo-Fani et al. (2019), la disminución de la viscosidad de las emulsiones $W_1/O/W_2$ se puede emplear como un parámetro indicador de desencapsulación del componente hidrofílico encapsulado (W_1) durante el almacenamiento. Así mismo, se ha reportado que el incremento de la viscosidad de la fase continua (fase acuosa externa o W_2), empleando biopolímeros y algunos otros materiales puede mejorar la estabilidad física de estos sistemas (Iqbal et al., 2013) puesto que se reduce la coalescencia de las gotas de fase oleosa durante la preparación de las muestras y su almacenamiento (Aditya et al., 2015). Con esta finalidad, además de crear sistemas enriquecidos con proteínas, en nuestro estudio usamos una dispersión de WPI al 40% (p/v) como fase continua (W_2) y los resultados obtenidos se encuentran descritos en la Tabla 5. La viscosidad del control fue la menor (540.00 ± 1.00 y 591.00 ± 5.57 mPa•s), seguida del tratamiento ED20% (742.00 ± 19.08 y 712.00 ± 7.21 mPa•s) a los días 0 y 48 de almacenamiento, y, de una manera similar al comportamiento del tamaño de gota, la viscosidad incrementó proporcionalmente a la cantidad de extracto de xoconostle encapsulado (W_1). Se pueden observar diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre tratamientos en el parámetro de viscosidad aparente desde el día cero hasta el día 48 de almacenamiento. Cada tratamiento por separado se mantuvo sin cambios significativos ($p > 0.05$) durante el mismo tiempo, lo cual nos sugiere que durante el periodo de evaluación el extracto de xoconostle aparentemente no se liberó en

ninguna preparación, probablemente debido a que la red proteica de WPI formó un gel que minimizó la movilidad de las gotas y por tanto su colisión y difusión de materia entre las fases W_1 y W_2 . Además, la viscosidad de una emulsión es directamente proporcional a la viscosidad de su fase continua (de Almeida et al. 2017), por lo que la ausencia de cambios en este parámetro nos sugiere estabilidad en el tiempo. Como se describió anteriormente, ED40% y el control fueron preparadas con la misma cantidad de W_1 , no obstante, su valor de viscosidad aparente fue estadísticamente diferente ($p < 0.05$). Esto nos confirma la interacción existente entre los componentes del extracto y los materiales de encapsulación desde la preparación de las emulsiones y durante su almacenamiento. Iqbal et al. (2013) reportaron datos de viscosidad aparente (≈ 1000 mPa•s o ≈ 1.0 Pa•s) similares a ED60% (1466.00 ± 1.00 Pa•s) cuando estudiaron el impacto de la temperatura sobre la microestructura y las propiedades de emulsiones dobles gelificadas. Se ha sugerido que la viscosidad de las emulsiones se ve influenciada por el contenido de fase dispersa (W_1), mostrando diferentes comportamientos los sistemas preparados con un bajo contenido de fase acuosa interna y los sistemas con elevado contenido de W_1 . Además, se cree que otros factores como el tamaño de gota y la cantidad de emulsión primaria dispersa en W_2 influyen en la viscosidad de las emulsiones (Buyukkestelli y El, 2019).

Tabla 5

Viscosidad aparente de los tratamientos de emulsiones dobles durante el almacenamiento.

	Días	Control	ED20%	ED40%	ED60%
Viscosidad aparente (mPa•s)	0	540.00±1.00 ^{aD}	742.00±19.08 ^{aC}	973.67±3.21 ^{aB}	1466.00±1.00 ^{aA}
	3	557.00±35.51 ^{aD}	753.33±15.88 ^{aC}	971.00±26.29 ^{aB}	1450.00±26.45 ^{abA}
	6	562.00±28.21 ^{aD}	745.67±30.09 ^{aC}	923.00±8.89 ^{bbB}	1476.67±15.27 ^{aA}
	12	540.00±1.00 ^{aD}	739.67±45.63 ^{aC}	968.33±10.69 ^{abB}	1400.00±10.00 ^{baA}
	24	538.00±25.16 ^{aD}	751.67±9.71 ^{aC}	972.00±24.06 ^{aB}	1423.33±5.77 ^{abA}
	48	591.00±5.57 ^{aD}	712.00±7.21 ^{aC}	983.00±14.42 ^{aB}	1436.67±35.12 ^{abA}

Los resultados se muestran como media \pm DE de ensayos realizados por triplicado (n=3).

Medias con letras minúsculas iguales en una misma columna no muestran diferencias estadísticas (Tukey, $p > 0.05$) entre los días de almacenamiento de un mismo tratamiento. Medias con letras mayúsculas iguales en la misma fila no muestran diferencias estadísticas entre tratamientos en un mismo día (Tukey, $p > 0.05$). **Control:** Emulsión doble con el 40% de agua desionizada en la fase acuosa interna. **ED20%:** Emulsión doble con el 20% de extracto de xoconostle en la fase acuosa interna. **ED40%:** Emulsión doble con el 40% de extracto de xoconostle en la fase acuosa interna. **ED60%:** Emulsión doble con el 60% de extracto de xoconostle en la fase acuosa interna.

6.1.4 Evaluación del pH

Si se pretende encapsular exitosamente un extracto vegetal dentro de emulsiones dobles W/O/W, es importante monitorear los cambios en el pH durante el almacenamiento puesto que esto podría ser un problema a la hora de incorporarlo a una matriz alimenticia. En este caso, el valor de pH de los tratamientos control y ED20% no mostró cambios significativos durante el almacenamiento. Sin embargo, en las muestras ED40% y ED60% se observó una disminución significativa ($p < 0.05$) del valor de pH durante los 48 días de almacenamiento (Tabla 6). Este comportamiento podría deberse a la difusión de ciertos compuestos bioactivos presentes en el extracto de xoconostle desde W_1 hacia W_2 puesto que se ha reportado que, debido a sus propiedades anfifílicas, compuestos como los ácidos fenólicos pueden atravesar la barrera lipídica que existe entre la fase acuosa interna y la fase continua de las emulsiones dobles (Velderrain-Rodríguez, Acevedo-Fani et al., 2019), disminuyendo ligeramente el pH de la fase continua. Además, apoyándose en los resultados del control y ED20%, se puede concluir que esta migración de compuestos bioactivos se ve incrementada al aumentar la cantidad de extracto encapsulado en la fase interna de las emulsiones.

Tabla 6

Valores de pH de los tratamientos de emulsiones dobles durante el almacenamiento.

	Días	Control	ED20%	ED40%	ED60%
pH	0	5.65±0.08 ^{aAB}	5.61±0.02 ^{aB}	5.77±0.08 ^{aA}	5.65±0.03 ^{aAB}
	3	5.46±0.04 ^{bB}	5.63±0.08 ^{aA}	5.68±0.02 ^{aA}	5.59±0.07 ^{abAB}
	6	5.54±0.07 ^{abAB}	5.65±0.08 ^{aA}	5.52±0.04 ^{bAB}	5.47±0.01 ^{cB}
	12	5.58±0.02 ^{abA}	5.50±0.01 ^{aA}	5.53±0.04 ^{bA}	5.51±0.03 ^{bCA}
	24	5.55±0.06 ^{abA}	5.53±0.02 ^{aA}	5.50±0.02 ^{bA}	5.46±0.05 ^{cA}
	48	5.52±0.04 ^{abAB}	5.56±0.08 ^{aA}	5.29±0.06 ^{cC}	5.42±0.01 ^{cBC}

Los resultados se muestran como media \pm DE de ensayos realizados por triplicado ($n=3$).

Medias con letras minúsculas iguales en una misma columna no muestran diferencias estadísticas (Tukey, $p > 0.05$) entre los días de almacenamiento de un mismo tratamiento. Medias con letras mayúsculas iguales en la misma fila no muestran diferencias estadísticas entre tratamientos en un mismo día (Tukey, $p > 0.05$). **Control:** Emulsión doble con el 40% de agua desionizada en la fase acuosa interna. **ED20%:** Emulsión doble con el 20% de extracto de xoconostle en la fase acuosa interna. **ED40%:** Emulsión doble con el 40% de extracto de xoconostle en la fase acuosa interna. **ED60%:** Emulsión doble con el 60% de extracto de xoconostle en la fase acuosa interna.

6.2 Estabilidad de compuestos bioactivos encapsulados durante el almacenamiento

En la Tabla 7 se muestran los contenidos de fenoles totales, flavonoides, betalaínas y taninos de muestras de emulsiones dobles con el 20 (ED20%), 40 (ED40%) y 60 % (ED60%) de extracto de xoconostle encapsulado, durante 48 días de almacenamiento. En todos los tratamientos, el contenido de fenoles totales, flavonoides y taninos mostró una tendencia a la disminución durante el almacenamiento a pesar de la encapsulación. Al día cero, el contenido de fenoles totales fue estadísticamente diferente ($p < 0.05$) entre los tratamientos, excepto entre ED40% y ED60%, sin embargo, a partir del día 6 y hasta el día 48, el contenido de fenoles totales mostró diferencias entre todos los tratamientos, observándose el mayor contenido en ED60%, seguido de ED40%, ED20% y el control, como se esperaba. El tratamiento ED20% tuvo un contenido de fenoles totales de 10.49 ± 0.11 mg/100g al día 0 y de 6.70 ± 0.08 al día 48, ED40% de 18.01 ± 0.31 y 13.99 ± 0.11 , y ED60% de 18.67 ± 0.38 y 9.67 ± 0.08 , a los días cero y 48 de almacenamiento, respectivamente. Con base en estos datos, después de 48 días de almacenamiento, los porcentajes de pérdida de fenoles totales para ED20%, ED40% y ED60% fueron de 36.13% 22.32% y 48.20%, respectivamente. Guzmán-Díaz et al. (2019) reportaron porcentajes de pérdida de polifenoles de té verde encapsulados dentro de emulsiones dobles del 15.13% después de 35 días de almacenamiento a 4°C. Estos resultados comparados con los nuestros muestran que la temperatura de almacenamiento de las emulsiones dobles influye en la estabilidad de los compuestos encapsulados durante el almacenamiento. El almacenamiento a temperatura ambiente disminuye drásticamente el contenido de fenoles totales puesto que, aunque se encuentran protegidos por una matriz oleosa y una fase acuosa externa, la temperatura aumenta la interacción molecular entre los diversos componentes del extracto de xoconostle y los componentes de la emulsión, promoviendo su liberación y/o degradación.

Tabla 7

Contenido de compuestos bioactivos (fenoles totales, flavonoides totales, betacianinas, betaxantinas y taninos) de emulsiones dobles W/O/W con extracto de xoconostle, durante el almacenamiento.

	Días	Control	ED20%	ED40%	ED60%
Fenoles totales (mgEAG/100g ED)	0	4.71±0.27 ^{bC}	10.49±0.11 ^{aB}	18.01±0.31 ^{aA}	18.67±0.38 ^{bA}
	3	4.99±0.05 ^{bC}	10.44±0.21 ^{aB}	16.69±0.26 ^{bA}	16.67±0.53 ^{aA}
	6	5.02±1.48 ^{bD}	8.73±0.07 ^{bC}	16.09±0.57 ^{cA}	14.72±0.13 ^{cdB}
	12	4.38±0.35 ^{bD}	8.78±0.14 ^{bC}	16.92±0.18 ^{cA}	13.18±0.21 ^{dB}
	24	4.45±0.20 ^{bD}	8.07±0.25 ^{cC}	17.05±0.26 ^{dA}	12.28±0.06 ^{cB}
	48	8.19±0.57 ^{aC}	6.70±0.08 ^{dD}	13.99±0.11 ^{eA}	9.67±0.08 ^{eB}
Flavonoides Totales (mgEQ/100g ED)	0	0.27±0.03 ^{aC}	0.79±0.26 ^{aB}	1.45±0.08 ^{aA}	1.51±0.08 ^{aA}
	3	0.26±0.04 ^{aC}	0.54±0.06 ^{bB}	1.35±0.05 ^{bA}	1.22±0.08 ^{abA}
	6	0.27±0.04 ^{aB}	0.47±0.09 ^{bB}	1.26±0.10 ^{bA}	1.12±0.06 ^{bcA}
	12	0.22±0.01 ^{aD}	0.48±0.05 ^{bC}	1.11±0.05 ^{cB}	0.88±0.05 ^{cA}
	24	0.22±0.01 ^{aD}	0.44±0.06 ^{bC}	0.91±0.04 ^{cA}	0.82±0.03 ^{bB}
	48	0.24±0.07 ^{aD}	0.39±0.05 ^{bC}	0.82±0.15 ^{dA}	0.61±0.04 ^{dB}
Betacianinas (mg betacianina/100g ED)	0	0.00±0.00 ^{aD}	0.15±0.02 ^{aC}	0.32±0.01 ^{aB}	0.41±0.03 ^{aA}
	3	0.00±0.00 ^{aD}	0.12±0.02 ^{bC}	0.29±0.01 ^{bB}	0.42±0.02 ^{aA}
	6	0.00±0.00 ^{aD}	0.11±0.01 ^{bC}	0.27±0.01 ^{bB}	0.35±0.01 ^{bA}
	12	0.00±0.00 ^{aD}	0.11±0.00 ^{bC}	0.26±0.02 ^{cB}	0.30±0.03 ^{cA}
	24	0.00±0.00 ^{aD}	0.10±0.02 ^{bC}	0.23±0.01 ^{dB}	0.26±0.02 ^{cA}
	48	0.00±0.00 ^{aD}	0.06±0.01 ^{dC}	0.22±0.02 ^{eA}	0.21±0.01 ^{dB}
Betaxantinas (mg betaxantina/100g ED)	0	0.00±0.00 ^{bD}	0.05±0.00 ^{aC}	0.13±0.01 ^{aA}	0.16±0.03 ^{aB}
	3	0.00±0.00 ^{bD}	0.04±0.00 ^{abcC}	0.12±0.01 ^{aB}	0.12±0.02 ^{bA}
	6	0.00±0.00 ^{bD}	0.04±0.00 ^{bcdC}	0.12±0.01 ^{aB}	0.09±0.02 ^{cA}
	12	0.00±0.00 ^{bD}	0.03±0.00 ^{cdC}	0.09±0.01 ^{bB}	0.08±0.01 ^{cdA}
	24	0.00±0.00 ^{bD}	0.03±0.00 ^{dC}	0.09±0.02 ^{bB}	0.07±0.01 ^{cdA}
	48	0.02±0.00 ^{aD}	0.04±0.00 ^{abC}	0.07±0.01 ^{bB}	0.06±0.01 ^{dA}
Taninos (mgEC/100g ED)	0	1.57±0.16 ^{aD}	9.59±0.94 ^{aC}	13.25±0.58 ^{aB}	17.91±0.34 ^{aA}
	3	1.52±0.19 ^{abD}	8.92±0.50 ^{abC}	11.58±0.63 ^{bB}	17.07±1.09 ^{abA}
	6	1.33±0.18 ^{abD}	7.91±0.40 ^{bcC}	10.83±0.79 ^{bcB}	15.93±1.01 ^{bA}
	12	1.30±0.08 ^{abD}	7.69±0.19 ^{bcC}	10.03±0.59 ^{cdB}	13.83±0.52 ^{cA}
	24	0.95±0.08 ^{bcD}	7.16±0.21 ^{cdC}	10.04±0.30 ^{cdB}	11.82±0.50 ^{cA}
	48	0.68±0.43 ^{cdD}	5.93±0.26 ^{dC}	9.15±0.20 ^{dB}	9.31±0.51 ^{dB}

Los resultados se muestran como media ± DE de ensayos realizados por triplicado (n=3).

Medias con letras minúsculas iguales en una misma columna no muestran diferencias estadísticas (Tukey, $p > 0.05$) entre los días de almacenamiento de un mismo tratamiento. Medias con letras mayúsculas iguales en la misma fila no muestran diferencias estadísticas entre tratamientos en un mismo día (Tukey, $p > 0.05$). **Control:** Emulsión doble con el 40% de agua desionizada en la fase acuosa interna. **ED:** Emulsión doble. **ED20%:** Emulsión doble con el 20% de extracto de xoconostle en la fase acuosa interna. **ED40%:** Emulsión doble con el 40% de extracto de xoconostle en la fase acuosa interna. **ED60%:** Emulsión doble con el 60% de extracto de xoconostle en la fase acuosa interna.

El contenido de flavonoides totales no mostró diferencias estadísticas ($p > 0.05$) entre ED60% y ED40% a los días 0, 3 y 6 pero si se encontraron diferencias entre ED20%, ED40% y el control desde el día cero hasta el día 48 de almacenamiento. Como se puede observar, el contenido inicial de fenoles y flavonoides no mostró diferencias entre ED40% y ED60% lo cual se podría explicar por valor de eficiencia de encapsulación obtenido para estos dos tratamientos (Fig. 14). ED40% tuvo una elevada eficiencia de encapsulación ($95.91 \pm 2.26\%$), mientras que ED60% tuvo una muy baja ($66.32 \pm 1.85\%$), esto implica que más del 40% de los compuestos bioactivos del xoconostle en ED60% no fueron encapsulados y por lo tanto fueron descartados junto con la fase acuosa externa de las emulsiones (W_2) después de los procesos de centrifugación y separación.

Las betalaínas son pigmentos que poseen actividad antioxidante y esto les confiere múltiples actividades biológicas. Las betalaínas más importantes en frutos del cactus son las betacianinas (de color rojo) y las betaxantinas (de color amarillo). El contenido de betalaínas en los tratamientos de emulsiones dobles se resume en la Tabla 7. Tanto el contenido de betacianinas (BTC) como de betaxantinas (BTX) disminuyó significativamente durante el almacenamiento y mostró diferencias estadísticas entre tratamientos ($p < 0.05$). Cenobio-Galindo et al. (2019) reportaron valores de betalaínas totales (BTC + BTX) similares a los nuestros en emulsiones dobles incorporadas en una bebida fermentada de tipo yogur (0.46 - 1.4 mg/100 mL, dependiendo del tratamiento).

El contenido de taninos también mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos en todos los días de almacenamiento (Tabla 7). ED20% y ED60% no mostraron cambios significativos entre el día cero y el día 3 de almacenamiento, no obstante, se observó disminución progresiva de taninos a lo largo de los 48 días de almacenamiento en todos los tratamientos. En general, se observó disminución significativa ($p < 0.05$) de compuestos bioactivos en todos los tratamientos a partir del día 3 de almacenamiento con excepción del contenido de fenoles totales y taninos en ED20%, y de flavonoides y taninos en ED60%, los cuales mostraron disminuciones significativas a partir del día 6. El control mostró los valores más

bajos en todos los casos (Tabla 7). Kim et al. (2003) reportaron que la efectividad de las emulsiones dobles para proteger compuestos bioactivos durante el almacenamiento se puede ver influenciada por la concentración de éstos en la fase interna (W_1), por el tipo de antioxidantes encapsulados y por el pH de las muestras. Ellos observaron una importante disminución de la estabilidad del ácido kójico encapsulado dentro de emulsiones dobles cuando el pH era más cercano a 7.0, una estabilidad media a pH de 4.5 y la mayor estabilidad a pH ácido (3.7). Este comportamiento podría explicar en parte la degradación de los compuestos de xoconostle encapsulados en nuestro estudio, puesto que los valores de pH de nuestros tratamientos fueron cercanos a 5.5.

La actividad antidiabética de los extractos naturales ha sido ampliamente reportada (Chávez-Silva et al., 2018; Chen et al., 2016; Medina-Pérez et al., 2019; Wu et al., 2017). Esta y otras actividades benéficas se han atribuido principalmente al contenido de polifenoles y familias químicas asociadas como los flavonoides y los ácidos hidoxicinámicos. La actividad antidiabética de estos fitoquímicos afecta la homeostasis de la glucosa en diferentes puntos del metabolismo debido a su capacidad de inhibir enzimas como la α -amilasa y la α -glucosidasa. Mediante diferentes técnicas computacionales se han elucidado mecanismos de inhibición enzimática, los cuales dependen de la naturaleza del fitoquímico, por ejemplo, se ha reportado en la literatura que los grupos 3', 4' dihidroxilo del anillo B de ciertos flavonoides, interfieren con los residuos aminoacídicos que forman el sitio activo de estas enzimas, impidiendo su biocatálisis (Alongi et al., 2018). En cuanto al poder antidiabético de compuestos como los ácidos fenólicos se ha reportado su actividad, sin embargo, se conoce poco acerca de sus mecanismos de acción, aunque se sugiere que los grupos acetilados presentes en estos y otros compuestos ejercen un papel importante en los mecanismos de inhibición (Wu et al., 2017).

6.3 Actividad antioxidante durante el almacenamiento

En la actividad antioxidante como inhibición del radical DPPH[·] se observa que los tratamientos ED20%, ED40% y ED60% mostraron una disminución durante el almacenamiento (Tabla 8) mientras que el tratamiento control mostró un alto porcentaje de inhibición de DPPH[·]. La elevada actividad antioxidante de los monofenoles presentes en los aceites vegetales (principalmente tocoferoles [Vit. A]) podría explicar el comportamiento del control (Londoño, 2012). Martins et al. (2020) encontraron porcentajes de actividad antioxidante (% AA) para DPPH[·] similares al tratamiento ED40% ($85.09 \pm 0.69\%$) al día cero de almacenamiento y reportaron una actividad antioxidante equivalente al 59.62% de la actividad antioxidante inicial de emulsiones dobles cargadas con ácido gálico después de 28 días de almacenamiento, atribuyendo estas pérdidas a la protección que los antioxidantes del extracto pudieron ejercer sobre los lípidos de la fase oleosa contra la oxidación, así como variaciones de temperatura y cierta exposición al aire. Esos autores consideran viable la encapsulación de antioxidantes mediante emulsiones dobles al obtener una actividad antioxidante superior al 50% (con respecto a la inicial) después del almacenamiento. Todos nuestros tratamientos mostraron porcentajes superiores al 60% con respecto al valor inicial después de 48 días de almacenamiento.

Con respecto a la inhibición del radical ABTS^{·+} (%), se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos y durante el almacenamiento. Al día cero, la actividad antioxidante se comportó de una manera dependiente de la fracción encapsulada en W_1 (extracto de xoconostle o agua destilada). Después de 48 días de almacenamiento, ED40% mostró la mayor actividad antioxidante ($45.35 \pm 0.26\%$), la cual fue estadísticamente mayor a ED20% y ED60% (Tabla 8) probablemente debido a la alta eficiencia de encapsulación obtenida después del segundo paso de emulsificación ($95.91 \pm 2.26\%$).

Tabla 8

Actividad antioxidante (DPPH[·] y ABTS^{·+}) de emulsiones dobles W/O/W con extracto de xoconostle, durante el almacenamiento.

	Días	Control	ED20%	ED40%	ED60%
DPPH [·] (%)	0	40.64±1.05 ^{cd}	61.16±0.24 ^{ac}	71.95±2.58 ^{bb}	86.41±0.21 ^{aA}
	3	43.79±1.59 ^{abd}	56.38±0.29 ^{bc}	77.00±0.41 ^{aA}	70.48±0.32 ^{bb}
	6	41.21±0.35 ^{bcC}	41.78±0.69 ^{dc}	59.28±0.48 ^{dA}	50.91±1.15 ^{cB}
	12	41.03±0.20 ^{cC}	40.27±0.71 ^{dec}	59.18±0.29 ^{dA}	52.80±0.44 ^{cB}
	24	45.93±1.12 ^{aB}	37.79±0.35 ^{ec}	64.83±0.21 ^{CA}	47.70±0.97 ^{dB}
	48	45.01±0.73 ^{aC}	50.73±1.93 ^{cB}	57.30±1.67 ^{dA}	53.03±0.99 ^{cB}
ABTS ^{·+} (%)	0	29.98±0.79 ^{ad}	53.93±1.62 ^{ac}	62.34±0.44 ^{aB}	76.46±2.30 ^{aA}
	3	28.33±1.15 ^{abd}	41.11±0.45 ^{bcC}	52.75±1.01 ^{cB}	59.73±1.39 ^{bcA}
	6	25.79±2.83 ^{bc}	45.06±2.26 ^{bb}	55.82±0.80 ^{bA}	53.38±0.40 ^{dA}
	12	25.55±2.33 ^{abd}	38.08±0.45 ^{cC}	51.62±0.72 ^{cB}	55.65±1.34 ^{cdA}
	24	25.79±1.88 ^{abd}	41.23±3.62 ^{bcC}	51.16±0.84 ^{cB}	60.99±0.44 ^{bA}
	48	24.85±0.59 ^{bc}	36.11±0.57 ^{cB}	45.35±0.26 ^{dA}	35.30±2.40 ^{eB}

Los resultados se muestran como media ± DE de ensayos realizados por triplicado (n=3).

Medias con letras minúsculas iguales en una misma columna no muestran diferencias estadísticas (Tukey, $p > 0.05$) entre los días de almacenamiento de un mismo tratamiento. Medias con letras mayúsculas iguales en la misma fila no muestran diferencias estadísticas entre tratamientos en un mismo día (Tukey, $p > 0.05$). **DPPH[·]**: Inhibición del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo expresado como porcentaje (%). **ABTS^{·+}**: Inhibición del radical ácido 2,2'azinobis- (3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico expresado como porcentaje (%). **Control**: Emulsión doble con 40% de agua desionizada en la fase acuosa interna. **ED20%**: Emulsión doble con el 20% de extracto de xoconostle en la fase acuosa interna. **ED40%**: Emulsión doble con el 40% de extracto de xoconostle en la fase acuosa interna. **ED60%**: Emulsión doble con el 60% de extracto de xoconostle en la fase acuosa interna. *La acarbosa se utilizó como un segundo control al momento del análisis de todas las muestras.

La actividad antioxidante de las emulsiones se mostró variable dependiendo del método empleado para su determinación (DPPH[·] o ABTS^{·+}). Dichas variaciones se han atribuido en diferentes reportes a la propia naturaleza de los radicales, siendo el radical ABTS^{·+} más versátil para evaluar antioxidantes hidrófilos y lipófilos mientras que el radical DPPH[·] es difícil de interpretar cuando el espectro de absorción de las sustancias evaluadas se asemeja a la absorbancia del radical, lo cual, además de su sobrevaloración ante sustancias de pequeño tamaño molecular, podría explicar los mayores porcentajes de actividad antioxidante observados en nuestros tratamientos, incluyendo el control (Londoño, 2012). Aunque el control mostró los valores más bajos de actividad antioxidante frente a ambos radicales (DPPH[·] y ABTS^{·+}), se observaron porcentajes importantes de esta actividad, los cuales se vieron potenciados con la encapsulación del extracto. Este hecho pone

de manifiesto el potencial de las emulsiones dobles (como sistemas de encapsulación de extractos ricos en antioxidantes) para ser incorporados como ingredientes funcionales en productos saludables.

6.4 Actividad antidiabética durante el almacenamiento

Al día cero no se observaron diferencias estadísticas ($p > 0.05$) en el porcentaje de inhibición de α -amilasa entre los tratamientos con extracto de xoconostle encapsulado. ED20% y ED40% permanecieron sin cambios significativos durante los primeros 12 días de almacenamiento mientras que ED60% mostró una disminución estadística después del día 6 de almacenamiento (Tabla 9) quizá debido a la pobre protección de compuestos bioactivos del extracto a consecuencia de la baja eficiencia de encapsulación (EE). Después del almacenamiento, ED40% permaneció con el mayor poder inhibitorio contra α -amilasa ($30.46 \pm 1.27\%$) lo cual es congruente con la alta EE calculada al inicio. Tomando en cuenta su porcentaje inicial, en ED20% y ED40% la inhibición de α -amilasa después del almacenamiento parece estar más relacionada con la fracción de extracto encapsulado que con la EE (%).

Los porcentajes de inhibición de α -glucosidasa mostraron diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre tratamientos y durante el tiempo de almacenamiento (Tabla 9). Al día cero, este porcentaje de inhibición fue proporcional a la cantidad de extracto encapsulado, observando el mayor poder antidiabético en ED60% ($78.84 \pm 1.17\%$) y el más bajo en el control. Sin embargo, después del almacenamiento, ED60% mostró también las mayores pérdidas de actividad biológica ($\approx 85\%$), seguido de ED40% ($\approx 50\%$) y ED20% ($\approx 40\%$), por lo que el poder antidiabético de las emulsiones dobles después del almacenamiento se comportó de manera inversamente proporcional a la cantidad de fase acuosa interna. ED40% nuevamente mostró la mayor actividad antidiabética ($30.19 \pm 0.67\%$) después del día 48. El control acarboxa (inhibidor farmacéutico) mostró los valores más bajos de inhibición para ambas enzimas (Tabla 9).

Tabla 9

Actividad antidiabética (inhibición de α -amilasa y α -glucosidasa [%]) de emulsiones dobles W/O/W con extracto de xoconostle, durante el almacenamiento.

	Días	Control	ED20%	ED40%	ED60%
Inhibición α -amilasa (%)	0	7.40±4.22 ^{aC}	33.52±2.54 ^{aB}	39.92±2.68 ^{aB}	40.19±2.52 ^{aB}
	3	2.50±2.33 ^{aC}	33.80±5.52 ^{aB}	39.50±2.50 ^{aB}	35.47±1.46 ^{abB}
	6	5.94±12.36 ^{aC}	30.18±4.01 ^{abB}	34.49±2.84 ^{abB}	26.42±3.98 ^{cB}
	12	0.75±8.09 ^{aC}	29.49±3.01 ^{abcB}	33.38±2.51 ^{abB}	29.76±4.51 ^{bcB}
	24	0.90±5.52 ^{aD}	24.20±1.25 ^{bcBC}	32.27±2.52 ^{bb}	17.94±2.21 ^{dC}
	48	2.65±1.10 ^{aE}	22.25±2.14 ^{cC}	30.46±1.27 ^{bb}	13.91±1.88 ^{dD}
			*Acarbosa: 77.37±4.05 ^{aA}		
Inhibición α -glucosidasa (%)	0	3.78±2.87 ^{aE}	33.88±3.99 ^{aD}	58.77±1.59 ^{aC}	78.84±1.17 ^{aB}
	3	7.25±2.20 ^{aD}	36.09±0.49 ^{aC}	54.61±2.19 ^{aB}	54.16±3.13 ^{bb}
	6	7.87±3.82 ^{aD}	25.39±3.77 ^{bc}	40.08±9.53 ^{bb}	41.09±2.83 ^{cB}
	12	5.57±2.60 ^{aD}	25.53±1.77 ^{bc}	33.64±2.99 ^{bb}	38.71±5.95 ^{cB}
	24	1.05±1.89 ^{aE}	33.62±0.39 ^{aD}	38.33±0.14 ^{bc}	43.50±2.91 ^{cB}
	48	5.99±2.32 ^{aE}	20.20±1.37 ^{bc}	30.19±0.67 ^{bb}	12.11±1.67 ^{dD}
			*Acarbosa: 88.76±1.09 ^{aA}		

Los resultados se muestran como media \pm DE de ensayos realizados por triplicado (n=3).

Medias con letras minúsculas iguales en una misma columna no muestran diferencias estadísticas (Tukey, $p > 0.05$) entre los días de almacenamiento de un mismo tratamiento. Medias con letras mayúsculas iguales en la misma fila no muestran diferencias estadísticas entre tratamientos en un mismo día (Tukey, $p > 0.05$). **Control:** Emulsión doble con 40% de agua desionizada en la fase acuosa interna. **ED20%:** Emulsión doble con el 20% de extracto de xoconostle en la fase acuosa interna. **ED40%:** Emulsión doble con el 40% de extracto de xoconostle en la fase acuosa interna. **ED60%:** Emulsión doble con el 60% de extracto de xoconostle en la fase acuosa interna. *La acarbosa se utilizó como un segundo control al momento del análisis de todas las muestras.

La actividad inhibitoria de α -amilasa y α -glucosidasa relacionadas con la actividad antidiabética fue superior a la reportada por de Souza et al. (2018) al encapsular compuestos fenólicos mediante el método de coacervación compleja (4.1 y 6.3 para α -amilasa y α -glucosidasa, respectivamente), lo que reafirma la viabilidad de los sistemas de encapsulación basados en emulsiones dobles para encapsular y proteger compuestos antidiabéticos naturales.

6.5 Digestión *in vitro* de emulsiones dobles

6.5.1 Actividad antioxidante durante la digestión

La Fig. 15 y Fig. 16 resumen los resultados de actividad antioxidante durante la simulación de la digestión. Todos los tratamientos mostraron un incremento de la capacidad antioxidante (DPPH \cdot y ABTS \cdot^+) a medida que el proceso digestivo avanzaba y hubo diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$). La actividad antioxidante medida como inhibición del radical DPPH \cdot mostró un máximo de 73.72

$\pm 0.99\%$ (ED40%) después de la fase intestinal (FI), sin mostrar diferencias estadísticas ($p > 0.05$) con ED60% ($72.15 \pm 1.15\%$).

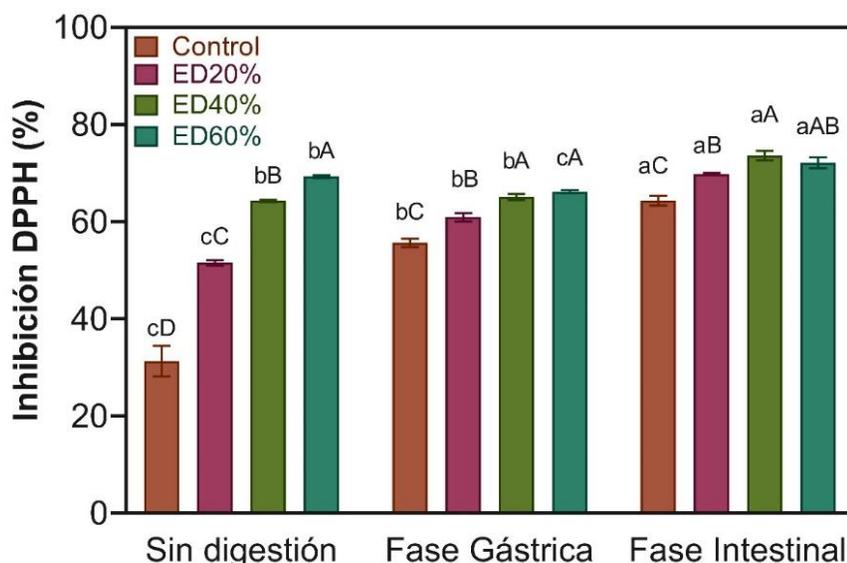


Fig. 15. Inhibición del radical DPPH' del extracto de xoconostle encapsulado durante la digestión. Barras con letras minúsculas iguales no muestran diferencias estadísticas (Tukey, $p > 0.05$) entre las fases de digestión de un mismo tratamiento. Barras con letras mayúsculas iguales no muestran diferencias estadísticas entre tratamientos en una misma fase de digestión (Tukey, $p > 0.05$). **Control:** Emulsión doble con 40% de agua desionizada en la fase acuosa interna. **ED20%:** Emulsión doble con el 20% de extracto de xoconostle en la fase acuosa interna. **ED40%:** Emulsión doble con el 40% de extracto de xoconostle en la fase acuosa interna. **ED60%:** Emulsión doble con el 60% de extracto de xoconostle en la fase acuosa interna. *La acarbosa se utilizó como un segundo control al momento del análisis de todas las muestras

La inhibición del radical ABTS^{•+} en general no mostró diferencias estadísticas ($p > 0.05$) entre las muestras sometidas a digestión gástrica (FG) y las muestras no digeridas (SD), sin embargo, alcanzó casi el 100% en todos los tratamientos después de la fase intestinal. Este aumento de actividad antioxidante después de la fase intestinal puede deberse a diferentes razones. Primeramente, la digestión de la fracción lipídica con pancreatina liberó el extracto de xoconostle, el cual contiene diferentes moléculas con actividad antioxidante. Después, la hidrólisis de los triacilglicerol que componen el aceite de canola pudo provocar la liberación de compuestos antioxidantes atrapados en la matriz oleosa que contribuyeron al poder antioxidante. Además, se ha demostrado que la digestión de proteínas lácteas (como el WPI empleado como fase continua en nuestros tratamientos) con pepsina

y pancreatina, libera péptidos con aminoácidos como Trp y Tyr los cuales contienen grupos fenólicos e indólicos con la capacidad de donar hidrógenos, lo que a su vez les confiere alta actividad de eliminación de radicales $ABTS^{\cdot+}$ (Hernández-Ledesma, Quirós, Amigo y Recio, 2007).

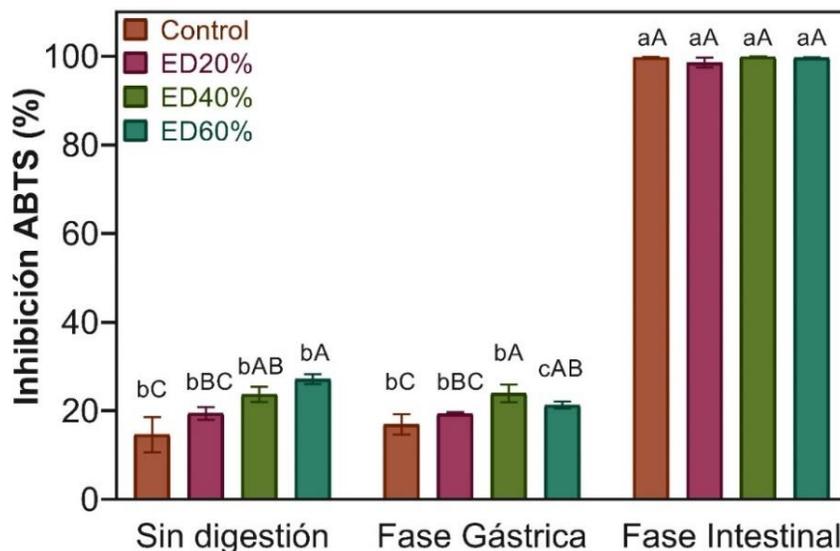


Fig. 16. Inhibición del radical $ABTS^{\cdot+}$ del extracto de xoconostle encapsulado durante la digestión. Barras con letras minúsculas iguales no muestran diferencias estadísticas (Tukey, $p > 0.05$) entre las fases de digestión de un mismo tratamiento. Barras con letras mayúsculas iguales no muestran diferencias estadísticas entre tratamientos en una misma fase de digestión (Tukey, $p > 0.05$). **Control:** Emulsión doble con 40% de agua desionizada en la fase acuosa interna. **ED20%:** Emulsión doble con el 20% de extracto de xoconostle en la fase acuosa interna. **ED40%:** Emulsión doble con el 40% de extracto de xoconostle en la fase acuosa interna. **ED60%:** Emulsión doble con el 60% de extracto de xoconostle en la fase acuosa interna. *La acarbosa se utilizó como un segundo control al momento del análisis de todas las muestras.

6.5.2 Actividad antidiabética durante la digestión

La actividad antidiabética de los distintos tratamientos mostró un comportamiento diferente a la actividad antioxidante (Fig. 17 y Fig. 18). En las muestras sin digestión (SD), la inhibición de α -amilasa fue proporcional a la fracción de extracto encapsulado y no se observaron diferencias estadísticas ($p > 0.05$) entre los tratamientos después de la fase intestinal (FI), sin embargo, ED40%, el cual mostró también los valores más altos de eficiencia de encapsulación, mostró el porcentaje de inhibición más alto ($29.10 \pm 2.43\%$) (Fig. 17). Pasukamonset, Kwon, y Adisakwattana (2016) encontraron porcentajes de inhibición de α -amilasa similares

a los de este estudio (Fig. 17) después de someter a digestión un extracto de polifenoles de *Clitoria ternatea* atrapados dentro de microcápsulas de alginato ($28.87 \pm 0.09\%$).

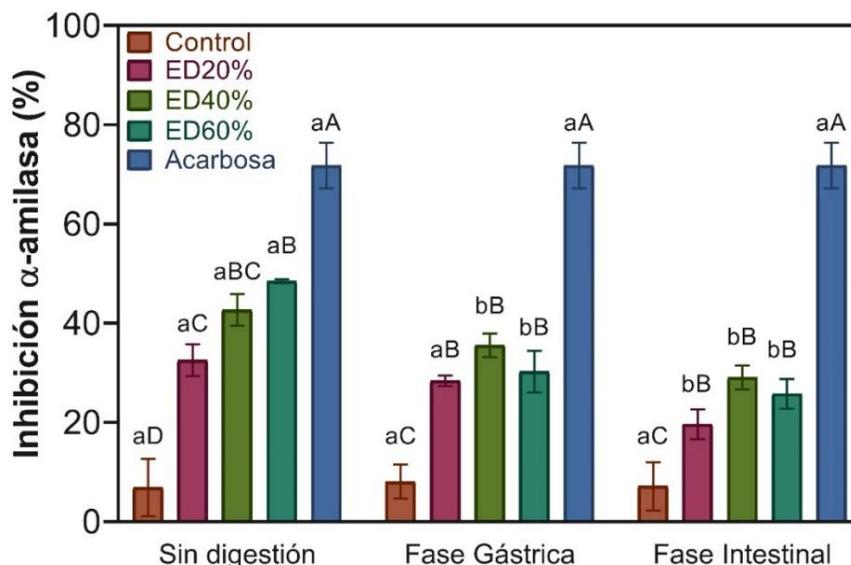


Fig. 17. Inhibición de α -amilasa del extracto de xoconostle encapsulado durante digestión. Barras con letras minúsculas iguales no muestran diferencias estadísticas (Tukey, $p > 0.05$) entre las fases de digestión de un mismo tratamiento. Barras con letras mayúsculas iguales no muestran diferencias estadísticas entre tratamientos en una misma fase de digestión (Tukey, $p > 0.05$). **Control:** Emulsión doble con 40% de agua desionizada en la fase acuosa interna. **ED20%:** Emulsión doble con el 20% de extracto de xoconostle en la fase acuosa interna. **ED40%:** Emulsión doble con el 40% de extracto de xoconostle en la fase acuosa interna. **ED60%:** Emulsión doble con el 60% de extracto de xoconostle en la fase acuosa interna. *La acarbosa se utilizó como un segundo control al momento del análisis de todas las muestras.

El tratamiento ED40% mostró el mayor porcentaje de inhibición de α -glucosidasa en todas las fases de la digestión, seguida de ED20% y ED60%. Todos los tratamientos no sometidos a digestión tuvieron alrededor de 50% de inhibición de α -glucosidasa y después de la fase intestinal se conservó de un 45-50% de la actividad inhibitoria en todos los tratamientos con respecto al valor inicial. El control sin extracto y la acarbosa mostraron los valores más bajo y más alto de inhibición enzimática, respectivamente (Fig. 18). Links et al. (2015) también reportaron una disminución de los porcentajes de inhibición de α -amilasa y α -glucosidasa después de la digestión de taninos de sorgo encapsulados dentro de micropartículas de

kafirina, atribuyendo el grado de inhibición enzimática al tamaño y estructura química de los polifenoles presentes en los extractos.

Con base en nuestros datos, podemos concluir que el efecto antidiabético del extracto de emulsiones no se comportó de una manera proporcional a la cantidad de extracto encapsulado. Así mismo, la actividad antioxidante no se relacionó con la actividad inhibitoria del extracto contra ninguna de las dos enzimas digestivas analizadas. Así, el poder antidiabético parece estar condicionado principalmente por el porcentaje de extracto que permaneció realmente dentro de las gotas de aceite (EE) y por factores como el tamaño de glóbulo, es decir, a menor tamaño de gota, mayor resistencia gástrica e intestinal de las emulsiones contra la digestión.

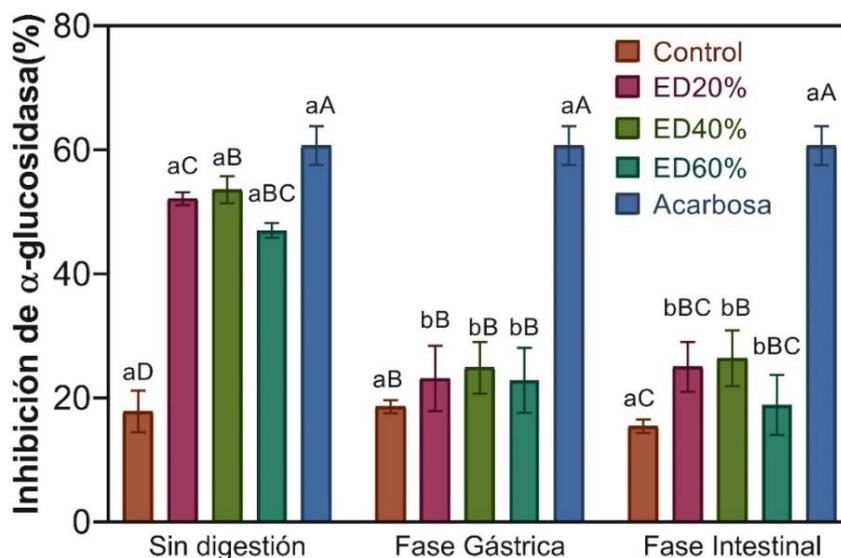


Fig. 18. Inhibición de α -glucosidasa del extracto de xoconostle encapsulado durante digestión. Barras con letras minúsculas iguales no muestran diferencias estadísticas (Tukey, $p > 0.05$) entre las fases de digestión de un mismo tratamiento. Barras con letras mayúsculas iguales no muestran diferencias estadísticas entre tratamientos en una misma fase de digestión (Tukey, $p > 0.05$). **Control:** Emulsión doble con 40% de agua desionizada en la fase acuosa interna. **ED20%:** Emulsión doble con el 20% de extracto de xoconostle en la fase acuosa interna. **ED40%:** Emulsión doble con el 40% de extracto de xoconostle en la fase acuosa interna. **ED60%:** Emulsión doble con el 60% de extracto de xoconostle en la fase acuosa interna. *La acarbosa se utilizó como un segundo control al momento del análisis de todas las muestras.

6.5.3 Liberación de ácidos grasos durante la digestión

Durante la simulación de la fase intestinal de la digestión, la lipasa presente en la pancreatina hidroliza los triacilgliceroles presentes en fase oleosa de las emulsiones (aceite de canola), liberándose el contenido encapsulado dentro de los glóbulos grasos (extracto de xoconostle). Como productos de hidrolisis se obtienen dos ácidos grasos libres y un monoacilglicérido (Qin, Yang, Gao, Yao y McClements, 2017). Estos ácidos grasos libres son ácidos carboxílicos (-COOH) que acidifican el medio a medida que transcurre el tiempo de digestión. Así, la adición de NaOH (0.25 M) con la finalidad de mantener el pH en un valor de 7.0 durante 120 minutos de simulación digestiva, nos permite conocer el comportamiento digestivo de estos sistemas en el tiempo. Este parámetro entonces lo consideramos, al igual que la actividad antioxidante durante la digestión, como prueba de la liberación del extracto encapsulado una vez que llega al intestino.

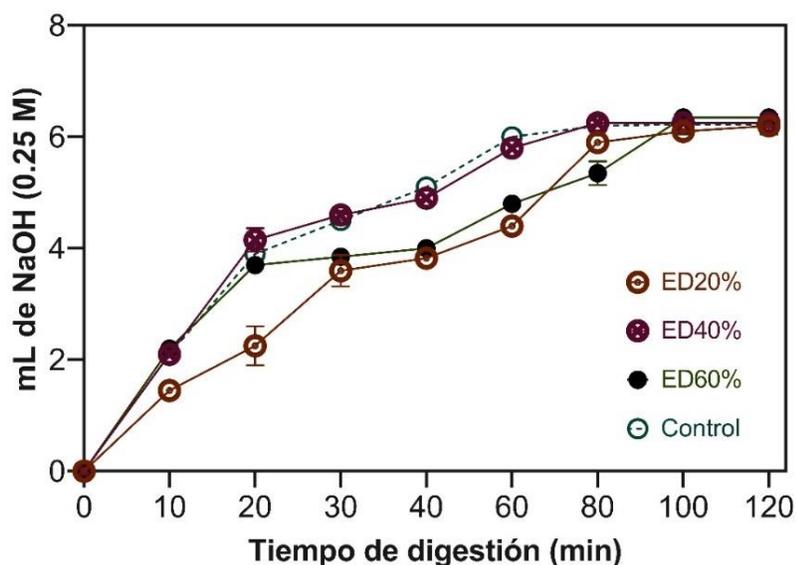


Fig. 19. Comportamiento de la digestión de la fase lipídica de los tratamientos de emulsiones dobles durante la fase intestinal. **Control:** Emulsión doble con 40% de agua desionizada en la fase acuosa interna. **ED20%:** Emulsión doble con el 20% de extracto de xoconostle en la fase acuosa interna. **ED40%:** Emulsión doble con el 40% de extracto de xoconostle en la fase acuosa interna. **ED60%:** Emulsión doble con el 60% de extracto de xoconostle en la fase acuosa interna. *La acarbosa se utilizó como un segundo control al momento del análisis de todas las muestras.

Durante los primeros minutos de la digestión intestinal se observó un rápido incremento en la liberación de ácidos grasos (AGL) en todos los tratamientos. Posteriormente, la digestión lipídica se ralentizó y mantuvo en un aumento progresivo hasta los 120 minutos del ensayo (Fig. 19). Se puede observar que durante los primeros 20 min no hubo diferencias aparentes entre los tratamientos ED40%, ED60% y control mientras que ED20% mostró una liberación de AGL más lenta pero progresiva, probablemente debido a la mayor cantidad de fase oleosa presente en esta formulación. Gasa-Falcon et al. (2017) reportaron una digestión lipídica acelerada en los primeros minutos de ensayo y después un periodo de digestión más lento y progresivo hasta los 120 min en su estudio de digestión de emulsiones dobles empleado fibra de mandarina como biopolímero en la fase continua. Este comportamiento fue muy similar al de nuestros tratamientos.

Se debe destacar que el tratamiento ED40% y el control (los cuales fueron preparados con la misma proporción de fases), no mostraron diferencias en la hidrólisis durante todo el experimento ($p > 0.05$). Debido a que la digestión lipídica en emulsiones dobles es considerada un fenómeno interfacial que depende de la unión del complejo lipasa-colipasa sobre las superficies de las gotas grasas emulsificadas en la fase continua, se puede concluir que la encapsulación de extracto de xoconostle no ocasionó un impedimento interfacial que alterara el comportamiento de la digestión lipídica de las emulsiones dobles (Velderrain-Rodríguez, Salvia-Trujillo et al., 2019).

7. Conclusiones

Las emulsiones dobles con mayor cantidad de fase acuosa interna (extracto de xoconostle) son menos eficientes para proteger compuestos bioactivos y actividad biológica.

La digestión simulada *in vitro* aumentó la capacidad antioxidante de los tratamientos, pero disminuyó su efecto antidiabético alrededor de un 50%.

La formulación de ED40% fue la más adecuada para preservación de biocompuestos y actividad antidiabética del extracto de xoconostle.

La microencapsulación de extracto de xoconostle mediante sistemas de emulsiones dobles parece una alternativa prometedora para la preservación de extracto de xoconostle, puesto que mantiene viables hasta un 60-80% de los compuestos bioactivos, además de su capacidad antioxidante y antidiabética después de un almacenamiento prolongado a temperatura ambiente.

8. Referencias

- Abirami, A., Nagarani, G., y Siddhuraju, P. (2014). In vitro antioxidant, anti-diabetic, cholinesterase and tyrosinase inhibitory potential of fresh juice from *Citrus hystrix* and *C. maxima* fruits. *Food Science and Human Wellness*, 3(1), 16-25.
- Aditya, N. P., Aditya, S., Yang, H. J., Kim, H. W., Park, S. O., Lee, J., y Ko, S. (2015). Curcumin and catechin co-loaded water-in-oil-in-water emulsion and its beverage application. *Journal of functional foods*, 15, 35-43.
- Ahmad, L. A., y Crandall, J. P. (2010). Type 2 diabetes prevention: a review. *Clinical Diabetes*, 28(2), 53-59.
- Alongi, M., Verardo, G., Gorassini, A., y Anese, M. (2018). Effect of pasteurization on in vitro α -glucosidase inhibitory activity of apple juice. *LWT*, 98, 366-371.
- Andrade, J., Wright, A. J., y Corredig, M. (2018). In vitro digestion behavior of water-in-oil-in-water emulsions with gelled oil-water inner phases. *Food research international*, 105, 41-51.
- Andrés-Lacueva, C., Medina-Rejon, A., Llorach, R., Urpi-Sarda, M., Khan, N., Chiva-Blanch, G., ... y Lamuela-Raventos, R. M. (2010). Phenolic compounds: chemistry and occurrence in fruits and vegetables. *Fruit and vegetable phytochemicals: Chemistry, nutritional value and stability*, 53-80.
- Arreola, N. H. J. (1988). Distribución de las especies de *Opuntia* en Jalisco. *Memoria de la III Reunión Nacional y I Reunión Internacional. El Nopal*, 10-14.
- Arulselvan, P., Ghofar, H. A. A., Karthivashan, G., Halim, M. F. A., Ghafar, M. S. A., y Fakurazi, S. (2014). Antidiabetic therapeutics from natural source: A systematic review. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 4(4), 607-617.
- Aruwa, C. E., Amoo, S. O., y Kudanga, T. (2018). *Opuntia* (Cactaceae) plant compounds, biological activities and prospects—A comprehensive review. *Food Research International*, 112, 328-344.

- Arvouet-Grand, A., Vennat, B., Pourrat, A., y Legret, P. (1994). Standardization of propolis extract and identification of principal constituents. *Journal de pharmacie de Belgique*, 49(6), 462-468.
- Asmat, U., Abad, K., y Ismail, K. (2016). Diabetes mellitus and oxidative stress—A concise review. *Saudi pharmaceutical journal*, 24(5), 547-553.
- Azeredo, H. M. (2009). Betalains: properties, sources, applications, and stability—a review. *International journal of food science & technology*, 44(12), 2365-2376.
- Bakry, A. M., Abbas, S., Ali, B., Majeed, H., Abouelwafa, M. Y., Mousa, A., y Liang, L. (2016). Microencapsulation of oils: A comprehensive review of benefits, techniques, and applications. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 15(1), 143-182.
- Balcaen, M., Vermeir, L., Declerck, A., y Van der Meeren, P. (2016). Influence of internal water phase gelation on the shear-and osmotic sensitivity of W/O/W-type double emulsions. *Food Hydrocolloids*, 58, 356-363.
- Benalla, W., Bellahcen, S., y Bnouham, M. (2010). Antidiabetic medicinal plants as a source of alpha glucosidase inhibitors. *Current diabetes reviews*, 6(4), 247-254.
- Berton-Carabin, C. C., Sagis, L., y Schroën, K. (2018). Formation, structure, and functionality of interfacial layers in food emulsions. *Annual review of food science and technology*, 9, 551-587.
- Blonde, L. (2012). Benefits and risks for intensive glycemic control in patients with diabetes mellitus. *The American journal of the medical sciences*, 343(1), 17-20.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., y Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.

- Buyukkestelli, H. I., y El, S. N. (2019). Development and characterization of double emulsion to encapsulate iron. *Journal of Food Engineering*, 263, 446-453.
- Carocho, M., Morales, P., y Ferreira, I. C. (2018). Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives. *Trends in Food Science & Technology*, 71, 107-120.
- Castellanos-Santiago, E., y Yahia, E. M. (2008). Identification and quantification of betalains from the fruits of 10 Mexican prickly pear cultivars by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(14), 5758-5764.
- Cenobio-Galindo, A. D. J., Díaz-Monroy, G., Medina-Pérez, G., Franco-Fernández, M. J., Ludeña-Urquizo, F. E., Vieyra-Alberto, R., y Campos-Montiel, R. G. (2019). Multiple Emulsions with Extracts of Cactus Pear Added in A Yogurt: Antioxidant Activity, In Vitro Simulated Digestion and Shelf Life. *Foods*, 8(10), 429.
- Chatterjee, S., Khunti, K., y Davies, M. J. (2017). Type 2 diabetes. *The Lancet*, 389(10085), 2239-2251.
- Chávez-Silva, F., Cerón-Romero, L., Arias-Durán, L., Navarrete-Vázquez, G., Almanza-Pérez, J., Román-Ramos, R., ... y Estrada-Soto, S. (2018). Antidiabetic effect of *Achillea millefolium* through multitarget interactions: α -glucosidases inhibition, insulin sensitization and insulin secretagogue activities. *Journal of ethnopharmacology*, 212, 1-7.
- Chen, J., Wu, Y., Zou, J., y Gao, K. (2016). α -Glucosidase inhibition and antihyperglycemic activity of flavonoids from *Ampelopsis grossedentata* and the flavonoid derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 24(7), 1488-1494.
- Chinsembu, K. C. (2019). Diabetes mellitus and nature's pharmacy of putative antidiabetic plants. *Journal of herbal medicine*, 15, 100230.
- Cho, N., Shaw, J. E., Karuranga, S., Huang, Y., da Rocha Fernandes, J. D., Ohlrogge, A. W., y Malanda, B. (2018). IDF Diabetes Atlas: Global estimates

- of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes research and clinical practice*, 138, 271-281.
- Chouaibi, M., Mejri, J., Rezig, L., Abdelli, K., y Hamdi, S. (2019). Experimental study of quercetin microencapsulation using water-in-oil-in-water (W1/O/W2) double emulsion. *Journal of Molecular Liquids*, 273, 183-191.
- Chung, K. T., Wong, T. Y., Wei, C. I., Huang, Y. W., y Lin, Y. (1998). Tannins and human health: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 38(6), 421-464.
- Corstens, M. N., Berton-Carabin, C. C., de Vries, R., Troost, F. J., Masclee, A. A., y Schroën, K. (2017). Food-grade micro-encapsulation systems that may induce satiety via delayed lipolysis: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(10), 2218-2244.
- Crawford, K. (2017). Review of 2017 diabetes standards of care. *Nurs Clin North Am*, 52(4), 621-63.
- de Almeida P., D., Ramos, A. M., de Oliveira, E. B., Martins, E. M. F., de Barros, F. A. R., Vidigal, M. C. T. R., ... y da Rocha, C. T. (2017). Increased thermal stability of anthocyanins at pH 4.0 by guar gum in aqueous dispersions and in double emulsions W/O/W. *International journal of biological macromolecules*, 117, 665-672.
- de Melo, E. B., da Silveira, A., y Carvalho, I. (2006). α -and β -Glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity. *Tetrahedron*, 62(44), 10277-10302.
- Desai K. G. H., y Park, H. J. (2005): Recent developments in microencapsulation of food ingredients, *Drying Technology: An International Journal*, 23(7), 1361-1394.
- de Souza, V. B., Thomazini, M., Barrientos, M. A. E., Nalin, C. M., Ferro-Furtado, R., Genovese, M. I., y Favaro-Trindade, C. S. (2018). Functional properties and encapsulation of a proanthocyanidin-rich cinnamon extract (*Cinnamomum*

- zeylanicum) by complex coacervation using gelatin and different polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 77, 297-306.
- Dickinson, E. (2011). Double emulsions stabilized by food biopolymers. *Food Biophysics*, 6(1), 1-11.
- Dickinson, E. (2015). Colloids in food: ingredients, structure, and stability. *Annual review of food science and technology*, 6, 211-233.
- Dima, C., y Dima, S. (2020). Bioaccessibility study of calcium and vitamin D3 co-microencapsulated in water-in-oil-in-water double emulsions. *Food chemistry*, 303, 125416.
- Ding, S., Serra, C. A., Vandamme, T. F., Yu, W., y Anton, N. (2018). Double emulsions prepared by two-step emulsification: History, state-of-the-art and perspective. *Journal of Controlled Release*, 295, 31-49.
- Espinosa-Muñoz, V., Roldán-cruz, C. A., Hernández-Fuentes, A. D., Quintero-Lira, A., Almaraz-Buendía, I., y Campos-Montiel, R. G. (2016). Ultrasonic-assisted extraction of phenols, flavonoids, and biocompounds with inhibitory effect against Salmonella Typhimurium and Staphylococcus Aureus from Cactus pear. *Journal of Food Process Engineering*, 40(2), e12358.
- Fang, Z., y Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols—a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(10), 510-523.
- Flores, F. P., y Kong, F. (2017). In vitro release kinetics of microencapsulated materials and the effect of the food matrix. *Annual Review of Food Science and Technology*, 8, 237-259.
- Gandía-Herrero, F., y García-Carmona, F. (2013). Biosynthesis of betalains: yellow and violet plant pigments. *Trends in plant science*, 18(6), 334-343.
- Garti, N. (1997). Progress in stabilization and transport phenomena of double emulsions in food applications. *LWT-Food Science and Technology*, 30(3), 222-235.

- Gasa-Falcon, A., Odriozola-Serrano, I., Oms-Oliu, G., y Martin-Belloso, O. (2017). Influence of mandarin fiber addition on physico-chemical properties of nanoemulsions containing β -carotene under simulated gastrointestinal digestion conditions. *LWT*, 84, 331-337.
- Gondi, M., y Rao, U. P. (2015). Ethanol extract of mango (*Mangifera indica* L.) peel inhibits α -amylase and α -glucosidase activities, and ameliorates diabetes related biochemical parameters in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. *Journal of food science and technology*, 52(12), 7883-7893.
- González-Stuart, A. E., y Rivera, J. O. (2019). Nutritional and therapeutic applications of prickly pear cacti. In *Bioactive food as dietary interventions for diabetes* (pp. 349-360). Academic Press.
- Gowd, V., Bao, T., Wang, L., Huang, Y., Chen, S., Zheng, X., ... y Chen, W. (2018). Antioxidant and antidiabetic activity of blackberry after gastrointestinal digestion and human gut microbiota fermentation. *Food chemistry*, 269, 618-627.
- Guzmán-Díaz, D. A., Treviño-Garza, M. Z., Rodríguez-Romero, B. A., Gallardo-Rivera, C. T., Amaya-Guerra, C. A., y Báez-González, J. G. (2019). Development and Characterization of Gelled Double Emulsions Based on Chia (*Salvia hispanica* L.) Mucilage Mixed with Different Biopolymers and Loaded with Green Tea Extract (*Camellia sinensis*). *Foods*, 8(12), 677.
- Guzmán-Maldonado, S. H., Morales-Montelongo, A. L., Mondragón-Jacobo, C., Herrera-Hernández, G., Guevara-Lara, F., y Reynoso-Camacho, R. (2010). Physicochemical, nutritional, and functional characterization of fruits xoconostle (*Opuntia matudae*) pears from Central-Mexico region. *Journal of Food Science*, 75(6), C485-C492.
- Hemar, Y., Cheng, L. J., Oliver, C. M., Sanguansri, L., y Augustin, M. (2010). Encapsulation of resveratrol using water-in-oil-in-water double emulsions. *Food Biophysics*, 5(2), 120-127.

- Hernández-Fuentes, A. D., Trapala-Islas, A., Gallegos-Vásquez, C., Campos-Montiel, R. G., Pinedo-Espinoza, J. M., y Guzmán-Maldonado, S. H. (2015). Physicochemical variability and nutritional and functional characteristics of xoconostles (*Opuntia* spp.) accessions from Mexico. *Fruits*, 70(2), 109-116.
- Hernandez-Ledesma, B., Quiros, A., Amigo, L., y Recio, I. (2007). Identification of bioactive peptides after digestion of human milk and infant formula with pepsin and pancreatin. *International Dairy Journal*, 17(1), 42-49.
- Herrera, T., del Hierro, J. N., Fornari, T., Reglero, G., y Martin, D. (2019). Inhibitory effect of quinoa and fenugreek extracts on pancreatic lipase and α -amylase under in vitro traditional conditions or intestinal simulated conditions. *Food chemistry*, 270, 509-517.
- Hervert-Hernández, D., García, O. P., Rosado, J. L., y Goñi, I. (2011). The contribution of fruits and vegetables to dietary intake of polyphenols and antioxidant capacity in a Mexican rural diet: Importance of fruit and vegetable variety. *Food Research International*, 44(5), 1182-1189.
- Iqbal, S., Baloch, M. K., Hameed, G., y McClements, D. J. (2013). Controlling W/O/W multiple emulsion microstructure by osmotic swelling and internal protein gelation. *Food research international*, 54(2), 1613-1620.
- Jiménez-Colmenero, F. (2013). Emulsiones múltiples: compuestos bioactivos y alimentos funcionales. *Nutrición Hospitalaria*, 28(5), 1413-1421.
- Kale, S. N., y Deore, S. L. (2017). Emulsion micro emulsion and nano emulsion: a review. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 8(1), 39.
- Khadem, B., Khellaf, M., y Sheibat-Othman, N. (2020). Investigating swelling-breakdown in double emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 585, 124181.
- Khan, A. Y., Talegaonkar, S., Iqbal, Z., Jalees Ahmed, F., y Khar, R. K. (2006). Multiple emulsions: an overview. *Current drug delivery*, 3(4), 429-443.

- Kim, J. W., Kang, H. H., Suh, K. D., y Oh, S. G. (2003). Stabilization of water-soluble antioxidant in water-in-oil-in-water double emulsions. *Journal of dispersion science and technology*, 24(6), 833-839.
- Lekshmi, R. K., Rahima, M., Chatterjee, N. S., Tejpal, C. S., Anas, K. K., Vishnu, K. V., ... y Suseela, M. (2019). Chitosan–whey protein as efficient delivery system for squalene: characterization and functional food application. *International journal of biological macromolecules*, 135, 855-863.
- Li, K., Woo, M. W., Patel, H., y Selomulya, C. (2017). Enhancing the stability of protein-polysaccharides emulsions via Maillard reaction for better oil encapsulation in spray-dried powders by pH adjustment. *Food Hydrocolloids*, 69, 121-131.
- Links, M. R., Taylor, J., Kruger, M. C., y Taylor, J. R. (2015). Sorghum condensed tannins encapsulated in kafirin microparticles as a nutraceutical for inhibition of amylases during digestion to attenuate hyperglycaemia. *Journal of functional foods*, 12, 55-63.
- Liu, J., Tan, Y., Zhou, H., Mundo, J. L. M., y McClements, D. J. (2019). Protection of anthocyanin-rich extract from pH-induced color changes using water-in-oil-in-water emulsions. *Journal of Food Engineering*, 254, 1-9.
- Londoño L. J. (2012). Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. In *Desarrollo y transversalidad serie Lasallista Investigación y Ciencia*. Corporación Universitaria Lasallista.
- Lutz, R., Aserin, A., Wicker, L., y Garti, N. (2009). Double emulsions stabilized by a charged complex of modified pectin and whey protein isolate. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 72(1), 121-127.
- Martins, C., Higaki, N. T. F., Montrucchio, D. P., de Oliveira, C. F., Gomes, M. L. S., Miguel, M. D., ... y Dias, J. D. F. G. (2020). Development of W1/O/W2 emulsion with gallic acid in the internal aqueous phase. *Food Chemistry*, 314, 126174.

- McClements, D. J. (2010). Emulsion design to improve the delivery of functional lipophilic components. *Annual review of food science and technology*, 1, 241-269.
- Medina-Pérez, G., Zaldívar-Ortega, A. K., Cenobio-Galindo, A. D. J., Afanador-Barajas, L. N., Vieyra-Alberto, R., Estefes-Duarte, J. A., y Campos-Montiel, R. G. (2019). Antidiabetic Activity of Cactus Acid Fruit Extracts: Simulated Intestinal Conditions of the Inhibitory Effects on α -amylase and α -glucosidase. *Applied Sciences*, 9(19), 4066.
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T. O. R. S. T. E. N., Bourlieu, C., ... y Dufour, C. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food—an international consensus. *Food & function*, 5(6), 1113-1124.
- Morales, P., Barros, L., Ramírez-Moreno, E., Santos-Buelga, C., y Ferreira, I. C. (2015). Xoconostle fruit (*Opuntia matudae* Scheinvar cv. Rosa) by-products as potential functional ingredients. *Food chemistry*, 185, 289-297.
- Morales, P., Ramírez-Moreno, E., de Cortes Sanchez-Mata, M., Carvalho, A. M., y Ferreira, I. C. (2012). Nutritional and antioxidant properties of pulp and seeds of two xoconostle cultivars (*Opuntia joconostle* FAC Weber ex Digué and *Opuntia matudae* Scheinvar) of high consumption in Mexico. *Food Research International*, 46(1), 279-285.
- Muscholik, G., y Dickinson, E. (2017). Double emulsions relevant to food systems: preparation, stability, and applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(3), 532-555.
- Ng, Z. X., y See, A. N. (2019). Effect of in vitro digestion on the total polyphenol and flavonoid, antioxidant activity and carbohydrate hydrolyzing enzymes inhibitory potential of selected functional plant-based foods. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43(4), e13903.

- Nyambe-Silavwe, H., Villa-Rodriguez, J. A., Ifie, I., Holmes, M., Aydin, E., Jensen, J. M., y Williamson, G. (2015). Inhibition of human α -amylase by dietary polyphenols. *Journal of Functional Foods*, 19, 723-732.
- Olokoba, A. B., Obateru, O. A., y Olokoba, L. B. (2012). Type 2 diabetes mellitus: a review of current trends. *Oman medical journal*, 27(4), 269.
- Osorio-Esquivel, O., Ortiz-Moreno, A., Álvarez, V. B., Dorantes-Álvarez, L., y Giusti, M. M. (2011). Phenolics, betacyanins and antioxidant activity in *Opuntia joconostle* fruits. *Food Research International*, 44(7), 2160-2168.
- Otálora, M. C., Carriazo, J. G., Iturriaga, L., Nazareno, M. A., y Osorio, C. (2015). Microencapsulation of betalains obtained from cactus fruit (*Opuntia ficus-indica*) by spray drying using cactus cladode mucilage and maltodextrin as encapsulating agents. *Food chemistry*, 187, 174-181.
- Ozkan, G., Franco, P., De Marco, I., Xiao, J., y Capanoglu, E. (2019). A review of microencapsulation methods for food antioxidants: Principles, advantages, drawbacks and applications. *Food chemistry*, 272, 494-506.
- Pablo-Gutierrez, J., Rivera-Dommarco, J., Shamah-Levy, T., Villalpando-Hernández, S., Franco, A., Cuevas-Nasu, L., y Hernández-Avila, M. (2012). Encuesta nacional de salud y nutrición: Resultados nacionales. *Tomado de <http://ensanut.insp.mx/informes/ENSANUT2012ResultadosNacionales.pdf>*.
- Paiz, R. C., Juárez-Flores, B. I., Cecilia, J. R. A. R. N., Ortega, C., Aguuml, J. A. R., Chávez, E. G., y Fuentes, G. Á. (2010). Glucose-lowering effect of *xoconostle* (*Opuntia joconostle* A. Web., Cactaceae) in diabetic rats. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(22), 2326-2333.
- Parada, J., Pérez-Correa, J. R., y Pérez-Jiménez, J. (2019). Design of low glycemic response foods using polyphenols from seaweed. *Journal of functional foods*, 56, 33-39.
- Pasukamonset, P., Kwon, O., y Adisakwattana, S. (2016). Alginate-based encapsulation of polyphenols from *Clitoria ternatea* petal flower extract

enhances stability and biological activity under simulated gastrointestinal conditions. *Food Hydrocolloids*, 61, 772-779.

Pérez-Alonso, C., Campos-Montiel, R. G., Morales-Luna, E., Reyes-Munguía, A., Aguirre-Álvarez, G. y Pimentel-González, D. J. (2015). Stabilization of phenolic compounds from *Opuntia oligacantha* forst by microencapsulation with agave sap (aguamiel). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 14(3), 579-588.

Piero, M. N., Nzaro, G. M., y Njagi, J. M. (2014). Diabetes mellitus-a devastating metabolic disorder. *Asian journal of biomedical and pharmaceutical sciences*, 5(40), 1.

Pimentel-González, D. J., Aguilar-García, M. E., Aguirre-Álvarez, G., Salcedo-Hernández, R., Guevara-Arauza, J. C., y Campos-Montiel, R. G. (2015). The Process and Maturation Stability of Chihuahua Cheese with Antioxidants in Multiple Emulsions. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(6), 1027-1035.

Pimentel-González, D. J., Campos-Montiel, R. G., Lobato-Calleros, C., Pedroza-Islas, R., y Vernon-Carter, E. J. (2009). Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* in double emulsions formulated with sweet whey as emulsifier and survival in simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*, 42(2), 292-297.

Pimienta-Barrios, E., Mendez-Moran, L., Ramirez-Hernandez, B. C., Garcia de Alba-Garcia, J. E., y Dominguez-Arias, R. M. (2008). Effect of xoconostle (*Opuntia joconostle* Web.) fruit consumption on glucose and seric lipids. *Agrociencia*, 42(6), 645-653.

Prasath, G. S., y Subramanian, S. P. (2011). Modulatory effects of fisetin, a bioflavonoid, on hyperglycemia by attenuating the key enzymes of carbohydrate metabolism in hepatic and renal tissues in streptozotocin-induced diabetic rats. *European journal of pharmacology*, 668(3), 492-496.

- Price, M. L., y Butler, L. G. (1977). Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. *Journal of Agricultural and food chemistry*, 25(6), 1268-1273.
- Qin, D., Yang, X., Gao, S., Yao, J., y McClements, D. J. (2017). Influence of dietary fibers on lipid digestion: Comparison of single-stage and multiple-stage gastrointestinal models. *Food Hydrocolloids*, 69, 382-392.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., y Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Salgueiro, A. C., Folmer, V., Bassante, F. E., Cardoso, M. H., da Rosa, H. S., y Puntel, G. O. (2018). Predictive antidiabetic activities of plants used by persons with diabetes mellitus. *Complementary Therapies in Medicine*, 41, 1-9.
- Santos, C. M., Freitas, M., y Fernandes, E. (2018). A comprehensive review on xanthone derivatives as α -glucosidase inhibitors. *European journal of medicinal chemistry*, 157, 1460-1479.
- Santos, M. G., Bozza, F. T., Thomazini, M., y Favaro-Trindade, C. S. (2015). Microencapsulation of xylitol by double emulsion followed by complex coacervation. *Food Chemistry*, 171, 32-39.
- Sechi, M., Syed, D. N., Pala, N., Mariani, A., Marceddu, S., Brunetti, A., ... y Sanna, V. (2016). Nanoencapsulation of dietary flavonoid fisetin: Formulation and in vitro antioxidant and α -glucosidase inhibition activities. *Materials Science and Engineering: C*, 68, 594-602.
- Shaddel, R., Hesari, J., Azadmard-Damirchi, S., Hamishehkar, H., Fathi-Achachlouei, B., y Huang, Q. (2017). Double emulsion followed by complex coacervation as a promising method for protection of black raspberry anthocyanins. *Food Hydrocolloids*, 77, 803-816.
- Shamah-Levy, T., Cuevas-Nasu, L., Gaona-Pineda, E. B., Gómez-Acosta, L. M., del Carmen Morales-Ruán, M., Hernández-Ávila, M., y Rivera-Dommarco, J. Á.

- (2018). Sobrepeso y obesidad en niños y adolescentes en México, actualización de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016. *salud pública de méxico*, 60(3), 244-253.
- Silva, W., Torres-Gatica, M. F., Oyarzun-Ampuero, F., Silva-Weiss, A., Robert, P., Cofrades, S., y Giménez, B. (2018). Double emulsions as potential fat replacers with gallic acid and quercetin nanoemulsions in the aqueous phases. *Food chemistry*, 253, 71-78.
- Şöhretoğlu, D., Sari, S., Barut, B., y Özel, A. (2018). Discovery of potent α -glucosidase inhibitor flavonols: insights into mechanism of action through inhibition kinetics and docking simulations. *Bioorganic chemistry*, 79, 257-264.
- Soni, L. K., Dobhal, M. P., Arya, D., Bhagour, K., Parasher, P., y Gupta, R. S. (2018). In vitro and in vivo antidiabetic activity of isolated fraction of *Prosopis cineraria* against streptozotocin-induced experimental diabetes: A mechanistic study. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 108, 1015-1021.
- Soto-Estrada, G., Moreno Altamirano, L., García-García, J. J., Ochoa Moreno, I., y Silberman, M. (2018). Trends in frequency of type 2 diabetes in Mexico and its relationship to dietary patterns and contextual factors. *Gaceta sanitaria*, 32, 283-290.
- Velderrain-Rodríguez, G. R., Acevedo-Fani, A., González-Aguilar, G. A., y Martín-Belloso, O. (2019). Encapsulation and stability of a phenolic-rich extract from mango peel within water-in-oil-in-water emulsions. *Journal of functional foods*, 56, 65-73.
- Velderrain-Rodríguez, G. R., Salvia-Trujillo, L., Wall-Medrano, A., González-Aguilar, G. A., y Martín-Belloso, O. (2019). In vitro digestibility and release of a mango peel extract encapsulated within water-in-oil-in-water (W 1/O/W 2) emulsions containing sodium carboxymethyl cellulose. *Food & function*, 10(9), 6110-6120.

- Vilcacundo, R., Martínez-Villaluenga, C. y Hernández-Ledesma, B. (2017). Release of dipeptidyl peptidase iv, α -amylase and α -glucosidase inhibitory peptides from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) during *in vitro* simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Functional Foods*, 35, 531-539. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2017.06.024>
- Wu, Y., Zhou, Q., Chen, X. Y., Li, X., Wang, Y., y Zhang, J. L. (2017). Comparison and screening of bioactive phenolic compounds in different blueberry cultivars: Evaluation of anti-oxidation and α -glucosidase inhibition effect. *Food research international*, 100, 312-324.
- Xu, Y., Guo, Y., Gao, Y., Niu, X., Wang, L., Li, X., ... y Yang, Y. (2018). Seperation, characterization and inhibition on α -glucosidase, α -amylase and glycation of a polysaccharide from blackcurrant fruits. *LWT*, 93, 16-23.
- Ye, Q., Georges, N., y Selomulya, C. (2018). Microencapsulation of active ingredients in functional foods: From research stage to commercial food products. *Trends in Food Science & Technology*, 78, 167-179.
- Yildirim, M., Sumnu, G., y Sahin, S. (2017). The effects of emulsifier type, phase ratio, and homogenization methods on stability of the double emulsion. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 38(6), 807-814.