

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***ENCAPSULACIÓN DE EXTRACTO DE CÁSCARA DE
GRANADA MEDIANTE EMULSIONES DOBLES Y SU
APLICACIÓN COMO ANTIMICROBIANO EN JUGO
DE MANZANA NO PASTEURIZADO***

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado
de Magíster en Ciencia de los Alimentos y Memoria para optar
al Título de Ingeniera en Alimentos por:

LEYLA CAMILA SANHUEZA KABA

Directora de Tesis: Dra. Paula García
Co-directora de Tesis: Dra. Begoña Giménez

Santiago-CHILE

Junio 2020

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidata

LEYLA CAMILA SANHUEZA KABA

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencia de los Alimentos y Título de Ingeniera en Alimentos, en el examen público rendido el día 26 de junio 2020.

Director de Tesis:

Dra. Paula García

Co-director de Tesis:

Dra. Begoña Giménez

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Jaime Ortiz

Dra. María Zúñiga

Dra. Mónica Rubilar

DEDICATORIA

A mis padres, por su apoyo, amor incondicional y confianza.
Sin ellos nada sería posible.

A la Me, por su cariño inagotable, su paciencia, por siempre estar presente
y ser esa familia que me regaló la vida. Y aunque la vida no quiso que me
vieras dar este paso, sé que me estarás acompañando siempre.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por apoyarme y estar presentes en cada momento.

A mis amigos, Claudia Cornejo, Consuelo Lagos, Daniel Coloma, Valentina Pierattini, Dana Bravo, Catalina Maestri, Daniela Bustamante, Patricio Parra, por estar siempre, darme el apoyo y la fuerza que necesito.

A mi directora de tesis Dra. Paula García por la inmensa confianza, apoyo, por su paciencia y su entera disposición siempre, por su preocupación tanto en el ámbito académico como personal, por ser más que una directora de tesis.

A mi codirectora de tesis Dra. Begoña Giménez por la solidaridad con sus conocimientos, por su apoyo, confianza, y su excelente disposición siempre.

Al profesor Luis López por su inagotable paciencia y excelente enseñanza, por su dedicación y vocación. Al igual que a Don Oscar, por su excelente disposición, voluntad y paciencia.

A todo el equipo del Departamento de Nutrición especialmente a Greys Lagos por su excelente voluntad y amistad, a la Señora Eli, por sus conversaciones, su excelente disposición y su preocupación.

A los docentes de mi comisión, Dra. María Carolina Zúñiga, Dra. Mónica Rubilar y Dr. Jaime Ortiz, por sus observaciones, correcciones y colaboración en esta investigación.

A Camila Mella y el Dr. Rommy Zúñiga por su buena disposición y colaboración.

A Gemma Gutierrez y María Matos, por recibirme en mi estadía de Magíster en la Universidad de Oviedo, España. Por su buena disposición, solidaridad con sus conocimientos y apoyo constante.

A Fondecyt..N° 11160541 para llevar a cabo este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	14
ANTECEDENTES GENERALES	16
1.1. Microbiota nativa de jugos no pasteurizados	16
1.2. Prevención del desarrollo de microorganismos en jugos de fruta no pasteurizados	18
1.3. Cáscara de granada como agente antimicrobiano	19
1.4. Encapsulación	22
1.4.1. Emulsión doble como microencapsulación	23
HIPOTESIS	26
OBJETIVOS	26
Objetivo general	26
Objetivo específicos	26
MATERIALES Y METODOS	27
2.1. Materiales	27
2.2. Métodos	27
2.2.1. Elaboración del extracto de cáscara de granada	27
2.2.2. Encapsulación de extracto de cáscara de granada mediante emulsiones dobles	28
2.2.3. Diseño experimental	29
2.2.4. Caracterización de la emulsión doble de extracto de cáscara de granada obtenida en condiciones óptimas	31

2.2.5. Parámetros cinéticos liberación de punicalagina desde el sistema de emulsión doble (obtenido en condiciones óptimas) en jugo de manzana no pasteurizado	34
2.2.6. Estabilidad microbiológica del jugo de manzana no pasteurizado, adicionado de extracto de cáscara de granada encapsulado por emulsión doble y sin encapsular	35
2.2.7. Análisis estadístico	37
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
3.1. Caracterización del extracto de cascara de granada	38
3.2. Optimización de encapsulación de extracto de cáscara de granada en emulsiones dobles	41
3.3. Estabilidad física y de punicalagina en la emulsión obtenida bajo condiciones óptimas	49
3.4. Estabilidad microbiológica	57
3.5. Resultados pendientes	63
CONCLUSIONES	64
Información adicional	66
BIBLIOGRAFÍA	67
ANEXOS	76

INDICE DE TABLAS

TABLA 1. Factores y niveles de diseño Box-Behnken para encapsulación de extracto de cáscara de granada en emulsión doble.....	30
TABLA 2. Condiciones experimentales, contenido de polifenoles totales (CPT), contenido de puniacalagina (P) y actividad antimicrobiana medida como halo de inhibición en <i>S. aureus</i> , para el diseño Box-Behnken.....	39-40
TABLA 3. Caracterización extracto de cáscara de granada obtenido en condiciones óptimas.	41
TABLA 4. Condiciones experimentales, eficiencia de encapsulación (EE) y tamaño de gota $D_{[4,3]}$ y deseabilidad observada para el diseño Box-Behnken... ..	43-44
TABLA 5. Valores óptimos obtenidos en base a la optimización de la deseabilidad observada para la optimización conjunta.....	48
TABLA 6. $D_{[4,3]}$ en el almacenamiento (20 días) a 4 y 25 °C.	52
TABLA 7. Eficiencia de encapsulación (EE %) en el almacenamiento (20 días) a 4 y 25 °C.	56
TABLA 8. Actividad antimicrobiana de extracto sin encapsular y encapsulado en emulsión doble sobre el RAM y levaduras del jugo de manzana. Recuento de colonias (N) y velocidad específica de crecimiento (k).	61

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Estructura punicalagina.....	21
FIGURA 2. Representación esquemática de una gota de emulsión doble (W ₁ /O/W ₂).	23
FIGURA 3. Esquema de elaboración de encapsulación de extracto de cáscara de granada mediante emulsiones dobles.	29
FIGURA 4. Ejemplo de un ensayo de actividad antimicrobiana medida como halo de inhibición en <i>S. aureus</i> . En 4 (100% etanol, 5 h, 150 rpm); en 8 (100 % etanol, 3 h, 250 rpm); en 9 (50 % etanol, 1 h, 50 rpm); 13 (50% etanol, 3 h, 150 rpm).	39
FIGURA 5. Gráfica de superficie de respuesta de la optimización conjunta de contenido de polifenoles totales (CPT), contenido de punicalagina (P) y actividad antimicrobiana en <i>S.aureus</i> (AAM) con 150 rpm de agitación.	41
FIGURA 6. Gráfica de superficie de respuesta para la variable dependientes de tamaño de gota D _[4.3] con 5 pasos en la segunda etapa de homogenización. ..	45
FIGURA 7. Gráfica de superficie de respuesta para las variable dependiente de eficiencia de encapsulación EE % con 5 pasos en la segunda etapa de homogenización.....	46

FIGURA 8. Gráfica de superficie de respuesta para los datos de deseabilidad obtenida a partir de la optimización conjunta de tamaño de gota ($D_{[4.3]}$) y eficiencia de encapsulación (EE %) con 5 pasos..... 48

FIGURA 9. Tamaño y distribución 9a: 4 °C; 9b: 25 °C en el almacenamiento por 1, 5, 10, 15 y 20 días. 50-51

FIGURA 10. Imágenes de CLSM donde, A: emulsión óptima D0, B: emulsión a 4 °C D1; C: emulsión 25 °C D1; D: emulsión 4 °C D5; E: emulsión 25 °C D5; F: emulsión 4 °C D10; G: emulsión 25 °C D10; H: emulsión 4 °C D15; I: emulsión 25 °C D15; J: emulsión 4 °C D20; K: emulsión 25 °C D20. La barra de escala representa 2 μm a 100x 4 de aumento. 55

FIGURA 11. Fenómenos de desestabilización de las emulsiones en el día 20. a: emulsión 4 °C D20; b: emulsión 25 °C D20. La barra representa 5 μm a 100x y 100x 4 de aumento. 55

FIGURA 12. Recuento de microorganismos expresado como log (UFC/mL) en los días 0, 5, 10, 15, 20. a) Recuento de microorganismos aerobios mesófilos (RAM) en jugo de manzana (J), jugo de manzana con extracto de cáscara de granada a concentración 9 mg/mL (J+ECG), jugo de manzana con extracto de cáscara de granada a concentración 9 mg/mL encapsulado por emulsiones dobles (J+ECGED). b) Recuento de levaduras en jugo de manzana (J), jugo de manzana con extracto de cáscara de granada a concentración 9 mg/mL

(J+ECG), jugo de manzana con extracto de cáscara de granada a concentración 9 mg/mL encapsulado por emulsiones dobles (J+ECGED)..... 60

FIGURA 13. Gráfica de porcentaje de liberación de punicalagina en jugo de manzana no pasteurizado..... 63

ABREVIATURAS

ECG: extracto de cáscara de granada

W₁/O/W₂: emulsión agua/aceite/agua

- W₁: fase acuosa interna
- W₂: fase acuosa externa
- O: fase oleosa

O₁/W/O₂: emulsión aceite/agua/aceite

- O₁: fase oleosa interna
- O₂: fase oleosa externa
- W: fase acuosa

PGPR: polirricinoleato de poliglicerol

MSR: metodología de superficie de respuesta

HBL: balance hidrofílico-lipofílico

Tween 80: monooleato de polioxietilensorbitano

Tween 20: monolaurato de polioxietilensorbitano

SCM: suma de cuadrados medios

CLSM: microscopía confocal laser de barrido

TSA: agar soya triptona

TSB: medio soya tripticaseína

MHT: agar Müller-Hinton

CMI: concentración mínima inhibitoria

RESUMEN

Los jugos de frutas naturales no pasteurizados son más propensos al deterioro por la acción de microorganismos nativos (mohos, levaduras y algunas bacterias). Métodos físicos y químicos han sido utilizados para mejorar su estabilidad microbiológica, no obstante, existe un creciente interés por los antimicrobianos naturales. La cáscara de granada (*Punica granatum* L.), es un residuo agroindustrial que contiene principalmente punicalagina, constituyendo una alternativa como potencial antimicrobiano. Sin embargo, su adición podría generar un sabor astringente y la interacción de la punicalagina con otros componentes del alimento podría inhibir su efecto. En este contexto, la encapsulación del extracto de cáscara de granada (ECG) en emulsiones dobles permitiría enmascarar el sabor, proteger el extracto y liberarlo en forma controlada. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de ECG, encapsulado en una emulsión doble, sobre la estabilidad microbiológica del jugo de manzana no pasteurizado. Se preparó una emulsión doble de tipo agua-en-aceite-en-agua ($W_1/O/W_2$). La emulsión doble se obtuvo mediante dos procesos de emulsificación, utilizando un mezclador para preparar las emulsiones groseras y un homogeneizador de alta presión para obtener las emulsiones dobles finas W_1/O y $W_1/O/W_2$. El ECG se adicionó en la fase acuosa interna (W_1) de acuerdo a un diseño Box-Behnken, utilizando como variables independientes la presión de homogenización en la primera y segunda etapa y el número de pasos en la segunda etapa, mientras que la eficiencia de encapsulación de punicalagina y tamaño de gota ($D_{[4,3]}$) se consideraron como variables de respuesta. Se realizó la optimización de acuerdo a MSR, obteniendo un tamaño $D_{[4,3]}$ 0,48 μm y 57 % de eficiencia de encapsulación para la emulsión óptima. Además, se comprobó su estructura multicompartimentalizada por microscopía confocal. En el almacenamiento se observó una disminución significativa de la eficiencia de encapsulación y tamaño. Finalmente se demostró su efectividad como antimicrobiano en jugo de manzana no pasteurizado, disminuyendo el recuento de levaduras y RAM y la velocidad de crecimiento microbiano.

INTRODUCCIÓN

Las frutas y vegetales poseen un papel muy importante en la dieta, convirtiéndose el jugo de frutas en una alternativa rápida y de fácil consumo de estas (Pandey & Negi, 2018).

Se entiende por jugo de fruta el producto obtenido al exprimir la fruta con o sin tratamiento. Por definición, es el producto fermentable, pero no fermentado, destinado al consumo directo, obtenido por proceso mecánico de fruta madura, preservado exclusivamente por medio físico (Bevilacqua et al., 2011; DTO. N°977/96, 1997; Pandey & Negi, 2018).

La demanda de jugos de frutas naturales no pasteurizados ha aumentado por parte de los consumidores, debido a su sabor fresco, ausencia de preservantes sintéticos y propiedades nutricionales beneficiosas para la salud (Pandey & Negi, 2018). Sin embargo, debido a su pH bajo y su composición rica en azúcares, agua, ácidos orgánicos, vitaminas, entre otros, hace a estos jugos más propensos al deterioro por la acción de microorganismos nativos (mohos, levaduras y algunas bacterias). Este deterioro, puede afectar la inocuidad, características sensoriales, propiedades nutricionales y disminuir la vida útil del producto (Aneja et al., 2014; Bevilacqua et al., 2011). Algunos métodos de conservación térmicos, no térmicos y químicos han sido utilizados para mejorar la estabilidad microbiológica de jugos, no obstante, estos presentan algunas desventajas como disminución de nutrientes y compuestos antioxidantes, alterando las características organolépticas, equipamiento más costoso y

posible efectos perjudiciales para la salud, respectivamente (Pandey & Negi, 2018).

Actualmente, existe un creciente interés por el uso de aditivos naturales en la formulación de alimentos, entre ellos, los antimicrobianos. La cáscara de granada (*Punica granatum* L.), es un residuo agroindustrial sin valor comercial. Sin embargo, constituye una alternativa como potencial antimicrobiano, dada su composición química rica en taninos hidrolizables, principalmente punicalagina, a la cual se le atribuye mayoritariamente este efecto (Al-Zoreky, 2009; Gullon et al., 2016).

El ECG ha reportado actividad antimicrobiana *in vitro* sobre diversas bacterias y en alimentos de tipo cárnico (Al-Zoreky, 2009; Devatkal et al., 2013; Dey et al., 2012; El-Nashi et al., 2015; Endo et al., 2012; Glazer et al., 2012; Gullon et al., 2016; Kanatt et al., 2010; Kharchoufi et al., 2018; Morsy et al., 2018; Reddy et al., 2007; Wu et al., 2016). Sin embargo, la adición de este extracto podría generar inconvenientes ya que posee un sabor astringente y la interacción de la punicalagina con otros componentes del alimento podría inhibir su efecto. En este contexto, la encapsulación del ECG en emulsiones dobles permitiría proteger el extracto y liberarlo en forma controlada (Jiménez-Colmenero, 2013; Pays, 2002).

De acuerdo a estos antecedentes, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del ECG (*Punica granatum* L.) encapsulado en emulsiones dobles sobre la estabilidad microbiológica del jugo de manzana no pasteurizado.

ANTECEDENTES GENERALES

1.1. MICROBIOTA NATIVA DE JUGOS NO PASTEURIZADOS

Los jugos de frutas, generalmente, poseen carbohidratos simples, ácidos orgánicos, vitaminas y elementos traza, por lo que son sustratos ideales para el crecimiento de microorganismos. Debido a su pH ácido ($\text{pH} \leq 4,5$), levaduras y mohos son los principales causantes de deterioro, generando turbidez, floculación, películas y aglomeraciones que afectan la calidad y vida útil del producto (Aneja et al., 2014). En general, se establece que, debido al pH ácido de los jugos de frutas, se inhibiría el crecimiento de microorganismos patógenos (Keller et al., 2004).

Levaduras

Las principales levaduras encontradas en los jugos de frutas han sido *Pichia* spp., *Candida* spp., *Saccharomyces* spp. y *Rhodotorula* spp. Específicamente se ha podido aislar *Pichia membranifaciens*, *Candida maltosa*, *C. sake*, *Saccharomyces baillii*, *S. bisporus*, *S. cerevisiae*, *S. rouxii*, *S. bayanus*, *Brettanomyces intermedius*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Torulopsis holmii*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Schwanniomyces occidentalis*, *Dekkera bruxellensis*, *D. naardenensis orulaspora delbrueckii* y *Zygosaccharomyces microellipsoides* (Tournas et al., 2006; Aneja et al., 2014).

Mohos

Existen mohos catalogados como termolábiles y otros resistentes al calor, donde los primeros, pueden producir esteras de micelio y se adhieren al interior

del envase, costuras del cartón, pudiendo generar moho y olores desagradables. En frutas frescas y jugos, se ha reportado la presencia de *Penicillium* spp., *Cladosporium* spp., *Aspergillus* spp., *Eurotium* spp., *Alternaria* spp., *Botrytis* spp., *Aureobasidium pullulans*, *Paecilomyces* spp. (Raybaudi-Massilia et al., 2009; Aneja et al., 2014).

Bacterias

Aunque las bacterias no son predominantes y se encuentran presentes en bajas concentraciones en jugos de frutas y vegetales, principalmente debido al pH, se han aislado bacterias heterofermentativas de ácido láctico (*Lactobacillus* spp. y *Leuconostoc* spp.), ácido acético (*Acetobacter* spp., *Gluconobacter* spp. y *Gluconacetobacter* spp.), formadoras de esporas (*Bacillus* spp. y *Clostridium* spp.) (Raybaudi-Massilia et al., 2009; Aneja et al., 2014) y otras como *Erwinia* spp., *Enterobacter* spp., *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *Propionibacterium cyclohexanicum*, *Pseudomonas* spp., *Streptomyces* spp. Específicamente *Streptomyces griseus*, ha sido frecuentemente aislada de jugo de manzana (Aneja et al., 2014; Lima Tribst et al., 2009).

En los últimos años, se ha incrementado la preocupación por la bacteria *Alicyclobacillus*, debido a su naturaleza termoacidófila y la presencia de endosporas altamente resistentes al calor, que permiten su supervivencia en productos de concentrados de fruta tratados térmicamente (Aneja et al., 2014; Foster, 2003).

Para el caso de las bacterias ácido lácticas, que son bacterias Gram positivas en forma de vara, catalasa negativo y heterofermentativas, principalmente se han aislado en jugos de fruta en mal estado. En el caso de las bacterias ácido acéticas, poseen la capacidad de crecer a relativamente bajo pH y bajo nivel de nutrientes, provocando la producción de sabores agrios (Aneja et al., 2014).

1.2. PREVENCIÓN DEL DESARROLLO DE MICROORGANISMOS EN JUGOS DE FRUTA NO PASTEURIZADOS

Los alimentos son perecederos por naturaleza, por lo que es necesario aplicar algún método de protección que asegure la inocuidad desde la producción al consumo, y que alargue su vida útil. Esto, sumado a la demanda por alimentos mínimamente procesados, plantea un desafío para la industria alimentaria (Lucera et al., 2012).

La principal razón de compra de los consumidores de jugos de frutas, es su valor nutricional, calidad organoléptica y la percepción de un producto natural. No obstante, estas propiedades se ven afectadas por la aplicación de tecnologías térmicas convencionales de conservación, como la pasteurización. Por esta razón, se han implementado tecnologías no térmicas de procesamiento menos invasivas (Santhirasegaram et al., 2016) como luz ultravioleta de onda corta (UV-C) (Baysal, 2018), radiación ionizante (Raybaudi-Massilia et al., 2009), termosonicación (Anaya-Esparza et al., 2017), altas presiones de homogenización (Bevilacqua et al., 2011), ultrasonido, luz pulsada (Aneja et al., 2014), tecnologías de barrera (Santhirasegaram et al., 2016), entre

otras. Sin embargo, varias de estas tecnologías necesitan de alta inversión para la compra de equipamientos, lo que podría encarecer el producto. Tradicionalmente, también se cuenta con el uso de preservantes alimentarios sintéticos, tales como benzoato de sodio y sorbato de potasio (Raybaudi-Massilia et al., 2009), los cuales no son bien percibidos por los consumidores. En los últimos años, la demanda por alimentos frescos, nutritivos y con preservantes naturales ha aumentado. Entre estos últimos, bacteriocinas, ácidos orgánicos, aceites esenciales y compuestos fenólicos, han reportado actividad antimicrobiana en jugos de fruta, principalmente sobre bacterias patógenas (Pandey & Negi, 2018). Pocos estudios han reportado actividad antimicrobiana en microorganismos de deterioro (levaduras y mohos principalmente) en jugos de frutas (Nguyen & Mittal, 2007).

1.3. CÁSCARA DE GRANADA COMO AGENTE ANTIMICROBIANO

Los extractos de origen vegetal han sido identificados como una nueva alternativa en la búsqueda de compuestos bioactivos con propiedades antimicrobianas. En este contexto, algunos estudios de investigación han reportado actividad antimicrobiana del ECG (*Punica granatum* L.) (Al-Zoreky, 2009; Devatkal et al., 2013; Dey et al., 2012; Glazer et al., 2012; Gullon et al., 2016; Kanatt et al., 2010; Kharchoufi et al., 2018; Molva & Baysal, 2015; Morsy et al., 2018; Quattrucci et al., 2013; Reddy et al., 2007; Rongai et al., 2017; Tayel et al., 2009; Tomadoni et al., 2016; Wu et al., 2016).

La granada proviene de la familia *Punicaceae*, y es un alimento rico en compuestos bioactivos en distintas partes del fruto, especialmente fitoquímicos. La parte comestible de la granada (50 %), consiste en un 40 % de arilos y 10 % semillas, donde su consumo es principalmente como fruto fresco, bebida, procesados (jaleas, mermeladas) y como extractos para ser usados con fines medicinales y suplemento dietario (Viuda-Martos et al., 2011; Wang, 2011; Elfalleh, 2012).

La cáscara de granada comprende aproximadamente el 50 % restante del peso total del fruto, la cual es considerada un desecho de la industria sin valor comercial. Sin embargo, constituye una fuente importante de compuestos bioactivos como ácidos fenólicos, flavonoides, taninos hidrolizables, antocianinas y proantocianidinas (Li et al., 2006; Amyrgialaki et al., 2014; Gullon et al., 2016), por lo cual, su uso podría proporcionar valor agregado. Entre los taninos hidrolizables, destacan los elagitaninos como la punicalagina, punicalina, ácido elágico y ácido galagico (Kharchoufi et al., 2018; Viuda-Martos et al., 2011). La punicalagina ($C_{48}H_{28}O_{30}$) es un compuesto fenólico hidrosoluble de alto peso molecular (PM: 1108), naturalmente se encuentran en forma de dos anómeros reversibles (α y β), es el compuesto mayoritario en la cáscara de granada y se ha relacionado directamente con actividad antimicrobiana (Glazer et al., 2012; Kazemi et al., 2016; Morsy et al., 2018). Reddy et al. (2007) señaló que, de las distintas fracciones de taninos hidrolizables de un ECG, la

punicalagina, seguida por el ácido galagico tendrían la mayor actividad antimicrobiana.

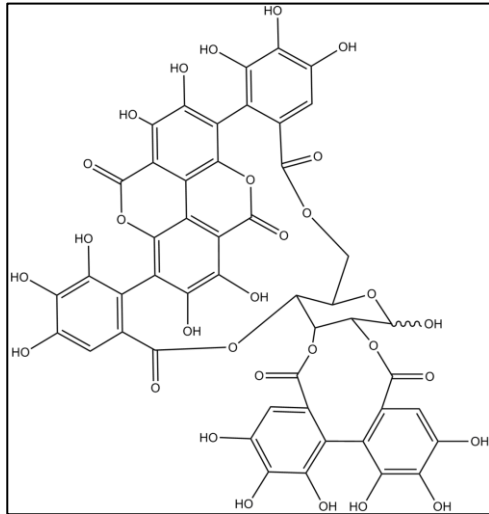


FIGURA 1. Estructura punicalagina.

En general, los mecanismos inhibitorios de los compuestos polifenólicos se asocian con la inhibición de las enzimas microbianas a través de la reacción con grupos sulfhídrico o por interacciones inespecíficas con las proteínas. Además, en muchos flavonoides derivados de plantas, se ha observado que actúan como agentes antiinfecciosos, debido a su capacidad de formar complejos con proteínas extracelulares y solubles en las paredes de las células bacterianas (Dey et al., 2012).

En relación a la actividad antimicrobiana de ECG, en estudios *in vitro*, se ha visto mayor efectividad en bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, entre otras), mientras que en bacterias Gram negativas (*Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris* y *Pseudomonas aeruginosa*) se ha observado actividad antimicrobiana, pero a mayores

concentraciones, al igual que con otros extractos vegetales (Kanatt et al. 2010; Dey et al. 2012).

Los estudios antimicrobianos en alimentos se han enfocado en productos cárnicos (Kanatt et al., 2010; Hayrapetyan et al., 2012; Devatkal et al., 2013; Quattrucci et al., 2013; El-Nashi et al., 2015; Wu et al., 2016; Wafa et al., 2017; Berizi et al., 2018; Morsy et al., 2018). De acuerdo a la revisión bibliográfica, aún no se ha evaluado la actividad antimicrobiana del ECG sobre microorganismos de deterioro en jugos de fruta.

1.4. ENCAPSULACIÓN

La encapsulación de componentes activos cada vez cobra más importancia, siendo aplicable en la industria química, farmacéutica y alimentaria (Fuchs et al., 2006).

La microencapsulación es una técnica donde, gotas líquidas, partículas sólidas o gaseosas son cubiertas por una película polimérica que permite proteger un compuesto del medio y liberarlo en forma controlada (Fuchs et al., 2006; Parra, 2010).

La microencapsulación de ECG se ha realizado por el método de secado por atomización para aplicación como antioxidante en alimentos (Çam et al., 2014; Kaderides et al., 2015), y como antifúngico para *Candida albicans* en sistema *in vitro* (Endo et al., 2012). Otra técnica utilizada ha sido la gelificación iónica, también orientada a aplicaciones antioxidantes (Zam et al., 2014; Zam, 2017).

No se han reportado estudios en relación a la microencapsulación de ECG para aplicación como antimicrobiano en jugos no pasteurizados.

1.4.1. EMULSIÓN DOBLE COMO MICROENCAPSULACIÓN

Las emulsiones dobles, son sistemas multicompartimentalizados, en los cuales coexisten emulsiones aceite-en-agua O/W y agua-en-aceite W/O. Las emulsiones dobles, pueden ser agua-en-aceite-en-agua ($W_1/O/W_2$) o aceite-en-agua-en-aceite ($O_1/W/O_2$), siendo más comunes la primeras (Garti, 1997; Jiménez-Colmenero, 2013). Las emulsiones $W_1/O/W_2$ consisten en gotas de agua (W_1) dispersas en glóbulos de grasa (O), los cuales, a su vez, se encuentran dispersos en una segunda fase continua acuosa (W_2) (Jiménez-Colmenero, 2013; Muschiolik & Dickinson, 2017).

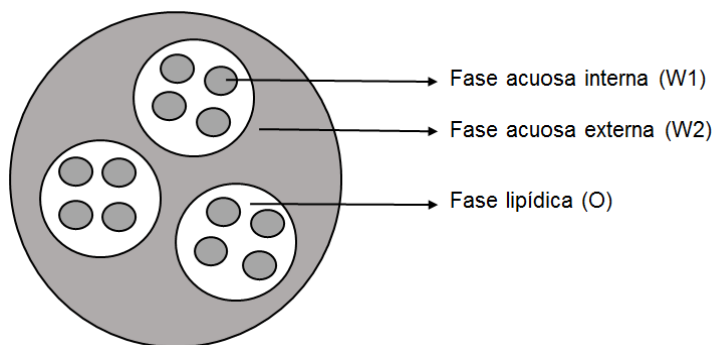


FIGURA 2. Representación esquemática de una gota de emulsión doble ($W_1/O/W_2$).

Existen varios métodos de preparación para la obtención de emulsiones dobles $W_1/O/W_2$, pero en general, su obtención implica un doble proceso de emulsificación, ya que ello genera un tamaño de partícula más reproducible y un sistema más estable (Jiménez-Colmenero, 2013). En el primer proceso de emulsificación, la W_1 se emulsiona con la fase oleosa (O) que contiene un

emulsificante lipofílico (HBL <10) mediante sistemas de alta energía (cizalla, ultrasonidos), obteniéndose la emulsión W_1/O . En el segundo proceso de emulsificación, la W_1/O se emulsiona con una nueva fase acuosa W_2 , esto mediante un emulsionante hidrofílico (HBL>10) en condiciones menos severas, a modo de evitar la ruptura de las gotas internas (Garti, 1997; Jiménez-Colmenero, 2013).

Entre los emulsionantes lipofílicos utilizados para formar las emulsiones primarias W_1/O , se pueden nombrar, polirricinoleato de poliglicerol (PGPR), Span 80, monoestearato de glicerilo, lecitina, entre otros, siendo el primero, el más utilizado. Por otro lado, para el caso de los emulsificantes hidrofílicos, se ha reportado el uso de maltodextrina, pectina, Tween 20, almidón modificado, quitosano, aislado de proteína de suero de leche, caseinato de sodio, goma arábica, gelatina, carboximetilcelulosa, entre otros y mezclas de ellos (Lobato-Calleros et al., 2008; Faridi et al. 2017; Muschiolik & Dickinson, 2017; Wang et al., 2017).

Las dobles emulsiones $W_1/O/W_2$, se han utilizado como estrategia para el desarrollo de alimentos más saludables, incluyendo alimentos funcionales. Estas emulsiones, pueden utilizarse para modificar cuantitativa (cantidad de grasa) y cualitativamente (perfil de ácidos grasos) el contenido de grasa en algunos alimentos, como también su carga calórica. Por ejemplo, reducción de grasa en leche descremada (Leong et al., 2018), yogurt batido, queso fresco (Jiménez-Colmenero, 2013), reducción de carga calórica, grasa y mejora en la

retención de color en productos cárnicos (Jiménez-Colmenero, 2013; Eisinaite et al., 2017).

Por otra parte, las emulsiones $W_1/O/W_2$ han sido utilizadas para encapsular compuestos bioactivos hidrofílicos en la fase acuosa interna y compuestos hidrofóbicos en la fase oleosa. Este sistema de encapsulación, permite controlar la liberación de ingredientes funcionales, protegerlos de condiciones medioambientales, aislarlo de otros compuestos con los cuales podrían reaccionar y enmascarar cualidades sensoriales indeseables como sabor amargo, astringente o metálico (Jiménez-Colmenero, 2013).

Dentro de los compuestos bioactivos encapsulados, mediante emulsiones dobles, se han reportado, probióticos (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*), minerales (magnesio, hierro, calcio), vitaminas (B₁₂, C, E, B₁), antioxidantes (resveratrol, ácido ascórbico, antocianinas, carotenoides), aminoácidos (L-Triptofano), compuestos aromáticos, proteínas (Lactoferrina), entre otros usos (Jiménez-Colmenero, 2013). Sin embargo, no se ha reportado la encapsulación de compuestos bioactivos extraídos de cáscara de granada en emulsiones dobles.

HIPOTESIS

El extracto de cáscara de granada (*Punica granatum* L.) posee un alto contenido de punicalagina, a la cual se le atribuye el efecto antimicrobiano. Por lo tanto, el extracto encapsulado en una emulsión doble, retardará el crecimiento de microorganismos de deterioro respecto del jugo adicionado de extracto sin encapsular.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del extracto de cáscara de granada encapsulado en una emulsión doble sobre la estabilidad microbiológica de jugo de manzana no pasteurizado.

OBJETIVO ESPECÍFICOS

- Estudiar las variables de formulación y proceso sobre la encapsulación de ECG en emulsiones dobles utilizando un diseño estadístico.
- Estudiar la estabilidad física y de punicalagina de la emulsión doble obtenida en condiciones óptimas.
- Estudiar los parámetros cinéticos y el mecanismo de liberación de punicalagina desde el sistema de emulsión doble obtenido en condiciones óptimas en jugo de manzana no pasteurizado.
- Estudiar la estabilidad microbiológica del jugo de manzana no pasteurizado, adicionado de ECG encapsulado en emulsión doble y sin encapsular.

MATERIALES Y METODOS

2.1. MATERIALES

- **Granadas:** cáscara de granada (*Punica granatum* L., variedad Wonderful).
- **Jugo de manzana:** manzanas rojas variedad Fuji, compradas en mercado local, obteniéndose el jugo mediante prensado en extractor de jugo (Ursus Trotter UT-BRONTE150).
- **Agentes emulsificantes:** lipofílico PGPR donado por DIMERCO (Santiago, Chile) e hidrofílico Tween 80 donado por Sigma-Aldrich (Missouri, USA).
- **Aceite de girasol:** marca Natura comprado en mercado local.
- **Estándar comercial:** punicalagina adquirido Sigma-Aldrich (Missouri, USA).
- **Medios de cultivo:** agar soya triptona (TSA), medio soya tripticaseína (TSB), agua peptonada, agar Müller-Hinton (MHT) (OXOID, PVEquip, Santiago, Chile).

2.2. MÉTODOS

2.2.1. ELABORACIÓN DEL EXTRACTO DE CÁSCARA DE GRANADA

El ECG se obtuvo por extracción de tipo convencional sólido-líquido utilizando un diseño de Box-Behnken (15 experimentos). La cáscara de granada deshidratada (2 g) se maceró con 20 mL de una solución agua:etanol, las variables independientes correspondieron al porcentaje de etanol, el tiempo (h), la agitación medida en rpm en agitador orbital (JSOS-500 JSR, Corea). Las variables de respuesta fueron el contenido de polifenoles totales medido por el

método de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965), contenido de punicalagina medido en HPLC-DAD (Zhang et al., 2009), y la actividad antimicrobiana medida como halo de inhibición (mm) en *S. aureus*. Todos los análisis fueron realizados en triplicado.

Las condiciones óptimas para la obtención del ECG se determinaron por Metodología de Superficie de Respuesta.

2.2.2. ENCAPSULACIÓN DE EXTRACTO DE CÁSCARA DE GRANADA MEDIANTE EMULSIONES DOBLES

El ECG se encapsuló en la fase interna acuosa (W_1) de emulsiones dobles tipo $W_1/O/W_2$ preparadas con aceite de girasol como fase oleosa. La emulsión primaria (W_1/O), se preparó con una relación $W_1:O$ 30:70, utilizando un 6 % de emulsionante lipofílico PGPR (HBL 1.5). La emulsión $W_1/O/W_2$ se obtuvo emulsionando la emulsión primaria (W_1/O) (20 %) con la fase acuosa externa W_2 (80 %), utilizando como emulsionante hidrófilo 2 % de Tween 80 (HBL 15). Adicionalmente, para regular la presión osmótica, se añadió 0,56 % de NaCl en W_2 . Se utilizó un mezclador para preparar las emulsiones groseras (Thermomix, Vorwek, Alemania) y un homogeneizador de alta presión de dos etapas de presurización (GEA Niro Soavi, Panda Plus 2000, Italia) para obtener las emulsiones finas W_1/O y $W_1/O/W_2$ (Figura 3).

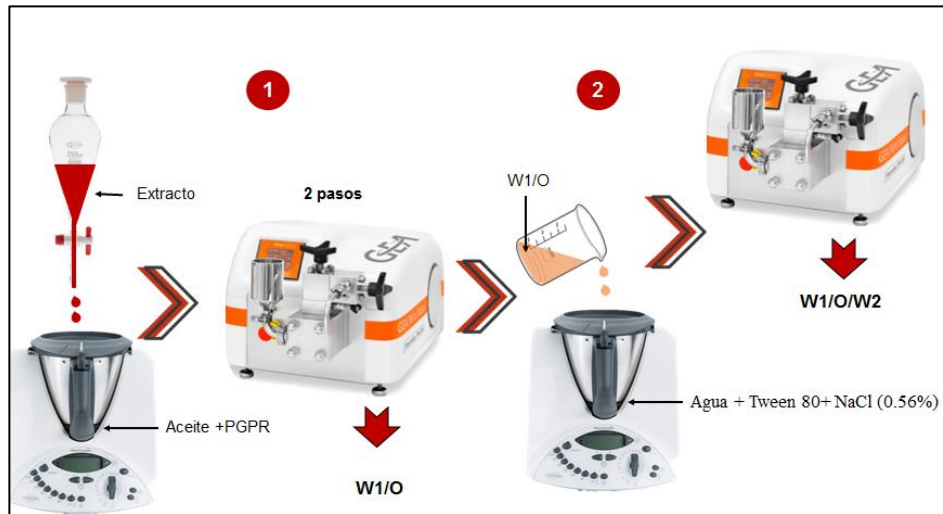


FIGURA 3. Esquema de elaboración de encapsulación de extracto de cáscara de granada mediante emulsiones dobles.

2.2.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

La encapsulación de ECG se realizó de acuerdo a un diseño experimental Box-Behnken con un total de 15 experimentos, considerando 3 puntos centrales. Las variables independientes correspondieron a la presión de homogeneización en la primera etapa (válvula) del homogeneizador durante la preparación de la emulsión W₁/O (550 - 1000 bar), la presión de homogeneización en la segunda etapa (válvula) del homogeneizador durante la preparación de la emulsión W₁/O/W₂ (150 - 300 bar), y el número de pases (1-5) de la emulsión W₁/O/W₂ por el homogeneizador (Tabla 1). Las variables respuesta fueron el tamaño de gota, la cual fue minimizada (diámetro volumétrico medio $D_{[4,3]}$) y la eficiencia de encapsulación de punicalagina, que fue maximizada (EE %) (Jiménez-Colmenero, 2013; Muschiolik & Dickinson, 2017; Silva et al., 2018; J. Wang et al., 2017).

Tanto en la preparación de la emulsión W_1/O como en $W_1/O/W_2$, la presión fijada en la segunda etapa del homogeneizador fue un 10 y 20 %, respectivamente, de la aplicada en la primera. En la preparación de la emulsión W_1/O se realizaron dos pases por el homogeneizador.

TABLA 1. Factores y niveles de diseño Box-Behnken para encapsulación de extracto de cáscara de granada en emulsión doble.

Factores	Niveles		
	-1	0	1
Presión 1 (bar)	550	775	1000
Presión 2 (bar)	150	225	300
Número de pasos	1	3	5

Presión 1: presión en la primera etapa de homogenización; Presión 2: presión en la segunda etapa de homogenización.

Para determinar las condiciones óptimas considerando todas las variables respuesta se utilizó la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) aplicando una optimización de respuesta múltiple utilizando la función de deseabilidad (Bezerra et al., 2008). Esta función, permite asignar un puntaje entre 0 y 1 al set de variables respuesta, donde 0 indica una respuesta indeseable y 1 el valor de respuesta deseable o ideal (Yolmeh & Jafari, 2017).

Los datos se ajustaron a un modelo de regresión de segundo orden de acuerdo con la siguiente ecuación (1).

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^3 b_i X_i + \sum_{i=1}^3 b_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 b_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

Donde Y es la respuesta predicha; los subíndices i y j variaron de 1 a la cantidad de variables (n = 3); b_0 fue el término de intercepción; los valores b_i fueron los coeficientes lineales, los valores b_{ii} fueron los coeficientes cuadráticos, b_{ij} fue el coeficiente de interacción, y X_i y X_j fueron los factores (variables independientes) (Yolmeh & Jafari, 2017).

2.2.4. CARACTERIZACIÓN DE LA EMULSIÓN DOBLE DE EXTRACTO DE CÁSCARA DE GRANADA OBTENIDA EN CONDICIONES ÓPTIMAS

2.2.4.1. Estabilidad física: se colocó 8 mL de emulsión en tubos cerrados y se almacenaron a 4 °C en refrigerador y a 25 °C en estufa de aire forzado. Se tomaron muestras periódicamente inmediatamente después de la preparación (1, 5, 10, 15 y 20 días). Se evaluó el tamaño de gota y distribución de tamaño, y análisis de la microestructura de la emulsión. Los análisis se realizaron el triplicado. Además, se realizó la medición del índice de cremado utilizando la siguiente ecuación (2):

$$\text{Í. Cremado} = \frac{HS}{HE} \times 100 \quad (2)$$

Donde:

HS: altura capa de suero

HE: altura total de emulsión (Silva et al., 2018).

- Tamaño de gota y la distribución de tamaños, se realizó mediante difracción láser con un analizador de tamaño de partícula (Mastersizer 2000, Malvern Instruments), equipado con un láser de He-Ne ($\lambda = 623 \text{ nm}$) y un rango

de medición 0,02-2.000 μm . Los parámetros utilizados fueron: índice de refracción de la fase dispersa de 1,529; absorbanza de glóbulo de 0,01; y un índice de refracción de la fase dispersante de 1,33; Obscuración del láser entre 8 % y 15 %. El tamaño se expresó como diámetro volumétrico medio ($D_{[4,3]}$), que se calculó con el software Mastersizer 2000 a partir de las distribuciones de tamaño obtenidas.

- La microestructura de las emulsiones dobles se evaluó por microscopía confocal (CLSM, LSM 700, Carl Zeiss, Germany). Para ello se realizó la tinción de la fase oleosa con compuesto fluorescente rojo de Nilo (0,2 % p/p). Las muestras se dispusieron en portaobjetos, se cubrieron con un cubreobjetos, y se sometieron a una longitud de onda de excitación de 488 nm, mientras que la señal fluorescente se recogió a 580 nm. La medición se realizó a 100 aumentos (Silva et al., 2018).

2.2.4.2. Estabilidad de punicalagina: se colocó la cantidad requerida para cada análisis en tubos cerrados y se almacenaron a 4 °C en refrigerador y a 25 °C en estufa de aire forzado. Se sacaron las muestras periódicamente inmediatamente después de la preparación (1, 5, 10, 15 y 20 días). El contenido de punicalagina se midió mediante la eficiencia de encapsulación y cantidad total de punicalagina. Este estudio de estabilidad se llevó a cabo por triplicado.

- La eficiencia de encapsulación de punicalagina se midió mediante HPLC-DAD a 360 nm, utilizando una bomba Merck Hitachi L-6200, un detector de fotodiodos Waters 996 y una columna C-18 (5 μm , 4.6 i.d.×250 mm, Waters,

Irlanda). Se utilizó como fase móvil A acetonitrilo y B ácido fosfórico al 0,4 % (Zhang et al., 2009). Se diluyó 4 mL de la emulsión doble con agua con la osmolaridad ajustada (1 mL), se centrifugó (2900 g, 45 min) para separar los glóbulos de aceite de W_2 , se filtró (0,22 μm) y la concentración de punicalagina se determinó por HPLC-DAD con la curva de calibración realizada previamente (Anexo 1 y 2). La EE se definió como el porcentaje de punicalagina en W_1 que permaneció en W_1/O posterior a la emulsificación, y se calculó mediante la siguiente ecuación (3).

$$EE=100-\frac{P_{W_2}\times 100}{P_t} \quad (3)$$

Donde P_{W_2} corresponde a la concentración de punicalagina recuperada de W_2 en un tiempo específico de almacenamiento (t), P_t es la concentración total de punicalagina en la emulsión en un tiempo específico de almacenamiento, la cual fue determinada como se describe a continuación (Robert et al., 2019, 2020; Silva et al., 2018).

- Contenido total de punicalagina en la emulsión doble. Para ello, 1,5 mL de emulsión fueron homogenizados con 1,5 mL de metanol, 2,1 mL de cloroformo y 0,5 mL de agua destilada homogenizando con Polytron PT 2100 (Kinematica AG, Luzern, Switzerland) a 20.000 rpm por 15 segundos entre cada solvente. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 10.000 rpm por 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue recolectado, filtrado (0,22 μm) y medido

en HPLC-DAD a 360 nm como se describe en el punto anterior, utilizando la curva de calibración elaborada previamente (Anexo 1 y 2) (Robert et al., 2020).

2.2.5. PARÁMETROS CINÉTICOS LIBERACIÓN DE PUNICALAGINA DESDE EL SISTEMA DE EMULSIÓN DOBLE (OBTENIDO EN CONDICIONES ÓPTIMAS) EN JUGO DE MANZANA NO PASTEURIZADO

Las propiedades de liberación de punicalagina del ECG encapsulado en la emulsión doble obtenida en condiciones óptimas, se evaluó en jugo de manzana no pasteurizado. Se colocaron 16 mL de ECG encapsulado por emulsión doble, correspondiente a 9 mg de ECG por mL de jugo, dentro de una membrana de diálisis (SnakeSkin™ con MWCO 3,5K, Termo Fisher Scientific). Las membranas con emulsión se introdujeron dentro de matraces con 100 mL de jugo, los cuales se mantuvieron a 4 °C con agitación constante. Se tomaron muestras durante 20 días (1, 2, 3, 5, 7, 9, 12, 14, 16, 19 y 20) de almacenamiento. Las muestras en triplicado fueron almacenadas. Posteriormente fueron filtradas (0,22 µm) y medido en HPLC-DAD a 360 nm utilizando la curva de calibración elaborada previamente (Anexo 1 y 2).

Los resultados se graficaron calculando la fracción liberada de punicalagina (M_t/M_∞) en el tiempo t . M_t es la cantidad de liberación de punicalagina en el tiempo t y M_∞ es la cantidad de punicalagina liberada a medida que el tiempo se aproxima al infinito.

2.2.6. ESTABILIDAD MICROBIOLÓGICA DEL JUGO DE MANZANA NO PASTEURIZADO, ADICIONADO DE EXTRACTO DE CÁSCARA DE GRANADA ENCAPSULADO POR EMULSIÓN DOBLE Y SIN ENCAPSULAR

2.2.6.1. Elaboración de jugo de manzana: para la elaboración del jugo se utilizaron manzanas rojas (variedad Fuji) adquiridas en un negocio local. La fruta se lavó y sanitizó previamente con hipoclorito de sodio de acuerdo a las indicaciones del fabricante. El jugo se obtuvo por prensado (Ursus Trotter UT-BRONTE150) sin pasteurizar.

2.2.6.2. Recuento inicial de la flora nativa: se efectuó el recuento de aerobios mesófilos (RAM) (INN, 2002a) así como de mohos y levaduras (INN, 2002b), ambos por el método de recuento en placas. Las muestras de jugo se sembraron transfiriendo alícuotas de 1 mL de diluciones seriadas a placas Petri. Los análisis se realizaron por triplicado y con tres diluciones en serie por duplicado para cada determinación. Para el RAM, se utilizó el medio de cultivo TSA y las placas se incubaron a 35 °C por 24 horas. Para el caso de mohos y levaduras, se utilizó el medio agar papa dextrosa, y las placas se incubaron a 22 °C por 5 días. Los análisis se realizaron por triplicado.

2.2.6.3. Concentración mínima inhibitoria (CMI): se consideró un rango de concentración de ECG de 2-12 mg/mL de jugo de manzana (Gullon et al. en 2016). Se incubaron las muestras a 35 °C por 24 horas para RAM, y a 22 °C por 5 días para mohos y levaduras, el recuento se realizó como se describe en el punto anterior. Para la determinación del CMI, se consideró la concentración

más baja de ECG, donde hubo diferencia significativa en el crecimiento de microorganismos (Al-Zoreky, 2009; Gullon et al., 2016).

2.2.6.4. Estabilidad microbiológica del jugo adicionado ECG encapsulado en dobles emulsiones dobles (J+ECGED): de acuerdo a la CMI obtenida en 2.2.6.3, la emulsión doble con ECG encapsulado se agregó a 100 mL de jugo de manzana y se almacenó a 4 °C durante 20 días. Se tomaron muestras periódicamente (0, 5, 10, 15 y 20 días) y se realizó el recuento como se describe en el punto anterior. De igual forma se evaluó la estabilidad microbiológica del jugo de manzana adicionado de ECG sin encapsular (J+ECG) y el jugo solo (J). Los análisis se realizaron por triplicado.

2.2.6.5. Cálculo de la velocidad específica de crecimiento: la cinética de crecimiento de los microorganismos se expresó de acuerdo con la siguiente expresión (4).

$$\log \left(\frac{N_f}{N_0} \right) = kt \tag{4}$$

Donde:

N_0 : número de microorganismos iniciales

N_f : número de microorganismos sobrevivientes al tiempo t

t: tiempo de almacenamiento (d)

k: velocidad específica de crecimiento (d^{-1})

La velocidad específica de crecimiento se calculó como la pendiente del ajuste lineal al graficar $\log (N_t/N_0)$ v/s t (Herrera, 2016; Stanier et al., 2005; Vargas, 2018).

2.2.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las condiciones óptimas para el diseño de encapsulación de ECG por emulsiones dobles se obtuvieron mediante MSR.

Para determinar diferencias estadísticas en la estabilidad para el diámetro volumétrico medio y eficiencia de encapsulación de punicalagina de las emulsiones se utilizó varianza múltiple. Para los análisis microbiológicos se utilizó varianza de una vía. Se aplicó la prueba de rango múltiple de Tukey HSD. Todos los análisis estadísticos se calcularon usando Statgraphics Centurion XV.I.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO DE CASCARA DE GRANADA

Para la obtención del ECG se realizó un diseño Box-Behnken con 15 experimentos (3 puntos centrales), donde las variables independientes fueron el porcentaje de etanol, el tiempo (h) y la velocidad de agitación (rpm). Las variables de respuesta fueron el contenido de polifenoles, contenido de punicalagina y el halo de inhibición en *S. aureus* (Figura 4; Tabla 2), todas las variables de respuesta fueron maximizadas.

En la Tabla 2, se observa el diseño experimental y las variables respuesta. El contenido total de polifenoles varió entre 14 y 138 mg EAG/g peso seco de cáscara de granada, el contenido de punicalagina entre 16,5 y 116 mg punicalagina/g peso seco de cáscara de granada y finalmente, el halo de inhibición varió entre 3 y 9,5 mm. Los valores mínimos de las variables respuesta fueron observados con mayor porcentaje de etanol (100%) y los valores máximos con el punto medio de etanol (50%).

Para todas las variables respuesta, la única variable independiente significativa fue el contenido de etanol (%) (Anexo 3,4 y 5), lo que se podría atribuir a la afinidad que posee la punicalagina con solventes polares. De acuerdo a la literatura, los ECG utilizados como antimicrobianos poseen mejor actividad con estos solventes (agua, etanol y metanol). Se ha descrito una buena extracción de compuestos fenólicos con metanol, sin embargo, para extractos con potencial aplicabilidad en alimentos, se han preferido extracciones con etanol,

agua y mezclas de ellos, debido a que son solventes más seguros (Jauhar et al., 2019; Singh et al., 2014). Se debe considerar, además, que las condiciones de operación como tiempo de contacto, temperatura, agitación, entre otras, podrían afectar en la extracción de estos compuestos (Quattrucci et al., 2013; Rongai et al., 2017; Singh et al., 2014; Tayel et al., 2009).

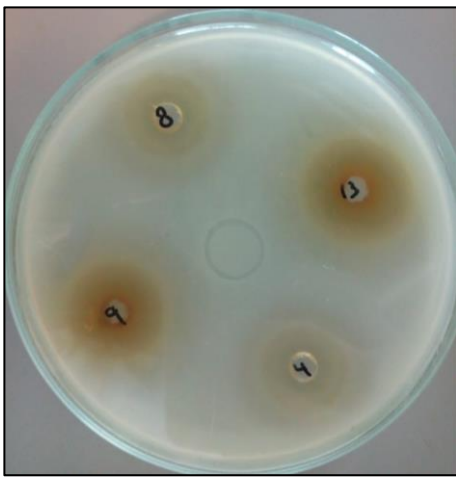


FIGURA 4. Ejemplo de un ensayo de actividad antimicrobiana medida como halo de inhibición en *S. aureus*. En 4 (100% etanol, 5 h, 150 rpm); en 8 (100 % etanol, 3 h, 250 rpm); en 9 (50 % etanol, 1 h, 50 rpm); 13 (50% etanol, 3 h, 150 rpm).

TABLA 2. Condiciones experimentales, contenido de polifenoles totales (CPT), contenido de punicalagina (P) y actividad antimicrobiana medida como halo de inhibición en *S. aureus*, para el diseño Box-Behnken.

Variables independientes			Variables respuesta		
Etanol (%)	Tiempo (h)	rpm	CPT (mg EAG/g p.s) ($X \pm SD$)	P (mg punicalagina/g p.s) ($X \pm SD$)	AAM <i>S. aureus</i> (mm) ($X \pm SD$)
0	1	150	89±4	57±2	6,5±0,7
100	1	150	17±2	16,5±0,1	3,8±0,4
0	5	150	91±4	73±2	7±1
100	5	150	26±3	26±5	3,5±0,7
0	3	50	118±3	72±1	5,8±0,4
100	3	50	14±2	17,9±0,3	3,5±0,7
0	3	250	87±3	66±1	6,0±0,0
100	3	250	18±1	22,4±0,4	3,0±0,7

50	1	50	128±12	116±4	6,0±0,0
50	5	50	107±11	88,8±0,3	6,8±0,4
50	1	250	121±4	106,9±0,6	7,3±0,4
50	5	250	124±5	110±3	6,8±0,4
50	3	150	138±5	114±4	9,5±0,7
50	3	150	137±7	107,8±0,5	7,0±0,0
50	3	150	138±7	106±3	8,3±0,4

CPT: contenido de polifenoles totales; P: contenido de punicalagina; AAM: actividad antimicrobiana; EAG: equivalente ácido gálico; p.s: peso seco de cáscara de granada; X: promedio; SD: desviación estándar.

La optimización se realizó por Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) maximizando las tres variables respuesta de forma conjunta, aplicando la función deseabilidad. En la figura 5 se observa la gráfica de superficie de respuesta de la optimización conjunta. Las condiciones óptimas de extracción fueron 38 % etanol, 159 rpm y 3 horas con 12 minutos. En la Tabla 3 se muestran las características químicas del ECG obtenido bajo condiciones óptimas.

El cromatograma de compuestos fenólicos obtenido mediante HPLC-DAD-ESI-TOF/MS, indicó que el compuesto mayoritario presente en el ECG es punicalagina (Anexo 6)

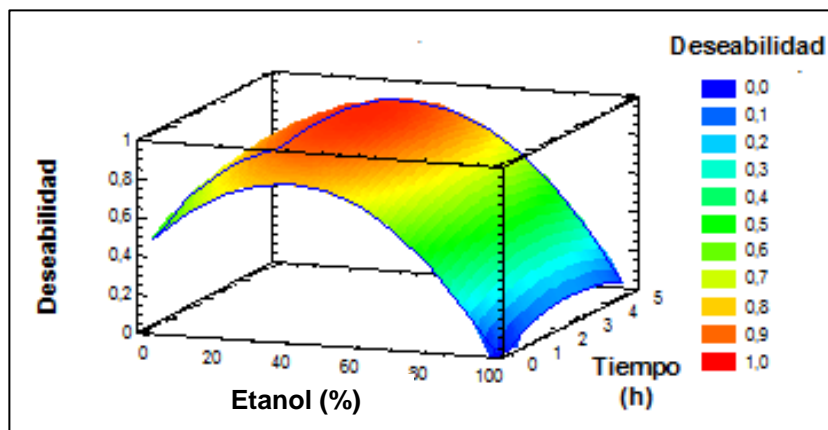


FIGURA 5. Gráfica de superficie de respuesta de la optimización conjunta de contenido de polifenoles totales (CPT), contenido de punicalagina (P) y actividad antimicrobiana en *S.aureus* (AAM) con 150 rpm de agitación.

TABLA 3. Caracterización extracto de cáscara de granada obtenido en condiciones óptimas.

Parámetro	ECG X±SD
CPT (mg EAG/g p.s)	124 ±3
P (mg punicalagina/g p.s)	94 ±3
AAM <i>S. aureus</i> (mm)	16,5 ± 0,7

CPT: contenido de polifenoles totales; P: contenido de punicalagina; AAM: actividad antimicrobiana; EAG: equivalente ácido gálico; p.s: peso seco de cáscara de granada.

3.2. OPTIMIZACIÓN DE ENCAPSULACIÓN DE EXTRACTO DE CÁSCARA DE GRANADA EN EMULSIONES DOBLES

El ECG se llevó a sequedad en rotavapor y se reconstituyó en agua destilada, concentrándolo al doble. Posteriormente, se encapsuló mediante emulsiones dobles de acuerdo a un diseño Box-Behnken (15 experimentos) (Tabla 4), donde las variables independientes fueron la presión en la primera etapa (válvula) de homogeneización (X1), presión en la segunda etapa (válvula) de homogeneización (X2) y el número de pasos de la emulsión $W_1/O/W_2$ por el homogeneizador (X3). Las variables respuesta correspondieron al tamaño de

gota expresado como diámetro volumétrico medio ($D_{[4,3]}$) y eficiencia de encapsulación expresado como porcentaje de encapsulación (EE) de punicalagina.

En la Tabla 4, se observa que los valores de tamaño de gota variaron entre 3,60 y 0,56 μm . El mayor valor (3,60 μm) se obtuvo para el caso de la presión media en la primera etapa (775 bar), y la presión y número de pasos mínimos en la segunda etapa, mientras que el menor valor (0,56 μm) se obtuvo para la presión media en la primera etapa, y la presión y número de pasos máximo; por lo que se observa que la presión y el número de pasos en la segunda etapa son las variables más significativas. Estos resultados son concordantes con lo reportado por McClements (2005), quien estableció que existe una relación aproximadamente lineal entre el logaritmo de la presión y el logaritmo del tamaño de gota.

Se observa que los valores de eficiencia de encapsulación de punicalagina fluctuaron entre 16 a 63 %, aumentando este valor a mayor número de pasos.

Valores menores a un 30 % fueron observados en encapsulación de B_{12} a presiones de 150 bar y 50 bar en la primera y segunda etapa de presión del homogeneizador, respectivamente, utilizando como emulsificantes caseinato de sodio y maltodextrina (O'Regan & Mulvihill, 2010). Por otro lado, encapsulación de apigenina utilizando Tween 80 y PGPR como emulsificantes mostró una eficiencia de 67 % (Kim et al., 2016). Por lo tanto, los emulsificantes utilizados

como las condiciones de operación jugarían un rol importante en la eficiencia de encapsulación.

Valores de eficiencia de encapsulación descritos anteriormente en la literatura se encuentran cercanos a los rangos obtenidos en el diseño experimental para las distintas condiciones de operación, por lo que, la encapsulación por emulsiones dobles, en general, posee un alto rango de eficiencia de encapsulación, lo cual dependerá de las condiciones de operación, emulsificantes utilizados y sus concentraciones, sustancia a encapsular, entre otras (Lamba et al., 2015).

TABLA 4. Condiciones experimentales, eficiencia de encapsulación (EE) y tamaño de gota $D_{[4,3]}$ y deseabilidad observada para el diseño Box-Behnken.

Variables independientes			Variables respuesta		Deseabilidad observada (D)
Presión 1 (X1) (bar)	Presión 2 (X2) (bar)	Pases (X3)	$D_{[4,3]}$ ($X \pm SD$)	EE (%) ($X \pm SD$)	
550	150	3	2,6±0,1	57±11	0,54
1000	150	3	1,5±0,1	61,8±0,6	0,81
550	300	3	0,87±0,02	55,0±0,8	0,86
1000	300	3	0,713±0,003	60±1	0,94
550	225	1	3,2±0,2	25±0,8	0,15
1000	225	1	2,7±0,2	41±8	0,40
550	225	5	0,640±0,004	62±5	0,97
1000	225	5	0,745±0,007	62±2	0,95
775	150	1	3,6±0,2	16±3	0,00
775	300	1	2,0±0,2	47±9	0,58
775	150	5	1,08±0,02	48,0±0,5	0,75
775	300	5	0,557±0,001	63±3	1,00
775	225	3	1,55±0,09	47,7±0,8	0,67
775	225	3	1,29±0,04	52±4	0,75
775	225	3	1,43±0,06	49±2	0,70
Coeficientes					

Carencia de ajuste	0,4	0,053	0,2
R²	99 %	86 %	98 %
R² ajustado a g.l	97 %	73 %	93 %

D_[4,3]: diámetro volumétrico medio. EE: eficiencia de encapsulación. X: promedio. SD: desviación estándar.

Se utilizó MSR para la optimización de cada variable respuesta. Para el análisis de varianza (ANDEVA) se consideraron las formas cuadráticas, lineales y la interacción entre las variables independientes a un nivel de 95 % de confianza. Además, se incluyeron las formas no significativas que aportaron a mejorar el ajuste del diseño (Bezerra et al., 2008).

Respecto del análisis de varianza (ANDEVA) para el tamaño de gota, la forma lineal del número de pasos, y de la presión en la primera y segunda etapa de homogenización fueron significativos con un efecto negativo sobre el tamaño de gota, por lo que, a mayor presión en ambas etapas de homogenización y número de pasos, menor tamaño de gota ($p \leq 0,05$) como se muestra en el gráfico de Pareto (Anexo 7). El modelo explicó el 97 % de la variabilidad (R² ajustado por grados de libertad) y una falta de ajuste no significativa ($p \geq 0,05$). La ecuación 5 de regresión cuadrática que describió el efecto de las variables independientes sobre el tamaño de gota es la siguiente:

$$D_{[4,3]} = 10,5299 - 0,00491667 \cdot X_1 - 0,0229019 \cdot X_2 - 1,76179 \cdot X_3 + 0,0000131852 \cdot X_1 \cdot X_2 + 0,00035 \cdot X_1 \cdot X_3 + 0,0017 \cdot X_2 \cdot X_3 + 0,0972768 \cdot X_3^2 \quad (5)$$

En la Figura 6 se presenta el gráfico de superficie respuesta para la

optimización de la variable tamaño de gota $D_{[4.3]}$. Se puede observar que, a mayores presiones en la primera y segunda etapa de homogenización, se obtiene un menor tamaño de gota expresado como diámetro volumétrico medio $D_{[4.3]}$. Además, el menor diámetro volumétrico medio ($0,26 \mu\text{m}$) se obtuvo considerando la menor presión en la primera etapa de homogenización (550 bar), la mayor presión en la segunda etapa de homogenización (300 bar) y con 5 pasos.

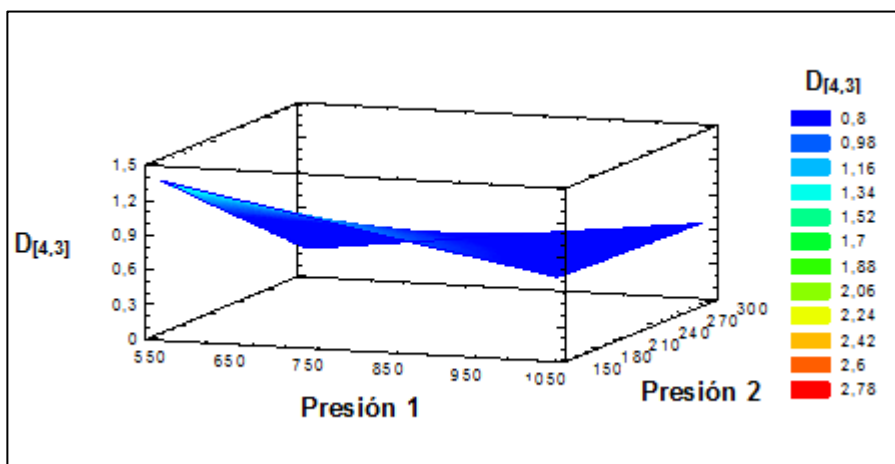


FIGURA 6. Gráfica de superficie de respuesta para la variable dependiente de tamaño de gota $D_{[4.3]}$ con 5 pasos en la segunda etapa de homogenización.

En cuanto al ANDEVA para la EE, la forma lineal del número de pasos en la segunda etapa de homogenización posee un efecto positivo significativo ($p \leq 0,05$), por lo que, a mayor número de pasos, mayor eficiencia de encapsulación como se muestra en el gráfico de Pareto (Anexo 8).

El modelo explicó el 73 % de la variabilidad (R^2 ajustado a los grados de libertad) y una falta de ajuste no significativa ($p \geq 0,05$). La ecuación 6 de

regresión cuadrática que describió el efecto de las variables independientes sobre la eficiencia de encapsulación de punicalagina es la siguiente:

$$EE = 19,351 - 0,148297*X1 + 0,150567*X2 + 32,3597*X3 + 0,000121747*X1^2 - 0,00861111*X1*X3 - 0,0263*X2*X3 - 2,18288*X3^2$$

(6)

Respecto de la eficiencia de encapsulación (Figura 7) se observó que principalmente a mayor presión en la segunda etapa, mayor eficiencia de encapsulación de punicalagina. Además, se observaron altos valores de eficiencia de encapsulación de punicalagina en ambos extremos del rango de presión de la primera etapa de homogenización. La eficiencia de encapsulación óptima se registró a 1000 bar en la primera etapa de homogenización, 300 bar y 4 pasos en la segunda etapa de homogenización con un 67 % de eficiencia de encapsulación.

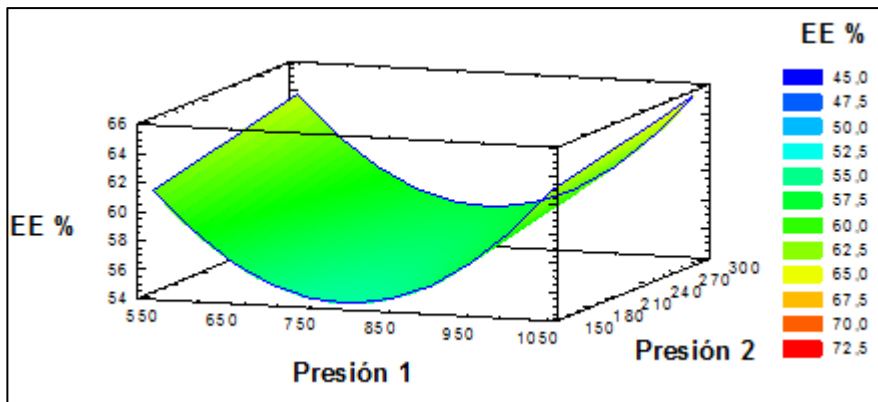


FIGURA 7. Gráfica de superficie de respuesta para las variable dependiente de eficiencia de encapsulación EE % con 5 pasos en la segunda etapa de homogenización.

Para la optimización múltiple se aplicó la función deseabilidad, minimizando el tamaño de gota y maximizando la EE, ambas con factor de peso, $s = 1$ y factor

de impacto, $I = 3$. El ANDEVA de la deseabilidad global observada indicó que la forma cuadrática y lineal del número de pasos, la forma lineal de la presión en la primera y segunda etapa de homogenización fueron significativas sobre la función deseabilidad observada ($p \leq 0,05$) como muestra en el gráfico de Pareto (Anexo 9). Todas las formas lineales mostraron un efecto positivo, por lo que, a mayor presión tanto en la primera como en la segunda etapa de homogenización y mayor número de pasos, mayor es la deseabilidad observada (más cercana a 1) (Anexo 9). La regresión fue significativa al 95 % de confianza, para lo cual el R^2 ajustado a los grados de libertad fue de un 93 %, residuales en un rango de $\pm 0,08$, mostrando un patrón aleatorio y una carencia de ajuste de 0,1782, lo que indica que el diseño de la optimización conjunta (función deseabilidad observada) es adecuado para explicar los datos (Anexo 10).

Para el análisis de varianza (ANDEVA) se consideraron todas las formas cuadráticas, lineales y la interacción entre las variables independientes a un nivel de 95 % de confianza, esto ya que la exclusión de las formas menos significativas no implica en un aumento en el R^2 ajustado a los grados de libertad.

En la Tabla 5, se muestran las condiciones óptimas de procesamiento obtenidas para la encapsulación de ECG en emulsiones múltiples, que resultaron 550 bar en la primera etapa de homogenización, 299 bar en la segunda etapa y 5 pasos en la segunda etapa.

Se puede observar que estas condiciones óptimas de procesamiento estuvieron en el extremo inferior del rango utilizado (550 bar) en el caso de la presión en la primera etapa de homogenización, y en el extremo superior para el rango utilizado (300 bar) en el caso de la presión y el número de pasos en la segunda etapa de homogenización (5), con una deseabilidad de 1 (Figura 8).

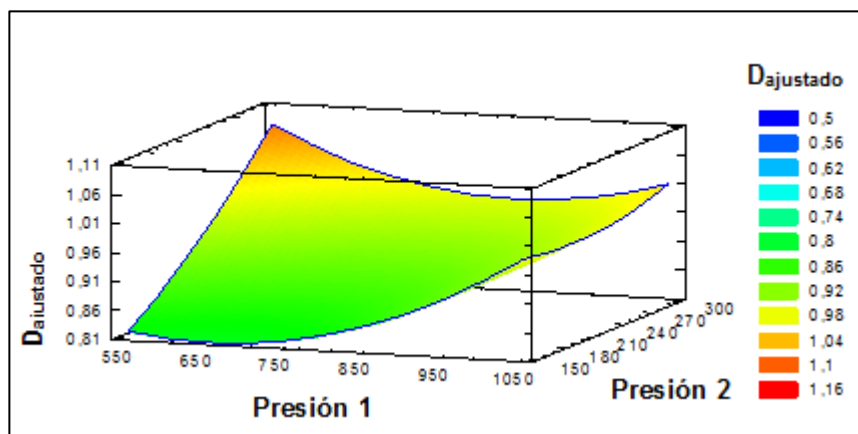


FIGURA 8. Gráfica de superficie de respuesta para los datos de deseabilidad obtenida a partir de la optimización conjunta de tamaño de gota ($D_{[4,3]}$) y eficiencia de encapsulación (EE %) con 5 pasos.

TABLA 5. Valores óptimos obtenidos en base a la optimización de la deseabilidad observada para la optimización conjunta.

Variable independiente	Emulsión doble óptima
Presión en la primera etapa (bar)	550
Presión en la segunda etapa (bar)	299
Número de pasos en la segunda etapa	5

La ecuación de regresión cuadrática que describe el efecto de las variables independientes sobre el valor de la deseabilidad observada es (7):

$$D_{\text{ajustado}} = -1,1685 - 0,000350306 * X_1 + 0,0043248 * X_2 + 0,614857 * X_3 + 0,00000112851 * X_1^2 - 0,00000287579 * X_1 * X_2 - 0,000142367 * X_1 * X_3 + 0,00000374321 * X_3^2 - 0,000546798 * X_2 * X_3 - 0,03711118 * X_3^2$$

(7)

3.3. ESTABILIDAD FÍSICA Y DE PUNICALAGINA EN LA EMULSIÓN OBTENIDA BAJO CONDICIONES ÓPTIMAS

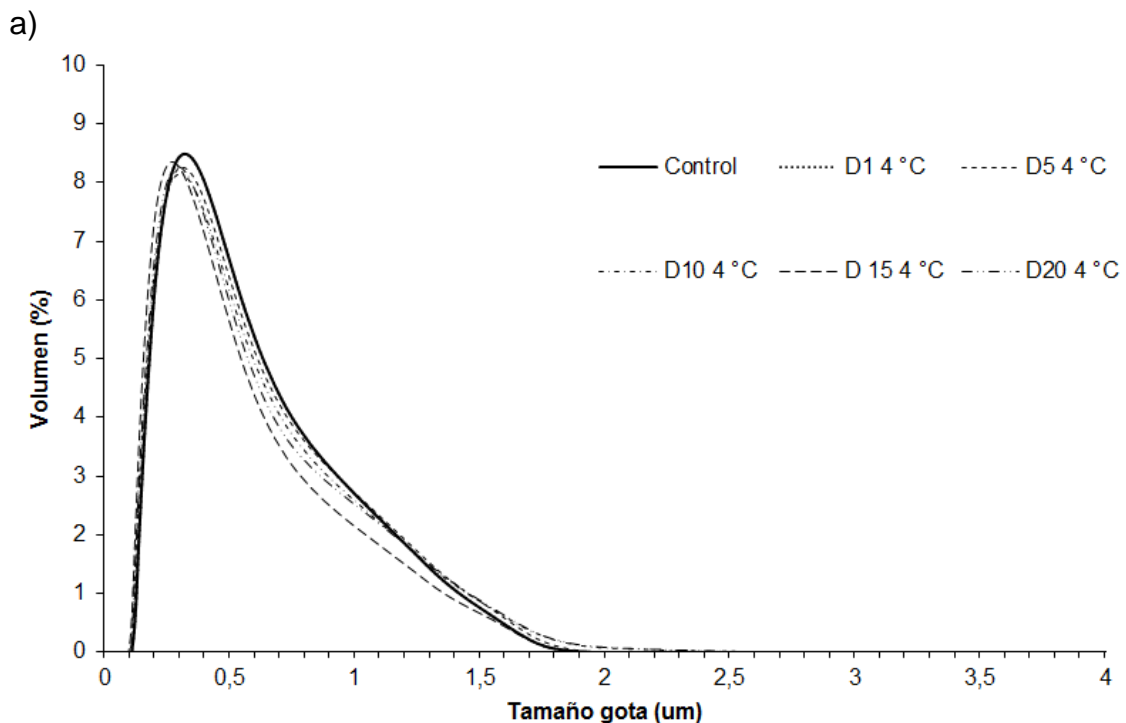
La estabilidad física y de punicalagina se evaluó periódicamente durante 20 días, realizándose mediciones los días 1, 5, 10, 15 y 20 a 4 y 25 °C. La estabilidad física se evaluó por medición de tamaño de gota y distribución de tamaño, y evaluación de la microestructura mediante microscopía confocal. Para el caso de la estabilidad de punicalagina, se realizó la medición de eficiencia de encapsulación y contenido de punicalagina total en la emulsión.

3.3.1. Estabilidad física de la emulsión

3.3.1.1. Distribución y tamaño de gota

En la Figura 9 se observa la distribución de tamaño de gota durante el almacenamiento a 4 °C (figura 9a) y 25 °C (figura 9b). Se observó una distribución de tamaño monomodal, con tamaños comprendidos en el rango entre 0,1 y 2 µm, tanto a 4 °C como a 25 °C hasta el día 15. En el caso de las muestras almacenadas a 4 °C no se observaron cambios significativos en la distribución de tamaños ni en el rango de tamaño de gota durante el tiempo de almacenamiento. Sin embargo, en las muestras almacenadas a 25 °C se observó una reducción significativa del tamaño durante el tiempo de

almacenamiento, lo que podría deberse a la expulsión de W_1 a través de la fase oleosa, provocando un cambio de la emulsión doble $W_1/O/W_2$ a una emulsión simple tipo O/W (Tamnak et al., 2016). Además, en las emulsiones almacenadas a 25 °C se observó la aparición de una segunda población de glóbulos grasos con tamaños en el rango 2-7 μm , lo cual podría ser explicado por el fenómeno de coalescencia favorecido por la temperatura, ya que a medida que aumenta la temperatura, la viscosidad del aceite es menor. En este contexto, Aditya et al. (2015) establecieron que, a mayor viscosidad de la fase oleosa existe una menor probabilidad de coalescencia de las gotas de aceite. Este fenómeno podría explicar el aumento de tamaño de gota durante el almacenamiento observado en la emulsión almacenada a 25 °C (Figura 9).



b)

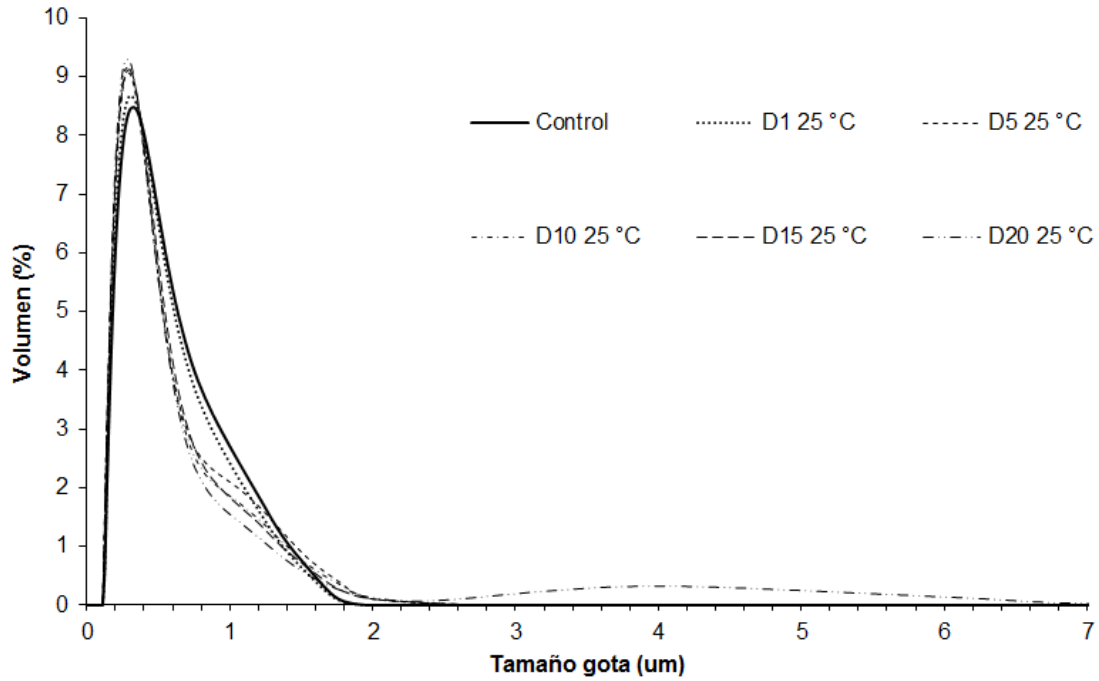


FIGURA 9. Tamaño y distribución 9a: 4 °C; 9b: 25 °C en el almacenamiento por 1, 5, 10, 15 y 20 días.

En la Tabla 6 se muestran los valores de $D_{[4,3]}$ de la emulsión múltiple obtenida bajo condiciones óptimas durante el almacenamiento. Para la emulsión obtenida en condiciones óptimas fresca el $D_{[4,3]}$ fue de 0,48 μm . Se observa que, las diferentes muestras almacenadas a las distintas temperaturas (4 y 25 °C) presentaron diferencias significativas entre ellas a lo largo de todo el estudio. Además, para la misma muestra a lo largo del almacenamiento, se observaron diferencias significativas en ambas temperaturas, donde el tamaño disminuye en ambos casos (4 y 25 °C), lo cual se puede deber a la expulsión del ECG desde la fase acuosa interna (W_1), a la fase acuosa externa (W_2), generando un tamaño de gota de aceite menor, como se explicó anteriormente.

En las emulsiones almacenadas a 4 °C, se observa una disminución significativa posterior al día 10 y en las emulsiones almacenadas a 25 °C, posterior al día 5, lo que se podría deber a que la expulsión de W_1 se ve mayormente facilitada por la menor viscosidad del aceite a más alta temperatura, lo que concuerda con la distribución de tamaño en la Figura 9. Por otra parte, en la muestra almacenada hasta el día 20, a ambas temperaturas, existe un aumento del diámetro volumétrico medio significativo, posiblemente, debido a la coalescencia o floculación de una porción de la muestra.

TABLA 6. $D_{[4,3]}$ en el almacenamiento (20 días) a 4 y 25 °C.

Día	$D_{[4,3]}$ (μm)	
	4 °C	25 °C
1	0,480±0,009 ^{Bd}	0,4630±0,0005 ^{Ac}
5	0,4780±0,0004 ^{Bcd}	0,446±0,003 ^{Ab}
10	0,471±0,002 ^{bbc}	0,433±0,004 ^{Aa}
15	0,4340±0,0004 ^{Ba}	0,434±0,004 ^{Aa}
20	0,4660±0,0008 ^{Bb}	0,4930±0,0006 ^{Ad}

Las letras (A-B) indican diferencias significativas entre las muestras a las distintas temperaturas ($p \leq 0,05$).

Las letras (a-e) indican diferencias significativas para la misma muestra a los diferentes días ($p \leq 0,05$).

Se considera un tamaño de partícula de 10 a 1000 nm apropiado para la entrega del material encapsulado al medio en el que se encuentra en una tasa controlada y sostenida, por lo que los tamaños obtenidos a lo largo del almacenamiento serían adecuados para este propósito (Lamba et al., 2015).

Valores de $D_{[4,3]}$ alrededor de 2 μm se reportaron utilizando concentraciones similares de PGPR y Tween 80 (Tamnak et al., 2016), lo cual es un tamaño significativamente mayor al obtenido en este estudio.

Tamaños de gota más pequeños se observan en general con equipos de alta presión, esto sumado a una mayor presión de homogenización y mayor número de pasos, explicaría tamaños menores a los reportados en otros estudios que utilizaron los mismos emulsificantes (PGPR y Tween 80), donde los rangos de tamaño promedio de emulsión doble fresca, en ambos casos para la encapsulación de NaCl, se encuentran entre 2 μm , utilizando como estabilizante caseinato de sodio realizado con ultraturrax (Prakash, 2012) y 70,5 μm utilizando como estabilizante gelatina hecho con un rotor-estator (Lamba et al., 2015; Sapei et al., 2012).

Se debe considerar que existen diversas condiciones de procesamiento, tipo y concentración de emulsificante, entre otros, que pueden dificultar la comparación de los resultados (Lamba et al., 2015).

3.3.1.2. Análisis de microestructura

En la Figura 10 se muestra la microscopía de la emulsión óptima en almacenamiento a 4 y 25 °C, durante 20 días. De acuerdo a la clasificación realizada por Florence & Whitehill en 1981, se observan emulsiones tipo A y tipo B, donde las tipo A corresponden a emulsiones que poseen tamaño de gota de la fase acuosa interna más grande y las de tipo B múltiples gotas de fase acuosa interna que corresponde aproximadamente al 45 % de la emulsión W_1/O

(Anexo 11). Estos sistemas de liberación son más simples, principalmente por difusión (Anexo 12).

En general, no se observaron diferencias notables en el tamaño de gota a lo largo del periodo de almacenamiento, lo cual se condice con los datos obtenidos para el diámetro volumétrico medio ($D_{[4,3]}$). Sin embargo, el día 20 se observó mayor variabilidad en los diámetros de las gotas con respecto al día 1, resultados concordantes con los datos de tamaño de gota. Por otra parte, el día 20 fueron más notorios los fenómenos de floculación y coalescencia para 4 y 25 °C, respectivamente, tal y como se puede observar en las micrografías tomadas por CLSM, estos fenómenos podrían explicar el aumento de tamaño promedio (Figura 11).

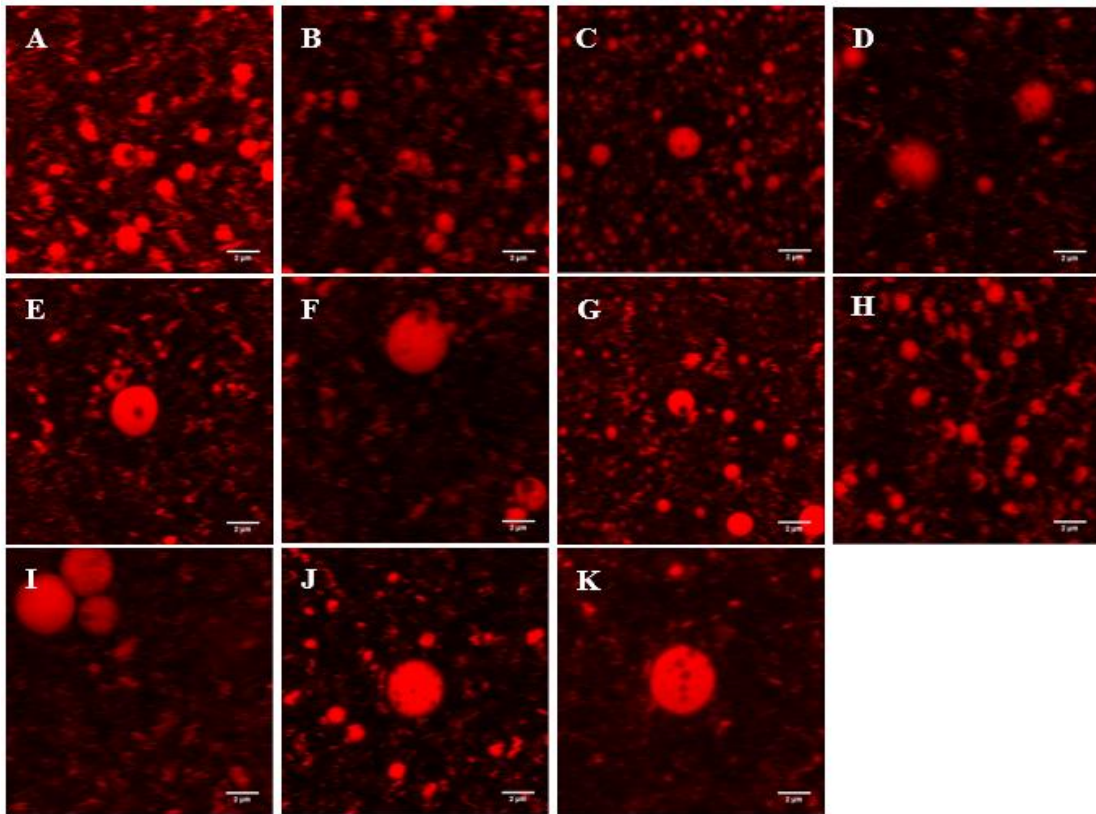


FIGURA 10. Imágenes de CLSM donde, A: emulsión óptima D0, B: emulsión a 4 °C D1; C: emulsión 25 °C D1; D: emulsión 4 °C D5; E: emulsión 25 °C D5; F: emulsión 4 °C D10; G: emulsión 25 °C D10; H: emulsión 4 °C D15; I: emulsión 25 °C D15; J: emulsión 4 °C D20; K: emulsión 25 °C D20. La barra de escala representa 2 µm a 100x 4 de aumento.

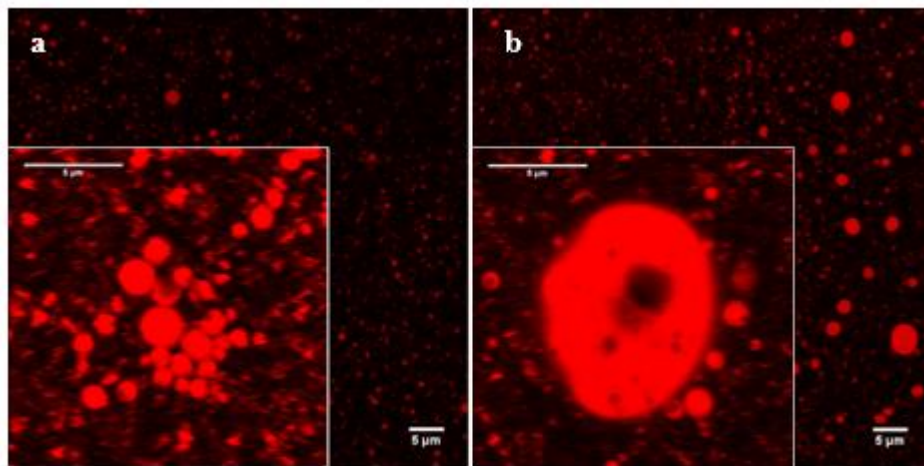


FIGURA 11. Fenómenos de desestabilización de las emulsiones en el día 20. a: emulsión 4 °C D20; b: emulsión 25 °C D20. La barra representa 5 µm a 100x y 100x 4 de aumento.

Hasta el día 20 no se observó cremado en las emulsiones, ni alguna desestabilización aparente. Sin embargo, alrededor del día 25, fueron visibles agregaciones las cuales podrían deberse a floculación y/o coalescencia, concordantes con lo observado por microscopía confocal.

3.3.2 Estabilidad de punicalagina y eficiencia de encapsulación

En la Tabla 7 se muestran los valores de EE de la emulsión doble obtenida bajo condiciones óptimas. La emulsión doble fresca tuvo una eficiencia de encapsulación de 57 %. Durante los 20 días de almacenamiento se encontró una disminución significativa de la eficiencia de encapsulación, tanto a 4 como a 25 °C, siendo mayor en las emulsiones almacenadas a 25 °C. En el día 1, se observó que la eficiencia de encapsulación fue significativamente mayor (55 %) en la muestra a 4 °C, respecto de la muestra a 25 °C (52 %). Este comportamiento se mantuvo durante todo el almacenamiento llegando el día 20 a valores de eficiencias de encapsulación de punicalagina del 22 y 16 % a 4 y 25 °C, respectivamente.

TABLA 7. Eficiencia de encapsulación (EE %) en el almacenamiento (20 días) a 4 y 25 °C.

Día	EE (%)	
	4 °C	25 °C
1	55±2 ^{Bd}	52±4 ^{Ad}
5	40±2 ^{Bc}	33±1 ^{Ac}
10	35±2 ^{Bc}	29±2 ^{Ac}
15	28±3 ^{Bb}	24±2 ^{Ab}
20	22±3 ^{Ba}	16±2 ^{Aa}

Las letras (A-B) indican diferencias significativas entre las muestras a las distintas temperaturas ($p \leq 0,05$).

Las letras (a-e) indican diferencias significativas para la misma muestra a los diferentes días ($p \leq 0,05$).

Se reportaron valores de eficiencia de encapsulación de tartrazina alrededor de un 50 % utilizando PGPR y Tween 80 en concentraciones similares a las utilizadas en la emulsión doble fresca, lo cual se condice con la eficiencia de encapsulación de punicalagina obtenida en la emulsión doble óptima que fue de un 57 % (Tamnak et al., 2016).

En los 20 días que se realizó la medición no hubo una degradación significativa ($p \geq 0,05$) de la punicalagina total contenida en la emulsión. Por lo que la disminución de la eficiencia de encapsulación de punicalagina, como se expresó anteriormente, podría ser debido a la expulsión de W_1 a través la fase oleosa, lo cual se condice con una leve disminución del tamaño sobre todo a mayor temperatura, donde se produce una mayor disminución de la eficiencia de encapsulación (Tamnak et al., 2016).

3.4. ESTABILIDAD MICROBIOLÓGICA

El jugo elaborado posee un pH de 4,65 y 14,20 °Brix. Se midió la carga inicial del jugo realizando un recuento de microorganismos aerobios mesófilos, levaduras y mohos.

Para la adición del ECG sin encapsular y encapsulado por emulsión doble al jugo de manzana, primeramente, se determinó la CMI de ECG (sin encapsular), en un rango de concentración de 2-12 mg extracto cáscara de granada/mL de jugo de manzana. Se encontraron diferencias significativas en el recuento a la

concentración de 9 mg/mL de jugo de manzana con respecto a las otras concentraciones, posterior a las 24 horas de incubación para RAM y 5 días para mohos y levaduras, por lo que esta concentración se seleccionó para realizar el análisis microbiológico. El estudio de la estabilidad microbiológica del jugo se realizó en almacenamiento a 4 °C durante 20 días. Se consideraron tres sistemas: jugo (J); jugo + ECG sin encapsular (J+ECG) y jugo + ECG encapsulado por emulsión doble (J+ECGED).

En la Figura 12 se observa el RAM (Figura 12a) y recuento de levaduras (Figura 12b). Para RAM se observó un aumento para los tres sistemas a lo largo del estudio. Para el día cero se observó que el J+ECGED presentó un recuento significativamente mayor respecto de J y J+ECG. Lo anterior, se puede explicar debido a que las emulsiones dobles tienen una carga microbiana inicial de $0,4 \times 10^3$ UFC/mL. El día 5, el jugo sin extracto presentó un RAM mayor respecto del jugo con extracto sin encapsular y encapsulado. No obstante, las diferencias fueron significativas solo con el jugo con extracto sin encapsular. Esto podría atribuirse a que el extracto sin encapsular adicionado al jugo actúa más rápidamente que el extracto encapsulado, el cual podría liberarse en forma controlada. Desde el día 10, el J+ECGED presentó un recuento significativamente menor respecto del jugo solo, pero no presentó diferencias con J+ECG. Todos los sistemas se mantuvieron dentro de los límites establecidos por el Reglamento Sanitario de los Alimentos (RSA) hasta el día 10. Desde el día 15 de almacenamiento, el J+ECGED mostró un recuento

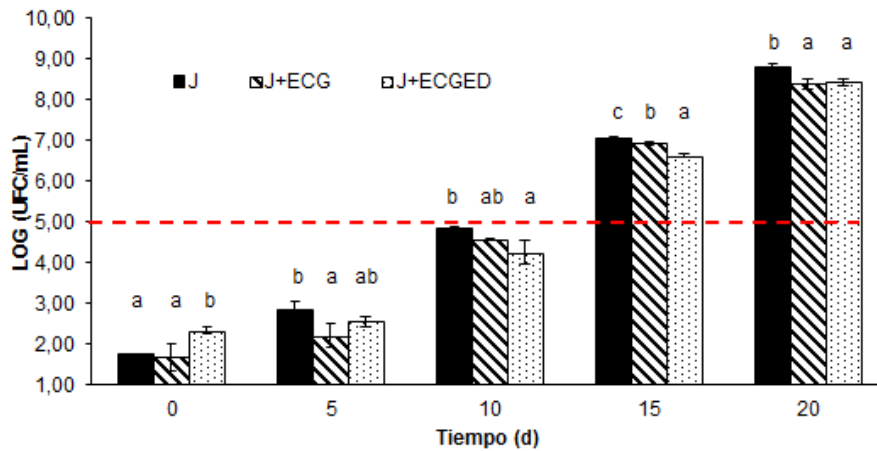
significativamente menor respecto de jugo (J) y J+ECG, lo que podría atribuirse a que la efectividad del ECG sin encapsular disminuye por las condiciones (pH, enzimas, proteínas, azúcares, etc.) al encontrarse en contacto directo con el jugo, mientras que la liberación del extracto encapsulado hacia el jugo podría aumentar desde ese día. No obstante, es importante considerar que los sistemas sobrepasan el límite establecido posterior a los 10 días (Figura 12a).

De acuerdo al RSA Art. 173, en el grupo de alimentos de “Zumos, néctares, bebidas a base de frutas y verduras no pasteurizados”, se indica como límite máximo 10^5 UFC/mL de RAM, por lo que hasta el día 10 los tres sistemas se encuentran dentro de los límites reglamentarios, sin embargo, el recuento del jugo sin extracto, estaría cercano al límite (DTO. N° 977/96, 1997).

En la Figura 12b se observa solo el recuento de levaduras, esto debido a que el crecimiento de mohos en el almacenamiento, desde el día 5, fue casi nulo en todos los sistemas.

Al igual que en el caso de RAM, solo posteriormente al día 10 el recuento de levaduras fue significativamente menor en el jugo con extracto sin encapsular y encapsulado respecto del jugo sin extracto, sin embargo, los límites son mayores a los límites por el RSA (DTO. N° 977/96, 1997). Si bien el RSA no indica límites para mohos y levaduras en el grupo de “Zumos, néctares, bebidas a base de frutas y verduras no pasteurizados”, en el grupo de “Frutas y verduras desecadas o deshidratadas”, se establece 10^3 UFC/mL como límite máximo de mohos y levaduras para cada uno.

a)



b)

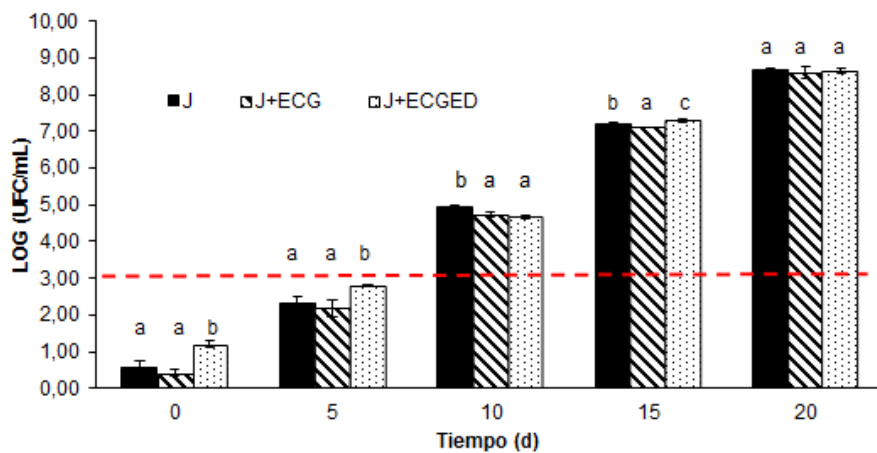


FIGURA 12. Recuento de microorganismos expresado como log (UFC/mL) en los días 0, 5, 10, 15, 20. a) Recuento de microorganismos aerobios mesófilos (RAM) en jugo de manzana (J), jugo de manzana con extracto de cáscara de granada a concentración 9 mg/mL (J+ECG), jugo de manzana con extracto de cáscara de granada a concentración 9 mg/mL encapsulado por emulsiones dobles (J+ECGED). b) Recuento de levaduras en jugo de manzana (J), jugo de manzana con extracto de cáscara de granada a concentración 9 mg/mL (J+ECG), jugo de manzana con extracto de cáscara de granada a concentración 9 mg/mL encapsulado por emulsiones dobles (J+ECGED).

En la Tabla 8 se muestra la velocidad específica de crecimiento microbiano, en la que se puede observar que la velocidad de crecimiento en RAM es significativamente menor entre los primeros 5 días para J+ECGED y J+ECG

con respecto al jugo solo. Entre los días 5 y 10, se observa una velocidad de crecimiento significativamente menor para J+ECGED con respecto a J y J+ECG, resultados que se condicen con el menor crecimiento significativo para RAM en el día 10 (Figura 12a). Por otra parte, para el caso del recuento de levaduras, existe una menor velocidad de crecimiento significativa entre los días 5 y 10 de J+ECGED con respecto al J+ECG y J.

TABLA 8. Actividad antimicrobiana de extracto sin encapsular y encapsulado en emulsión doble sobre el RAM y levaduras del jugo de manzana. Recuento de colonias (N) y velocidad específica de crecimiento (k).

Muestra	Tiempo (d)	RAM		Levaduras	
		N (UFC/mL)	k (d ⁻¹)	N (UFC/mL)	k (d ⁻¹)
J	0	5,6.E+01	-	5,6.E+01	-
	5	5,5.E+02	0,19±0,04 ^{Aa}	5,5.E+02	0,35±0,01 ^{Aa}
	10	7,1.E+04	0,43±0,03 ^{Ba}	7,1.E+04	0,53±0,04 ^{Bb}
	15	1,1.E+07	0,440±0,002 ^{Ba}	1,1.E+07	0,45±0,02 ^{Ba}
	20	4,3.E+08	0,36±0,01 ^{Ba}	4,3.E+08	0,29±0,02 ^{Aa}
J+ECG	0	5,7.E+01	-	5,7.E+01	-
	5	1,6.E+02	0,0661±0,0008 ^{Ab}	1,6.E+02	0,37±0,01 ^{Aa}
	10	3,7.E+04	0,479±0,004 ^{Ba}	7,1.E+04	0,48±0,02 ^{Bb}
	15	8,6.E+06	0,51±0,06 ^{Ba}	8,6.E+06	0,49±0,02 ^{Bab}
	20	2,5.E+08	0,29±0,01 ^{Ca}	2,5.E+08	0,27±0,02 ^{Ca}
J+ECGED	0	2,1.E+02	-	2,1.E+02	-
	5	3,7.E+02	0,05±0,01 ^{Ab}	3,7.E+02	0,32±0,02 ^{Aa}
	10	2,0.E+04	0,34±0,05 ^{Bb}	2,0.E+04	0,38±0,01 ^{Ba}
	15	4,3.E+06	0,48±0,06 ^{Ca}	4,3.E+06	0,53±0,02 ^{Cb}
	20	2,5.E+08	0,36±0,03 ^{Ba}	2,5.E+08	0,25±0,03 ^{Da}

J: jugo sin extracto ni emulsión. J+ECG: jugo adicionado con extracto sin encapsular en concentración 9mg/mL. J+ECGED: jugo adicionado con extracto a concentración 9 mg/mL encapsulado en emulsión doble.

Las letras (A-D) indican diferencias significativas para la misma muestra en los diferentes días ($p \leq 0,05$). Las letras (a-b) indican diferencias significativas entre las distintas muestras en un mismo día ($p \leq 0,05$).

Los resultados de este estudio indican que el ECG encapsulado en una emulsión doble, disminuye significativamente la velocidad de crecimiento de RAM y levaduras entre los días 5 y 10 durante almacenamiento en refrigeración (4 °C), en comparación con el jugo sin extracto y jugo con extracto sin encapsular.

Considerando los límites establecido por el RSA, para el caso de jugo de fruta no pasteurizado (que solo indica límite para RAM), el producto se encuentra dentro de la norma hasta los 10 días. Después de 10 días, las diferencias en los recuentos se mantienen, no obstante, los límites permitidos se exceden para todos los sistemas.

Con los antecedentes antes mencionados, se recomendaría disminuir la carga inicial de las emulsiones, para obtener resultados más significativos. Los jugos de frutas frescos comerciales sometidos solo a refrigeración como tecnología de conservación tienen una vida útil limitada de aproximadamente tres días. Por lo tanto, de acuerdo a los resultados se puede establecer que la adición de ECG encapsulado por emulsión doble permitiría aumentar la vida útil del jugo de manzana al menos en términos microbiológicos. Por lo que, la emulsión doble podría ser una protección propicia para el compuesto, resultando en una liberación controlada e indicando resultados favorables para ser usado como bacteriostático principalmente, y como fungistático, con algunas consideraciones, en jugo de manzana sin pasteurizar.

3.5. RESULTADOS PENDIENTES

PARÁMETROS CINÉTICOS LIBERACIÓN DE PUNICALAGINA

Para evaluar los parámetros cinéticos, se obtuvieron alícuotas de jugo los días 1, 2, 3, 5, 7, 9, 12, 14, 16, 19 y 20, el jugo fue filtrado a $0,22 \mu\text{m}$ y posteriormente medido por HPLC-DAD, sin embargo, debido a problemas con el equipo los resultados obtenidos no fueron concluyentes.

En la Figura 13 se observa la gráfica de porcentaje de liberación de punicalagina al jugo de manzana hasta el día 5 (96 horas), donde se logró liberar 1,87 % de la punicalagina total contenida en la emulsión (M^∞).

Se observa que los primeros días posee una velocidad de liberación bastante lenta lo cual se podría deber a que el compuesto no es soluble en aceite lo cual dificulta el paso (Pays, 2002). Sin embargo, como se explicó anteriormente los resultados obtenidos no fueron concluyentes debido a problemas con el equipo.

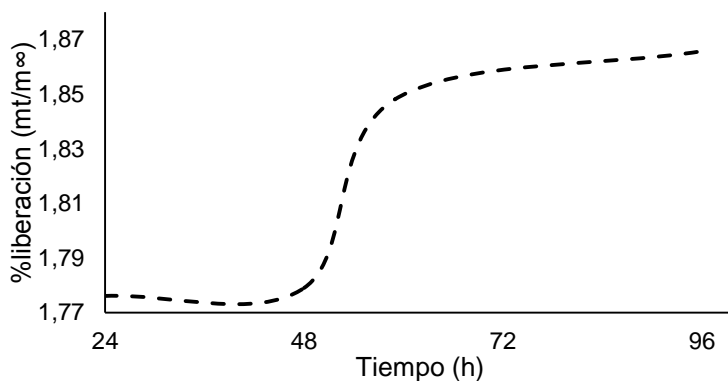


FIGURA 13. Gráfica de porcentaje de liberación de punicalagina en jugo de manzana no pasteurizado.

CONCLUSIONES

- Las condiciones óptimas para la encapsulación de extracto de granada por emulsiones dobles fueron: 550 bar de presión en la primera etapa, 300 bar en la segunda etapa y 5 pases en la segunda etapa, manteniendo fijo 2 pases en la primera etapa.
- La encapsulación de extracto de cáscara de granada por emulsiones dobles obtenida en condiciones óptimas se corroboró mediante microscopía confocal. La caracterización de la emulsión obtuvo un 57 % de eficiencia de encapsulación de punicalagina y tamaño de gota $D_{[4,3]}$ 0,48 μm .
- A menor temperatura (4 °C), la emulsión doble obtenida en condiciones óptimas, mostró mejor estabilidad física (evaluada por tamaño de gota) y estabilidad de punicalagina (evaluada como eficiencia de encapsulación) hasta el día 10 de almacenamiento.
- Con respecto al efecto antimicrobiano, se observó una disminución significativa en el recuento de RAM para el jugo adicionado con ECG encapsulado por emulsiones dobles, en relación al jugo en el almacenamiento.
- Para las levaduras, se observó un recuento menor en el día 10 del jugo adicionado con extracto de cáscara de granada encapsulado por emulsiones dobles con respecto al jugo solo.

- En ambos casos, hasta el día 10 se observó una velocidad de crecimiento menor del jugo adicionado con extracto encapsulado en emulsión doble, con respecto al jugo solo y jugo con extracto sin encapsular.
- El ECG encapsulado por emulsión doble presenta mejor comportamiento como bacteriostático que como fungistático.
- Finalmente, el extracto de cáscara de granada encapsulado en una emulsión doble, disminuye el recuento de microorganismos (aerobios mesófilos y levaduras) y la velocidad de crecimiento hasta los 10 días, lo cual concuerda con los datos de eficiencia de encapsulación y tamaño de gota.
- Se recomienda evaluar técnicas de tratamiento no término para las emulsiones dobles con objetivo de disminuir la carga microbiológica inicial ($0,4 \times 10^3$ UFC/mL).

INFORMACIÓN ADICIONAL

En el marco de las becas de “Estadías cortas de investigación Convocatoria 2019- 2020” que otorga la Universidad de Chile, realicé una estadía en la Universidad de Oviedo entre los meses de noviembre del 2019 a enero 2020 en el grupo de Emulsiones y Fenómenos Interfaciales de esa casa de estudio.

Realicé la encapsulación mediante emulsiones dobles de extracto de cáscara de granada realizado en el marco del proyecto Fondecyt 11160541, con las mismas proporciones de aceite y emulsificantes expuesta en este trabajo.

Para la realización de las emulsiones dobles se consideraron dos procesos, emulsificación directa con membrana de emulsificación y por agitación mecánica, para cada proceso se consideró la utilización de cinco tipos de aceite (naranja, ricino, soya, girasol, miglyol). Se midió eficiencia de encapsulación de punicalagina, tamaño de gota y distribución, inspección visual por microscopía, tanto para las emulsiones frescas como a los 20 días de almacenamiento a 30 °C. Además, se midió la estabilidad de las emulsiones mediante Turbiscan (Formulacion, France) por 20 días.

Actualmente, el artículo se encuentra en proceso de redacción.

BIBLIOGRAFÍA

- Aditya, N. P., Aditya, S., Yang, H.-J., Kim, H. W., Park, S. O., Lee, J., & Ko, S. (2015). Curcumin and catechin co-loaded water-in-oil-in-water emulsion and its beverage application. *Journal of Functional Foods*, 15, 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.03.013>
- Al-Zoreky, N. S. (2009). Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. *International Journal of Food Microbiology*, 134(3), 244–248. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.002>
- Amyrgialaki, E., Makris, D. P., Mauromoustakos, A., & Kefalas, P. (2014). Optimisation of the extraction of pomegranate (*Punica granatum*) husk phenolics using water/ethanol solvent systems and response surface methodology. *Industrial Crops and Products*, 59, 216–222. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.011>
- Anaya-Esparza, L. M., Velázquez-Estrada, R. M., Roig, A. X., García-Galindo, H. S., Sayago-Ayerdi, S. G., & Montalvo-González, E. (2017). Thermo-sonication: An alternative processing for fruit and vegetable juices. *Trends in Food Science & Technology*, 61, 26–37. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.11.020>
- Aneja, K. R., Dhiman, R., Aggarwal, N. K., & Aneja, A. (2014). Emerging Preservation Techniques for Controlling Spoilage and Pathogenic Microorganisms in Fruit Juices. *International Journal of Microbiology*, 2014, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2014/758942>
- Baysal, A. H. (2018). Short-Wave Ultraviolet Light Inactivation of Pathogens in Fruit Juices. En *Fruit Juices* (pp. 463–510). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802230-6.00024-2>
- Berizi, E., Hosseinzadeh, S., Shekarforoush, S. S., & Barbieri, G. (2018). Microbial, chemical, textural and sensory properties of coated rainbow trout by chitosan combined with pomegranate peel extract during frozen storage. *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 1004–1013. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.099>
- Bevilacqua, A., Corbo, M. R., Campaniello, D., D'Amato, D., Gallo, M., Speranza, B., & Sinigaglia, M. (2011). *Shelf life prolongation of fruit juices through essential oils and homogenization: A review*. 1157–1166.
- Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., & Escaleira, L. A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in

analytical chemistry. *Talanta*, 76(5), 965–977.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.019>

Çam, M., İçyer, N. C., & Erdoğan, F. (2014). Pomegranate peel phenolics: Microencapsulation, storage stability and potential ingredient for functional food development. *LWT - Food Science and Technology*, 55(1), 117–123.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.09.011>

Devatkal, S. K., Jaiswal, P., Jha, S. N., Bharadwaj, R., & Viswas, K. N. (2013). Antibacterial activity of aqueous extract of pomegranate peel against *Pseudomonas stutzeri* isolated from poultry meat. *Journal of Food Science and Technology*, 50(3), 555–560. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0351-y>

Dey, D., Debnath, S., Hazra, S., Ghosh, S., Ray, R., & Hazra, B. (2012). Pomegranate pericarp extract enhances the antibacterial activity of ciprofloxacin against extended-spectrum β -lactamase (ESBL) and metallo- β -lactamase (MBL) producing Gram-negative bacilli. *Food and Chemical Toxicology*, 50(12), 4302–4309. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.001>

DTO. N° 977/96. (1997). [Ministerio de Salud de la República de Chile]. *Reglamento sanitario de los alimentos. 13 de mayo de 1997.*

Eisinaite, V., Juraite, D., Schroën, K., & Leskauskaite, D. (2017). Food-grade double emulsions as effective fat replacers in meat systems. *Journal of Food Engineering*, 213, 54–59. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.05.022>

Elfalleh, W. (2012). Total phenolic contents and antioxidant activities of pomegranate peel, seed, leaf and flower. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(32). <https://doi.org/10.5897/JMPR11.995>

El-Nashi, H. B., Abdel Fattah, A. F. A. K., Abdel Rahman, N. R., & Abd El-Razik, M. M. (2015). Quality characteristics of beef sausage containing pomegranate peels during refrigerated storage. *Annals of Agricultural Sciences*, 60(2), 403–412. <https://doi.org/10.1016/j.aoas.2015.10.002>

Endo, E. H., Ueda-Nakamura, T., Nakamura, C. V., & Filho, B. P. D. (2012). Activity of Spray-dried Microparticles Containing Pomegranate Peel Extract against *Candida albicans*. *Molecules*, 17(12), 10094–10107. <https://doi.org/10.3390/molecules170910094>

Faridi Esfanjani, A., Jafari, S. M., & Assadpour, E. (2017). Preparation of a multiple emulsion based on pectin-whey protein complex for encapsulation of saffron extract nanodroplets. *Food Chemistry*, 221, 1962–1969. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.149>

Florence, A. T., & Whitehill, D. (1981). Some features of breakdown in water-in-oil-in-water multiple emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 79(1), 243–256. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(81\)90066-7](https://doi.org/10.1016/0021-9797(81)90066-7)

Foster, T. (2003). *Beverage quality and safety*. CRC Press.

Fuchs, M., Turchiuli, C., Bohin, M., Cuvelier, M. E., Ordonnaud, C., Peyrat-Maillard, M. N., & Dumoulin, E. (2006). Encapsulation of oil in powder using spray drying and fluidised bed agglomeration. *Journal of Food Engineering*, 75(1), 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.03.047>

Garti, N. (1997). Double emulsions—Scope, limitations and new achievements. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 123–124, 233–246. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(96\)03809-5](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(96)03809-5)

Glazer, I., Masaphy, S., Marciano, P., Bar-Ilan, I., Holland, D., Kerem, Z., & Amir, R. (2012). Partial Identification of Antifungal Compounds from *Punica granatum* Peel Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(19), 4841–4848. <https://doi.org/10.1021/jf300330y>

Gullon, B., Pintado, M. E., Pérez-Álvarez, J. A., & Viuda-Martos, M. (2016). Assessment of polyphenolic profile and antibacterial activity of pomegranate peel (*Punica granatum*) flour obtained from co-product of juice extraction. *Food Control*, 59, 94–98. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.05.025>

Hayrapetyan, H., Hazeleger, W. C., & Beumer, R. R. (2012). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by pomegranate (*Punica granatum*) peel extract in meat paté at different temperatures. *Food Control*, 23(1), 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.06.012>

Herrera, J. (2016). *Efecto bactericida de desinfectantes sobre cepas de E. coli y L. innocua en superficies de uso en la industria alimentaria* [Memoria para optar al título de Ingeniero en Alimentos.]. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.

Instituto Nacional de Normalización, Chile. NCh2659. Of 2002. Determinación de Microorganismos Aeróbios Mesófilos. Santiago, Chile: INN, 2002.

Instituto Nacional de Normalización, Chile. NCh2734. Of 2002. Determinación de Hongos y Levaduras. Santiago, Chile: INN, 2002.

Jauhar, S., Nor-Khaizura, M.-A.-R., Wan Ibadullah, W. Z., & Ismail-Fitry, M. (2019). *Review on different extraction methods of polyphenol compounds from pomegranate (punica granatum)*.

- Jiménez-Colmenero, F. (2013). Potential applications of multiple emulsions in the development of healthy and functional foods. *Food Research International*, 52(1), 64–74. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.040>
- Kaderides, K., Goula, A. M., & Adamopoulos, K. G. (2015). A process for turning pomegranate peels into a valuable food ingredient using ultrasound-assisted extraction and encapsulation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 31, 204–215. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.08.006>
- Kanatt, S. R., Chander, R., & Sharma, A. (2010). Antioxidant and antimicrobial activity of pomegranate peel extract improves the shelf life of chicken products. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(2), 216–222. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.02124.x>
- Kazemi, M., Karim, R., Mirhosseini, H., & Abdul Hamid, A. (2016). Optimization of pulsed ultrasound-assisted technique for extraction of phenolics from pomegranate peel of Malas variety: Punicalagin and hydroxybenzoic acids. *Food Chemistry*, 206, 156-166. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.017>
- Keller, S. E., Chirtel, S. J., Merker, R. I., Taylor, K. T., Tan, H. L., & Miller, A. J. (2004). Influence of Fruit Variety, Harvest Technique, Quality Sorting, and Storage on the Native Microflora of Unpasteurized Apple Cider. *Journal of Food Protection*, 67(10), 2240–2247. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.10.2240>
- Kharchoufi, S., Licciardello, F., Siracusa, L., Muratore, G., Hamdi, M., & Restuccia, C. (2018). Antimicrobial and antioxidant features of 'Gabsi' pomegranate peel extracts. *Industrial Crops and Products*, 111, 345–352. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.037>
- Kim, B.-K., Cho, A.-R., & Park, D.-J. (2016). Enhancing oral bioavailability using preparations of apigenin-loaded W/O/W emulsions: In vitro and in vivo evaluations. *Food Chemistry*, 206, 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.052>
- Lamba, H., Sathish, K., & Sabikhi, L. (2015). Double Emulsions: Emerging Delivery System for Plant Bioactives. *Food and Bioprocess Technology*, 8(4), 709–728. <https://doi.org/10.1007/s11947-014-1468-6>
- Leong, T. S. H., Zhou, M., Zhou, D., Ashokkumar, M., & Martin, G. J. O. (2018). The formation of double emulsions in skim milk using minimal food-grade emulsifiers – A comparison between ultrasonic and high pressure homogenisation efficiencies. *Journal of Food Engineering*, 219, 81–92. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.09.018>

Li, Y., Guo, C., Yang, J., Wei, J., Xu, J., & Cheng, S. (2006). Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chemistry*, 96(2), 254–260. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.02.033>

Lima Tribst, A. A., de Souza Sant'Ana, A., & de Massaguer, P. R. (2009). Review: Microbiological quality and safety of fruit juices—past, present and future perspectives. *Critical Reviews in Microbiology*, 35(4), 310–339. <https://doi.org/10.3109/10408410903241428>

Lobato-Calleros, C., Sosa-Pérez, A., Rodríguez-Tafoya, J., Sandoval-Castilla, O., Pérez-Alonso, C., & Vernon-Carter, E. J. (2008). Structural and textural characteristics of reduced-fat cheese-like products made from W1/O/W2 emulsions and skim milk. *LWT - Food Science and Technology*, 41(10), 1847–1856. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.01.006>

Lucera, A., Costa, C., Conte, A., & Del Nobile, M. A. (2012). Food applications of natural antimicrobial compounds. *Frontiers in Microbiology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00287>

McClements, D. J. (2005). *Food emulsions: Principles, practices, and techniques* (2nd ed). CRC Press.

Molva, C., & Baysal, A. H. (2015). Evaluation of bioactivity of pomegranate fruit extract against *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 3922 vegetative cells and spores in apple juice. *LWT - Food Science and Technology*, 62(2), 989–995. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.02.021>

Morsy, M. K., Mekawi, E., & Elsabagh, R. (2018). Impact of pomegranate peel nanoparticles on quality attributes of meatballs during refrigerated storage. *LWT*, 89, 489–495. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.11.022>

Muscholik, G., & Dickinson, E. (2017). Double Emulsions Relevant to Food Systems: Preparation, Stability, and Applications: Double emulsions in food.... *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(3), 532–555. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12261>

Nguyen, P., & Mittal, G. S. (2007). Inactivation of naturally occurring microorganisms in tomato juice using pulsed electric field (PEF) with and without antimicrobials. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 46(4), 360–365. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2006.07.010>

O'Regan, J., & Mulvihill, D. M. (2010). Sodium caseinate–maltodextrin conjugate stabilized double emulsions: Encapsulation and stability. *Food Research International*, 43(1), 224–231. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.031>

Pandey, A., & Negi, P. S. (2018). Use of Natural Preservatives for Shelf Life Extension of Fruit Juices. En *Fruit Juices* (pp. 571–605). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802230-6.00029-1>

Parra, R. (2010). *Revisión: Microencapsulación de Alimentos*. 2(63), 5669–5684.

Pays, K. (2002). Double emulsions: How does release occur? *Journal of Controlled Release*, 79(1–3), 193–205. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00535-1](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00535-1)

Prakash, W. V. (2012). *Studies on Design of Micro/Nano Emulsion Based Delivery System for Potential Nutraceuticals using dairy Based Ingredient*. National Dairy Research Institute (Deemed University).

Quattrucci, A., Ovidi, E., Tiezzi, A., Vinciguerra, V., & Balestra, G. M. (2013). Biological control of tomato bacterial speck using *Punica granatum* fruit peel extract. *Crop Protection*, 46, 18–22. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.12.008>

Raybaudi-Massilia, R. M., Mosqueda-Melgar, J., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2009). Control of Pathogenic and Spoilage Microorganisms in Fresh-cut Fruits and Fruit Juices by Traditional and Alternative Natural Antimicrobials. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8(3), 157–180. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2009.00076.x>

Reddy, M., Gupta, S., Jacob, M., Khan, S., & Ferreira, D. (2007). Antioxidant, Antimalarial and Antimicrobial Activities of Tannin-Rich Fractions, Ellagitannins and Phenolic Acids from *Punica granatum* L. *Planta Medica*, 73(5), 461–467. <https://doi.org/10.1055/s-2007-967167>

Robert, P., Vergara, C., Silva-Weiss, A., Osorio, F. A., Santander, R., Sáenz, C., & Giménez, B. (2020). Influence of gelation on the retention of purple cactus pear extract in microencapsulated double emulsions. *PLOS ONE*, 15(1), e0227866. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227866>

Robert, P., Zamorano, M., González, E., Silva-Weiss, A., Cofrades, S., & Giménez, B. (2019). Double emulsions with olive leaves extract as fat replacers in meat systems with high oxidative stability. *Food Research International*, 120, 904–912. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.12.014>

Rongai, D., Pulcini, P., Pesce, B., & Milano, F. (2017). Antifungal activity of pomegranate peel extract against fusarium wilt of tomato. *European Journal of Plant Pathology*, 147(1), 229–238. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0994-7>

Santhirasegaram, V., Razali, Z., & Somasundram, C. (2016). Safety improvement of fruit juices by novel thermal and nonthermal processing. En *Food Hygiene and Toxicology in Ready-to-Eat Foods* (pp. 209–223). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801916-0.00012-1>

Sapei, L., Naqvi, M. A., & Rousseau, D. (2012). Stability and release properties of double emulsions for food applications. *Food Hydrocolloids*, 27(2), 316–323. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.10.008>

Silva, W., Torres-Gatica, M. F., Oyarzun-Ampuero, F., Silva-Weiss, A., Robert, P., Cofrades, S., & Giménez, B. (2018). Double emulsions as potential fat replacers with gallic acid and quercetin nanoemulsions in the aqueous phases. *Food Chemistry*, 253, 71–78. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.128>

Singh, M., Jha, A., Kumar, A., Hettiarachchy, N., Rai, A. K., & Sharma, D. (2014). Influence of the solvents on the extraction of major phenolic compounds (punicalagin, ellagic acid and gallic acid) and their antioxidant activities in pomegranate aril. *Journal of Food Science and Technology*, 51(9), 2070-2077. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1267-0>

Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144.

Stanier, R. Y., Guerrero, R., & Villanueva, J. R. (2005). *Microbiología*. Reverté.

Tamnak, S., Mirhosseini, H., Tan, C. P., Tabatabaee Amid, B., Kazemi, M., & Hedayatnia, S. (2016). Encapsulation properties, release behavior and physicochemical characteristics of water-in-oil-in-water (W/O/W) emulsion stabilized with pectin–pea protein isolate conjugate and Tween 80. *Food Hydrocolloids*, 61, 599–608. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.06.023>

Tayel, A. A., El-Baz, A. F., Salem, M. F., & El-Hadary, M. H. (2009). Potential applications of pomegranate peel extract for the control of citrus green mould. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 116(6), 252–256. <https://doi.org/10.1007/BF03356318>

Tomadoni, B., Cassani, L., Ponce, A., Moreira, M. R., & Agüero, M. V. (2016). Optimization of ultrasound, vanillin and pomegranate extract treatment for shelf-stable unpasteurized strawberry juice. *LWT - Food Science and Technology*, 72, 475–484. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.05.024>

Tournas, V. H., Heeres, J., & Burgess, L. (2006). Moulds and yeasts in fruit salads and fruit juices. *Food Microbiology*, 23(7), 684–688. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.01.003>

Vargas, C. (2018). *Efectividad in vitro del ácido peracético frente a cepas de Escherichia coli y Listeria innocua* [Memoria para optar al título de Ingeniero en Alimentos]. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.

Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., Sendra, E., Sayas-Barberá, E., & Pérez-Álvarez, J. A. (2011). Antioxidant properties of pomegranate (*Punica granatum* L.) bagasses obtained as co-product in the juice extraction. *Food Research International*, 44(5), 1217–1223. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.057>

Wafa, B. A., Makni, M., Ammar, S., Khannous, L., Hassana, A. B., Bouaziz, M., Es-Safi, N. E., & Gdoura, R. (2017). Antimicrobial effect of the Tunisian Nana variety *Punica granatum* L. extracts against *Salmonella enterica* (serovars Kentucky and Enteritidis) isolated from chicken meat and phenolic composition of its peel extract. *International Journal of Food Microbiology*, 241, 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.007>

Wang, J., Shi, A., Agyei, D., & Wang, Q. (2017). Formulation of water-in-oil-in-water (W/O/W) emulsions containing trans-resveratrol. *RSC Advances*, 7(57), 35917–35927. <https://doi.org/10.1039/C7RA05945K>

Wang, Z. (2011). Extract of Phenolics From Pomegranate Peels. *The Open Food Science Journal*, 5(1), 17–25. <https://doi.org/10.2174/1874256401105010017>

Wu, J., Jahncke, M. L., Eifert, J. D., O'Keefe, S. F., & Welbaum, G. E. (2016). Pomegranate peel (*Punica granatum* L) extract and Chinese gall (*Galla chinensis*) extract inhibit *Vibrio parahaemolyticus* and *Listeria monocytogenes* on cooked shrimp and raw tuna. *Food Control*, 59, 695–699. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.06.050>

Yolmeh, M., & Jafari, S. M. (2017). Applications of Response Surface Methodology in the Food Industry Processes. *Food and Bioprocess Technology*, 10(3), 413–433. <https://doi.org/10.1007/s11947-016-1855-2>

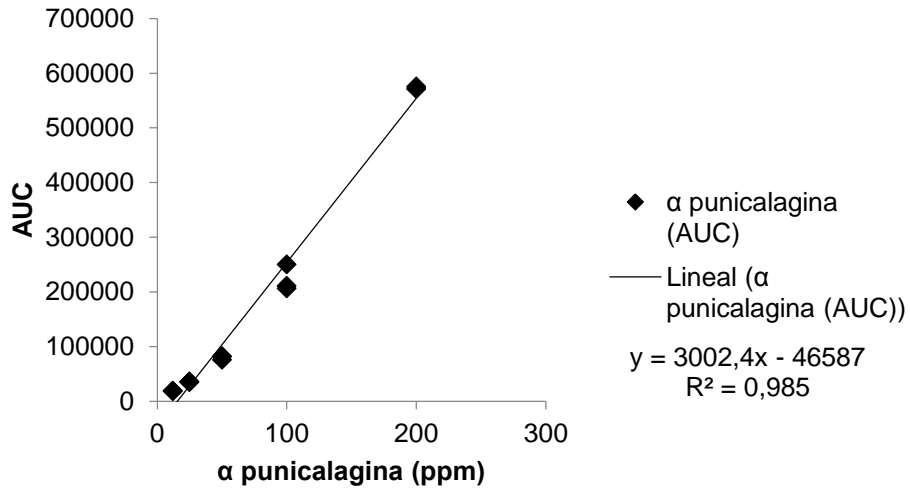
Zam, W. (2017). Fortification of dairy products by microcapsules of polyphenols extracted from pomegranate peels. En J. C. R. Ruiz & M. R. S. Campos (Eds.), *New Polymers for Encapsulation of Nutraceutical Compounds* (pp. 145–157). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119227625.ch7>

Zam, W., Bashour, G., Abdelwahed, W., & Khayata, W. (2014). Alginate-pomegranate peels' polyphenols beads: Effects of formulation parameters on loading efficiency. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 50(4), 741–748. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502014000400009>

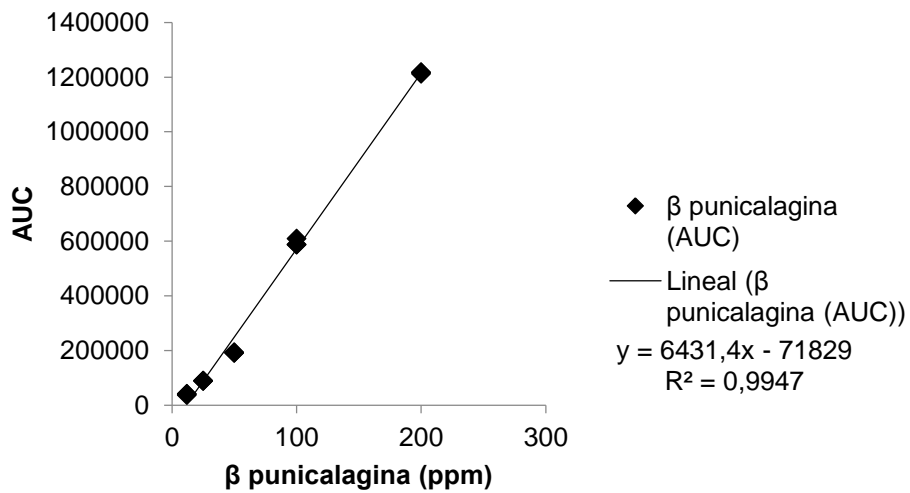
Zhang, Y., Wang, D., Lee, R., Henning, S. M., & Heber, D. (2009). Absence of Pomegranate Ellagitannins in the Majority of Commercial Pomegranate Extracts: Implications for Standardization and Quality Control. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(16), 7395–7400. <https://doi.org/10.1021/jf9010017>

ANEXOS

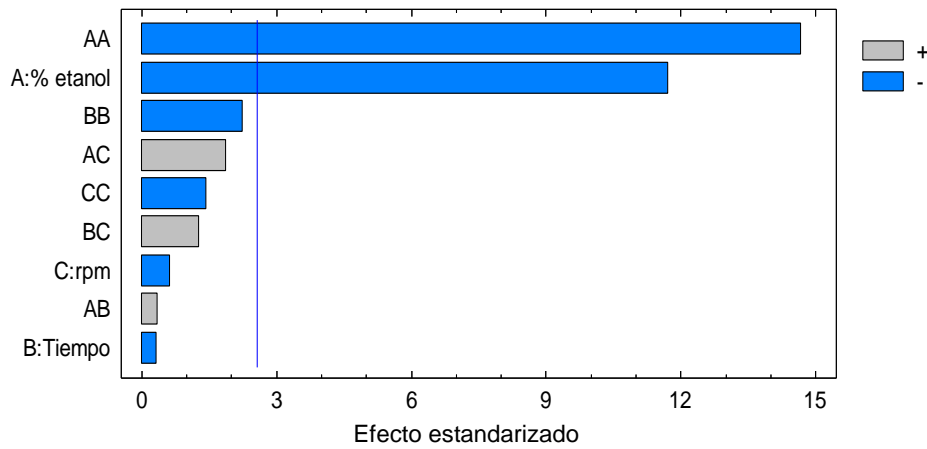
ANEXO 1. Curva de calibración de α punicalagina.



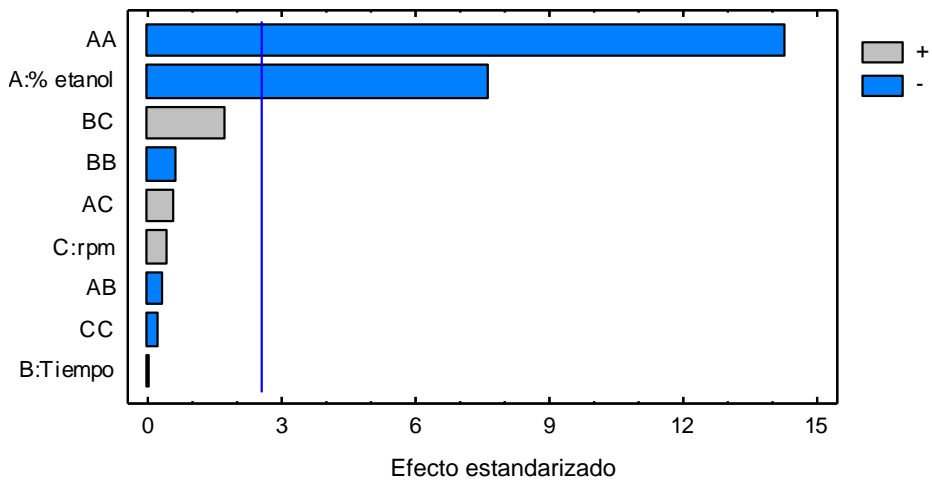
ANEXO 2. Curva de calibración de β punicalagina.



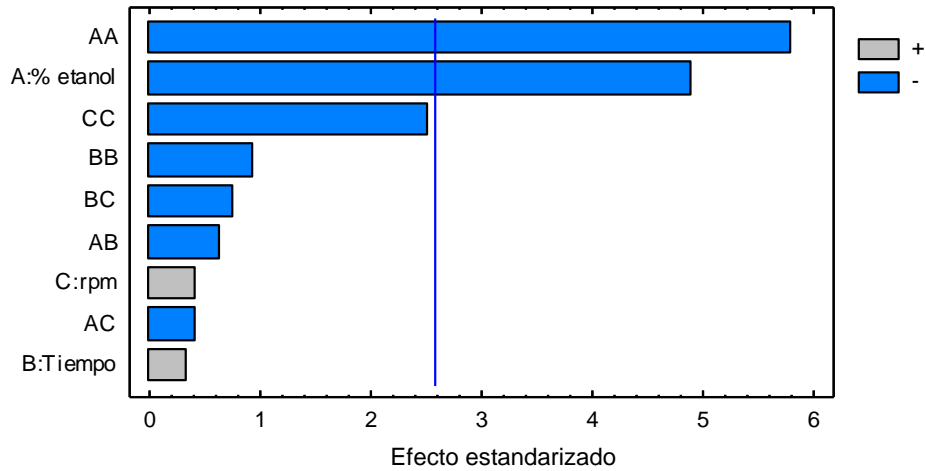
ANEXO 3. Diagrama de Pareto para la variable dependiente de contenido de polifenoles totales (CPT) para la optimización del ECG.



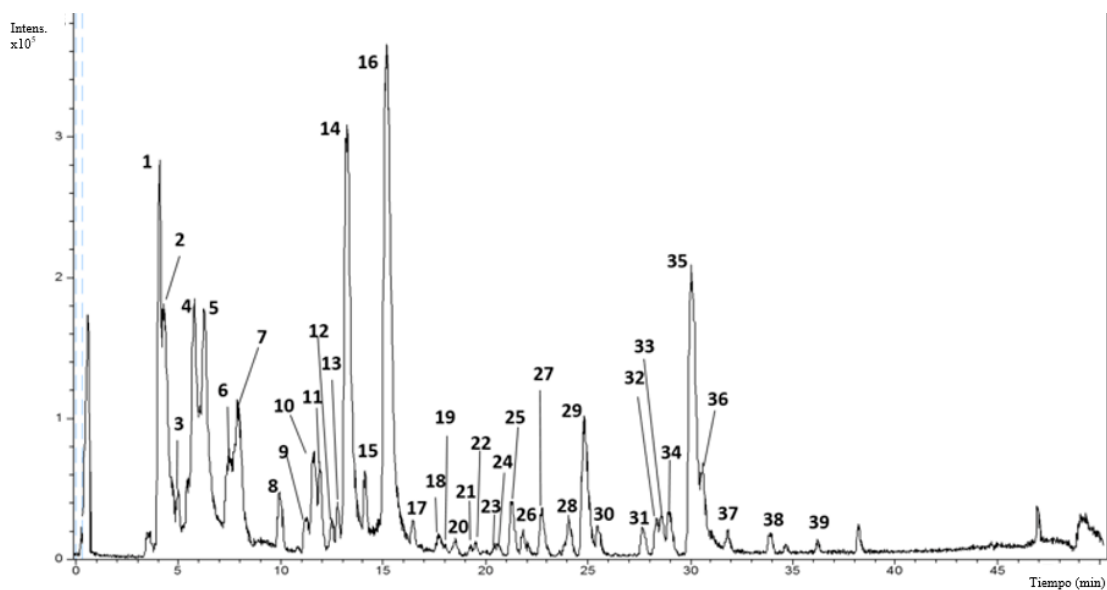
ANEXO 4. Diagrama de Pareto para la variable dependiente de contenido de punicalagina (P) para la optimización del ECG.



ANEXO 5. Diagrama de Pareto para la variable dependiente de actividad antimicrobiana medida como halo de inhibición en *S. aureus* (mm) para la optimización del ECG.

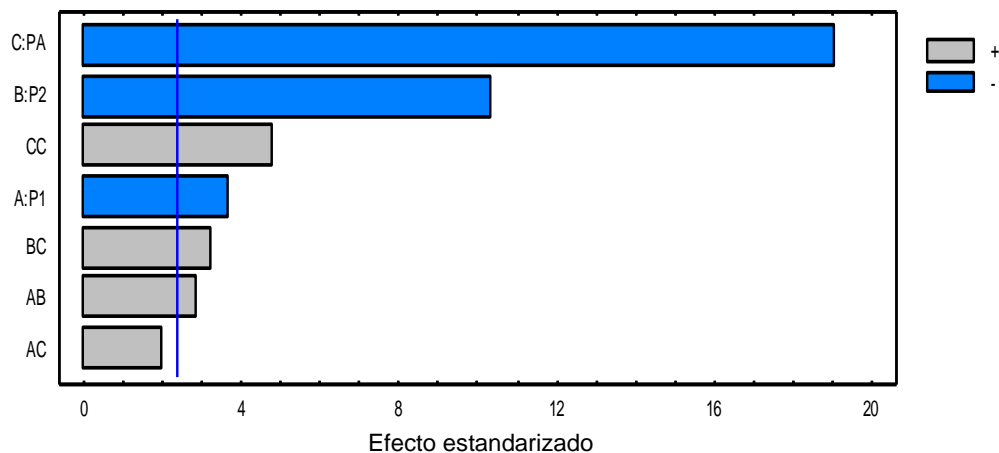


ANEXO 6. Perfil cromatográfico de compuestos polifenólicos de extracto de cáscara de granada por HPLC-DAD-ESI-TOF/MS.



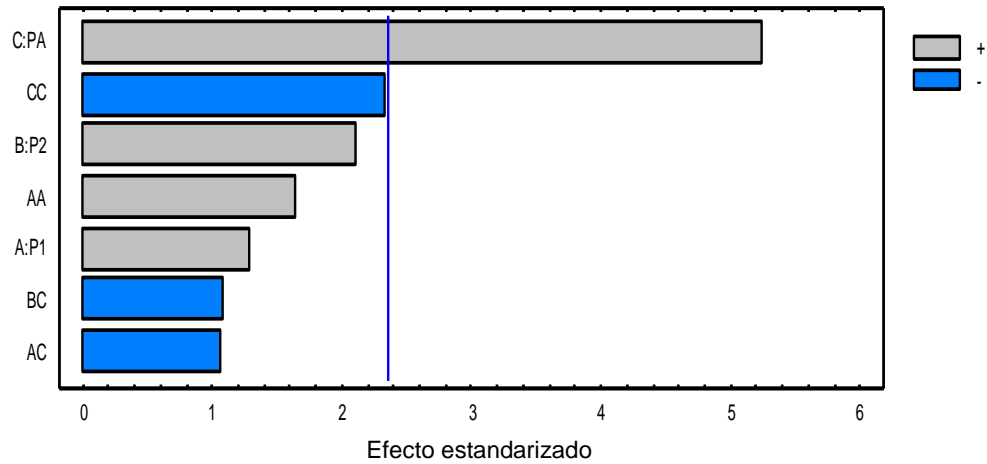
(1)azúcar, (2)azúcar, (3)azúcar, (4)isómero de ácido clorogénico, (5) isómero de ácido clorogénico 2, (6)ácido cítrico, (7) ácido isocítrico, (8) isómero de galoil hexosa, (9) isómero de galoil-glucósido 2, (10) punicalagina α , (11) ácido gálico, (12) isómero de galoil-glucósido 3, (13) isómero de catequina 1, (14) punicalagina β , (15) isómero de catequina 2, (16) punicalagina γ , (17) bilactona de ácido valónico, (18) corilagina, (19) punigluconina, (20) desconocido 1, (21) pentosa de ácido elágico, (22) desconocido 2, (23) desconocido 3, (24) desconocido 4, (25) galloil-HHDP-hexosa, (26) ácido carboxílico de brevifolina, (27) desconocido 5, (28) glucopiranosido de galato de metilo, (29) isómero de hexósido del ácido elágico 1, (30) desconocido 6, (31) desconocido 7, (32) pentosido de ácido elágico, (33) isómero de hexósido del ácido elágico 2, (34) ácido elágico desoxihex, (35) ácido elágico, (36) kaempferol 3-cumaroilglucósido, (37) glucósido de luteolina, (38) luteolina arabinosa, (39) luteolina.

ANEXO 7. Diagrama de Pareto para la variable dependiente de tamaño de gota expresado como diámetro volumétrico medio D[4.3].



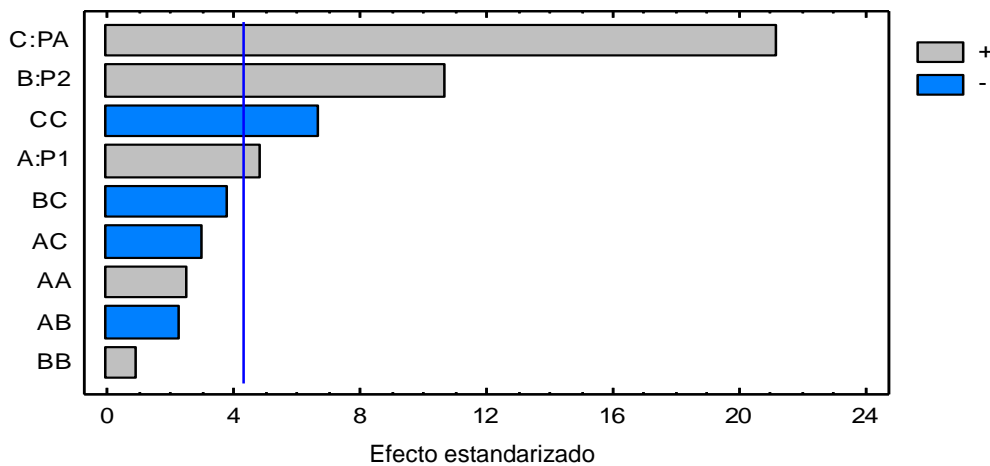
Donde P1: presión en la primera etapa de homogenización, P2: presión en la segunda etapa de homogenización, PA: número de pasos en la segunda etapa de homogenización.

ANEXO 8. Diagrama de Pareto para la variable dependiente de eficiencia de encapsulación de punicalagina EE %.



Donde P1: presión en la primera etapa de homogenización, P2: presión en la segunda etapa de homogenización, PA: número de pasos en la segunda etapa de homogenización.

ANEXO 9. Diagrama de Pareto para la optimización conjunta en base a la deseabilidad observada.



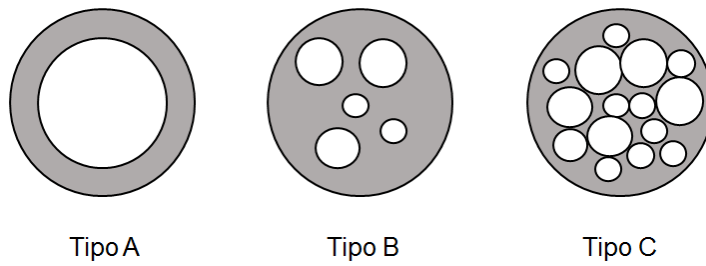
Donde P1: presión en la primera etapa de homogenización, P2: presión en la segunda etapa de homogenización, PA: número de pasos en la segunda etapa de homogenización.

ANEXO 10. Análisis de varianza de deseabilidad observada del modelo de optimización.

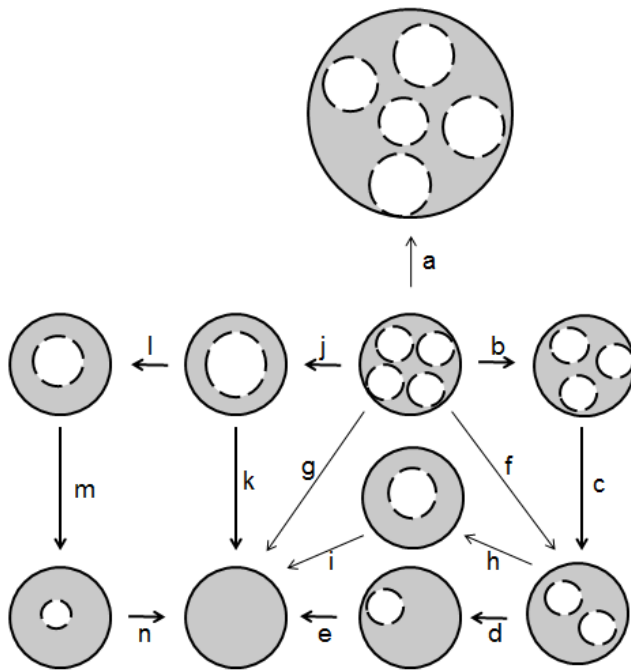
Fuente	Suma de cuadrados	Df	Cuadrado medio	F-Ratio	P-Value
A:P1	0,04	1	0,04	24	0,04
B:P2	0,2	1	0,2	115	0,009
C:PA	0,8	1	0,8	450	0,002
AA	0,01	1	0,01	7	0,1
AB	0,009	1	0,009	5	0,2
AC	0,02	1	0,02	9	0,09
BB	0,002	1	0,02	0,9	0,4
BC	0,03	1	0,03	15	0,06
CC	0,08	1	0,08	45	0,02
Regresión	1	9	0,1	23	0,002
Residual	0,03	5	0,006		
Carencia de ajuste	0,03	3	0,009	5	0,2
Error puro	0,004	2	0,002		
Total (corr.)	1	14			

P1: presión en la primera etapa. P2: presión en la segunda etapa. PA: número de pasos en la segunda etapa

ANEXO 11. Esquema de clasificación de tipos de emulsiones postulado por Florence & Whitehill, 1981.



ANEXO 12. Diagrama de vías de liberación de fase acuosa interna generado por Florence & Whitehill, 1981.



a: coalescencia con o sin fase interna. b, c, d, e: expulsión individual de fase acuosa interna. f: expulsión de más de una gota de fase acuosa. g: expulsión completa de las gotas de fase acuosa. h, i, j, k: unión de gotas de fase acuosa interna y posterior expulsión. l, m, n: difusión de fase acuosa interna generando gradual contracción.