

**Evaluación del efecto antifúngico *In Vitro* del  
aceite esencial de hoja de canela  
(*Cinnamomum zeylanicum*) puro y  
microencapsulado**

**Sandra Antonieta Narváez Guerrero**

**Honduras**  
Diciembre, 2006

ZAMORANO  
CARRERA DE AGROINDUSTRIA

**Evaluación del efecto antifúngico *In Vitro* del  
aceite esencial de hoja de canela  
(*Cinnamomum zeylanicum*) puro y  
microencapsulado**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar  
al título de Ingeniera en Agroindustria en el Grado  
Académico de Licenciatura

Presentado por:

**Sandra Antonieta Narváez Guerrero**

**Honduras**  
Diciembre, 2006

El autor concede a Zamorano permiso  
para reproducir y distribuir copias de este  
trabajo para fines educativos. Para otras personas  
físicas o jurídicas se reservan los derechos de autor.

---

Sandra Antonieta Narváez Guerrero

**Honduras**  
Diciembre, 2006

**Evaluación del efecto antifúngico *In Vitro* del aceite esencial de hoja de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) puro y microencapsulado**

Presentado por:

Sandra Antonieta Narváez Guerrero

Aprobado:

---

Wilfredo Domínguez, M.Sc.  
Asesor Principal

---

Raúl Espinal, Ph.D.  
Director  
Carrera de Agroindustria

---

Gustavo A. González-Aguilar, Ph. D.  
Asesor Principal Externo  
CIAD, México

---

George Pilz, Ph.D.  
Decano Académico

---

Francisco J. Bueso, Ph. D.  
Asesor

---

Kenneth L. Hoadley, D.B.A.  
Rector

---

J. Fernando Ayala-Zavala, M.Sc.  
Asesor Externo  
CIAD, México

## **DEDICATORIA**

A mi padre Luís Edison a mi madre Gloria Antonieta por brindarme su apoyo incondicional y enseñarme que con amor, paciencia y trabajo se puede realizar todo lo que uno desea.

A mis hermanas Diana Paulina, Estefanía Elizabeth, María Alejandra por ser partícipes de los mejores momentos de mi vida, brindarme sus consejos y amor incondicional.

A toda mi familia y en especial a mi abuela Erminda del Rosario por demostrarme con el ejemplo la razón de vivir, enseñarme a luchar por mis ideales y entregarme su amor absoluto.

A mis amigas y amigos por compartir conmigo momentos inolvidables y brindarme sus consejos, lealtad y cariño en cada instante.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios y la Virgen María por ser guías poderosas que iluminan mi vida.

A mi padre Luís Edison por ser un hombre de grandes valores y sobre todo humilde que con el ejemplo me ha demostrado como luchar en la vida y brindarme apoyo, confianza, ternura y amor absoluto.

A mi madre Gloria Antonieta por ser la mujer luchadora, trabajadora, fuerte pero de la mismo forma bondadosa y dulce que se ha sacrificado para enseñarme con paciencia y amor como superarme en la vida.

A mis hermanas Diana, Estefanía y María Alejandra por ser pacientes y enseñarme a distinguir los pequeños detalles de la vida.

A mis primos Patricio, Juan y Darío por sus consejos, apoyo y ayuda en cada momento.

A mis amigas y amigos por permitirme ser parte de sus vidas, brindarme sus valiosos consejos y compartir momentos llenos de felicidad y nostalgia.

A mis profesores de la carrera de Agroindustria por su apoyo y enseñarme a ser una buena profesional.

A mis asesores por su ayuda, tiempo, paciencia, apoyo y sobre todo su amistad.

A Fernando Ayala-Zabala por su apoyo y sincera amistad demostrada desde el principio.

Al personal del Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Vegetal y al Laboratorio de Productos Vegetales Frescos Cortados por darme la oportunidad de aprender, tener su apoyo y amistad incondicional.

A todas aquellas personas que me brindaron su amistad y apoyo en cada momento.

## **AGRADECIMIENTO A PATROCINADORES**

A mis padres por su gran sacrificio y brindarme una valiosa oportunidad.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, AC) Localizado en Hermosillo, Sonora, México, por ofrecerme la manera para desarrollar la presente investigación. En especial al Laboratorio de Productos Vegetales Frescos Cortados ubicado dentro de la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal. Al Doctor Gustavo A. González-Aguilar y al M.Sc J. Fernando Ayala-Zavala por recibirme amablemente dentro de su grupo de trabajo y brindarme la ayuda física y moral para el desarrollo satisfactorio de esta tesis.

## RESUMEN

Narváez, S. 2006. Evaluación del efecto antifúngico *In Vitro* del aceite esencial de hoja de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) puro y microencapsulado. Proyecto Especial de Graduación del Programa de Ingeniería en Agroindustria. Zamorano, Honduras. 28p.

En la actualidad existe una gran tendencia a consumir alimentos saludables libres de químicos que afectan al consumidor. Una alternativa natural son los aceites esenciales que se han investigado por sus propiedades insecticidas, fungiestáticas, antibacterianas y medicinales. Este estudio se realizó en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, (CIAD) A.C. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto antifúngico *In Vitro* del aceite esencial de hoja de canela puro y microencapsulado en  $\beta$ -ciclodextrina contra *Alternaria alternata* y *Botrytis cinerea*. Se elaboró y comprobó, a través de espectrofotometría en IR, la formación de complejos entre el aceite y  $\beta$ -ciclodextrina. Los complejos se formularon con las siguientes proporciones: 4:96, 8:92, 12:88 y 16:84. Se empleó cromatografía de gases para determinar la concentración de eugenol, compuesto antimicrobial del aceite. Se realizaron ensayos para medir la actividad antifúngica del aceite puro y microencapsulado. Finalmente, se empleó el Programa SAS<sup>®</sup> para el análisis estadístico de los datos mediante una separación de medias DUNCAN con un nivel de significancia ( $\alpha=0.05$ ). El estudio de espectrofotometría sugiere la formación del complejo aceite:  $\beta$ -ciclodextrina. Se encontró que el porcentaje de eugenol en el aceite esencial puro fue de 78% p/p. Para el caso de los complejos, las proporciones de 16:84 y 12:88 presentaron un contenido más alto de eugenol (4.99 y 4.39%, respectivamente) que los tratamientos 8:92 y 4:96 ( $P<0.05$ ). Con relación al crecimiento micelial, resultó ser significativamente mayor la inhibición del aceite puro comparado con el complejo ( $P<0.05$ ), sin embargo, la capacidad antifúngica del aceite microencapsulado se mantuvo. Adicionalmente, se esperaba que la microencapsulación permitiera la liberación lenta del aceite para lograr un efecto residual. Por otro lado, el aceite puro y los complejos fueron más eficaces en inhibir el crecimiento de *Botrytis cinerea* comparado con *Alternaria alternata* ( $P<0.05$ ).

Palabras clave:  $\beta$ -ciclodextrina, *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, espectrofotometría en IR, Cromatografía de gases, eugenol.

---

Wilfredo Domínguez, M.Sc.  
Asesor Principal



## CONTENIDO

	Portadilla.....	i
	Autoría .....	ii
	Página de firmas.....	iii
	Dedicatoria.....	iv
	Agradecimientos .....	v
	Agradecimiento a patrocinadores.....	vi
	Resumen.....	vii
	Contenido.....	viii
	Índice de Cuadros .....	x
	Índice de Figuras.....	xi
	Índice de Ecuación.....	xii
	Índice de Anexos .....	xiii
1	<b>REVISIÓN DE LITERATURA .....</b>	<b>1</b>
1.1	CANELA .....	1
1.1.1	Actividad antifúngica del aceite de canela .....	1
1.2	CICLODEXTRINA .....	2
1.2.1	Microencapsulación.....	2
1.3	PÉRDIDAS POSCOSECHA DE FRUTAS Y HORTALIZAS POR DETERIORO .....	3
2	<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>4</b>
3	<b>MATERIALES Y METODOS .....</b>	<b>5</b>
3.1	LOCALIZACIÓN DEL ESTUDIO.....	5
3.2	EQUIPO.....	5
3.3	MATERIALES.....	5
3.4	DISEÑO EXPERIMENTAL .....	5
3.5	ELABORACIÓN Y COMPROBACIÓN DE LA FORMACIÓN DE COMPLEJOS .....	6
3.5.1	Preparación de las muestras en el cromatógrafo de gases .....	7
3.6	EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIFÚNGICO <i>IN VITRO</i> CON <i>ALTERNARIA ALTERNATA</i> Y <i>BOTRYTIS CINEREA</i> .....	8
3.7	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	8
4	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>9</b>
4.1	RECUPERACIÓN DEL COMPLEJO AC: $\beta$ -CD EN FORMA DE SÓLIDOS.....	9

4.2	ANÁLISIS DE INFRARROJO .....	9
4.3	ANÁLISIS TOTAL DE EUGENOL EN EL ACEITE Y COMPLEJO USANDO CROMATOGRAFÍA DE GASES .....	10
4.4	ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA .....	12
5	<b>CONCLUSIONES</b> .....	14
6	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	15
7	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	16
8	<b>ANEXOS</b> .....	20

## ÍNDICE DE CUADROS

### Cuadro

1	Arreglo de parcelas divididas de los tratamientos.....	6
2	Porcentaje de recuperación del complejo sólido (AC: $\beta$ -CD) en diferentes proporciones.....	9
3	Cálculo de la curva estándar utilizada para la cuantificación cromatográfica de eugenol.....	11
4	Porcentaje de eugenol por cada tratamiento.....	11
5	Efecto del aceite puro y del complejo AC: $\beta$ -CD sobre el crecimiento micelial (mm) <i>In Vitro</i> de <i>Alternaria alternata</i> y <i>Botrytis cinerea</i> .....	13

## ÍNDICE DE FIGURAS

### Figura

1	Estructura y geometría de $\beta$ -ciclodextrina.....	2
---	---	---

## ÍNDICE DE ECUACIÓN

### Ecuación

1	Regresión lineal entre el área (y) y la cantidad de Eugenol (x).....	11
---	--	----

## ÍNDICE DE ANEXOS

### Anexo

1	Espectros IR de aceite de hoja de canela.....	21
2	Espectros IR de $\beta$ -ciclodextrina.....	22
3	Espectros IR de la mezcla física entre aceite puro y $\beta$ -ciclodextrina.....	23
4	Espectros IR del complejo de inclusión AC: $\beta$ -CD.....	24
5	Espectro IR y estructura química de eugenol.....	25
6	Cromatograma del estándar de eugenol.....	26
7	Cromatograma y porcentaje de eugenol en el aceite esencial puro.....	27
8	Cromatógrama de compuestos volátiles antes (a) y después (b) de la microencapsulación en $\beta$ -CD. ....	28

# 1. REVISIÓN DE LITERATURA

## 1.1. CANELA.

El género *Cinnamomum*, pertenece a la familia Lauraceae, nativa de Sri Lanka, comprende varias especies, son árboles de hojas perennes y la mayoría son aromáticas. Su sabor es debido a sus aceites esenciales aromáticos, que comprende 0.5% a 1% de su composición. Los aceites esenciales se obtienen por destilación en corriente de vapor de agua de *C. Zeylanicum* y *C. Cassia*. Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, por sus siglas en inglés, 2006), el aceite de hoja de canela (*C. zeylanicum*) contiene 75-85% de eugenol con una alta actividad antibacterial, y contiene 5% de cinamaldehído, el cual contribuye con su carácter aromático y características antimicrobianas. Mallavarapu y otros (1995), identificó 53 componentes en el aceite de hoja de canela, el mayor componente fue eugenol (81-84.5%). Otros componentes químicos del aceite esencial son principalmente carbonilos, aldehído cinámico, o-metoxialdehído cinámico, hidrocarbonatos ( $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -cimeno,  $\alpha$ -felandreno), aldehídos (benzílico, cumínico, nonílico, furfural), cetonas (metil amil cetona) y también trazos de alcohol (linalool) entre otros (Paranagama 1991).

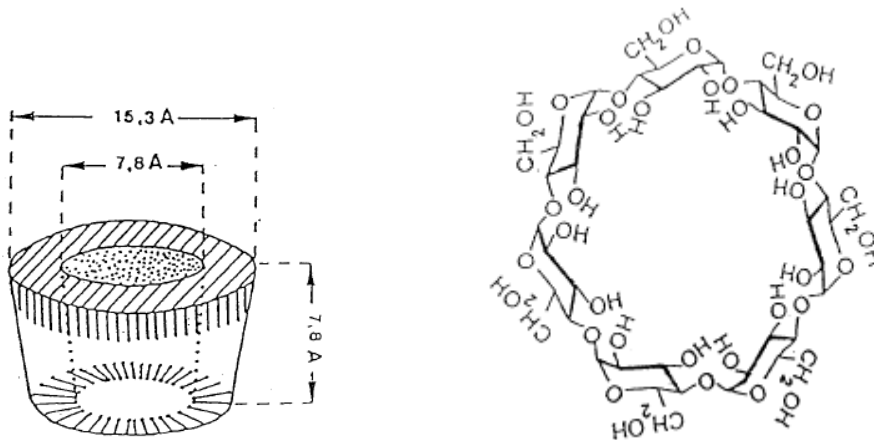
### 1.1.1. Actividad antifúngica del aceite de canela.

Juglal y otros (2002), estudió la efectividad de nueve aceites esenciales para controlar el crecimiento de micotoxinas y observó que el clavo de olor, canela y orégano fueron capaces de prevenir el crecimiento de *Aspergillus parasiticus* y *Fusarium moniliforme*, mientras que el clavo redujo la síntesis de aflatoxinas en granos infectados. El aceite de hoja de canela tiene principios antifúngicos y antibacterianos que pueden ser usados para prevenir el deterioro de comida debido al crecimiento microbiano (Fabio y otros 2003; Guynot y otros 2003; Kalemba y Kunicka 2003; Suhr y Nielsen 2003; Valero y Salmeron 2003; Friedman y otros 2002; Mejlholm y Dalgaard 2002; Ranasinghe y otros 2002; Smith-Palmer 2005; Yuste y Fung 2002; Mau y otros 2001). Por lo que se ha observado que el aceite de canela ha demostrado ser particularmente eficaz contra algunas especies de hongos tóxicos (Juglal y otros 2002; Soliman y Badeaa 2002; Montes – Belmont y Carvajal 1998). La acción antifúngica del aceite de hoja de canela involucra granulación del citoplasma, ruptura de la membrana citoplasmática o inactivación y/o inhibición de enzimas celulares. Estos eventos biológicos podrían tomar lugar separadamente o concomitantemente culminando con la inhibición de la germinación micelial (Cowan 1999).

## 1.2. CICLODEXTRINA.

Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos constituidos por anillos de moléculas de D (+) glucopiranososa unida entre sí, que forman una estructura troncocónica con una cavidad interior (Fig. 1). Esta cavidad es de naturaleza apolar, mientras que la superficie de la ciclodextrina es polar debido a que los grupos hidroxílicos se orientan hacia el exterior. Villiers (1891), define a las ciclodextrinas como moléculas capaces de formar complejos de inclusión en los que la disposición espacial desempeña un papel tan importante como la afinidad química por el ingrediente activo apolar capaz de incluirse en la cavidad de la ciclodextrina.

Esta estructura única es capaz de formar un complejo de inclusión, atrapando por completo o por parte la molécula huésped que se encuentra dentro de la cavidad, principalmente por fuerzas Van der Waals, interacciones dipolo-dipolo y por puentes de hidrógeno (Hedges y otros 1995).



**Figura 1. Estructura y geometría de  $\beta$ -ciclodextrina.**

Fuente: Kollengode (1997).

### 1.2.1. Microencapsulación.

La microencapsulación de sabores en  $\beta$ -ciclodextrina es uno de los métodos más efectivos para protegerlos de la oxidación, degradación por calor y evaporación (Hedges y otros 1995; Szente y otros 1988; Reineccius y Rish 1986; Pagington 1986). Para que exista un equilibrio entre la ciclodextrina y la molécula huésped, es necesario un equilibrio constante que depende de la naturaleza de la ciclodextrina y la molécula huésped, también de algunos factores como temperatura, nivel de humedad y otros factores del medio. Generalmente, la presencia de agua y/o altas temperaturas es requerida para liberar las moléculas huésped en el complejo (Reineccius y Risch 1986).

Yoshii y otros (1998), describen la inclusión de *d*-limonene dentro de la ciclodextrina usando bajo contenido de agua, desarrollaron un modelo matemático que podría ser usado para predecir el grado de inclusión del experimento bajo diferentes condiciones. El mismo



autor también estudió como algunos solventes como el etanol podrían ser usados en reemplazo al agua para formar el complejo de inclusión con compuestos de pobre solubilidad en agua.

Bhandari y otros (1998, 1999), comparó métodos de encapsulación del aceite de limón en la  $\beta$ -ciclodextrina, utilizando el método de precipitación en etanol y secado al vacío. Goubet y otros (1998), realizaron un estudio detallado de como la retención cambia de acuerdo a los compuestos de los diferentes tipos de aromas, la retención fue influenciada por el peso molecular, la forma, funcionalidad química, polaridad y volatilidad de las moléculas del huésped. La misma investigación utilizó varios métodos de espectroscopia para estudiar directamente la unión entre  $\beta$ -ciclodextrina y un grupo de compuestos diferenciado en propiedades físico-químicas, como solubilidad en agua.

Otros métodos analíticos han sido utilizados para estudiar la interacción entre el huésped y la ciclodextrina. La cromatografía de gases fue usado para valorar la retención de diferentes compuestos de funcionalidad química diferente en matriz de amilasa, almidón de maíz, almidón de trigo y  $\beta$ -ciclodextrina (Delarue y Giampaoli 2000). Caccia y otros (1998), utilizó técnicas analíticas como espectroscopia de RMN, espectroscopia de masas, y difracción por rayos X para caracterizar la estructura del complejo de inclusión entre  $\beta$ -ciclodextrina y neohesperidina dihidrochalcona, ambos en solución y en estado sólido. Estos autores demostraron que el anillo terminal de isovainillina ocupaba la cavidad hidrofóbica de la estructura de la ciclodextrina.

### **1.3. PÉRDIDAS POSCOSECHA DE FRUTAS Y HORTALIZAS POR DETERIORO FÚNGICO.**

Las enfermedades poscosecha de frutas y hortalizas son una de las mayores causas de pérdidas en la producción de alimentos en países desarrollados y subdesarrollados (Wilson y otros 1994). Según el Proyecto SICA Banco Mundial (2001), representan de 5 a 25% en países desarrollados y 20 a 50 % en países en vías de desarrollo. Para controlar las enfermedades se recurre principalmente a prácticas de manejo durante la cosecha y poscosecha. También se trata de minimizar la producción de heridas ya que éstas constituyen la vía de entrada para la mayoría de los patógenos. Para controlar el desarrollo de patógenos se recurre entonces a la aplicación de fungicidas sintéticos, mediante inmersión o por aspersión (Méndez y Mondino 1999). Estos fungicidas poscosecha está siendo objeto de numerosas restricciones en varios países, debido a la fuerte presión por parte de los consumidores exigiendo la limitación del uso de estos productos por razones toxicológicas y ambientales (Wilson y otros 1994). Esto ha llevado a investigar el uso de conservadores naturales como aditivos alimentarios, que no afecten la calidad del fruto, al medio ambiente ni la salud del consumidor

## 2. INTRODUCCIÓN

El uso de aceites esenciales como un aditivo alimentario ha llamado la atención de los investigadores por su poder antimicrobiano. Varios estudios han demostrado que las esencias de canela, clavo, pimienta morrón, tomillo, orégano y romero poseen efecto inhibitorio fuerte y constante contra varios patógenos y bacterias que deterioran a los alimentos (Aureli y otros 1992; Conner 1993).

Según la FAO (2006), el aceite de hoja de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) contiene como componente principal 75-85% de eugenol, con una alta actividad antibacterial, y contiene 5% de cinamaldehído, el cual contribuye con su carácter aromático y características antimicrobianas.

La desventaja de utilizar aceites esenciales es la exposición directa de volátiles, debido a que influye sobre la percepción sensorial del consumidor, de manera que, es necesario buscar métodos alternativos para que pueda ser utilizado en la industria. En este trabajo se utilizó la microencapsulación en  $\beta$ -ciclodextrinas que ayuda a garantizar un enmascaramiento de los compuestos volátiles hasta que se propicie una liberación controlada de los compuestos activos y disminuya las características que pueda influir sobre la percepción del consumidor preservando la capacidad antimicrobiana del aceite esencial. Además estos sistemas de liberación prolongada presentan otras ventajas, como conversión de principios activos líquidos en formas sólidas más fácilmente manipulables y almacenables, inclusión de principios activos incompatibles en la misma forma de administración y protección de compuestos lábiles frente a la degradación química (Díez y Herráez 2005). El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto antifúngico *In Vitro* del aceite esencial de hoja de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) puro y microencapsulado en  $\beta$ -ciclodextrina contra *Alternaria alternata* y *Botrytis cinerea*. Para lograrlo, se elaboró y comprobó la formación de complejos entre el aceite de hoja de canela y  $\beta$ -ciclodextrina a través de espectrofotometría en IR, se analizó el porcentaje de eugenol (compuesto antimicrobial) a través de cromatografía de gases y se realizaron ensayos para medir la actividad antifúngica de los mismos.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. LOCALIZACIÓN DEL ESTUDIO

El estudio se realizó en el Laboratorio de Productos Vegetales Frescos Cortados del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, AC). Carretera a La Victoria Km. 0.6, La Victoria Hermosillo, Sonora, México.

#### 3.2. EQUIPO

- Balanza Mettler Toledo AG 285
- Horno de convección Cole Parmer<sup>®</sup> Modelo 05015-50
- Desecadores Scienceware Dry-Keeper
- Espectrómetro FTIR Nicolet Protégé 460
- Cromatógrafo de gases Varian Modelo GC-3400x
- Detector selectivo de masas Saturn 2100T
- Detector de ionización de llama (FID)
- Pie de rey

#### 3.3. MATERIALES

- *Aislamientos*. Se empleó *A. alternata*, aislada desde tomates maduros con síntomas de pudrición y *B. cinerea* de fresa madura con síntomas de pudrición gris. Estos hongos se conservaron en Medio Agar, Papa, Dextrosa Acidificado (PDA; Difco Laboratorios).
- *Antifúngicos*. Se utilizó el aceite esencial de hoja de canela (W229210) otorgado por Sigma Aldrich Chemical Company Inc.
- *Ciclodextrina*. Se empleó  $\beta$ -ciclodextrina (W402826) otorgado por Sigma Aldrich Chemical Company Inc.
- *Análisis*. Se utilizó etanol (J.T. Baker) para la elaboración del complejo; y diclorometano (Sigma Aldrich Chemical Company Inc.) para los análisis cromatográficos.
- *Estándar*. Se empleó eugenol (Sigma Aldrich Chemical Company Inc.).

### 3.4. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para el análisis cuantitativo del eugenol en el aceite de canela y en cada complejo (AC:  $\beta$ -CD) por el cromatógrafo de gases se estableció un diseño estadístico de DCA (Diseño completamente al azar) donde se evaluó el aceite puro y los complejos 4: 96, 8:94, 12:88 y 16: 84.

En la comparación del crecimiento micelial *In Vitro* de los dos hongos *Alternaria alternata* y *Botritis cinerea*, entre el aceite puro y el complejo, se estableció un diseño estadístico de BCA (Bloques completos al azar) donde los bloques fueron los hongos. Se evaluaron dos tratamientos: aceite puro y complejo (AC:  $\beta$ -CD) con la proporción (16:84). Se evaluó las concentraciones: 0.01 g/mL, 0.025 g/mL y 0.05 g/mL.

**Cuadro 1. Arreglo de parcelas divididas de los tratamientos.**

Tratamientos hongo\ encapsulación (g/mL)	Aceite de hoja de canela puro			Complejo (AC: $\beta$ -CD)		
	0.01	0.025	0.05	0.01	0.025	0.05
<i>Alternaria alternata</i>	A1	A2	A3	A1	A2	A3
<i>Botritis cinerea</i>	B1	B2	B3	B1	B2	B3
Control						

### 3.5. ELABORACIÓN Y COMPROBACIÓN DE LA FORMACIÓN DE COMPLEJOS.

1. Para la elaboración de los complejos, se empleó el método por precipitación utilizado por Reineccius (1989).
  - 1.1 Se disolvió 15 g de  $\beta$ -ciclodextrina en 150 mL de etanol en agua (1:2) a 55 °C.
  - 1.2 El aceite de canela se disolvió en etanol (10% p/v) y se agregó lentamente a la mezcla de  $\beta$ -ciclodextrina.
  - 1.3 La adición de la solución del aceite se realizó a temperatura constante (55 °C) y con agitación continua.
  - 1.4 Luego se agitó la solución final durante 4 horas a temperatura ambiente y se la refrigeró a 4 °C durante 12 horas.
  - 1.5 La mezcla se filtró para recuperar el complejo de aceite: $\beta$ -ciclodextrina precipitado.

- 1.6 El filtrado se secó en el horno de convección a 50 °C durante 24 horas.
  - 1.7 El complejo se colocó en el desecador a 25 °C durante 24 horas para permitir que se alcance el equilibrio de humedad y se registró el peso.
  - 1.8 Los complejos fueron almacenados a 25 °C en contenedores sellados.
2. Para comprobar la formación del complejo se utilizó el Espectrómetro Nicolet Protégé 460.
    - 2.1. Los espectros de infrarrojo se obtuvieron en un rango de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  con el aceite esencial sobre placas de KBr, el complejo sólido (16:84) y la  $\beta$ -ciclodextrina en pastillas de KBr.

### 3.5.1. Preparación de las muestras en el cromatógrafo de gases.

Para la preparación de las muestras del complejo AC:  $\beta$ -CD, se identificó y cuantificó el eugenol por método de extracción de solvente (Padukka y otros 2000) y se analizó usando un cromatógrafo de gases Varian Modelo GC-3400 Cx equipado con detector de masas para identificación y comparación con el estándar, la cuantificación se realizó con el detector FID. Las condiciones fueron:

- Fase estacionaria: Columna DB – 5 de 30 m, 0.25 mm, 0.25  $\mu\text{m}$ , Agilent®.
- Fase móvil (gas de acarreo) Helio.
- Split 1:100.
- Flujo: 1 mL/min.
- Temperatura de la columna subió de 50 a 220 °C con una velocidad de 3 °C/min y se mantuvo por 10 min.
- Temperaturas del detector y del inyector fueron 220 y 290 °C respectivamente.

Extracción del aceite: La cantidad de aceite en el complejo fue determinado usando el método de extracción por solvente (diclorometano), siguiendo el análisis del porcentaje de eugenol por el espectrómetro de masas GC/MS/MS.

1. Se tomó 1 mL de diclorometano en un vial de 5 mL y en otro se diluyó 1 mL de aceite de hoja de canela en 9 mL de diclorometano. Para el caso de los complejos AC:  $\beta$ -CD, se mezcló 0.15-0.20 g con agua destilada (8 mL) y diclorometano (4 mL).
2. Las muestras fueron sonicadas por 30 minutos. La fase orgánica conteniendo los compuestos volátiles fue decantada, y la fase acuosa fue extraída con 3 lavados y sonicados como anteriormente se describió.
3. Se midió el volumen y las muestras fueron inyectadas en el espectrómetro de masas GC/MS/MS. Se calculó la concentración de eugenol en porcentaje. Se identificó el eugenol con base en su peso molecular y el estándar. Los datos cuantitativos se obtuvieron electrónicamente del percentil del área sin el uso de factores de corrección.

### 3.6. EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIFÚNGICO *IN VITRO* CON *ALTERNARIA ALTERNATA* Y *BOTRYTIS CINEREA*.

1. Los tratamientos fueron concentraciones de 0.01 mg/mL, 0.025 mg/mL, 0.05 mg/mL para el complejo que presentó la mayor concentración de eugenol y el aceite puro para un total de 12 tratamientos más los controles del hongo sin aceite (con el medio únicamente).
2. Se mezclaron los tratamientos con 200mL del medio agar, papa, dextrosa acidificado.
3. La mezcla fue a 45 °C con agitación permanente, la misma que se colocó en placas Petri.
4. Una vez solidificado el medio se sembró el hongo en el centro de la superficie del agar con un asa estéril.
5. Posteriormente, los medios de cultivo inoculados se incubaron a temperatura ambiente, se realizó la mediciones a las 48 horas. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.
6. El diámetro de los hongos cultivados bajo la presencia del complejo o aceite se comparó con el crecimiento de un control sin complejo o aceite, el crecimiento micelial se expresa en mm de diámetro de la colonia.

### 3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El estudio estadístico se realizo en dos fases:

a) Formación del complejo de aceite de canela en matriz de  $\beta$ -ciclodextrina.

Se realizaron análisis descriptivos de espectros de IR, detección de la presencia de volátiles en el aceite antes y después de microencapsular en matriz de  $\beta$ -ciclodextrina. Para el análisis cuantitativo de eugenol se realizó un análisis de varianza (ANDEVA, por sus siglas en inglés), para evaluar si existían o no diferencias en el porcentaje de eugenol. La separación de medias se realizó por la prueba DUNCAN ( $p \leq 0.05$ ). El análisis estadístico se realizó por medio del programa estadístico. “Statiscal Análisis System” (SAS<sup>®</sup> v9. 1. 2, 2004).

b) Comparación del crecimiento micelial *In Vitro* de los hongos *Alternaria alternata* y *Botritis cinerea*, en el aceite puro y el complejo.

Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA, por sus siglas en inglés), para evaluar si existían o no diferencias en el crecimiento micelial. La separación de medias se realizó por la prueba DUNCAN ( $p \leq 0.05$ ). El análisis estadístico se realizó por medio del programa estadístico. “Statiscal Análisis System” (SAS<sup>®</sup> v9. 1. 2, 2004).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. RECUPERACIÓN DEL COMPLEJO AC: $\beta$ -CD EN FORMA DE SÓLIDOS.

Para la formación del complejo se empleó el método por precipitación utilizado por Reineccius (1989). La recuperación del complejo del aceite de hoja de canela en  $\beta$ -ciclodextrina (AC:  $\beta$ -CD) se presenta en la Cuadro 2 como datos de referencia. Los factores que pudieron afectar el porcentaje de recuperación se encuentran: residuos de aceite de hoja de canela y ciclodextrina en la solución después de la precipitación del complejo y volatilización de los componentes del aceite esencial durante el proceso. Para las proporciones más altas, una cantidad del aceite de hoja de canela pudo no ser incluido en el interior de la  $\beta$ -ciclodextrina. Sin embargo, para las proporciones bajas aseguran una mayor absorción de sus componentes en la matriz de ciclodextrina que para el caso de las proporciones altas, estas alcanzaron a saturar la matriz, ocupando todas las posibles regiones de unión.

**Cuadro 2. Porcentaje de recuperación del complejo sólido (AC:  $\beta$ -CD) en diferentes proporciones.**

Tratamientos (Proporciones de AC y $\beta$ -CD)	AC (g)	$\beta$ -CD (g)	Inicial teórico AC + $\beta$ -CD (g)	Final recuperado AC: $\beta$ -CD (g)	Recuperación <sup>a</sup> (%)
(4: 96)	0.625	15	15.625	15.2797	97.79
(8: 92)	1.3043	15	16.3043	16.0909	98.69
(12: 88)	2.045	15	17.045	16.5399	97.04
(16: 84)	2.8571	15	17.8571	16.4631	92.19

<sup>a</sup> Diferencia entre el peso final recuperado y el peso inicial de la suma teórica de la cantidad de aceite de hoja de canela (AC) más la cantidad de  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD).

### 4.2. ANÁLISIS DE INFRARROJO

Los espectros IR se obtuvieron en un rango de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  con el aceite esencial sobre placas de KBr, el complejo sólido y la  $\beta$ -ciclodextrina en pastillas de KBr. Los

espectros del aceite esencial,  $\beta$ -ciclodextrina, mezcla física y el complejo de inclusión se pueden comparar en el Anexo 1, 2, 3 y 4.

Los espectros de la  $\beta$ -ciclodextrina presentaron una larga banda entre 3268 y 3517  $\text{cm}^{-1}$  que corresponde a los grupos O-H y la banda 2934  $\text{cm}^{-1}$  que corresponde a los grupos  $\text{CH}_2$ . En el complejo sólido AC:  $\beta$ -CD, la banda 1515 $\text{cm}^{-1}$ , característico de los aromáticos, por su anillo terminal, presentaron menor intensidad a lo que se observó en la mezcla física, demostrando que estos grupos funcionales tuvieron una mayor interacción en el complejo que en la mezcla física al igual que las bandas 1614 $\text{cm}^{-1}$ , 1640 $\text{cm}^{-1}$ , 1724 $\text{cm}^{-1}$  pertenecientes a los grupos C=C. Esto podría demostrar que el anillo terminal de eugenol ocupó la cavidad hidrofóbica de la  $\beta$ -ciclodextrina, lo cual se puede comparar con la investigación de Caccia (1998), según afirmó que el anillo terminal de isovainillina, estructura muy similar al eugenol, ocupaba la cavidad hidrofóbica de  $\beta$ -ciclodextrina. Por lo tanto, debido a la naturaleza de los componentes del aceite de hoja de canela que interaccionan con la  $\beta$ -ciclodextrina las principales interacciones que existe son fuerzas de Van der Waals.

#### **4.3. ANÁLISIS TOTAL DE EUGENOL EN EL ACEITE Y COMPLEJO USANDO CROMATOGRAFIA DE GASES.**

En este estudio se utilizó el método de Padukka y otros (2000). Los anexos 6, 7 y 8 presentan cromatogramas del estándar de eugenol, del aceite puro y la diferencia entre el aceite puro y el complejo.

Para calcular el porcentaje de eugenol se utilizó el estándar de Sigma Aldrich Chemical Company Inc. (Cuadro 3), del cual se calculó una ecuación para conocer la cantidad de eugenol en cada muestra (Ecuación 1).



**Cuadro 3. Cálculo de la curva estándar utilizada para la cuantificación cromatográfica de eugenol.**

Eugenol (ug/mL)	Area (pA)	RF
1.2353	9	7.29
1.2353	10	8.10
12.353	93	7.53
12.353	95	7.69
123.53	962	7.79
123.53	986	7.98
494.12	3600	7.29
494.12	3542	7.17
705.9	4949	7.01
705.9	5241	7.42
1008.42	7349	7.29
1008.42	7059	7.00
1440.6	11171	7.75
1440.6	10542	7.32
2058	15214	7.39
2058	15142	7.36
	Media	7.46
	Desviación estándar	0.32
	% CV	4.31

$$y = 7.4079x - 34.553$$

$$R^2 = 0.9983$$

**Ecuación 1. Regresión lineal entre el Área (y) y la cantidad de Eugenol (x).**

En el Cuadro 4 se puede observar los porcentajes de eugenol del aceite puro y por cada complejo en  $\beta$ -ciclodextrina que se obtuvieron por el método de extracción por solvente (Padukka y otros 2000).

**Cuadro 4. Porcentaje de eugenol por cada tratamiento.\***

Tratamientos	% de Eugenol
AC	78.30 <sup>a</sup>
16:84	4.99 <sup>b</sup>
12:88	4.39 <sup>b</sup>
8:92	3.10 <sup>c</sup>
4:96	2.73 <sup>c</sup>

\*Promedio con literales diferentes son estadísticamente diferentes (P<0.05).

Aceite de hoja de canela (AC)

El porcentaje de eugenol que se encontró en el aceite de hoja de canela fue aproximadamente 78%, lo que confirma que se encuentra dentro del rango (75-85%) establecido por la FAO (2006), y existió diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) en comparación a los complejos. Para los complejos con  $\beta$ -ciclodextrina el porcentaje de eugenol varió significativamente ( $P < 0.05$ ), siendo menor estos dos últimos tratamientos. Esto confirma que las moléculas volátiles del aceite podrían ser incluidas dentro de las moléculas de  $\beta$ -ciclodextrina (Pagington 1986). En el trabajo de Reineccius y otros (2002), que confirma que el isoeugenol tiene 0% de retención en la  $\beta$ -ciclodextrina, mientras que Kollengode y Hanna (1997), confirma que el eugenol tiene 100% de retención en la  $\beta$ -ciclodextrina, estos resultados varían de acuerdo al método de formación del complejo utilizado por cada investigador.

#### 4.4. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.

En este estudio se utilizó el complejo con mayor porcentaje de eugenol en la formulación (16:84) y los tratamientos fueron:

- Controles (hongos sin aplicación)
- *Alternaria alternata* con aceite puro.
- *Botrytis cinerea* con aceite puro.
- *Alternaria alternata* con el complejo AC:  $\beta$ -CD.
- *Botrytis cinerea* con el complejo AC:  $\beta$ -CD.

El crecimiento micelial en el aceite de hoja de canela puro fue nulo y existió diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) en comparación al complejo, debido a una mayor cantidad e interacción de los compuestos volátiles (Cuadro 5). Existió una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre *Alternaria alternata* y *Botritis cinerea*, demostrando mayor poder de inhibición en *Botritis cinerea*. Para los complejos existió una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ), demostrando que la mayor concentración del tratamiento no permitió el crecimiento de los hongos. Según reportó Goubran y otros (1993), el cinamaldehído, linalool, eugenol y 1,8 cineol son componentes activos que ayudan a inhibir el crecimiento de *Monilia*, *Botrytis* y *Mucor*. Esto se debe según Dormann y otros (2000), a que los aldehídos poseen actividad antimicrobial a través del grupo aldehído conjugado, por su doble unión  $C=C$  es altamente electronegativo y pueden interferir en el proceso biológico que involucra la transferencia de electrones, que reaccionan con el nitrógeno en las proteínas y ácidos nucleicos, por lo tanto inhiben el crecimiento del hongo.

**Cuadro 5. Efecto del aceite puro y del complejo AC:  $\beta$ -CD sobre el crecimiento micelial (mm) *In Vitro* de *Alternaria alternata* y *Botrytis cinerea*.\***

Hongos	Control	AC: $\beta$ -CD (g/mL)			AC (g/mL)		
		0.01	0.025	0.05	0.01	0.025	0.05
<i>Alternaria alternata</i>	5.5 <sup>a</sup>	2.6 <sup>b</sup>	2.5 <sup>b</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>
<i>Botrytis cinerea</i>	2.5 <sup>a</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>

\*Promedio con distinta letra en cada fila son estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

AC:  $\beta$ -CD = Complejo (16:84) del aceite de hoja de canela y  $\beta$ -ciclodextrina.

AC = Aceite de hoja de canela.

## 5. CONCLUSIONES

Se logró comprobar la formación del complejo entre el aceite de hoja de canela y la  $\beta$ -ciclodextrina (AC:  $\beta$ -CD).

La técnica de cromatografía de gases determinó que la concentración de eugenol en el aceite de hoja de canela fue 78%, por lo que se puede declarar que se encuentra dentro del rango establecido por la FAO (2006).

Se obtuvo una menor concentración de eugenol en los complejos microencapsulados en  $\beta$ -ciclodextrina en un rango de 4.99% a 2.73% comparado con el aceite puro ( $P < 0.05$ ).

El aceite puro presentó mayor efecto inhibitorio en el análisis antifúngico.

El mayor efecto inhibitorio sobre *Alternaria alternata* fue la concentración de 0.05 g/mL del complejo (AC:  $\beta$ -CD).

El aceite de hoja de canela puro y el complejo obtuvieron mayor poder de inhibición en contra de *Botrytis cinerea* comparado a *Alternaria alternata*.

## **6. RECOMENDACIONES**

Realizar secado al vacío para elaborar el complejo (AC:  $\beta$ -CD) y comparar con este estudio.

Realizar la evaluación antifúngica del complejo (AC:  $\beta$ -CD) sobre frutas y/o vegetales frescos.

Realizar análisis para evaluar el comportamiento del complejo a diferentes humedades relativas y tiempo.

## 7. BIBLIOGRAFÍA.

Aureli P, Constantini A, Zoles S. 1992. Antibacterial activity of some plants essential oils against *Listeria monocytogenes*. *J Food Pro* (55):344-48.

Bhandari BR, D'Arcy BR, Thi Bich LL. 1998. Lemon oil to  $\beta$ -cyclodextrin ration effect on the inclusion efficiency of  $\beta$ -cyclodextrin and the retention of oil volatiles in the complex. *J Agric Food Chem* 46(4):1494-99.

Bhandari BR, D'Arcy BR, Padukka I. 1999. Encapsulation of lemon oil by paste method using  $\beta$ -cyclodextrin: encapsulation efficiency and profile of oil volatiles. *J Agric Food Chem* 47(12):5194-97.

Caccia F, Dispenza R, Fronza G, Fuganti C, Malpezzi L, Mele A. 1998. Structure of neohesperidin dihydrochalcone/ $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex: NMR, MS and X-ray spectroscopic investigation. *J Agric Food Chem.* 46(4):1500-05.

Conner DE. 1993. Naturally occurring compounds. In: Davidison PM, Branen AL, editors. *Antimicrobials in foods*. New York: Marcel Dekker. p 441-68.

Cowan MM. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Revie.* (12):564-82.

Delarue J, Giampaoli P. 2000. Study of interaction phenomena between aroma compounds and carbohydrate matrices by inverse gas chromatography. *J Agric Food Chem.* 48(6):2372-75.

Díez O, Herráez M. 2005. Importancia de los sistemas de liberación prolongada en los preparados dermofarmacéuticos. Valencia: Dep. de Farmacia y Tec. Farmacéutica. Facultada de Farmacia. Disponible en: [http://portalfarma.com/pfarma/taxonomia/general/gp000023.nsf/voDocumentos/0A00ADE322E0A6A4C1256F2E005CFAE0/\\$File/20%20oct%20Nuevas%20orientaciones%20en%20e%20-%20Octa.doc](http://portalfarma.com/pfarma/taxonomia/general/gp000023.nsf/voDocumentos/0A00ADE322E0A6A4C1256F2E005CFAE0/$File/20%20oct%20Nuevas%20orientaciones%20en%20e%20-%20Octa.doc). Consultado en Sep. 8, 2006.

Dormann HJD, Deans SG. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. of Appl Microbiol.* 88: 308-316.

Fabio A, Corona A, Forte E, Quaglio P. 2003. Inhibitory activity of spices and essential oils on psychrotrophic bacteria. *New Microbiol.* 26(1):115-20.

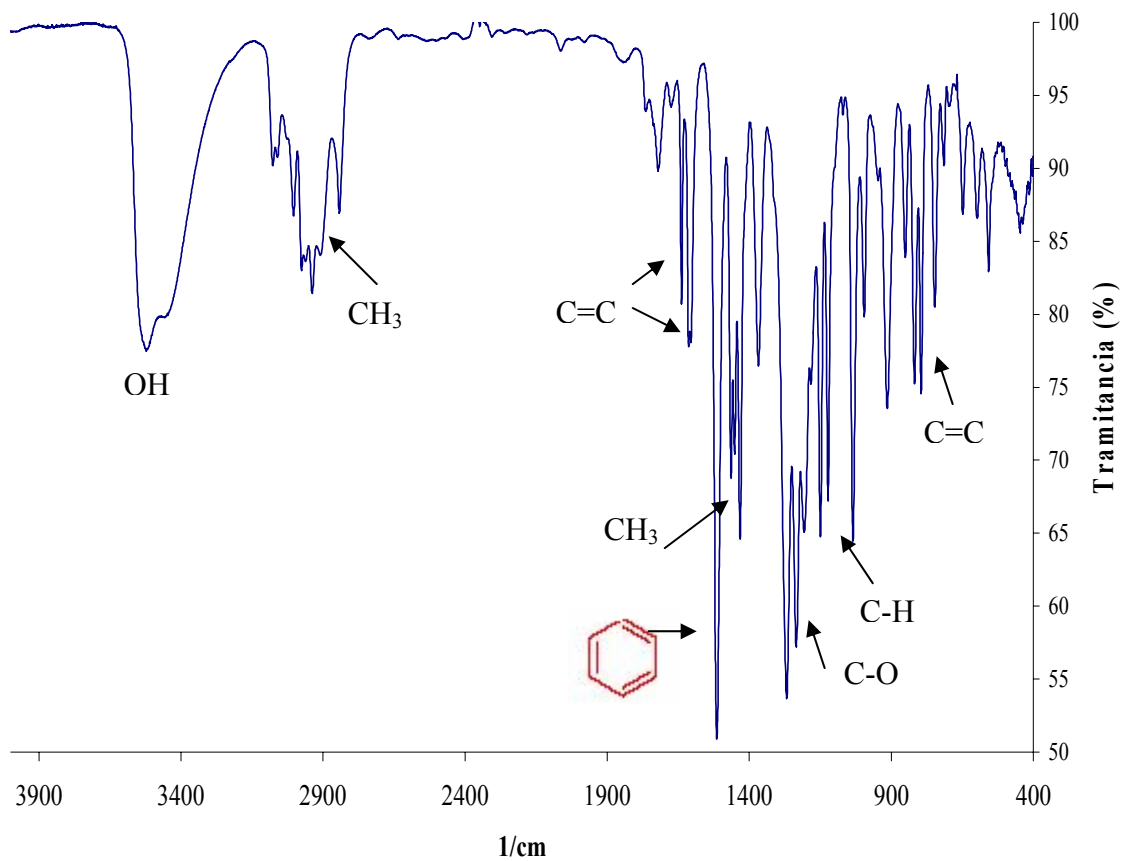
- FAO. 2006. Cinnamomum oils (including cinnamon and cassia). Forestry Dept. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/V5350E/V5350e04.htm>. Consultado el Sep 8, 2006.
- Friedman M, Henika PR, Mandrell RE. 2002. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. J Food Prot. 65(10):1545-60.
- Goubet I, Le Quéré J-L, Voilley A. 1998. Retention of aroma compounds by carbohydrates: influence of their physicochemical characteristics and of their physical state. J Agric Food Chem. 48(5):1981-90.
- Goubran FH, Holmes RJ. 1993. The Development of Alternative Fungicides from Essential oils. Rural Industries Research and Development Report. Institute for Horticultural Development, Knoxfield, Department of Agriculture, Victoria.1-45.
- Guynot ME, Ramos AJ, Seto L. 2003. Antifungal activity of volatile compounds generated by essential oils against fungi commonly causing deterioration of bakery products. J Appl Microbiol. 94(5):893-899.
- Hedges AR, Shieh WJ, Sikorski CT. 1995. Use of cyclodextrins for encapsulation in the use and treatment of food products. In: Risch SJ, Reineccius GA, editors. Encapsulation and controlled release of food ingredients. ACS Symposium Series 590. Washington DC: American Chemical Soc. p 60-71.
- Juglal S, Govinden R, Odhav B. 2002. Spices oils for the control of co-occurring mycotoxin-producing fungi. J Food Prot. (65):638-87.
- Kalembe D, Kunicka A. 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Curr. Med Chem. 10(10):813-29.
- Kollengode A, Hanna M. 1997. Cyclodextrin Complexed Flavors Retention in Extruded Starches. J Food Sci. (62):1057-60.
- Mallavarapu GR, Ramesh S, Chandrasekhara RS, Rajeswara Rao BR, Kaul PN, Battacharya AK. 1995. Investigation of the essential oil of cinnamon leaf grown at Bangalore and Hyderabad. J Flav. Fragr. (10):239-42.
- Mau J, Chen C, Hsieh P. 2001. Antimicrobial effect of extracts from Chinese chive, cinnamon and corni fructus. J Agric Food Chem. 49(1):183-88.
- Mejlholm O, Dalgaard P. 2002. Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. Lett Appl Microbiol. 34(1):27-31.

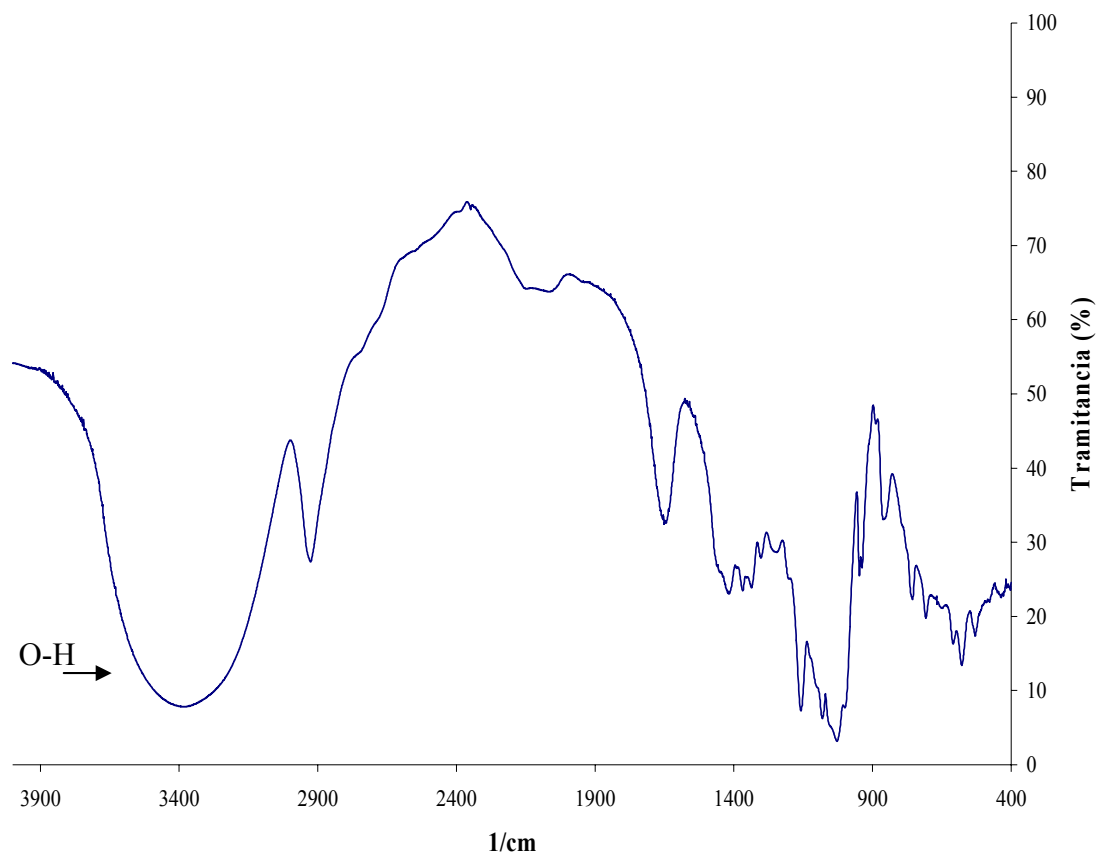
- Méndez S, Mondino P. 1999. Control biológico poscosecha en Uruguay. Montevideo: Universidad de la República. Facultad de Química. Disponible en: <http://www.eumedia.es/articulos/vr/hortofrut/91frutos.htm>. Consultado Sep 12, 2006.
- Montes-Belmont R, Carvajal M. 1998. Control of *Aspergillus flavus* in maize with plant essential oils and their components. *J Food Prot.* 61(5):616-19.
- Pagington JS. 1986. Beta-cyclodextrin. *Perf Flavorist* 11(1):49-58.
- Padukka I, Bhandari B, D'Arcy B. 2000. Evaluation of various extraction methods of encapsulated oil from  $\beta$ -cyclodextrin-lemon oil complex powder. *J Food Comp Anal.* 13(1):59-70.
- Paranagama PA. 1991. Analysis of Sri Lankan Essential Oils by Gas Chromatography and Mass Spectroscopy. Senanayake, U.M, Eds; ITI. Colombo, Sri Lanka. 1-40.
- Proyecto SICA. 2001. Manejo poscosecha de productos hortifrutícolas en fresco. Escuela Politécnica Nacional Departamento de Ciencia de los Alimentos y Biotecnología. Disponible en: [http://www.sica.gov.ec/agronegocios/sistema%20valor/poscosecha\\_hortifruticolas.htm](http://www.sica.gov.ec/agronegocios/sistema%20valor/poscosecha_hortifruticolas.htm). Consultado Sep 12, 2006.
- Ranasinghe L, Jayawardena B, Abeywickrama K. 2002. Fungicidal activity of essential oils of *Cinnamomum zeylanicum* (L.) and *Syzygium aromaticum* (L.) Merr et L.M.Perry against crown rot and anthracnose pathogens isolated from banana. *Lett Appl Microbiol.* 35(3):208-11.
- Reineccius GA, Risch SJ. 1986. Encapsulation of artificial flavors by  $\beta$ -cyclodextrin. *Perf Flavorist* 11(4):1-6.
- Reineccius GA. 1989. Flavor encapsulation. *Food Rev. Int.* (5):147-76.
- Reineccius TA, Reineccius GA, Peppard TL. 2002. Encapsulation of Flavors using Cyclodextrins: Comparison of Flavor Retention in Alpha, Beta, and Gamma Types. *J Food Sci.* (67):3271-79.
- Suhr KI, Nielsen PV. Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi. *J Appl Microbiol.* 2003; 94(4):665-674.
- Smith-Palmer A, Stewartt J, Fyfe L. 2005. Inhibition of listeriolysin O and phosphatidylcholinespecific production in *Listeria monocytogenes* by subinhibitory concentrations of plant essential oils. *J Med Microbiol.* 51(7):567-74.
- Soliman KM, Badeaa RI. 2002. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food Chem Toxicol.* 40(11):1669-75.

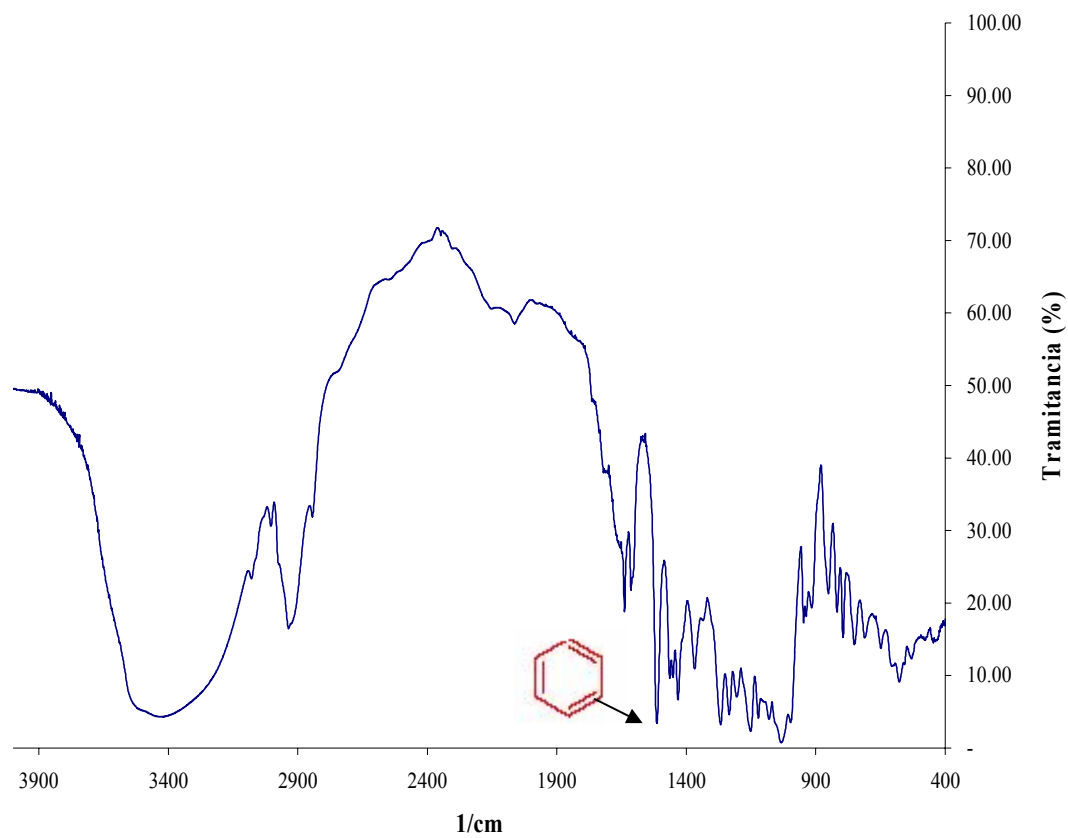


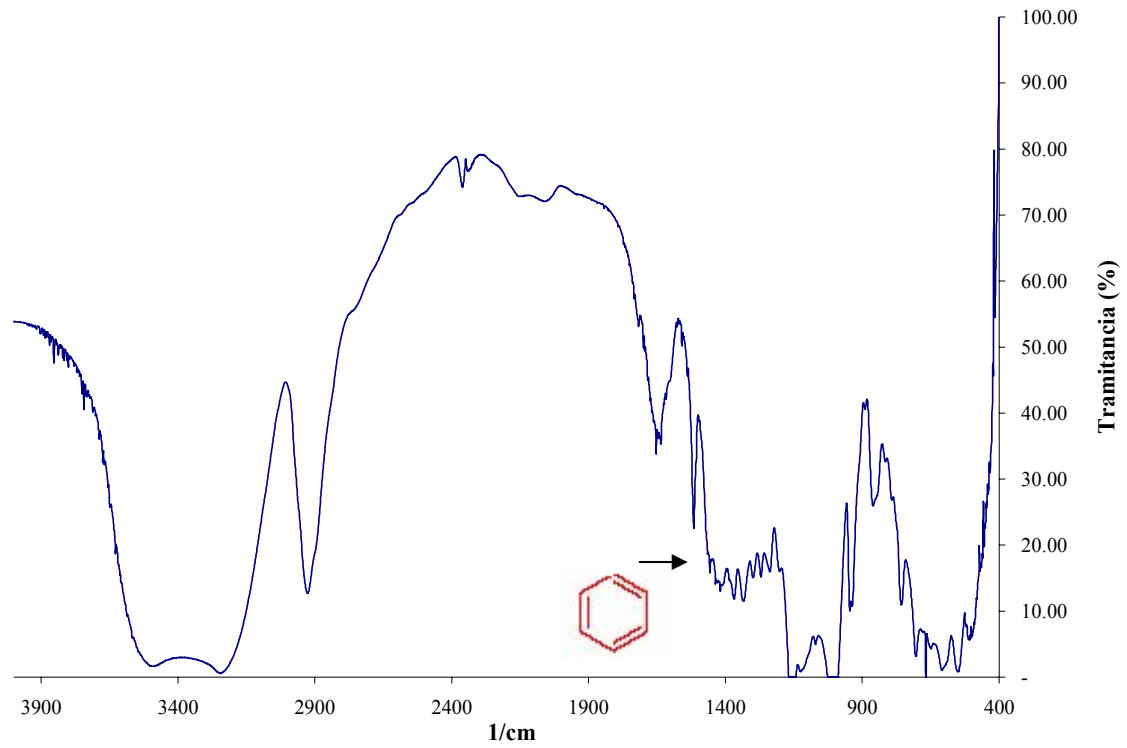
- Szente L, Harangi J, Szejtli J. 1988. Long-term storage stability studies on flavor  $\beta$  - cyclodextrin complexes. Proc 4th Int Symp Cyclodextrins. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer. p 545-49.
- Valero M, Salmeron MC. 2003. Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. Int J Food Microbiol. 85(1-2):73-81.
- Villiers A. 1891. Sur la fermentation de la fécule par l'action du ferment butyrique. C R Acad. Sci. (112): 536.
- Wilson CL, Ghaouth A, Chalutz E, Droby S, Stevens C, Khan V, Arul J. 1994. Potencial of induced Resistance to Control Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables. Plant Disease (78:9):837-44.
- Yoshii H, Furuta T, Okita E, Toyomi A, Linko Y-Y, Linko P. 1998. The increased effect of kneading on the formation of inclusion complexes between *d*-limonene and  $\beta$ -cyclodextrin at low water content. Biosci Biotechnol Biochem. 62(3):464-68.
- Yoshii H, Takeshi F, Asada M, Sugisava H. 1992. Quantitative analysis by X-ray diffraction of the inclusion complex formed by *d*-limonene in a  $\beta$ -cyclodextrin /maltodextrin mixed powder. Biosci Biotechnol Biochem. (56):384-87.
- Yuste J, Fung DY. 2002. Inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A 49594 in apple juice supplemented with cinnamon. J Food Prot. 65(10):1663-66.

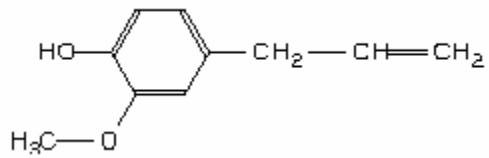
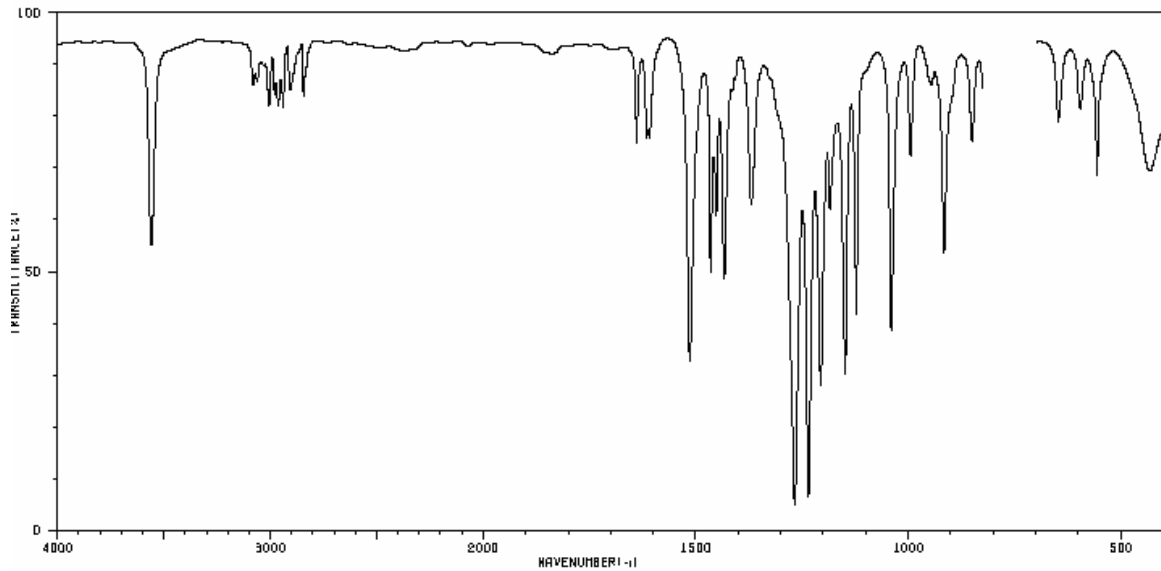
## **8. ANEXOS**

**Anexo 1.** Espectros IR de aceite de hoja de canela.

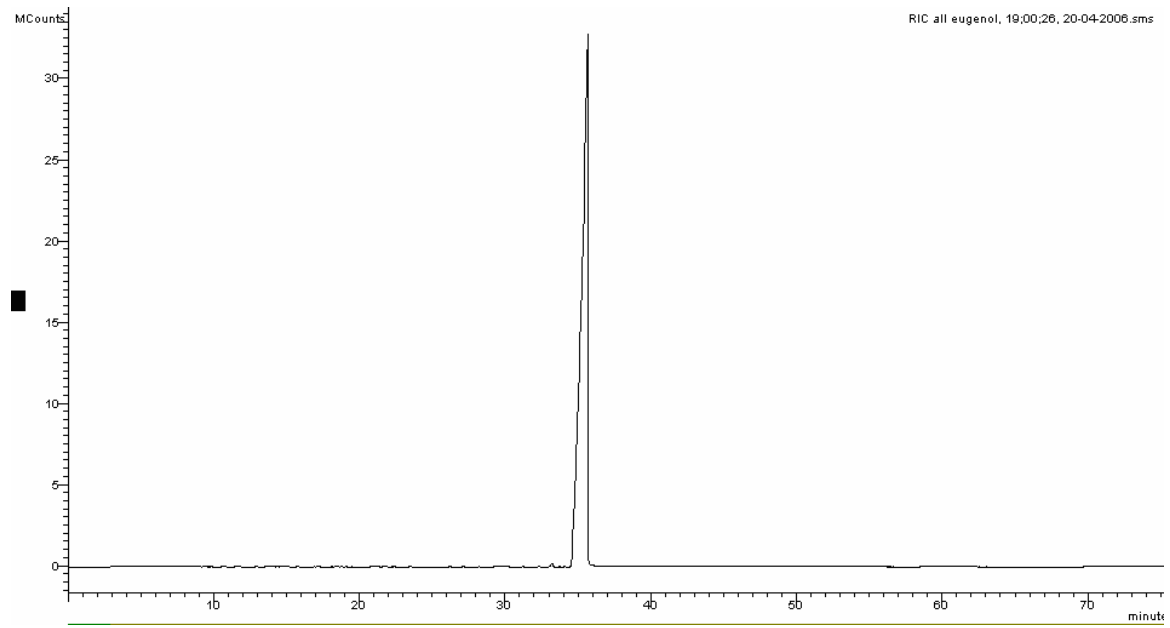
**Anexo 2.** Espectros IR de  $\beta$ -ciclodextrina.

**Anexo 3.** Espectros IR de la mezcla física entre aceite puro y  $\beta$ -ciclodextrina.

**Anexo 4.** Espectros IR del complejo de inclusión AC:  $\beta$ -CD.

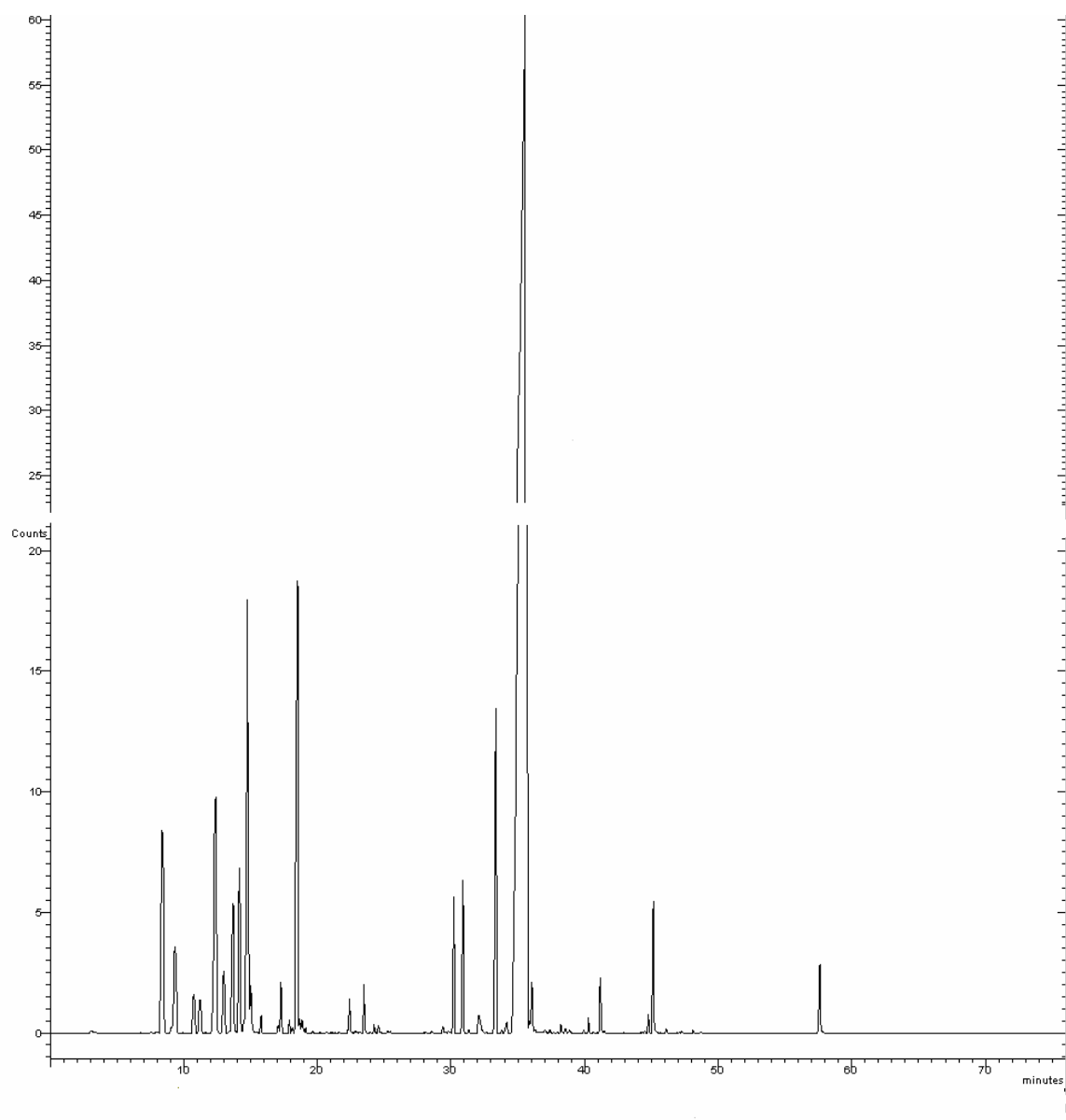
**Anexo 5.** Espectro IR y estructura química de eugenol.

Fuente: Spectral Database for Organic Compounds SDBS (2006)

**Anexo 6.** Cromatograma del estándar de eugenol.



**Anexo 7.** Cromatograma y porcentaje de eugenol en el aceite esencial puro.



<b>ug/mL</b>	<b>Area</b>	<b>[Eugenol] en aceite</b>	<b>% Eugenol (p/p)</b>
1020	5934	805.7010759	78.99
1020	5906	801.9213272	78.62
1020	5807	788.5572159	77.31

**Anexo 8.** Cromatógrama de compuestos volátiles antes (a) y después (b) de la microencapsulación en  $\beta$ -CD. 1: cinamaldehído, 2: eugenol, 3: copaeno, 4:  $\beta$ -caryophylleno

