

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**MICROENCAPSULACIÓN DE EXTRACTO DE CÁSCARA DE
GRANADA POR SECADO POR ATOMIZACIÓN Y SU EFECTO
EN LA ESTABILIDAD MICROBIOLÓGICA DE JUGO DE
FRUTA NO PASTEURIZADO.**

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar el grado de
Magister en Alimentos, mención en Gestión, Calidad e Inocuidad**

ELIDA ROCIO COCA MÁLAGA

Directora de Tesis: Dra. Paula García Concha

Co-Directora: Dra. Paz Robert Canales

Santiago-Chile

Enero 2021

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 presentada por el candidato

ELIDA ROCIO COCA MALAGA

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Alimentos, mención Gestión, Calidad e Inocuidad, en el examen público rendido el día

Director de Tesis:

Dra. Paula García Concha _____

Co-director de Tesis:

Dra. Paz Robert Canales _____

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dra. Cielo Char _____

Dra. Alicia Rodríguez _____

Dr. Cristian Tapia _____

TABLA DE CONTENIDOS

INTRODUCCION	9
1.1 Microorganismos implicados en el deterioro de jugos de fruta	11
1.2 Tecnologías para prevenir el deterioro microbiológico de jugos de fruta.....	12
1.3. Extracto de cáscara de granada como antimicrobiano natural.	14
1.4 Microencapsulación.....	17
1.5 Métodos de microencapsulación.	18
1.6 Agentes encapsulantes.....	20
1.7 Microencapsulación de extracto de cáscara de granada.	22
1.8. Hipótesis	25
1.9. Objetivos	25
MATERIALES Y METODOS	26
2.1. Materiales	26
2.2. Métodos	26
2.2.1. Elaboración de extracto de cáscara de granada	26
2.2.1.1. Preparación del ECG	26
2.2.1.2. Caracterización del ECG	27
2.2.2. Encapsulación de ECG	28
2.2.2.1. Diseño experimental para la elaboración de micropartículas de ECG con inulina (ECG-IN)	28
2.2.2.2. Preparación de las micropartículas de ECG con inulina (ECG-IN).	28
2.2.2.3. Preparación de micropartículas de ECG con mezcla de inulina-alginato de sodio y mezcla de inulina-carragenina.....	29
2.2.3. Caracterización de las micropartículas de ECG obtenidas bajo condiciones óptimas	30
2.2.3.1 Actividad de agua	30
2.2.3.2 Contenido de humedad	30
2.2.3.3 Contenido total de Punicalagina	30
2.2.3.4 Contenido superficial de Punicalagina	30
2.2.3.5 Eficiencia de encapsulación EE.....	31
2.2.3.6 Análisis cromatográfico	31

2.2.3.7 Morfología de las micropartículas	31
2.2.3.8 Tamaño de partícula.....	31
2.2.4. Estabilidad microbiológica de un jugo de manzana sin pasteurizar adicionado con ECG encapsulado y ECG no encapsulado	31
2.2.4.1. Preparación del jugo de manzana	31
2.2.4.2 Recuento inicial de la microbiota del jugo	32
2.2.4.3. Determinación de la concentración de ECG para adicionar al jugo de manzana	32
2.2.4.4. Estabilidad microbiológica de jugo de manzana con ECG encapsulado y ECG no encapsulado.....	33
2.2.5. Análisis estadístico	33
RESULTADOS Y DISCUSION	34
3.1. Caracterización del ECG.	34
3.2. Microencapsulación de ECG.....	35
3.2.1 Microencapsulación de ECG-IN.....	35
3.3. Caracterización de las micropartículas de ECG obtenidas bajo condiciones óptimas	39
3.4 Estudio de estabilidad microbiológica del jugo de manzana adicionado de ECG encapsulado y ECG no encapsulado.....	46
CONCLUSIONES	52
BIBLIOGRAFIA	53
ANEXOS	65
Anexo 1. Curva de calibración utilizada para caracterizar el contenido de polifenoles totales en el ECG.	65
Anexo 2. Curva de calibración utilizada para cuantificar el contenido total de PG.	65
Anexo 3. Perfil cromatográfico de compuestos polifenólicos de extracto de cáscara de granada por HPLC-DAD	66
Anexo 4. Optimización sistema de micropartículas ECG-IN	67

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Estudios sobre aplicación de extracto de cáscara de granada como antimicrobiano en alimentos.	17
Tabla 2. Estudios sobre microencapsulación de extracto de cáscara de granada.....	23
Tabla 3. Variables independientes y niveles en el diseño composito central más punto axial para la encapsulación del sistema ECG-IN.....	28
Tabla 4. Caracterización del extracto de cáscara de granada.....	35
Tabla 5. Diseño experimental y eficiencia de encapsulación para la microencapsulación de ECG con inulina por secado por atomización.....	36
Tabla 6. Características físicas y químicas de los sistemas de micropartículas (ECG-IN, ECG-(IN+AS ₁), ECG-(IN+AS ₂), ECG-(IN+CR ₁), ECG-(IN+CR ₂)).	41
Tabla 7. Recuentos obtenidos del ensayo de determinación de ECG para adicionar en el jugo de manaza.....	46
Tabla 8. Análisis de varianza para la variable respuesta Eficiencia de Encapsulación del sistema de micropartículas ECG-IN.....	67

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de la punicalagina (Akhtar et al., 2015).	15
Figura 2. Morfología de una micropartícula. (A) Microcápsula. (B) Microesfera (Paulo & Santos, 2017).	18
Figura 3. Diagrama de Pareto para la EE de PG del sistema de micropartículas ECG-IN	37
Figura 4. Gráfico de Superficie Respuesta para la EE de PG del sistema de micropartículas ECG-IN.	38
Figura 5. Microfotografías SEM de las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas para los sistemas ECG-IN (A), ECG-(IN+AS ₁) (B), ECG-(IN+AS ₂) (C), ECG-(IN+CR ₁) (D), ECG-(IN+CR ₂) (E) (x 10 000).	45
Figura 6. Recuento de microorganismos expresado como log (UFC/mL) en los días 0, 3, 6, 9, 12 y 15.....	48

LISTA DE SIMBOLOS, ABREVIATURAS O NOMENCLATURA

AS: alginato de sodio

CMI: concentración mínima inhibitoria

CR: carragenina

ECG: extracto de cáscara de granada

EE: eficiencia de encapsulación

IN: inulina

MSR: metodología de superficie respuesta

PG: punicalagina

RAM: recuento de aerobios mesófilos

TSA: agar soya triptona

TSB: medio soya tripticaseína

RESUMEN

Actualmente, los jugos de fruta sin pasteurizar tienen mayor demanda por parte de los consumidores. Sin embargo, su vida útil es limitada, debido a la acción de microorganismos de deterioro como hongos, levaduras y algunas bacterias. Para mejorar su estabilidad microbiológica se han utilizado algunos métodos físicos y químicos, no obstante, el interés de los consumidores por el uso de antimicrobianos naturales está aumentando. La cáscara de granada es un residuo agroindustrial que contiene diversos compuestos bioactivos, destacando la punicalagina a la cual se le han atribuido propiedades antimicrobianas. Sin embargo, la adición de extracto de cáscara de granada (ECG) a un jugo podría generar un sabor astringente, y la interacción de la punicalagina con otros componentes del jugo podrían inhibir su efecto. En este contexto, la encapsulación permitiría enmascarar el sabor, proteger los compuestos bioactivos y liberarlos en forma controlada. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de ECG encapsulado sobre la estabilidad microbiológica de un jugo de manzana no pasteurizado. La encapsulación del ECG se realizó mediante secado por atomización utilizando inulina (IN), mezclas inulina-alginato de sodio (IN-AS) e inulina-carragenina (IN-CR) como agentes encapsulantes, obteniéndose cinco sistemas: ECG-IN; ECG-(IN+AS₁); ECG-(IN+AS₂); ECG-(IN+CR₁) y ECG-(IN+CR₂). La EE presentó diferencias significativas entre los sistemas de micropartículas, obteniéndose el mayor y menor valor para ECG-IN (94%) y ECG-AS₁ (87%), respectivamente. No obstante, todos los sistemas, presentaron una alta EE (>87%). Las micropartículas presentaron una baja a_w (<0,2), humedad (<3,6%) y una morfología externa similar entre ellas. Por lo tanto, se obtuvieron micropartículas con características similares al encapsular el ECG con diferentes agentes encapsulantes o mezclas de estos. La adición de micropartículas de ECG-(IN+CR₁) y ECG-(IN+CR₂), permitió aumentar la estabilidad microbiológica del jugo de manzana no pasteurizado, disminuyendo el recuento de aerobios mesófilos. No se observó efecto del ECG sobre el recuento de hongos y levaduras.

INTRODUCCION

La demanda de jugos no pasteurizados ha aumentado en los últimos años debido a la preferencia de los consumidores por productos más nutritivos y con menos aditivos químicos (Mosqueda-Melgar et al., 2012; Pandey & Negi, 2018). Sin embargo, debido a su pH ácido, su composición y la falta de algún tratamiento de conservación, estos jugos son más propensos al deterioro por la acción de microorganismos propios del alimento (microbiota), tales como, hongos, levaduras y algunas bacterias (Martínez-Gonzales & Catillo, 2016). Este deterioro, puede afectar la inocuidad, características sensoriales, propiedades nutricionales y disminuir la vida útil del producto (Bevilacqua et al., 2011; Aneja et al., 2014a).

La estabilidad microbiológica de los jugos se ha controlado mediante diversos tratamientos físicos y químicos (Kharchoufi et al., 2018). No obstante, algunas de estas tecnologías pueden afectar las propiedades nutricionales y sensoriales del jugo, son de elevado costo o no son bien percibidas por los consumidores (Lima et al., 2009; Rupasinghe & Yu, 2012). Actualmente existe un creciente interés en la búsqueda de nuevos métodos para la preservación de alimentos, dentro de los cuales destaca el uso de preservantes naturales obtenidos de desechos agroindustriales, como la cáscara de granada (Tomadoni et al., 2015).

La granada (*Punica granatum* L) es una fruta originaria de Asia Central. Su cultivo se ha extendido a distintos países, incluidos algunos en Sudamérica, entre ellos, Chile (Kharchoufi et al., 2018). La cáscara de granada representa el 50% del peso del fruto y es un residuo agroindustrial sin valor comercial. Sin embargo, posee diferentes

compuestos bioactivos, siendo la punicalagina el compuesto mayoritario, al cual se le han atribuido mayormente los efectos antimicrobianos (Cam & Hisil, 2010; Viuda-Martos et al., 2010).

El extracto de cáscara de granada (ECG) ha reportado actividad antimicrobiana principalmente en estudios *in vitro* sobre microorganismos patógenos (Reddy et al., 2007; Al-Zoreky, 2009; Tayel et al., 2009; Dey et al., 2012; Endo et al., 2012; Glazer et al., 2012; Hayrapetyan et al., 2012; Malviya et al., 2014; Molva & Basal, 2015; Gullon et al., 2016; Wu et al., 2016; Rongai et al., 2017; Wafa et al., 2017). Menos estudios se han realizado en alimentos, los cuales se han enfocado en alimentos de tipo cárnico. (Al-Zoreky, 2009; Kanatt et al., 2010; Hayrapetyan et al., 2012; Devatkal et al., 2013; Quattrucci et al., 2013; Wu et al., 2016; Wafa et al., 2017; Berizi et al., 2018). La adición de ECG como antimicrobiano natural al jugo podría generar algunos inconvenientes, como otorgar un sabor astringente (Akhtar et al., 2015), y la interacción de la punicalagina con otros componentes de la matriz alimentaria podría disminuir su efectividad como antimicrobiano. En este contexto, el uso de la tecnología de encapsulación se presenta como una herramienta para enmascarar la astringencia, proteger el compuesto activo y liberarlo en forma controlada (De Vos et al., 2010; Dias et al., 2017).

De acuerdo a los antecedentes, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del ECG encapsulado con diferentes agentes encapsulantes mediante secado por atomización, sobre la estabilidad microbiológica de jugo de manzana no pasteurizado.

1.1 Microorganismos implicados en el deterioro de jugos de fruta

Los jugos de fruta son alimentos con alta actividad de agua que contienen azúcares, ácidos orgánicos, vitaminas y otros nutrientes que favorecen el crecimiento microbiano, donde la pérdida de calidad puede ocurrir por causas enzimáticas, químicas, físicas y microbiológicas. El principal deterioro de los jugos de fruta no pasteurizados se atribuye a microorganismos pertenecientes a la microbiota del jugo (microorganismos de deterioro), como hongos y levaduras, los cuales pueden reducir la calidad y valor nutricional del producto, haciéndolo no apto para el consumo y disminuyendo su vida útil (aproximadamente 3 días en refrigeración) (Raybaudi-Massilia et al., 2009; Aneja et al., 2014b). También es posible considerar microorganismos patógenos causantes de posibles enfermedades en los consumidores. Existen tres grupos principales de microorganismos relacionados al deterioro de jugos de frutas no pasteurizados: hongos, levaduras y bacterias.

Hongos: Gran parte de los hongos son microorganismos aeróbicos, tolerantes de bajo pH y altas concentraciones de azúcar. Pueden producir olores desagradables y formación de estela micelar en jugos. *Penicillium spp.*, *Aspergillus spp.*, *Eurotium spp.*, *Alternaria spp.*, *Cladosporium spp.*, *Paecilomyces spp.*, y *Botrytis spp.* son algunos de los géneros involucrados en el deterioro de los jugos (Raybaudi-Massilia et al., 2009; Aneja et al., 2014a).

Levaduras: Estos microorganismos son capaces de desarrollarse en condiciones de pH bajo, alto contenido de azúcares y temperaturas de refrigeración. El deterioro causado por levaduras puede reducir la calidad organoléptica, ya que genera turbidez, producción de CO₂, olores desagradables y cambios de color. *Candida maltosa*, *Pichia*

anómala, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* son las especies que se encuentran principalmente relacionadas en el deterioro de jugos de fruta (Tournas et al., 2006; Raybaudi-Massilia et al., 2009; Aneja et al., 2014a;). Algunas especies como *Zygosaccharomyces bailii*, *Z. rouxii*, *Candida krusei*, *Saccharomyces bisporus* *Schizosaccharomyces pombe* y *Pichia membranaefaciens* se han reportado como resistentes a los preservantes usados habitualmente (Lima et al., 2009).

Bacterias: las bacterias ácido lácticas y las acetobacterias son la principal causa de descomposición en jugos frescos no pasteurizados, debido a que pueden producir metabolitos como ácido acético y fórmico, etanol y dióxido de carbono alterando el sabor del jugo (Lima et al., 2009). Géneros como *Acetobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Propionibacterium*, *Pseudomonas* y *Zymomonas* se han reportado como microorganismos de descomposición de jugos (Raybaudi-Massilia et al., 2009; Sospedra et al., 2012; Aneja et al., 2014a). Específicamente, *Streptomyces griseus*, ha sido frecuentemente aislada de jugo de manzana (Lima et al., 2009; Aneja et al., 2014a). En los últimos años se ha incrementado la preocupación por la bacteria no patógena *Alicyclobacillus*. Esta bacteria es termoacidófila y formadora de esporas capaces de resistir el proceso de pasteurización de jugos (Witthuhn et al., 2007).

1.2 Tecnologías para prevenir el deterioro microbiológico de jugos de fruta

Para controlar el deterioro microbiológico y aumentar la vida útil de jugos se han aplicado diversos tratamientos, sin embargo, el problema aún no ha sido completamente resuelto. El tratamiento térmico de pasteurización es la tecnología más

común, pero puede producir algunos efectos indeseables en las propiedades organolépticas, nutricionales y fisicoquímicas del jugo (Rupasinghe & Yu, 2012). Estos efectos negativos han motivado gran interés en el desarrollo de nuevas tecnologías no térmicas menos invasivas, como por ejemplo altas presiones, pulsos eléctricos (Santhirasegaram et al., 2016), luz ultravioleta (Baysal, 2018) y termosonicación (Anaya-Esparza et al., 2017), entre otros (Mosqueda-Melgar et al., 2012). No obstante, algunas de estas tecnologías necesitan de alta inversión para la compra de equipamientos, lo que podría encarecer el producto. Algunos preservantes químicos sintéticos como el benzoato de sodio y el sorbato de potasio, también han sido utilizados para prevenir el proceso de deterioro de jugos, pero los consumidores perciben este tipo de aditivos como potencialmente nocivos para la salud (Pandey & Negi, 2018).

En los últimos años, la demanda por alimentos frescos, nutritivos y con preservantes naturales ha aumentado (Razzaghi-Abyaneh & Rai, 2013). Las propiedades antimicrobianas de extractos de plantas y hierbas han sido reconocidos durante siglos (Razzaghi-Abyaneh & Rai, 2013). Numerosos estudios han reportado actividad antimicrobiana de bacteriocinas, aceites esenciales de hierbas, especias, compuestos fenólicos y ácidos orgánicos en jugos de fruta (Raybaudi-Massilia et al., 2006; Tserennadmid et al., 2011; Mosqueda-Melgar et al., 2012; Aneja et al., 2014a; Tyagi et al., 2014; Tomadoni et al., 2015; Pandey & Negi, 2018). Sin embargo, estos estudios se han enfocado en evaluar la actividad antimicrobiana de estos extractos sobre bacterias patógenas. Sin embargo, pocos estudios han reportado actividad antimicrobiana en microorganismos de deterioro (hongos y levaduras) en jugos de frutas (Nguyen & Mittal, 2007).

1.3. Extracto de cáscara de granada como antimicrobiano natural

El fruto de la granada (*Punica granatum* L.) pertenece a la familia Punicaceae y es originaria de Asia Central. Su cultivo se ha extendido a través del Mediterráneo, China, India, Sudáfrica y América (Kharchoufi et al., 2018) incluyendo Chile, donde la variedad Wonderful es la más cultivada (Sepúlveda et al., 2010) y se consume principalmente como fruta fresca y en jugo.

El interés en el fruto de la granada ha aumentado en los últimos años debido a sus efectos benéficos en la salud, atribuidos al potencial antioxidante de sus componentes, principalmente taninos hidrolizables y antocianinas entre otros (Molva & Baysal, 2015). Sin embargo, estas propiedades no se limitan a la parte comestible de la fruta, sino también a los desechos generados durante el procesamiento del fruto (cáscara, semillas, flores, corteza y brotes), con cantidades de compuestos bioactivos aún mayores en comparación al fruto comestible (Akhtar et al., 2015). Así, durante la última década, ha incrementado el interés en los desechos provenientes de la industria alimentaria, con el fin de reducir el impacto ambiental que provocan y para su potencial uso en el desarrollo de productos con valor agregado (Goula & Lazarides, 2015; Rochelle et al., 2016).

La cáscara de granada, también llamada pericarpio o corteza, representa aproximadamente el 50% del peso del fruto y es considerada un residuo agroindustrial sin valor comercial (Viuda-Martos et al., 2010). Sin embargo, constituye una fuente importante de compuestos bioactivos como ácidos fenólicos, flavonoides, taninos hidrolizables y proantocianidinas, entre otros. Entre los taninos hidrolizables destacan los elagitaninos, como la punicalagina, punicalina, ácido elágico y ácido galágico (Fischer et al 2011; Viuda-Martos et al., 2011; Kharchoufi et al., 2018). La

punicalagina ($C_{48}H_{28}O_{30}$) (Figura 1) es el compuesto mayoritario de la cáscara de granada, es un compuesto exclusivo de este fruto y se caracteriza por su alto peso molecular (PM: 1108) y su solubilidad en agua (Çam & Hişil, 2010).

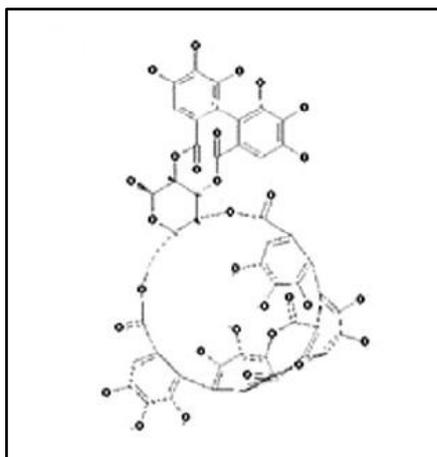


Figura 1. Estructura química de la punicalagina (Akhtar et al., 2015).

La actividad antimicrobiana (antibacteriana y antifúngica) del ECG se relacionaría con el alto contenido de compuestos fenólicos, particularmente punicalagina y ácido elágico (Singh et al., 2019). Estos compuestos junto a otros presentes en el ECG ejercerían un efecto sinérgico frente a diferentes microorganismos (Reddy et al., 2007; Glazer et al., 2012; Kharchoufi et al., 2018; Singh et al., 2019).

El mecanismo de inhibición de los polifenoles en general, se ha asociado a la interacción con las proteínas de membrana de las células bacterianas (Tanveer et al., 2014; Akhtar et al., 2015). Esta interacción de los polifenoles con los grupos sulfhidrilo (-SH) de las proteínas microbianas genera un transporte reducido de sustratos dentro de la célula y un mal funcionamiento de las enzimas (Tanveer et al., 2015).

La actividad antimicrobiana del ECG se ha estudiado principalmente *in vitro* sobre microorganismos patógenos (Al-Zoreky, 2009; Dahham et al., 2010; Khan & Haneef,

2011; Negi, 2012; Agourram et al., 2013; Gyawali e Ibrahim, 2014; Akhtar et al., 2015), mientras que otros estudios en alimentos, se han enfocado en productos cárnicos (Tabla 1) (Al- Zoreky, 2009; Kanatt et al., 2010; Hayrapetyan et al, 2012; Devatkal et al., 2013; Quattrucci et al., 2013; Wu et al., 2016; Wafa et al., 2017; Berizi 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.

Una vez que los compuestos fenólicos se extraen de las cáscaras de granada (ECG), son susceptibles a degradación por condiciones ambientales (luz, oxígeno, humedad y temperatura). Además, el ECG posee un sabor astringente que podría afectar las características organolépticas del jugo. Por otra parte, la punicalagina es soluble en agua y por lo tanto, podría reaccionar con otros componentes presentes en el jugo como, proteínas o polisacáridos, disminuyendo su disponibilidad y afectando su eficiencia. Las condiciones encontradas en el jugo (pH, enzimas y otros) también podrían afectar a los componentes de ECG (McClements, 2012). En este contexto, la aplicación de la tecnología de microencapsulación permitiría enmascarar el sabor astringente del extracto, proteger el extracto (punicalagina) y liberarlo en forma controlada en un jugo de fruta.

Tabla 1. Estudios sobre aplicación de extracto de cáscara de granada como antimicrobiano en alimentos.

Tipo extracto	Alimento	Microrganismo	Referencia
Extracto metanólico	pescado	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Yersinia enterocolitica</i>	Al-Zoreky, N.S. 2009
Extracto acuoso	pollo	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i>	Kanatt et al., 2010
Extracto metanólico	paté de carne	<i>Listeria monocytogenes</i>	Hayrapetyan et al., 2012
Extracto acuoso	carne de pollo	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Devatkal et al., 2013
Extracto metanólico	tomate	<i>Pseudomonas syringae</i>	Quattrucci et al., 2013
Extracto metanólico	camarones y atún cocidos	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> y <i>Listeria monocytogenes</i>	Wu et al., 2016
Extracto etanólico	carne de pollo	<i>Salmonella enterica</i> (serotipo Kentucky y Enteritidis)	Wafa et al., 2017
Extracto metanólico combinado con quitosano	trucha arco iris	bacterias psicrófilas, ácido lácticas y hongos	Berizi et al., 2018

1.4 Microencapsulación

La microencapsulación es una técnica mediante la cual compuestos activos, sólidos, líquidos o gaseosos se introducen en una matriz o sistema pared de naturaleza polimérica con el fin de proteger los activos de las condiciones del medioambiente (luz, temperatura, humedad y oxígeno, entre otros), de su interacción con otros componentes del alimento o bien para la liberación controlada de los compuestos

activos, en un lugar y/o velocidad específica (Yáñez-Fernández et al., 2002; Fang, & Bhandari, 2010).

Los productos resultantes de la microencapsulación se denominan micropartículas, morfológicamente conformadas por dos elementos: el ingrediente activo también denominado material de núcleo; y un segundo material, designado como agente encapsulante o material de pared (Paulo & Santos, 2017). Dependiendo del método de encapsulación y del agente encapsulante, las micropartículas pueden clasificarse como: (1) microcápsulas, constituidas por un material muralla, que se distingue claramente del núcleo que puede ser sólido ó líquido, y (2) microesferas, sistema matricial en el cual la sustancia a encapsular está dispersa en una matriz continua formada por el agente encapsulante (Fig. 2) (Madene et al., 2006).

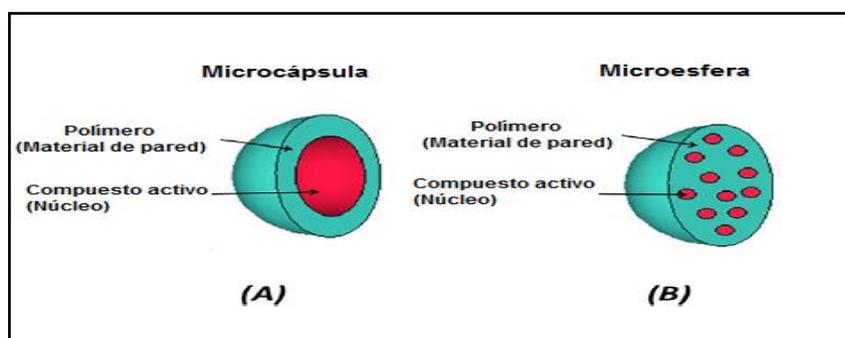


Figura 2. Morfología de una micropartícula. (A) Microcápsula. (B) Microesfera (Paulo & Santos, 2017).

1.5 Métodos de microencapsulación

La encapsulación de compuestos fenólicos se ha realizado por medio de métodos físicos como secado por atomización, recubrimiento por lecho fluidizado, liofilización, extrusión, y métodos químicos como gelificación iónica, coacervación, polimerización

interfacial y atrapamiento en liposomas, entre otros (Dias et al., 2017; Robert et al., 2017).

El secado por atomización es el método más utilizado en la industria de alimentos para encapsular principios activos, ya que es una operación simple, económica, continua y fácilmente reproducible (Desai & Park, 2005; Dias et al., 2017). Esta técnica se basa en la atomización de una solución, emulsión o dispersión; las gotas atomizadas entran en contacto con el aire caliente, lo que provoca una rápida evaporación del solvente obteniéndose un producto en polvo (Dias et al., 2017). Una de las ventajas de esta técnica, además de su simplicidad, es su utilidad para encapsular materiales sensibles al calor, ya que el tiempo de exposición a temperaturas elevadas es muy corto (5 a 30 s) (Gouin, 2004). Sin embargo, este método se considera una técnica de inmovilización más que una tecnología de encapsulación verdadera, ya que parte del agente activo queda expuesto superficialmente sobre la micropartícula (microesferas) (De Vos et al., 2010). La forma típica de las micropartículas es esférica con un rango de tamaño entre 10-50 μm (Garshallaoui et al., 2007). Las micropartículas en forma de polvo son fácilmente manipulables y permiten asegurar la calidad microbiológica por reducción de la actividad de agua (Hayashi, 1989).

Para obtener micropartículas con características específicas mediante secado por atomización, es necesario optimizar las variables de formulación de la solución alimentadora (relación compuesto activo/agente encapsulante, viscosidad de la solución, concentración de sólidos del activo) y variables de proceso (temperatura y flujo de alimentación, temperatura de secado ó de ingreso del aire al secador,

temperatura de salida del producto), aunque en la mayoría de los casos, las condiciones se determinan a través de estudios de ensayos y error (Gharsallaoui et al., 2007).

1.6 Agentes encapsulantes

Un paso importante en el proceso de microencapsulación es la selección de material encapsulante que dependerá del tipo de compuesto a encapsular, método de microencapsulación y aplicación final de las micropartículas (Gharsallaoui et al., 2007). Los polímeros pueden ser sintéticos o naturales, permitidos para aplicaciones en alimentos y también pueden mezclarse a fin de obtener propiedades de barrera y mecanismos de liberación específicos (Gouin, 2004). Para secado por atomización, los agentes encapsulantes deben presentar: solubilidad o dispersabilidad en agua (Desai & Park, 2005), buenas propiedades emulsificantes cuando el activo es hidrofóbico, baja viscosidad en soluciones concentradas, carácter no higroscópico, sabor suave y en lo posible un bajo costo (Murua-Pagola et al., 2009).

Para la microencapsulación de compuestos fenólicos por secado por atomización se han utilizado diferentes agentes encapsulantes, estos incluyen: polisacáridos (almidón, maltodextrinas de diferente equivalente de dextrosa (DE) y quitosano); gomas (goma arábica, goma mezquita y goma agar), lípidos (ácido esteárico, mono y diglicéridos), proteínas (gelatina, caseína, suero de leche, proteínas de soja, trigo y arroz), siendo las maltodextrinas las más utilizadas (Robert et al., 2017).

Para este estudio se seleccionaron inulina, alginato de sodio y carragenina como agentes encapsulantes, debido a que son polímeros que presentan diferentes propiedades como solubilidad, viscosidad y estabilidad a diferentes pH.

La inulina (IN) es un polisacárido constituido por moléculas de fructosa unidas por enlace β glucosídicos. Las principales fuentes de inulina son raíces y tubérculos como

achicoria (*Chichorium intybus*), Dalia (*Dahlia pinuata Cav.*) y alcachofa (*Helianthus tuberosus*). El interés por este polímero se debe a que es de grado alimentario, biodegradable, dispersable en agua y de bajo costo (Biedrzycka & Bieleka, 2004; Tripoli et al., 2005). La inulina ha mostrado un efecto prebiótico, porque actúa como fibra dietaria, siendo escasamente hidrolizada por enzimas gástricas o intestinales, pero fermentada principalmente por la microflora del intestino grueso.

El alginato de sodio (AS) es un polisacárido aniónico lineal, consiste en β -1,4-D-ácido manurónico (M-bloque) y α -1,4-L-ácido glucurónico (bloque G), producido comercialmente a partir de algas pardas y bacterias. Es ampliamente utilizado en la industria de alimentos y farmacéutica, sin embargo, debido a su baja solubilidad en agua y alta viscosidad a bajas concentraciones, los trabajos donde se ha usado AS como agente encapsulante de compuestos bioactivos mediante secado por atomización son escasos (González et al., 2019). El AS es capaz de formar una estructura de gel, la cual es relativamente estable a pH ácido, pero en condiciones alcalinas suaves se desintegra. Por esta razón, dentro de la tecnología de microencapsulación, el AS ha sido aplicado para liberación controlada de compuestos bioactivos (Yoo et al., 2006)

La carragenina (CR) es un polisacárido sulfatado natural, se encuentra en las paredes celulares de las algas marinas rojas (Rhodophyceae) y se extrae principalmente de los géneros Chondrus, Eucheuma, Gigartina e Iridaea. Se compone de unidades de galactosa y/o de anhidrogalactosa, sulfatadas o no, unidas por enlaces alternos α (1-3) y β (1-4). Los grupos sulfato determinan la clasificación en uno de los tres tipos principales de carragenina: k (kappa), l (lambda) y (i) iota; estos grupos también están

relacionados con la solubilidad de la carragenina (Sedayu et al., 2019). Niveles altos de sulfatos en CR conducen a una menor solubilidad y menor resistencia del gel. Son estables en un rango de pH entre 7-10, pero a pH más bajos puede ocurrir hidrólisis que conduce a la pérdida de viscosidad (Van de Velde, 2008). En la industria de alimentos la CR es ampliamente utilizada debido a sus propiedades físicas y funcionales, como el espesamiento, habilidades de gelificación y estabilización (Li et al., 2014).

1.7 Microencapsulación de extracto de cáscara de granada

Los métodos de encapsulación de ECG comprenden la gelificación iónica, el secado en frío y el secado por atomización, siendo este último el método más utilizado. Dentro de los agentes encapsulantes se han empleado maltodextrina, proteína de suero de leche, quitosano, alginato y goma acacia. En su mayoría, estos trabajos se han orientado a evaluar la actividad antioxidante de las micropartículas, como un posible aditivo en alimentos (Tabla 2) (Endo et al., 2012; Zam et al., 2013; Cam et al., 2014; Zam et al., 2014; Kaderides et al., 2015; Zam, 2016; Kaderides & Gouda, 2019; Sharayei et al., 2019; Kaderides et al., 2020). Hasta la fecha no se han reportado estudios relacionados con la aplicación de micropartículas de ECG en jugos naturales.

Tabla 2. Estudios sobre microencapsulación de extracto de cáscara de granada.

Método de encapsulación	Agente encapsulante	Objetivo	Referencia
Secado por atomización	Alginato, quitosano	Encapsular extracto de cáscara de granada con alginato y quitosano y evaluar actividad antifúngica.	Endo et al., 2012
Gelificación iónica	Alginato de sodio + pectina	Evaluar el efecto de la encapsulación sobre la actividad antioxidante del extracto de cáscara de granada.	Zam et al., 2013
Secado por atomización	Maltodextrina	Enriquecer el helado regular con fenoles microencapsulados como modelo para evaluar actividad in vitro.	Cam et al., 2014
Gelificación iónica	Alginato de sodio + cloruro de calcio	Aditivo en productos farmacéuticos o alimenticios.	Zam et al., 2014
Secado por atomización	Goma arábica, Capsul y maltodextrina	Encapsular extracto de cáscara de granada con diferentes agentes encapsulantes	Nogueira et al., 2014
Secado por atomización	Maltodextrina, Tween 80, leche en polvo, aislado de proteína de suero, goma arábica	Utilizar la cáscara de granada y recuperar ingredientes valiosos a través del secado por atomización	Goula & Lazarides, 2015
Secado por atomización	Maltodextrina + proteína de suero de leche	Extender la vida útil de la pasta de avellana.	Kaderides et al., 2015

Gelificación iónica	Alginato de sodio alginato de sodio + pectina	Enriquecer leche con fenoles microencapsulados.	Zam, 2016
Secado por atomización	Capsul	Encapsular extracto de cáscara de granada aplicando metodología de superficie respuesta	Bustamante et al., 2017
Secado por atomización	Subproductos del procesado de jugo de naranja	Introducir fibras de fruta como agente encapsulante de extractos fenólicos.	Kaderides & Goula, 2019
Secado en frío	Maltodextrina y ciclodextrina	Encapsular el extracto y comparar su actividad antifúngica versus sorbato de potasio.	Sharayei et al., 2019
Secado por atomización	Subproductos del procesado de jugo de naranja	Evaluar la estabilidad del extracto encapsulado y utilizarlo como componente biofuncional en galletas.	Kaderides et al., 2020

1.8. Hipótesis

El extracto microencapsulado de cáscara de granada (*Punica granatum*) mejorará la calidad microbiológica del jugo de fruta no pasteurizado, reduciendo el crecimiento de microorganismos de deterioro.

1.9. Objetivos

Objetivo General

Evaluar el efecto del extracto de cáscara de granada (*Punica granatum*) microencapsulado sobre la estabilidad microbiológica del jugo de fruta no pasteurizado.

Objetivos Específicos

- Estudiar las variables de formulación y proceso para encapsular el ECG con inulina mediante secado por atomización, utilizando un diseño estadístico.
- Encapsular el ECG con mezcla inulina-alginato de sodio e inulina-carragenina, manteniendo las condiciones óptimas del sistema con inulina.
- Caracterizar física, química y morfológicamente las micropartículas de ECG con inulina, mezcla inulina-alginato de sodio e inulina-carragenina.
- Estudiar la estabilidad microbiológica del jugo de fruta no pasteurizado adicionado con ECG encapsulado y ECG no encapsulado.

MATERIALES Y METODOS

2.1. Materiales

- **Granadas:** cáscara de granada (*Punica granatum* L., var. Wonderful).
- **Agentes encapsulantes:** Inulina (IN) (Orafti GR™) adquirida en Alfa Group (Santiago, Chile), alginato de sodio (AS) adquirido en Prinal (Santiago, Chile) y carragenina (CR) (Quasagel T80) donada por Quimatic® (Santiago, Chile).
- **Jugo de manzana:** manzanas rojas variedad Fuji, adquiridas en mercado local de Santiago. El jugo de manzana se obtuvo mediante prensado en un extractor de jugo (Ursus Trotter UT-BRONTE150).
- **Estándar comercial:** Punicalagina adquirida en Sigma-Aldrich (St Louis, MO, Estados Unidos).
- **Medios de cultivo:** agar soya triptona (TSA), soya tripticaseína (TSB), agua peptonada, agar Müller-Hinton (MHT). OXOID, PV Equip (Santiago, Chile).

2.2. Métodos

2.2.1. Elaboración de extracto de cáscara de granada

2.2.1.1. Preparación del ECG

El ECG se obtuvo por extracción convencional sólido-líquido bajo condiciones óptimas determinadas en un estudio previo. La cáscara de granada seca y molida (2 g) se maceró con etanol: agua (38:62 v/v, 20 mL). La mezcla se mantuvo por 3,2 h a 159 rpm en un agitador orbital (JSOS-500 JSR, Corea), y luego se centrifugó a 4000 rpm durante 15 minutos (Allegra 21R, Beckman). El sobrenadante se filtró al vacío utilizando un embudo Büchner. El extracto resultante se almacenó a -20°C en tubos Falcon.

2.2.1.2. Caracterización del ECG

El ECG se caracterizó de acuerdo a los siguientes parámetros:

- **Contenido de humedad:** se determinó utilizando un equipo analizador de humedad MA 50.R (Radwag, Poland).
- **Sólidos solubles (°Brix), pH:** de acuerdo a los métodos descritos en AOAC (1996).
- **Contenido de polifenoles totales (CPT):** se cuantificó espectrofotométricamente por el método de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi 1965). La absorbancia de las muestras se midió a 725 nm y los resultados se expresaron en miligramos de ácido gálico equivalente por gramo de peso seco (mg EAG/g p.s), según una curva de calibración (Anexo 1). Los análisis se realizaron por triplicado.
- **Contenido de punicalagina:** se determinó por HPLC, utilizando una bomba Merck Hitachi L-6200A, con detector de arreglo de diodos Waters 996 acoplado a un computador provisto con el software Empower Pro y una columna C18 (250 mm x 4,6 d.i. x 5 μ m, Symmetry, Waters, Irlanda). Las fases móviles utilizadas fueron: acetonitrilo (fase A) y ácido fosfórico acuoso (0,4%) (fase B). Se usó un gradiente de las fases móviles, correspondiente a: 0 min, 95% B; 0-10 min, 85% B; 30 min, 75% B; 35 min, 95% B; con un flujo de 1 mL/min y una temperatura de la columna de 30°C. Todas las muestras fueron filtradas (0.22 μ m) y luego inyectadas (20 μ L volumen de inyección). La longitud de onda monitoreada fue de 360 nm para la detección y cuantificación de punicalagina total (calculada por la suma de áreas de punicalagina α y β), se realizó utilizando una curva de calibración (Anexo 2). Los resultados se

expresaron como miligramos de punicalagina por gramo de peso seco (mg punicalagina/g peso seco). Los análisis se realizaron por triplicado.

2.2.2. Encapsulación de ECG

2.2.2.1. Diseño experimental para la elaboración de micropartículas de ECG con inulina (ECG-IN)

Para realizar la encapsulación del ECG con IN se aplicó un diseño composito central más punto axial con un total de 12 experimentos (4 puntos experimentales, 4 puntos axiales y 4 puntos centrales). La relación ECG/IN (1:0,5 - 1:2) y la temperatura del aire de entrada al secador (120-190 °C) se consideraron como variables independientes. La variable respuesta correspondió a la eficiencia de encapsulación de punicalagina (EE). Se utilizó la Metodología de Superficie Respuesta (MSR) para determinar las condiciones óptimas del sistema. En la Tabla 3 se presentan las variables independientes y los niveles del diseño experimental utilizado para la encapsulación del ECG-IN.

Tabla 3. Variables independientes y niveles en el diseño composito central más punto axial para la encapsulación del sistema ECG-IN.

Variables independientes	Niveles				
	$-\alpha$	-1	0	1	α
Relación ECG/IN	1:0,34	1:0,5	1:1,25	1:2	1:2,16
Temperatura del aire de entrada al secador (°C)	113	120	155	190	198

ECG: extracto de cáscara de granada; IN: inulina

2.2.2.2. Preparación de las micropartículas de ECG con inulina (ECG-IN).

Las micropartículas del sistema ECG-IN se prepararon considerando 100 g de solución. La IN (1,7-10,8g) se disolvió en agua destilada (84,2-93,3 g) a 70 °C con agitación constante (200 rpm) y luego se enfrió hasta alcanzar temperatura ambiente.

A cada preparación se le agregó 5 g de ECG y se homogeneizó utilizando un Polytron PT2100 (Kinematica AG, Suiza). Las soluciones obtenidas se llevaron a un Mini Spray-Dryer B-290 (Büchi, Suiza) con alimentación y flujo de aire de secado en paralelo. Las condiciones para el secado fueron: temperatura del aire de entrada al secador entre 120 y 190°C, flujo de aire de 600 L/h, velocidad de alimentación de 2,5 mL/min y 5 bar (20 psi). Las micropartículas resultantes se almacenaron evitando el contacto con la luz, manteniéndolas a -20 °C hasta su posterior análisis.

2.2.2.3. Preparación de micropartículas de ECG con mezcla de inulina-alginato de sodio y mezcla de inulina-carragenina

Las micropartículas de ECG con mezcla inulina-alginato de sodio (IN-AS) y de inulina- carragenina (IN-CR) se prepararon considerando las condiciones óptimas de relación ECG: IN y temperatura del aire de entrada al secador establecidas para el sistema ECG-IN, manteniendo la misma cantidad de sólidos en cada uno de los sistemas. Las micropartículas de IN-AS e IN-CR se prepararon utilizando dos contenidos de AS y CR: 0,5 g para (ECG-(IN+AS₁) y ECG-(IN+CR₁), y 1 g para (ECG-(IN+AS₂) y ECG-(IN+CR₂). Se prepararon soluciones de alimentación considerando 100 g de solución. La IN (9,5 ó 10 g) se disolvió en agua destilada (84,5 g) a 70 °C, manteniendo agitación constante. El AS (0,5 y 1 g) y la CR (0,5 y 1 g) se disolvieron en agua destilada a 30 °C y 65 °C respectivamente, con agitación constante (200 rpm), y se agregaron a las soluciones de IN. El ECG (5g), se adicionó cuando las soluciones de los agentes encapsulantes alcanzaron temperatura ambiente. Las soluciones resultantes se llevaron al equipo de secado por atomización (B-290, Büchi, Suiza). Las condiciones de secado para los sistemas fueron: temperatura del aire de

entrada al secador de 166 °C, flujo del aire de 600 L/h, velocidad de alimentación de 3 mL/min y presión de atomización de 5 bar (20 psi).

2.2.3. Caracterización de las micropartículas de ECG obtenidas bajo condiciones óptimas

Para la caracterización de los cinco sistemas de micropartículas (ECG-IN, ECG-(IN+AS₁), ECG-(IN+AS₂), ECG-(IN+CR₁) y ECG-(IN+CR₂) se consideraron los siguientes parámetros:

2.2.3.1 Actividad de agua: se determinó utilizando un equipo HygroPalm (Rotronic, USA).

2.2.3.2 Contenido de humedad: se determinó utilizando un equipo analizador de humedad MA 50.R (Radwag, Poland).

2.2.3.3 Contenido total de Punicalagina: las micropartículas de cada sistema (100 mg) se mezclaron con 1,6 mL de agua grado HPLC, se agitó en un vortex (1 min) y se sonicó a 30°C por 10 min (ELMA P 60H, Alemania). Luego se agregó 0,4 mL de metanol, se agitó en un vortex (1 min), se sonicó a 30°C (10 min) y se centrifugó a 4000 rpm (6 min) (Allegra 21R, Beckman). Finalmente, el sobrenadante se extrajo, se aforó a 5 mL y se inyectó en el HPLC. Los análisis se realizaron por triplicado y se expresaron como mg de punicalagina total/g de polvo.

2.2.3.4 Contenido superficial de Punicalagina: las micropartículas de cada sistema (200 mg) fueron tratadas con 1 mL de metanol, se agitaron manualmente (30 s) y luego en un vortex (30 s); a continuación se centrifugaron a 1500 rpm (2 min). Finalmente, el sobrenadante se filtró (Millipore 0,22 µm) y se inyectó en el HPLC. Los análisis se realizaron por triplicado y se expresaron como mg de punicalagina superficial/g de polvo.

2.2.3.5 Eficiencia de encapsulación EE: se calculó de acuerdo a la ecuación 1.

$$EE = \frac{\text{Contenido de punicalagina total exp} - \text{contenido de punicalagina superficial}}{\text{Contenido de punicalagina total exp}} \times 100 \text{ (Ec. 1)}$$

2.2.3.6 Análisis cromatográfico: el contenido total y superficial de punicalagina de las micropartículas se determinó por HPLC, como fue descrito en el punto 2.2.1.2.

2.2.3.7 Morfología de las micropartículas: la estructura externa de las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas (ECG-IN, ECG-(IN+AS₁), ECG-(IN+AS₂), ECG-(IN+CR₁), ECG-(IN+CR₂)) se analizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Las micropartículas se cubrieron con oro/paladio, utilizando un evaporador al vacío PS 10E y analizadas por un microscopio electrónico (LEO Electron Microscopy Ltd., Cambridge, Reino Unido) operado a 20 kV. Las imágenes escaneadas se recogieron digitalmente a través del software EDS 7424 (Oxford Instruments, Oxford, Reino Unido).

2.2.3.8 Tamaño de partícula: se determinó por difracción de luz láser (DLL), utilizando un analizador de tamaño de partícula (LV 950-V2 Horiba, Kyoto, Japón). Las micropartículas se dispersaron en propilenglicol y los resultados se expresaron como diámetro de volumen promedio (D_{4,3}).

2.2.4. Estabilidad microbiológica de un jugo de manzana sin pasteurizar adicionado con ECG encapsulado y ECG no encapsulado

2.2.4.1. Preparación del jugo de manzana

Las manzanas (variedad fuji) se adquirieron en un supermercado local. La fruta se lavó y sanitizó por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio durante 3 min. El jugo

se obtuvo por prensado (Ursus Trotter UT-BRONTE150), se transfirió a una botella de vidrio estéril y posteriormente se envasó en botellas de 100 mL.

2.2.4.2 Recuento inicial de la microbiota del jugo

En el jugo de manzana se efectuó el recuento de aerobios mesófilos (RAM) (INN, 2002a), hongos y levaduras (INN, 2002b), utilizando el método de recuento en placas. Las muestras de jugo se sembraron transfiriendo alícuotas de 1 mL de diluciones seriadas a placas Petri. El recuento de aerobios mesófilos se realizó utilizando TSA como medio de cultivo y las placas se incubaron a 35°C durante 24 h. El recuento de hongos y levaduras se realizó utilizando agar papa dextrosa como medio de cultivo. Las placas se incubaron a 22°C durante 5 días (INN, Norma Chilena 2734:2002). Los análisis se realizaron por triplicado y con tres diluciones en serie por duplicado para cada determinación.

2.2.4.3. Determinación de la concentración de ECG para adicionar al jugo de manzana

Se adicionó ECG (3 a 12 mg de ECG/mL jugo) en jugo de manzana (Tserennadmid et al., 2011). El jugo de manzana control (sin ECG) y jugo de manzana con ECG en diferentes concentraciones se incubaron 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 2.2.4.2. Para seleccionar la concentración de ECG, se consideró la concentración más baja de ECG, donde se determinó que hubo diferencia significativa en el crecimiento de microorganismos (Al-Zoreky, 2009; Gullon et al., 2016).

2.2.4.4. Estabilidad microbiológica de jugo de manzana con ECG encapsulado y ECG no encapsulado

Se colocó 70 mL de jugo de manzana en botellas de vidrio y se adicionó ECG no encapsulado (630 μ L) ó encapsulado (1,31-1,63g de micropartículas), de acuerdo a la concentración obtenida anteriormente (punto 2.2.4.3), considerando el mismo contenido de punicalagina en todos los sistemas. Como control se utilizó el jugo sin adición de ECG. Las botellas se taparon y se almacenaron a 4°C durante 15 días. Se tomaron muestras periódicamente (0, 3, 6, 9, 12,15 días) y se realizaron los recuentos de RAM, hongos y levaduras como se describió en la sección 2.2.5.3. Los análisis se realizaron por triplicado.

2.2.5. Análisis estadístico

Las condiciones óptimas del diseño de micropartículas ECG-IN se obtuvieron utilizando la Metodología de Superficie Respuesta (MSR). Para determinar las diferencias estadísticas entre los sistemas de micropartículas estudiados se aplicó análisis de varianza ANOVA y la prueba de rango múltiple de Tuckey. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software Statgraphics versión Centurion XVI (Statpoint Inc, 2011).

RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. Caracterización del ECG

En la tabla 4 se muestran las características físicas y químicas del ECG obtenido por extracción con solvente (etanol:agua 38:62 v/v). El CPT fue de 124,3 mg EAG/g p.s. La literatura muestra un amplio rango de valores de CPT, fluctuando entre 53,65 y 612 mg EAG/g p.s. para extractos de cáscara de granada de diversas variedades obtenidos por distintos métodos de extracción (Cam & Hisil, 2010; Elfalleh et al., 2012; Saad et al., 2012; Tabaraki et al., 2012; Kam et al., 2013; Amyrgialaki et al., 2014; Mushtaq et al., 2015; Abid et al., 2017; Khalil et al., 2017; Yan et al., 2017; Khalil et al., 2018; Rongai et al., 2019). El ECG presentó un contenido de punicalagina de 94,2 mg punicalagina/g p.s, siendo el principal compuesto identificado en el ECG (Anexo 3). En la literatura, se reportan valores que fluctúan desde 1,6 a 476 mg PG/g p.s (Cam & Hisil, 2010; Nogueira et al., 2014; Bustamante et al., 2017; Khalil et al., 2017; Yan et al., 2017; Khalil et al., 2018; Rongai et al., 2019).

De los estudios, es posible concluir que la variabilidad en los resultados de CPT y punicalagina del ECG, depende de las características agronómicas del fruto (ubicación geográfica, cultivar, clima, estado de cosecha, entre otras), del pretratamiento de la materia prima (condición de almacenamiento, método de secado, molienda, entre otros), del método de extracción, del solvente y condiciones de extracción (temperatura, tiempo) y de las determinaciones analíticas, entre otros (Moure et al., 2001; Kam et al., 2013; Kushawa et al., 2015; Abid et al., 2017; Yan et al., 2017).

Por otra parte, algunos estudios indican que la cáscara de granada presenta mayor CPT y actividad antioxidante que otras partes del mismo fruto como, semillas, flores, hojas

y arilos incluyendo el jugo obtenido de estos últimos (Gözlekçi, et al., 2011; Elfalleh et al., 2012; Yan et al., 2017). Además, el contenido de polifenoles en el ECG es mayor al reportado para extractos de frutos reconocidos como una excelente fuente de polifenoles como arándanos (16,2 y 47,6 mg EAG/g de fruto seco) (Namiesnik et al., 2014; Pertuzatti et al., 2014), calafate (16,1 y 34,9 mg EAG/g de fruto seco) (Mariangel et al., 2013) y maqui (*Aristotelia chilensis* (Mol) Stuntz) con valores de 45,7 mg EAG/g de maqui seco (Rubilar et al., 2011).

Tabla 4. Caracterización del extracto de cáscara de granada.

Parámetros	ECG (X ± DE)
Humedad (%)	93,6 ± 0,2
Sólidos solubles (°Brix a 20 °C)	19,1 ± 0,4
Polifenoles totales (mg EAG/g p.s)	124,3±2,9
Contenido de PG (mg PG/g p.s)	94,2±2,5

ECG: extracto de cáscara de granada; EAG: equivalente de ácido gálico; p.s: peso seco de cáscara de granada; X: promedio; DE: desviación estándar (n = 3).

3.2. Microencapsulación de ECG

3.2.1 Microencapsulación de ECG-IN

La encapsulación del ECG con IN se realizó utilizando secado por atomización como método de encapsulación. Se aplicó un diseño composito central más punto axial para evaluar el efecto de la variable de formulación relación ECG/IN (X_1) y la variable de proceso temperatura del aire de entrada al secador (X_2) sobre la variable respuesta (eficiencia de encapsulación de punicalagina (EE)). La eficiencia de encapsulación de punicalagina representa la retención de ECG en el interior de las micropartículas. Así, una mayor EE representa un menor contenido de punicalagina superficial en las micropartículas. La tabla 5 muestra el diseño experimental y la EE para la

microencapsulación ECG con IN mediante secado por atomización.

Tabla 5. Diseño experimental y eficiencia de encapsulación para la microencapsulación de ECG con inulina por secado por atomización.

Ensayo	Relación ECG/IN	Temperatura del aire de entrada al secador (°C)	EE (%)
	[X ₁]	[X ₂]	X±DE
1	1:0,5	120	83,3 ± 2,3
2	1:0,5	190	93,1 ± 0,8
3	1:2	120	90,7 ± 0,8
4	1:2	190	95,2 ± 0,9
5	1:1,25	112,65	89,0 ± 0,5
6	1:1,25	197,35	94,3 ± 0,2
7	1:0,34	155	86,8 ± 3,4
8	1:2,16	155	93,1 ± 0,2
9	1:1,25	155	91,5 ± 1,1
10	1:1,25	155	91,7 ± 1,4
11	1:1,25	155	92,3 ± 1,4
12	1:1,25	155	92,8 ± 1,7

ECG: extracto de cáscara de granada; IN: inulina; EE: eficiencia de encapsulación; X: promedio; DE: desviación estándar

Se utilizó la Metodología de Superficie Respuesta (MSR) para maximizar la EE del sistema ECG-IN. En el análisis de varianza (ANDEVA) se consideraron las formas lineales, cuadráticas y la interacción entre las variables independientes, a un nivel de confianza del 95 %. Las formas no significativas se eliminaron de la ecuación (Anexo 4). El resultado de los experimentos para el diseño del sistema de micropartículas ECG-IN indicó que la EE de punicalagina varió entre 83,3 y 95,2%. El ANDEVA indicó que la forma lineal y cuadrática de la temperatura de entrada al secador, la forma lineal de la relación ECG/IN, y la interacción entre la relación ECG/IN y la temperatura de entrada al secador, fueron significativas ($p \leq 0,05$) sobre la EE de punicalagina (Figura 3). El modelo explicó el 94 % de la variabilidad (R^2 -ajustado corregido por grados de libertad) en la EE de punicalagina, con un valor residual menor a 1,7. Además, la falta de ajuste no fue significativa ($p > 0,05$), lo que indica que los modelos

matemáticos se ajustaron bien con los datos experimentales.

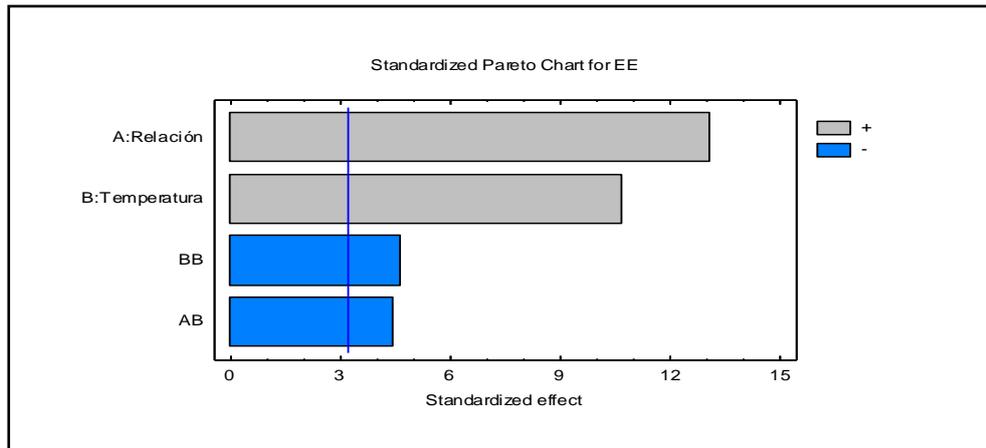


Figura 3. Diagrama de Pareto para la EE de PG del sistema de micropartículas ECG-IN

La ecuación de regresión cuadrática que describe el efecto de las variables independientes sobre la EE fue la siguiente:

$$EE = 39,7443 + 11,8858 * X_1 + 0,475612 * X_2 - 0,0509524 * X_1 * X_2 - 0,00110315 * X_2^2$$

La figura 4 muestra el gráfico de Superficie Respuesta para la optimización del sistema de micropartículas ECG-IN. Se observa que a mayor contenido de agente encapsulante, mayor es la EE de punicalagina. Esto se puede atribuir a la rápida formación de una costra sobre la superficie de las gotas atomizadas (Gharsallaoui et al., 2007; Kaderides et al., 2015), conduciendo a una mayor retención del compuesto. Además, un mayor contenido de IN provee un mayor número de grupos hidroxilos disponibles para formar puentes de hidrógeno con la punicalagina, aumentando la interacción entre inulina y punicalagina (Urzúa et al., 2017). Un comportamiento similar se observó para la temperatura del aire de entrada al secador (Figura4), porque al aumentar la temperatura de entrada al secador, aumentó levemente la EE de ECG. Se ha reportado que al aumentar la temperatura del aire de entrada, se produce una evaporación más rápida del agua favoreciendo la formación de la costra sobre la

superficie de las gotas atomizadas que permite la difusión del agua pero retiene el agente activo (Robert et al., 2012; Shishir & Chen, 2017; Kaderides et al., 2020). No obstante, algunos autores establecen que durante el secado por atomización, temperaturas sobre 180°C, podrían causar una excesiva evaporación del agua y favorecer la formación de fisuras o grietas en las micropartículas, produciéndose una temprana liberación y degradación del compuesto encapsulado (Wu et al., 2014; Kaderides et al., 2015; Mohammed et al., 2017).

De acuerdo a la superficie de respuesta estimada para el sistema ECG-IN (Figura 4), la mayor EE de punicalagina se obtuvo al utilizar una relación ECG/IN de 1:2,16 correspondiente al punto axial (superior) del diseño. Por otro lado, la condición óptima de temperatura del aire de entrada al secador fue de 166 °C, la cual estuvo en un valor intermedio del rango estudiado (120 a 190 °C).

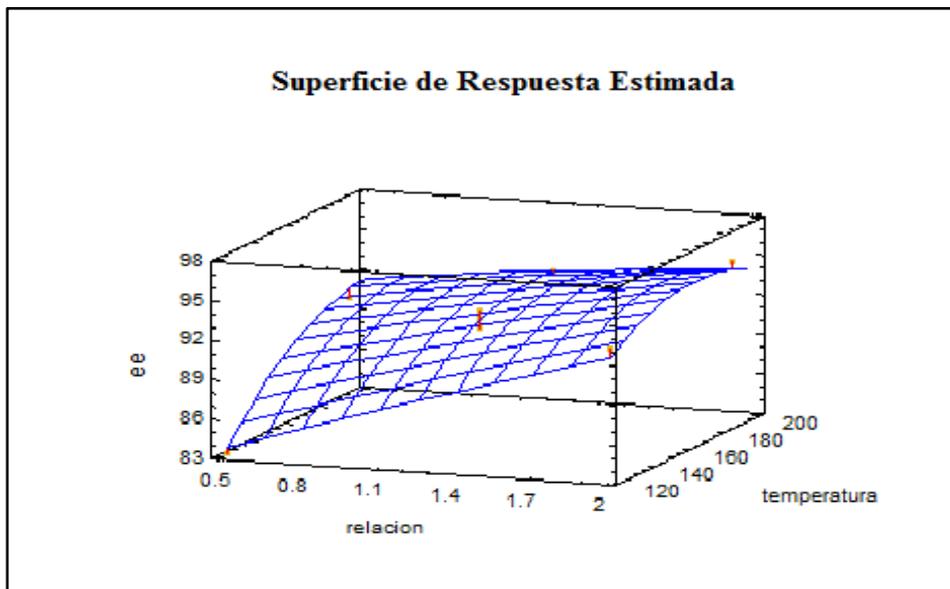


Figura 4. Gráfico de Superficie Respuesta para la EE de PG del sistema de micropartículas ECG-IN.

3.3. Caracterización de las micropartículas de ECG obtenidas bajo condiciones óptimas

La Tabla 6 muestra las características físicas y químicas de las micropartículas ECG-IN, ECG-(IN+AS₁), ECG-(IN+AS₂), ECG-(IN+CR₁), ECG-(IN+CR₂). La encapsulación de ECG utilizando como agente encapsulante mezcla de inulina y alginato de sodio (ECG-(IN+AS₁), ECG-(IN+AS₂)) e inulina con carragenina (ECG-(IN+CR₁) y ECG-(IN+CR₂)), se realizó considerando las condiciones óptimas obtenidas para el sistema ECG-IN (relación ECG/IN (1:2,16) y temperatura del aire de entrada al secador (166 °C). De esta forma, se obtuvo la misma cantidad de sólidos (15,5 g) en cada uno de los sistemas. En este estudio sólo se consideró como variable respuesta la EE ya que la recuperación y el rendimiento del proceso mostraron valores similares en todos los experimentos del diseño.

Otros estudios de encapsulación de ECG mediante secado por atomización, mostraron distintas condiciones de optimización. Kaderides y Goula (2019) utilizaron como agente encapsulante un ingrediente en polvo alto en fibra obtenido a partir de residuos del procesamiento de jugo de naranja, obteniendo una relación óptima ECG/agente encapsulante de 1:9 y una temperatura óptima del aire de entrada de 162 °C. Cam et al. (2014) encapsularon ECG con diferentes tipos de maltodextrina, obteniendo una relación óptima de 1:1 y 1:3 a 160 °C. Kaderides et al. (2015) encapsularon ECG con una mezcla de maltodextrina y aislado de proteína de suero con relación de 1:9 a 150 °C. Las diferencias en las condiciones óptimas para las variables respuestas, principalmente la relación ECG/biopolímero, muestra que las condiciones óptimas son específicas para cada sistema de micropartículas y no pueden ser aplicadas al utilizar otros agentes encapsulantes. Las diferencias podrían atribuirse a la naturaleza y

propiedades del agente encapsulante (solubilidad y viscosidad), afectando la velocidad de formación de la costra sobre la superficie de la partícula y, por lo tanto, la retención del compuesto activo (Garshallaoui et al., 2007).

Es importante señalar que en condiciones óptimas, todos los sistemas de micropartículas alcanzaron una alta EE de punicalagina (>87%), aun cuando hubo diferencias significativas entre ellos. Las micropartículas ECG-IN obtuvieron una EE significativamente mayor (94,1%) respecto a las micropartículas ECG-(IN+AS₁), ECG-(IN+AS₂), ECG-(IN+CR₁) y ECG-(IN+CR₂), donde ECG-(IN+CR₁) presentó la menor EE (87,1%). Las altas EE se podrían atribuir al contenido de sólidos de la solución de alimentación y a la temperatura del aire de entrada al secador. Las micropartículas se elaboraron considerando una relación ECG/IN (1:2,16), en la cual se utilizó el mayor contenido de agente encapsulante del diseño (10,5g). Sin embargo, algunos autores sugieren que la incorporación de una gran cantidad de agente encapsulante podría exceder su solubilidad y precipitar, sin proporcionar ningún efecto encapsulante (Re, 1998; Jafari et al., 2008).

Existen pocos estudios sobre encapsulación de ECG mediante secado por atomización (Tabla 2). Además, sólo en uno de estos estudios los valores de EE se expresan de acuerdo al contenido de punicalagina, lo que dificulta la comparación de resultados. Bustamante et al. (2017) obtuvo una menor EE de punicalagina (77,3%) encapsulando ECG con almidón modificado (capsul). El mayor valor de EE de punicalagina en este trabajo se podría atribuir a las diferencias en las características estructurales de los diferentes agentes encapsulantes utilizados.

Tabla 6. Características físicas y químicas de los sistemas de micropartículas (ECG-IN, ECG-(IN+AS₁), ECG-(IN+AS₂), ECG-(IN+CR₁), ECG-(IN+CR₂)).

Sistema de micropartículas	ECG-IN	ECG-(IN+AS ₁)	ECG-(IN+AS ₂)	ECG-(IN+CR ₁)	ECG-(IN+CR ₂)
	X±DE	X±DE	X±DE	X±DE	X±DE
Relación ECG/polímero	1:2,1	1:2,1	1:2,1	1:2,1	1:2,1
Temperatura del aire de entrada (°C)	166	166	166	166	166
EE (%)	94,08±0,58 ^c	90,10±0,78 ^b	90,06±1,74 ^b	87,12±0,65 ^a	91,58±0,48 ^{bc}
PG superficial (mg PG/g polvo)	0,26±0,01 ^a	0,36±0,02 ^b	0,35±0,03 ^b	0,55±0,05 ^c	0,33±0,02 ^{ab}
PG total (mg PG/g polvo)	4,45±0,23 ^c	3,67±0,07 ^a	3,59±0,33 ^a	4,26±0,19 ^{bc}	3,86±0,01 ^{ab}
Humedad (%)	3,47 ±0,21 ^{bc}	3,03 ±0,21 ^{ab}	2,72 ±0,16 ^a	3,38 ±0,09 ^{bc}	3,63 ±0,21 ^c
Actividad de agua (a _w)	0,18±0,01 ^b	0,16±0,01 ^{ab}	0,15±0,01 ^{ab}	0,14±0,01 ^a	0,14±0,02 ^a
Tamaño de partícula D _(4,3) (µm)	5,87±0,21 ^a	14,05±0,35 ^c	11,69±0,09 ^b	12,55±0,22 ^c	13,33±0,04 ^d

ECG: extracto de cáscara de granada; IN: inulina; AS: alginato de sodio; CR: carragenina; PG: punicalagina; EE: eficiencia de encapsulación; letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas (p<0,05) entre sistemas de micropartículas para cada parámetro. Valores expresados como promedio (X) ± desviación estándar (DE).

La inulina es un polímero que reúne varias de las características que preferentemente debe tener un agente encapsulante para ser utilizados en procesos de secado por atomización, como solubilidad o dispersabilidad en agua y baja viscosidad en soluciones concentradas (Gouin, 2004; Desai & Park, 2005). Por esta razón diversos compuestos fenólicos se han encapsulado con inulina mediante esta técnica, obteniéndose altas EE (80 a 99%) y altos rendimientos (>70%) (Saenz et al., 2009; Robert et al., 2012; Beirão da Costa et al., 2013; Mayuri Omae et al., 2017; Urzúa et al., 2017; González et al., 2020), lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo. Alginato de sodio y carregenina han sido menos utilizados en secado por atomización. Estos polímeros presentan diferentes propiedades tecnológicas como, menor solubilidad y mayor viscosidad a bajo contenido de sólidos respecto de la inulina, por lo cual se han incorporado en concentraciones < 2% en la solución de alimentación. González et al. (2019) obtuvo una EE y un rendimiento de 58% y 52%, respectivamente, en la encapsulación de extracto de hoja de olivo con alginato de sodio mediante secado por atomización. Krishnaiah et al. (2012) encapsularon extracto de *Morinda citrifolia* L con CR con un rendimiento < 48%. Sin embargo, en el estudio no se indica la EE.

En otros estudios, donde el ECG se ha encapsulado por secado por atomización, los valores de EE se reportaron en base a polifenoles totales determinados espectrofotométricamente. Kaderides y Goula, (2019) informaron valores de EE de polifenoles totales entre 85-98,7% utilizando un agente encapsulante obtenido del residuo de procesamiento de jugo de naranja. Kaderides et al. (2015) y Goula & Lazarides (2015) obtuvieron valores de EE de polifenoles totales de 99,7% en ECG encapsulado con mezcla maltodextrina/aislado proteico de suero lácteo. Cam et al.

(2014) también obtuvo una alta EE (98%) encapsulando ECG con maltodextrinas de diferente DE. Menores valores de EE se obtuvieron al encapsular ECG con quitosano (75%) y con alginato de sodio (81%) (Endo et al., 2012). El ECG también se ha encapsulado por otros métodos, obteniéndose menores valores EE de polifenoles totales. Sharayei et al. (2019) encapsularon ECG mediante liofilización, alcanzando una EE de 83% con maltodextrina/ β -ciclodextrina (5%) y de 90% con maltodextrina/ β -ciclodextrina (10%), mientras que por gelificación iónica se reportó una EE de 44% con alginato de sodio (Zam et al., 2014) y de 50% con alginato de sodio/pectina (Zam et al., 2013).

Es importante señalar que en este trabajo se alcanzaron altas EE de punicalagina (>87%), al incorporar alginato de sodio o carragenina en mezclas con inulina, aun cuando hubo diferencias significativas entre los sistemas. Además, esta mezcla de polímeros podría modificar las propiedades de las micropartículas obtenidas sólo con inulina, lo que podría estar asociado con un control de la liberación del ECG.

En este estudio, las micropartículas de ECG-IN y ECG-(IN+CR₁) proporcionaron un contenido total de punicalagina significativamente mayor (4,5 y 4,3 mg punicalagina/g polvo, respectivamente) en comparación a los otros sistemas (ECG-(IN+CR₂), ECG-(IN+AS₁) y ECG-(IN+AS₂)). En el caso AS y CR, cuando hay un mayor contenido de estos polímeros en la mezcla con IN, el contenido de punicalagina disminuye, aunque no fue significativo. En general, estos resultados muestran que la EE, el contenido de punicalagina total y superficial depende de las características estructurales y composición del agente encapsulante.

El contenido de humedad de todas las micropartículas fue menor al 4%, valor que está dentro del rango descrito para micropartículas obtenidas por secado por atomización

(Gharsallaoui et al., 2007). Por lo tanto, un aumento en la temperatura del aire de entrada conlleva a un menor contenido la humedad. La actividad de agua de las micropartículas fue menor a 0,2, por lo cual habría una mayor estabilidad de los compuestos encapsulados durante el almacenamiento (Ahn et al., 2008), y se aseguraría la estabilidad microbiológica en los polvos (Bicudo et al., 2015; Tontul & Topuz, 2017).

Se encontraron distribuciones de tamaño de partícula unimodales en todos los sistemas de micropartículas. El tamaño de las micropartículas ($D_{4,3}$) varió entre 5,87 y 14,05 μm , siendo significativamente menor en las micropartículas de ECG-IN. Estos valores se encuentran dentro del rango establecido para micropartículas obtenidas por secado por atomización.

La figura 5 muestra las fotografías SEM de los sistemas de micropartículas ECG-IN (Figura 5A), ECG-(IN+AS₁) (Figura 5B), ECG-(IN+AS₂) (Figura 5C), ECG-(IN+CR₁) (Figura 5D), ECG-(IN+CR₂) (Figura 5E), obtenidas bajo condiciones óptimas. Las micropartículas de todos los sistemas presentaron una morfología similar, de forma esférica con superficie lisa y suave, algunas abolladuras y sin fisuras. Las abolladuras son atribuidas a la contracción que sufren las partículas durante el proceso de secado a altas o bajas temperaturas del aire de entrada (Alamilla-Beltrán et al, 2005; Gharsallaoui et al., 2007; Ronkart et al., 2007). En este estudio, se utilizó una alta temperatura de secado en todos los sistemas (166 °C), por lo cual, las abolladuras podrían atribuirse a una rápida evaporación del agua y alta presión generada dentro de las micropartícula (Alamilla-Beltrán et al., 2005). Además, en la figura 5 se observó cierto grado de aglomeración, la cual es producida por colisiones entre las

micropartículas dentro de la cámara de secado (aglomeración primaria) y colisiones de partículas que emergen de la cámara de secado como polvo de recirculación (aglomeración secundaria) (Ronkart et al., 2007). Morfologías similares se han reportado para micropartículas de ECG encapsuladas con fibra de residuos agroindustriales de jugo de naranja (Kaderides y Goula, 2019), maltodextrinas de diferentes equivalentes de dextrosa (Cam et al., 2014) y alginato de sodio (Endo et al., 2012).

En la fotografía de las micropartículas ECG-(IN+CR₁) (Figura 5D) se pueden observar unas hebras delgadas que corresponderían a la CR no solubilizada. Similarmente, Bartkowiak & Hunkeler (2001) describieron hebras delgadas en geles de CR.

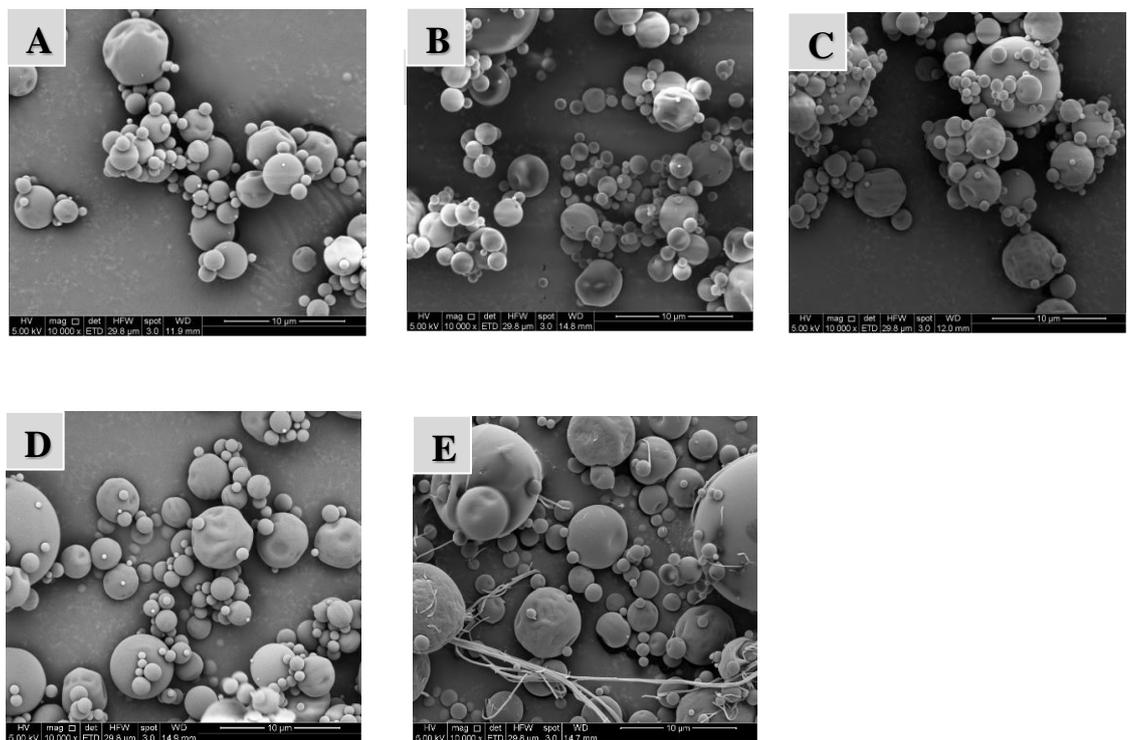


Figura 5. Microfotografías SEM de las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas para los sistemas ECG-IN (A), ECG-(IN+AS₁) (B), ECG-(IN+AS₂) (C), ECG-(IN+CR₁) (D), ECG-(IN+CR₂) (E) (x 10 000).

3.4 Estudio de estabilidad microbiológica del jugo de manzana adicionado de ECG encapsulado y ECG no encapsulado

Para la adición de ECG sin encapsular y ECG encapsulado al jugo de manzana, primero se determinó la concentración de ECG para adicionar en el jugo de manzana. Para esto se adicionó el ECG sin encapsular, en un rango de concentración de 3-12 mg ECG/mL de jugo de manzana. Se encontraron diferencias significativas con un menor recuento a partir de una concentración de 9 mg ECG/mL de jugo de manzana (Tabla 7), posterior a las 24 horas de incubación para RAM y de 5 días para mohos y levaduras, por lo cual, se seleccionó esta concentración para realizar el análisis microbiológico.

Tabla 7. Recuentos obtenidos del ensayo de determinación de ECG para adicionar en el jugo de manzana.

Concentración de ECG (mg/mL)	RAM (ufc/mL)	Hongos y levaduras (ufc/mL)
3	4,1 x 10 ^a	2,3 x 10 ^a
6	4,1 x 10 ^a	2,1 x 10 ^a
7	4 x 10 ^a	2,1 x 10 ^a
8	4 x 10 ^{ab}	1,9 x 10 ^a
9	2,6 x 10 ^{bc}	1,9 x 10 ^a
10	2,5 x 10 ^c	1,9 x 10 ^a
11	2,4 x 10 ^c	1,8 x 10 ^a
12	2,4 x 10 ^c	1,8 x 10 ^a

ECG: extracto de cáscara de granada; RAM: recuento de aerobios mesófilos; letras indican diferencias significativas entre las distintas concentraciones.

La carga inicial del jugo sin pasteurizar alcanzó valores de 2,2 x 10 UFC/mL para RAM y de 7,4 x 10 UFC/mL para mohos y levaduras.

El estudio de estabilidad microbiológica se realizó en almacenamiento a una temperatura de 4°C durante 15 días. Se consideraron siete sistemas: jugo [J]; jugo con ECG sin encapsular [J+ECG]; jugo con micropartículas de IN [J+(ECG-IN)]; jugo con micropartículas de mezcla IN y AS: [J+ECG-(IN+AS₁)] y [J+ECG-(IN+AS₂)]; jugo con micropartículas de mezcla IN y CR: [J + ECG-(IN+CR₁)] y [J+ ECG-(IN+CR₂)].

En la figura 6 (A-B) se observa el RAM (Figura 6A) y el recuento de mohos y levaduras (Figura 6B) para todos los sistemas: jugo de manzana sin extracto, jugo con ECG no encapsulado y jugos con ECG encapsulado (micropartículas), durante el almacenamiento.

Para RAM (figura 6A), se observó un aumento en todos los sistemas a lo largo del tiempo de almacenamiento. En el día cero y el día 3 no se observaron diferencias entre el jugo y cada uno de los sistemas estudiados.

El día 6, el jugo sin extracto presentó un RAM significativamente mayor en relación al jugo con ECG sin encapsular y jugos con ECG encapsulado, lo cual se podría atribuir al efecto antimicrobiano que ejercería el ECG en el jugo. Los jugos con micropartículas de IN-CR [J + ECG-(IN+CR₁)] y [J+ ECG-(IN+CR₂)], mostraron los menores recuentos de RAM en el día 6, sugiriendo un control de la liberación del ECG desde las micropartículas con IN-CR y/o un efecto del ECG superficial de las micropartículas.

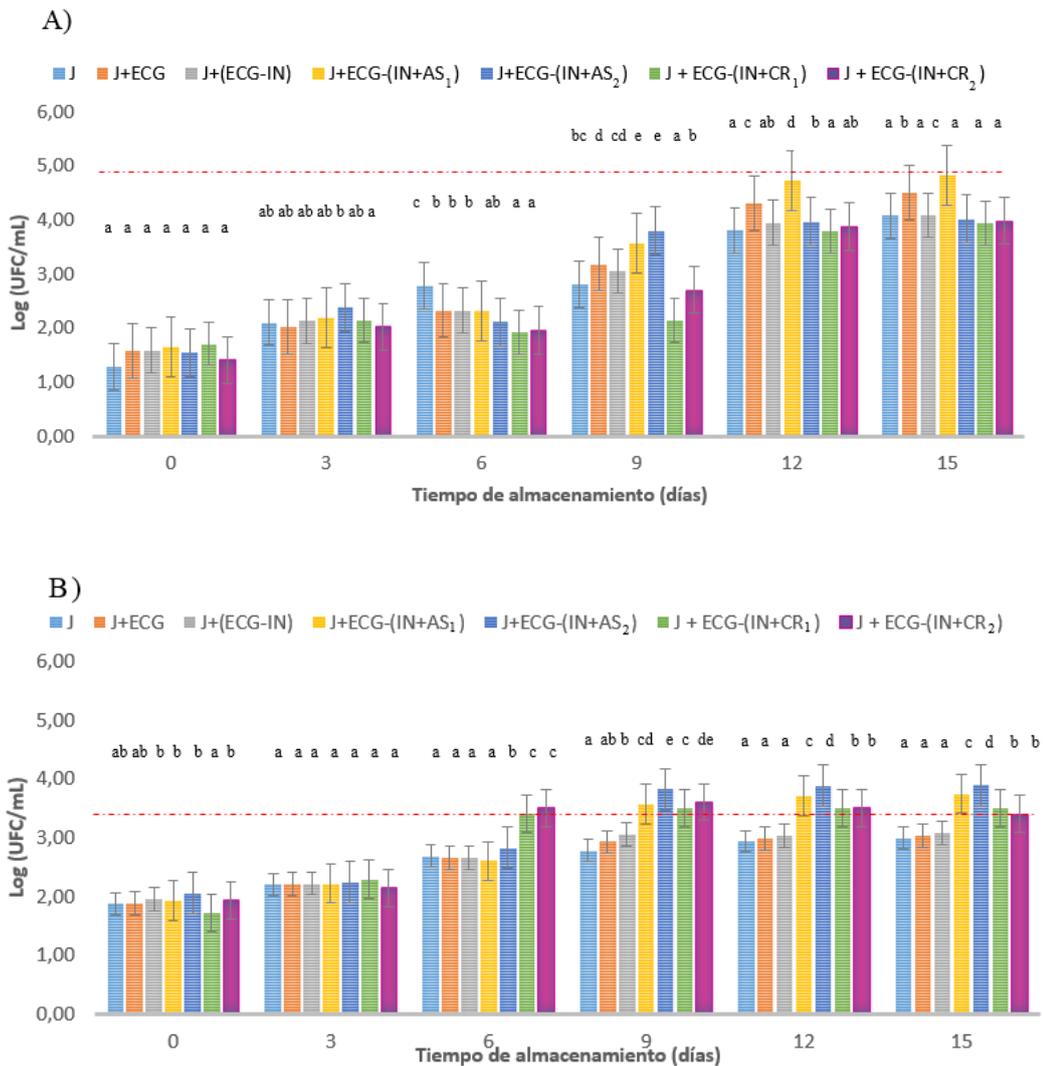


Figura 6. Recuento de microorganismos expresado como log (UFC/mL) en los días 0, 3, 6, 9, 12 y 15.

A). Recuento de microorganismos aeróbios mesófilos (RAM): jugo [J]; jugo con ECG sin encapsular [J+ECG]; jugo con micropartículas de IN [J+(ECG-IN)]; jugo con micropartículas de mezcla IN y AS: [J+ECG-(IN+AS₁)] y [J+ECG-(IN+AS₂)]; jugo con micropartículas de mezcla IN y CR: [J + ECG-(IN+CR₁)] y [J+ ECG-(IN+CR₂)].

B) Recuento de mohos y levaduras: jugo [J]; jugo con ECG sin encapsular [J+ECG]; jugo con micropartículas de IN [J+(ECG-IN)]; jugo con micropartículas de mezcla IN y AS: [J+ECG-(IN+AS₁)] y [J+ECG-(IN+AS₂)]; jugo con micropartículas de mezcla IN y CR: [J + ECG-(IN+CR₁)] y [J+ ECG-(IN+CR₂)].

El día 9, el RAM del jugo con ECG sin encapsular aumentó significativamente con respecto al jugo sin extracto. Lo anterior, se podría atribuir a que el efecto antimicrobiano del ECG en el jugo disminuiría su efectividad debido a la degradación de los polifenoles del ECG frente a las condiciones del medio (enzimas, pH y otros). Los jugos con micropartículas de IN-AS [J+ECG-(IN+AS₁)] y [J+ECG-(IN+AS₂)], alcanzaron recuentos significativamente mayores respecto de todos los otros sistemas. Lo anterior, se podría explicar debido al efecto del pH del jugo sobre la liberación de los polifenoles encapsulados. Robert et al. (2012) y García et al. (2013) reportaron que la liberación de ácido gálico desde micropartículas de inulina fue mayor a pH neutro (5,5) que a pH ácido (4,0). Por otra parte, el alginato de sodio es un polímero estable a pH ácido, mientras que en condiciones alcalinas se hincha y desintegra fácilmente liberando el compuesto encapsulado (Yoo et al., 2006). Además, se ha reportado que algunas bacterias producen alginato para autoencapsularse y protegerse del medio, disminuyendo de esta forma su mortalidad, por lo cual, el alginato de sodio se ha utilizado como método de inmovilización y/o protección para distintas bacterias (Stapper et al., 2004; Franklin et al., 2011; Sugumaran & Ponnusami, 2017). De acuerdo a estos antecedentes y considerando el pH del jugo de manzana (pH=4,0), se podría sugerir una menor liberación de ECG desde las micropartículas de IN-AS alcanzando mayores recuentos. En el caso de los jugos con micropartículas de IN-CR [J + ECG-(IN+CR₁)] y [J+ ECG-(IN+CR₂)], el menor recuento RAM, se podría explicar por la desestabilización de las carrageninas a pHs bajos, sugiriendo una liberación controlada del ECG, manteniendo un menor RAM. Robert et al. (2012) señalan que la liberación de un compuesto desde micropartículas dependería de la

naturaleza del agente encapsulante y del activo, así como también del tipo de alimento, los cuales determinarían la velocidad y mecanismo de liberación.

El día 12 todos los sistemas aumentaron el RAM respecto del día 9. El sistema [J+ECG-(IN+AS₁)] presentó un RAM significativamente mayor respecto de los otros sistemas, indicando que el ECG no se liberó en el jugo no ejerciendo su acción antimicrobiana. Los sistemas con IN-CR [J+ECG-(IN+CR₁)] y [J+ ECG-(IN+CR₂)] mostraron diferencias significativas sólo con el [J+ECG-(IN+AS₁)] y el jugo con ECG sin encapsular, por lo cual al día 12, las micropartículas con IN-CR liberaron gran parte del ECG al jugo. El mismo comportamiento se observó el día 15.

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 10⁵ UFC/mL de RAM, por lo que hasta el día 15, todos los sistemas se encuentran dentro de los límites reglamentarios (DTO. N° 977/96, 1997).

Para el recuento de mohos y levaduras (Figura 6B), los días cero y 3 se observó un comportamiento similar al descrito para RAM, no observándose diferencias significativas entre los sistemas.

Desde el día 6 en adelante no se observaron diferencias significativas entre el jugo sin ECG y el jugo con ECG sin encapsular. Además, el día 6, los sistemas [J+ECG-(IN+CR₁)] y [J+ ECG-(IN+CR₂)] presentaron recuentos significativamente mayores, respecto de los sistemas anteriores, contrariamente a lo observado el mismo día para RAM (figura 6A). Estos resultados podrían indicar que el ECG no tendría efecto o sería menos efectivo sobre mohos y levaduras. La actividad antifúngica del ECG sólo ha sido reportada frente a diferentes cepas *in vitro* (Sabbar et al., 2010; Sadeghian et

al., 2011). Además, se ha descrito la utilización de carragenina como medio de atrapamiento (inmovilización) del hongo *A. pullulans*, por lo que la carragenina podría actuar como agente protector para mohos y levaduras.

Desde el día 9 hasta el día 15, el [J+ECG-(IN+AS₁)] y [J+ECG-(IN+AS₂)], mostraron un aumento significativo en el recuento respecto de los otros sistemas, al igual que en el recuento de RAM (Figura 6A).

El Reglamento Sanitario de los Alimentos no establece límites de recuento de hongos y levaduras para el grupo de “Zumos, néctares y bebidas a base de frutas y verduras no pasteurizadas”. Si existe un límite establecido para el grupo “Frutas y verduras desecadas o deshidratadas” de 10³ UFC/mL tanto para hongos como levaduras.

De acuerdo a los resultados de este estudio se puede establecer que, los sistemas con IN-CR [J+ECG-(IN+CR₁)] y [J+ ECG-(IN+CR₂)] mejoraron la estabilidad microbiológica del jugo de manzana hasta el día 9, presentando RAM significativamente menores respecto a los otros sistemas dentro de los límites reglamentarios establecidos. Estos resultados se podrían atribuir a que la mezcla de agentes encapsulantes IN-CR permitiría controlar la liberación del ECG al jugo, por lo tanto, su efectividad permanecería en el tiempo. No obstante, para recuento de hongos y levaduras, estos sistemas presentaron recuentos significativamente mayores que los otros sistemas hasta el día 6, señalando que el ECG no tendría mayor efecto sobre este tipo de microorganismos.

Los sistemas de IN-AS, [J+ECG-(IN+AS₁)] y [J+ECG-(IN+AS₂)], alcanzaron RAM y recuento de hongos y levaduras significativamente mayores que los otros sistemas, debido a que el ECG no se liberó en los sistemas IN-AS.

CONCLUSIONES

- En la microencapsulación de ECG por secado por atomización, la temperatura de secado y la relación ECG/agente encapsulante tuvieron un efecto significativo sobre la eficiencia de encapsulación de punicalagina. Los altos valores de EE (sobre 87%) reflejan la interacción agente encapsulante-punicalagina en todos los sistemas de micropartículas estudiados.
- El tipo de biopolímero utilizado como agente encapsulante en su forma individual o en mezclas, tuvieron un efecto sobre la actividad antimicrobiana de polifenoles encapsulados en el jugo de manzana. En particular, la adición de micropartículas de ECG encapsulado con mezcla inulina-carragenina permitió aumentar la estabilidad microbiológica del jugo de manzana, principalmente controlando el crecimiento de bacterias mesófilas. Sin embargo, el ECG no presentó efecto sobre el recuento de hongos y levaduras en el jugo.
- En este contexto, se sugiere evaluar el efecto conjunto de estas micropartículas junto a otros métodos de conservación sobre el recuento de microorganismos.

BIBLIOGRAFIA

Abid, M., Yaich, H., Cheikhrouhou, S., Khemakhem, I., Bouaziz, M., Attia, H., & Ayadi, M. A. (2017). Antioxidant properties and phenolic profile characterization by LC–MS/MS of selected Tunisian pomegranate peels. *Journal of Food Science and Technology*, 54, 2890-2901.

Aghbashlo, M., Mobli, H., Madadlou, A., & Rafiee, S. (2013). Fish oil microencapsulation as influenced by spray dryer operational variables. *International Journal of Food Science and Technology*, 48, 1707-1713.

Agourram, A., Ghirardello, D., Rantsiou, K., Zeppa, G., Belviso, S., Romane, A., et al. (2013). Phenolic content, antioxidant potential and antimicrobial activities of fruit and vegetable by-product extracts. *International Journal of Food Properties*, 16, 1092-1104.

Ahn, J., Kim, Y.P., Seo, E., Choi, Y. & Kim, H.S. (2008). Optimization of microencapsulation of seed oil by response surface methodology. *Food Chemistry*, 107, 327-334.

Akhtar, S., Ismail, T., Fraternali, D., & Sestili, P. (2015). Pomegranate peel and peel extracts: Chemistry and food features. *Food Chemistry*, 174, 417-425.

Al-Zoreky, N. S. (2009). Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. *International Journal of Food Microbiology*, 134, 244-248.

Alamilla-Beltran, L., Chanona-Perez, J. J., Jimenez-Aparicio, A. R., & Gutierrez-Lopez, G. F. (2005). Description of morphological changes of particles along spray drying. *Journal of Food Engineering*, 67, 179-184.

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.

Anaya-Esparza, L. M., Velázquez-Estrada, R. M., Roig, A. X., García-Galindo, H. S., Sayago-Ayerdi, S. G., & Montalvo-González, E. (2017). Thermosonication: An alternative processing for fruit and vegetable juices. *Trends in Food Science & Technology*, 61, 26-37.

Aneja, K. R., Dhiman, R., Aggarwal, N. K., & Aneja, A. (2014a). Emerging preservation techniques for controlling spoilage and pathogenic microorganisms in fruit juices. *International Journal of Microbiology*, 2014, 1-14.

Aneja, K.R., Dhiman, R., Aggarwal, N.K., Kumar, V., & Kaur, M. (2014b). Microbes associated with freshly prepared juices of citrus and carrots. *International Journal of Food Science*. Article ID 408085.

AOAC. (1996). Official methods of analysis of AOAC International (16th ed.), Gaithersburg, USA.

Bartkowiak, A., & Hunkeler, D. (2001). Carrageenan-oligochitosan microcapsules: Optimization of the formation process. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 21, 285-298.

Baysal, A. H. (2018). Short-wave ultraviolet light inactivation of pathogens in fruit juices. En *Fruit Juices* (pp. 463-510). Elsevier.

Beirao da Costa, S., Duarte, C., Bourbon, A.I., Pinheiro, A.C., Serra, A.T., Moldao Martins, M., Nunes Januario. M.I., Vicente, A., Delgadillo, I., Duarte, C. & Beirao da Costa, M.I. (2012). Effect of the matrix system in the delivery and in vitro bioactivity of microencapsulated Oregano essential oil. *Journal of Food Engineering* 110, 190-199.

Berizi, E., Hosseinzadeha, S., Shekarforousha, 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.

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, science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. *Microbiology*, 3, 1157-1166.

Bicudo, M. O. P., J6, J., Oliveira, G. A. D., Chaimsohn, F. P., Sierakowski, M. R., Freitas, R. A. D., & Ribani, R. H. (2015). Microencapsulation of juçara (*Euterpe edulis* M.) pulp by spray drying using different carriers and drying temperatures. *Drying Technology*, 33, 153-161.

Biedrzycka, E., & Bieleka, M. (2004). Prebiotic effectiveness of fructans of different degrees of polymerization. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 170-175.

Bustamante, A., Hinojosa, A., Robert, P., & Escalona, V. (2017). Extraction and microencapsulation of bioactive compounds from pomegranate (*Punica granatum* var. Wonderful) residues. *International Journal of Food Science and Technology*, 52, 1452-1462.

Cam, M., & Hisil, Y. (2010). Pressurised water extraction of polyphenols from pomegranate peels. *Food Chemistry*, 123, 878-885.

- Cam, M., Icyer, N.C., & Erdogan, F. (2014). Pomegranate peel phenolics: Microencapsulation, storage stability and potential ingredient for functional food development. *LWT - Food Science and Technology*, 55, 117-123.
- Dahham, S.S, Ali, M.N, Tabassum, H., & Khan, M. (2010). Studies on Antibacterial and antifungal activity of oomegranate (*Punica granatum L.*) *American-Eurasian Journal of Agricultural. & Enviromental. Sciences.* 9, 273-281.
- Desai, H., & Park, H. (2005). Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology*, 23, 1361-1394.
- 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, 555-560.
- De Vos, P., Faas, M. M., Spasojevic, M., & Sikkema, J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International dairy journal*, 20, 292-302.
- Dey, D., Debnath, S., Hazra, S., Ghosh, S., Ray, R., & Hazra, B. (2012). Pomegranate pericarp extract enhances the antibacterial activity of ciprofloxacin against extendedspectrum β -lactamase (ESBL) and metallo- β -lactamase (MBL) producing Gram-negative bacilli. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 4302-4309.
- Dias, D.R., Botrel, D.A., De Barros Fernandes, R.V., & Borges, S.V. (2017). Encapsulation as a tool for bioprocessing of functional foods. *Current Opinion in Food Science*, 13, 31-37.
- Elfalleh, W., Hannachi, H., Tlili, N., Yahia, Y., Nasri, N., & Ferchichi, A. (2012). Total phenolic contents and antioxidant activities of pomegranate peel, seed, leaf and flower. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6, 4724-4730.
- Endo, E. H., Ueda-Nakamura, T., Nakamura, C. V., & Filho, B. (2012). Activity of spray-dried microparticles containing pomegranate peel extract against *Candida albicans*. *Molecules*, 17, 10094-10107.
- Fang, Z., & Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols—a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(10), 510-523.
- Fischer, U. A., Carle, R., & Kammerer, D. R. (2011). Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum L.*) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MS(n). *Food chemistry*, 127, 807-821.

- Franklin, M. J., Nivens, D. E., Weadge, J. T., & Lynne Howell, P. (2011). Biosynthesis of the pseudomonas aeruginosa extracellular polysaccharides, alginate, Pel, and Psl. *Frontiers in Microbiology*, 2, 1-16.
- García, P., Vega, J., Jiménez, P., Santos, J., & Robert P. (2013). Alpha-tocopherol microspheres with cross-linked and acetylated inulin and their release profile in a hydrophilic model. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115, 811-819.
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40, 1107-1121.
- Glazer, I., Segula, M., Prosper, M., Igal, B.I., Doron, H., Zohar, K., & Rachel, A. (2012). Partial Identification of Antifungal Compounds from *Punica Granatum* Peel Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 4841-4848.
- González, E., Gómez-Caravaca, A. M., Giménez, B., Cebrián, R., Maqueda, M., Martínez-Férez, A., Segura-Carretero, A., & Robert, P. (2019). Evolution of the phenolic compounds profile of olive leaf extract encapsulated by spray-drying during in vitro gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 279, 40-48.
- González, E., Gómez-Caravaca, A. M., Giménez, B., Cebrián, R., Maqueda, M., Parada, J., Robert, P. (2020). Role of maltodextrin and inulin as encapsulating agents on the protection of oleuropein during in vitro gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 310, 125976
- Gouin, S. (2004). Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 330-347.
- Goula, A.M., & Lazarides, H. (2015). Integrated processes can turn industrial foodwaste into valuable food by products and/or ingredients: The cases of olive mill and pomegranate wastes. *Journal of Food Engineering*, 167, 45-50.
- 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.
- Gyawali, R., & Ibrahim, S.A. (2014). Natural products as antimicrobial agents. *Food Control*, 46, 412-429.
- Hayashi, H. (1989). Drying technologies of foods - their history and future. *Drying Technology*, 7, 315-369.

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, 66-72.

Instituto Nacional de Normalización, INN. (2002a). Determinación de Microorganismos Aeróbicos Mesófilos. Chile (Norma Chilena Oficial 2659).

Instituto Nacional de Normalización, INN. (2002b). Determinación de Hongos y Levaduras. Chile (Norma Chilena Oficial 2734).

Jafari, S.M., Assadpoor, E., He, Y., & Bhandari, B. (2008). Encapsulation efficiency of Food flavours and oils during spray drying. *Drying. Technology*. 26, 816-835.

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 and Emerging Technologies*, 31, 204-215.

Kaderides, K., & Goula, A.M. (2019). Encapsulation of pomegranate peel extract with a new carrier material from orange juice by-products. *Journal of Food Engineering*, 253, 1-19.

Kaderides, K., Mourtzinis, I., & Goula, A. M. (2020). Stability of pomegranate peel polyphenols encapsulated in orange juice industry by-product and their incorporation in cookies. *Food Chemistry*, 310, 125849.

Kam, A., Li, K. M., Razmovski-Naumovski, V., Nammi, S., Chan, K., & Li, G. Q. (2013). Variability of the polyphenolic content and antioxidant capacity of methanolic extracts of pomegranate peel. *Natural Product Communications*, 8, 707-710.

Kanatt, S., 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, 216-222.

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, 2240-2247.

Khalil, A. A., Khan, M. R., Shabbir, M. A., & Rahman, K. U. (2017). Comparison of antioxidative potential and punicalagin content of pomegranate peels. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 27, 522-527.

Khalil, A. A., Khan, M. R., Shabbir, M. A., & Rahman, K. U. (2018). In vitro antioxidant activity and punicalagin content quantification of pomegranate peel

obtained as agro-waste after juice extraction. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 55, 197-201.

Khan, J.K., & Haneef, S. (2011). Antibacterial properties of *Punica granatum* peels. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 2, 23-27.

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.

Krishnaiah, D., Sarbatly, R., and Nithyanandam, R. (2012). Microencapsulation of *Morinda citrifolia* L. extract by spray-drying. *Chemical Engineering Research and Design*, 90, 622-632.

Kushwaha, S. C., Bera, M. B., & Kumar, P. (2015). Extraction of polyphenols from fresh pomegranate peel using response surface methodology. *Asian Journal of Chemistry*, 27 (12), 4320-4326.

Li, L., Ni, R., Shao, Y., & Mao, S. (2014). Carrageenan and its applications in drug delivery. *Carbohydrate Polymers*, 103(1), 1-11.

Lima, A.A., Tribst, A., De Souza Sant'ana, A., & DeMassaguer P.R. (2009). Review: microbiological quality and safety of fruit juices past, present and future perspectives. *Microbiology of fruit juices. Critical Reviews in Microbiology*, 35, 310-339.

Madene, A., Jacquot, M., Scher, J. & Desobry, S. (2006). Flavour encapsulation and controlled release-a review. *International Journal of Food Sciences and Technology* 41, 1-21.

Malviya, S., Arvind, J., & Hettiarachchy, N. (2014). Antioxidant and antibacterial potential of pomegranate peel extracts. *Journal of Food Science and Technology*, 51, 4132-4137.

Mariangel, E., Reyes-Diaz, M., Lobos, W., Bensch, E., Schalchli, H., & Ibarra, P. (2013). The antioxidant properties of calafate (*Berberis microphylla*) fruits from four different locations in southern Chile. *Cien. Inv. Agr.* 40 (1): 161-170. *Ciencia e Investigación Agraria*, 40, 161-170.

Martínez-González, N. E., & Castillo, A. (2016). Safety of fresh-squeezed juices. In *Food Hygiene and Toxicology in Ready-to-Eat Foods* (pp. 183-208). Elsevier Inc.

Mayuri Omae, J., Akie, P., Misturini, L., Siqueira dos Santos, S., Moser, C., Scaramal, G., & De Cassia Bergamasco, R. (2017). Beetroot extract encapsulated

in inulin: Storage stability and incorporation in sorbet. *Chemical Engineering Transactions*, 57, 1843-1848.

McClements, J. (2012). Requirements for food ingredient and nutraceutical delivery systems. In *Encapsulation technologies and delivery systems for foods ingredients and nutraceuticals*. Garti, N and McClements J, USA, Woodhead Publishing, 3-18.

Mohammed, N.K., Tan, C.P., Manap, Y.A., Alhelli, A.M., & Hussin, A.S.M., (2017). Process conditions of spray drying microencapsulation of Nigella sativa oil. *Powder Technology*, 315, 1-14.

Molva, C., & Baysal, A.H. (2015). Antimicrobial activity of grape seed extract on *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 3922 vegetative cells and spores in apple juice. *LWT - Food Science and Technology*, 60, 238-245.

Mosqueda-Melgar, J., Raybaudi-Massilia, R.M., & Martín-Belloso, O. (2012). Microbiological shelf life and sensory evaluation of fruit juices treated by high-intensity pulsed electric fields and antimicrobials. *Food and Bioprocess Technology*, 90, 205-214.

Moure, A. S. A., Cruz, J. M., Franco, D., Dominguez, J. M., Sineiro, J., Dominguez, H., & Parajoa, C, J. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72, 145-171.

Murua-Pagola, B., Beristain-Gevara, C.I., & Martinez-Bustos, F. (2009). Preparation of starch derivatives using reactive extrusion and evaluation of modified starches as shell materials for encapsulation of flavoring agents by spray drying. *Journal of Food Engineering*, 91, 380-386.

Mushtaq, M., Sultana, B., Anwar, F., Adnan, A., & Rizvi, S. (2015). Enzyme-assisted supercritical fluid extraction of phenolic antioxidant from pomegranate peel. *The Journal of Supercritical Fluids*, 104, 122-131.

Namiesnik, J., Vearasilp, K., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Ham, K. S., Kang, S. G., Park, Y., Arancibia-Avila, P., Toledo, F., & Gorinstein, S. (2014). Comparative assessment of two extraction procedures for determination of bioactive compounds in some berries used for daily food consumption. *International Journal of Food Science & Technology*, 49, 337-346.

Negi, P.S. (2012). Plants extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. *International Journal of Food Microbiology*, 156, 7-17.

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*, 46, 360-365.

Nogueira, R. I., Santiago, M. C. A., Paim, D. R. S. F., Santos, L. F., Carlos, A. L. M., Wilberg, V. C., & Freitas, S. P. (2014). Aqueous Extract of Pomegranate Peels (*Punica granatum*) encapsulated by spray drying. *19th International Drying Symposium (IDS 2014)*

Pandey, A., & Negi, P. S. (2018). Use of Natural Preservatives for Shelf Life Extension of Fruit Juices. In *Fruit Juices*. Elsevier, 571-605.

Paulo, F., & Santos, L. (2017). Design of experiments for microencapsulation applications: A review. *Materials Science and Engineering*, 77, 1327-1340.

Pertuzatti, P. B., Barcia, M. T., Rodrigues, D., da Cruz, P. N., Hermosín-Gutiérrez, I., Smith, R., & Godoy, H. T. (2014). Antioxidant activity of hydrophilic and lipophilic extracts of Brazilian blueberries. *Food chemistry*, 164, 81-88.

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.

Raybaudi-Massilia, R.M., Mosqueda-Melgar, J., & Martín-Belloso, O. (2006). Antimicrobial Activity of Essential Oils on Salmonella Enteritidis, Escherichia coli, and Listeria innocua in Fruit Juices. *Journal of Food Protection*, 69, 1579-1586.

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, 157-180.

Razzaghi-Abyaneh, & M., Rai, M. (2013). Antifungal metabolites from plants, Antifungal Metabolites from Plants. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 447-459.

Re, I. (1998). Microencapsulation by spray drying. *Drying Technology* 16, 195-1236.

Reddy, M., Gupta, S.K., 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, 461-467.

Reglamento Sanitario de los Alimentos. [en línea] <http://web.minsal.cl/sites/default/files/2013RSADECRETO_977_96_actualizado2013.pdf>

- Robert, P., Garcia, P., Reyes, N., Chavez, J. & Santos, J. (2012). Acetylated starch and inulin as encapsulating agents of gallic acid and their release behaviour in a hydrophilic system. *Food Chemistry* 134, 1-8.
- Robert, P., Garcia, P., & Fredes, C. (2017). Drying and preservation of polyphenols. In *Advances in technologies for producing food-relevant polyphenols* (pp. 281-302). USA: CRC Press/Taylor and Francis Group.
- Rochelle, A., Sardi, J., Freires, I.A., Galvão, L.C., Lazarini, J.G., De Alencar, S.M., & Rosalen, P.L. (2016). The anti-biofilm potential of commonly discarded agro-industrial residues against opportunistic pathogens. *Industrial Crops and Products*, 87, 150-160.
- Rongai, D., Pulcini, P., Di Lernia, G., Nota, P., Preka, P., & Milano, F. (2019). Punicalagin content and antifungal activity of different pomegranate (*Punica granatum* L.) genotypes. *Horticulturae*, 5, 1-9.
- Ronkart, S. N., Deroanne, C., Paquot, M., Fougnyes, C., Lambrechts, J. C., & Blecker, C.S. (2007). Characterization of the physical state of spray-dried inulin. *Food Biophysics*, 2, 83-92.
- Rubilar, M., Jara, C., Poo, Y., Acevedo, F., Gutierrez, C., Sineiro, J., & Shene, C. (2011). Extracts of Maqui (*Aristotelia chilensis*) and Murta (*Ugni molinae Turcz.*): sources of antioxidant compounds and α -Glucosidase/ α -Amylase inhibitors. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59, 1630-1637.
- Rupasinghe, H. P. V & Yu, L. (2012). Emerging Preservation Methods for Fruit Juices and Beverages. Food Additive, Yehia El-Samragy, IntechOpen
- Saad, H., Charrier-El Bouhtoury, F., Pizzi, A., Rode, K., Charrier, B., & Ayed, N. (2012). Characterization of pomegranate peels tannin extractives. *Industrial Crops and Products*, 40, 239-246.
- Sabbar, S., Naiman, M., Tabassum, H., & Khan, M. (2010). Studies on Antibacterial and Antifungal activity of Pomegranate (*Punica granatum* L.) *American-Eurasian J.Agric & Envirom. Sci.*, 9, 273-281.
- Sadeghian, A., Ghorbani, A., Nejad, A.M, & Rakhshandeh, H. (2011). Antimicrobial activity of aqueous and methanolic extracts of pomegranate fruit skin. *Avicenna Journal of Phyto Medicine*, 1, 67-73.
- Saenz, C., Tapia, S., Chavez, J. & Robert, P. (2009). Microencapsulation by spray drying of active compounds from cactus pear (*Opuntia Ficus-indica*). *Food Chemistry* 114, 616-622.

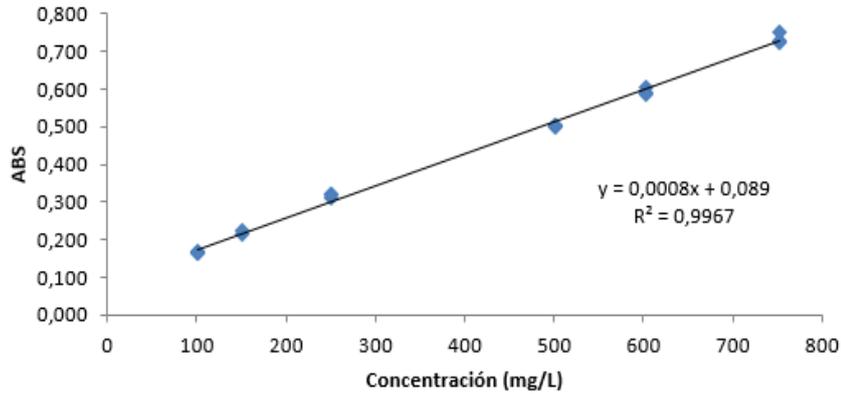
- Santhirasegaram, V., Razali, Z., & Somasundram, C. (2016). Safety improvement of fruit juices by novel thermal and nonthermal processing. En *Food Hygiene and Toxicology in Ready-to-Eat Foods* (pp. 209–223). Elsevier.
- Sedayu, B. B., Cran, M. J., & Bigger, S. W. (2019). A Review of Property Enhancement Techniques for Carrageenan-based Films and Coatings. *Carbohydrate Polymers*, 216, 287-302.
- Sepúlveda, E., Sáenz, C., Peña, Á., Robert, P., Bartolomé, B., & Gómez-Cordovés, C. (2010). Influence of the Genotype on the Anthocyanin Composition, Antioxidant Capacity and color of Chilean Pomegranate (*Punica granatum L.*) Juices. *Chilean journal of agricultural research*, 70, 50-57.
- Sharayei, P., Azarpazhooh, E., & Ramaswamy, H. S. (2019). Effect of microencapsulation on antioxidant and antifungal properties of aqueous extract of pomegranate peel. *Journal of Food Science and Technology*, 57, 723-733.
- Shishir, M.R.I, & Chen, W. (2017). Trends of spray drying: A critical review on drying of fruit and vegetables juices. *Trends in Food Science & Technology* 65, 49-67.
- Singh, B., Singh, J. P., Kaur, A., & Singh, N. (2019). Antimicrobial potential of pomegranate peel: a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 54, 959-965.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
- Sospedra, I., Rubert, J., Soriano, J.M., & Mañes, J. (2012). Incidence of microorganisms from fresh orange juice processed by squeezing machines. *Food Control*, 23, 282-285.
- Stapper, A. P., Narasimhan, G., Ohman, D. E., Barakat, J., Hentzer, M., Molin, S., Kharazmi, A., Høiby, N., & Mathee, K. (2004). Alginate production affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development and architecture, but is not essential for biofilm formation. *Journal of medical microbiology*, 53, 679-690.
- Sugumaran, K.R., & Ponnusami, V. (2017). Review on production, downstream processing and characterization of microbial pullulan. *Carbohydrate Polymers*, 173, 573-591.
- Tabaraki, R., Heidarizadi, E., & Benvidi, A. (2012). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (*Punica granatum L.*) peel antioxidants by response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, 98, 16-23.

- 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, 252-256.
- Tomadoni, B., Cassani, L., Moreira, M. R., & Ponce, A. (2015). Efficacy of vanillin and geraniol in reducing *Escherichia coli* O157:H7 on strawberry juice. *LWT - Food Science and Technology*, 64, 554-557.
- Tontul, I., & Topuz, A. (2017). Spray-drying of fruit and vegetable juices: Effect of drying conditions on the product yield and physical properties. *Trends in Food Science and Technology*, 63, 91-102.
- Tournas, V.H., Heeres, J., & Burgess, L. (2006). Moulds and yeasts in fruit salads and fruit juices. *Food Microbiology*, 23, 684-688.
- Tripoli, E., Giammanco, M., Tabacchi, G., Di Majo, D., Giammanco, S., & La Guardia, M. (2005). The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutrition research reviews*, 18(1), 98-112
- Tserennadmid, R., Takó, M., Galgóczy, L., Papp, T., Pesti, M., Vágvölgyi, C., Almássy, K., & Krisch, J. (2011). Anti-yeast activities of some essential oils in growth medium, fruit juices and milk. *Int. J. Food Microbiol*, 144, 480-486.
- Tyagi, A.K., Gottardi, D., Malik, A., & Guerzoni, M.E. (2014). Chemical composition, in vitro anti-yeast activity and fruit juice preservation potential of lemon grass oil. *LWT - Food Science and Technology*, 57, 731-737.
- Urzúa, C., González, E., Dueik, V., Bouchon, P., Giménez, B., & Robert, P. (2017). Olive leaves extract encapsulated by spray-drying in vacuum fried starch–gluten doughs. *Food and Bioproducts Processing*, 106, 171-180.
- Van de Velde, F. (2008). Structure and function of hybrid carrageenans. *Food Hydrocolloids*, 22(5), 727-734.
- Viuda-Martos, M., Fernández-López, J., & Pérez-Alvarez, J. (2010). Pomegranate and its Many Functional Components as Related to Human Health: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 635-654.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., Sendra, E., Sayas-Barbera, E. & Pérez-Alvarez, J.A. (2011). Antioxidant properties of pomegranate (*Punica granatum* L.) bagasses obtained as co-product in the juice extraction. *Food Research International*, 44, 1217-1223.
- 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

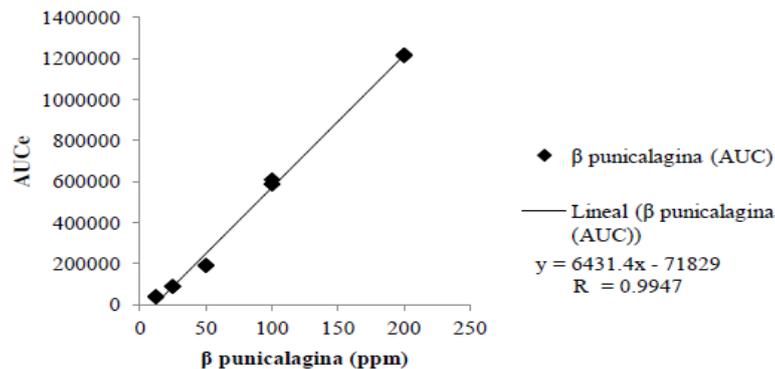
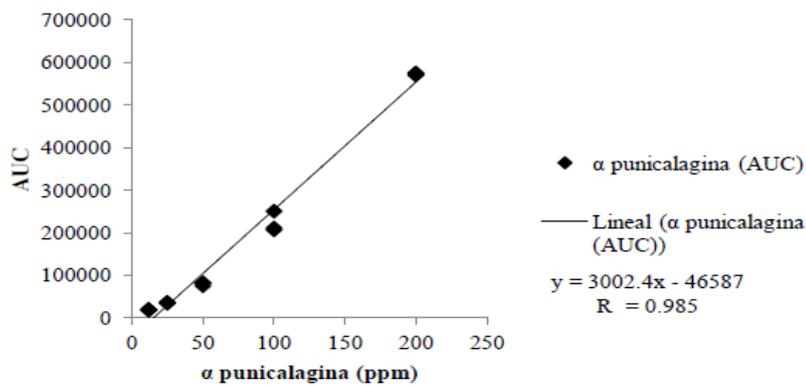
- Kentucky and Enteritidis) isolated from chicken meat and phenolic composition of its peel extract. *International Journal of Food Microbiology*, 241, 123-131.
- West, T. P. (2000). Exopolysaccharide production by entrapped cells of the fungus *Aureobasidium pullulans* ATCC 201253. *Journal of Basic Microbiology*, 40, 397-401.
- Witthuhn, R.C., Duvenage, D., & Gouws, P.A. (2007). Evaluation of different growth media for the recovery of the species of *Alicyclobacillus*. *Letters in Applied Microbiology*, 45, 224-229.
- Wu, Y., Zou, L., Mao, J., Huang, J., & Liu, S., (2014). Stability and encapsulation efficiency of sulforaphane microencapsulated by spray drying. *Carbohydr. Polym.*, 102, 497-503.
- 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.
- Yan, L., Zhou, X., Shi, L., Shalimu, D., Ma, C., & Liu, Y. (2017). Phenolic profiles and antioxidant activities of six Chinese pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. *International Journal of Food Properties*, 20, S94-S107.
- Yoo, S. H., Song, Y. B., Chang, P. S., & Lee, H. G. (2006). Microencapsulation of α -tocopherol using sodium alginate and its controlled release properties. *International journal of biological macromolecules*, 38, 25-30.
- Zam, W., Bashour, G., Abdelwahed, W., & Khayata, W. (2013). Formulation and in-vitro release of pomegranate peels' polyphenols microbeads. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 4, 3536-3540.
- 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, 741-748.
- Zam, W. (2016). Fortification of bovine milk with natural polyphenols extracted from pomegranate peels. *Progress in Nutrition*, 18, 135-139.

ANEXOS

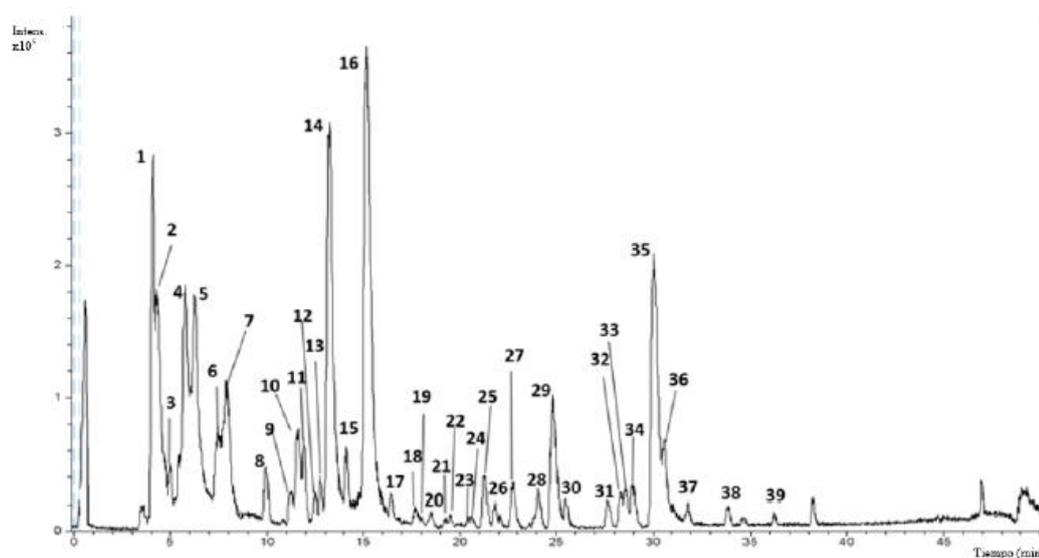
Anexo 1. Curva de calibración utilizada para caracterizar el contenido de polifenoles totales en el ECG.



Anexo 2. Curva de calibración utilizada para cuantificar el contenido total de PG.



Anexo 3. Perfil cromatográfico de compuestos polifenólicos de extracto de cáscara de granada por HPLC-DAD



- (1) azúcar, (2) azúcar, (3) azúcar, (4) isómero de ácido clorogénico, (5) isómero de ácido clorogénico, (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) galoil-HHDP-hexosa, (26) ácido carboxílico de brevifolina, (27) desconocido 5, (28) glucopiranosido de galato de metilo, (29) isómero de hexóxido del ácido elágico 1, (30) desconocido 6, (31) desconocido 7, (32) pentósido del ácido elágico, (33) isómero del hexóxido del ácido elágico, (34) ácido elágico desoxihex, (35) ácido elágico, (36) kaempferol 3-cumaroilglucósido, (37) glucósido de luteolina, (38) luteolina arabinosa, (39) luteolina.

Anexo 4. Optimización sistema de micropartículas ECG-IN

Tabla 8. Análisis de varianza para la variable respuesta Eficiencia de Encapsulación del sistema de micropartículas ECG-IN

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-p
A:Relación	61,9847	1	61.9847	171.39	0.0010
B:Temperatura	41,5195	1	41.5195	114.80	0.0017
AB	7,15562	1	7.15562	19.79	0.0211
BB	7,82917	1	7.82917	21.65	0.0187
Lack-of-fit	3,60009	4	0.900022	2.49	0.2399
Error total	1,085	3	0.361667		
Total (corr.)	123,174	11			

R-cuadrada = **96.1964** por ciento

R-cuadrada (ajustado por G.L) = **94.0229** por ciento

Error estándar del est. = 0.601387

Error absoluto medio = 0.541653

Estadístico Durbin-Watson = 2.28577 (P=0.7655)

Autocorrelación residual de Lag 1 residual = -0.252464

Optimizar respuesta

Objetivo: maximizar Eficiencia de Encapsulación%

Valor óptimo: 95, 6926

Factores establecidos y óptimo ECG-IN

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
relación	0.342499	2.1575	2.1575
temperatura	112.65	197.35	165.731