

Área del Conocimiento de Agricultura

EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES EN DOS VARIEDADES DE CANELA Y SU EFECTO ANTIFÚNGICO EN *ASPERGILLUS FLAVUS* Y *RHIZOPUS STOLONIFER*

Trabajo Monográfico para optar al título de
Ingeniero Químico

Elaborado por:

Br. LIDIA
MARGARITA
BAQUEDANO
PALACIOS
2013-61017

Tutor:

MSc. JUAN MANUEL
ALONSO SANTOS

19 de diciembre de 2023
Managua, Nicaragua

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis queridos padres Pablo Baquedano y Francis Palacios y a mi hermana, Arq. Francis Baquedano, por todo su apoyo incondicional y su amor leal.

AGRADECIMIENTOS

A Jehová Dios, por la vida, la sabiduría, las fuerzas y los principios bíblicos que me enseñó al desarrollar y culminar este proyecto. A mis queridos padres, por su anhelo de brindarme la mejor educación para mi desarrollo personal y profesional.

A la Facultad de Ingeniería Química y a todos mis maestros, por brindarme los conocimientos y aptitudes en mi formación como Ingeniera Química. Al personal del Laboratorio de Procesos y al Programa de Investigación, Estudios Nacionales y Servicios del Ambiente (PIENSA), por proporcionarme las instalaciones y recursos necesarios para desarrollar este trabajo.

A mi tutor MSc. Juan Alonso Santos por aportar de su valioso tiempo, su conocimiento, su apoyo y ánimo constante para culminar este proyecto de investigación. A mi asesora Ing. Heysell Delgado Silva por su conocimiento, disciplina, compromiso y palabras de ánimo durante el desarrollo de esta investigación.

A todos mis familiares, que me apoyaron de corazón durante el transcurso de mi carrera universitaria, a mis amigos que siempre me alentaron en los momentos difíciles y a todos aquellos amigos increíbles que hice en la universidad: gracias por su ayuda, su paciencia, su consuelo y su amistad. Todos los buenos recuerdos que hicimos quedaran grabados en mi corazón como parte importante de esta etapa de mi vida.

Por último, quiero agradecer de manera especial a mi compañera Ninoska Guerrero Rivera, quien trabajó incansablemente junto conmigo en el desarrollo de esta investigación, pero que por motivos ajenos no pudo concluir la investigación. Su pasión, constancia, actitud positiva, alegría, habilidades y resiliencia fueron fundamentales para poder realizar este proyecto. Gracias a Ninoska, aprendí muchas lecciones que me permitieron crecer y desarrollarme más como ser humano, fue una compañera inigualable, y estoy segura que donde sea que vaya, debido a la gran calidad de persona que es, logrará tener éxito en todas las metas que se proponga pues siempre se esfuerza, trabaja duro y da lo mejor de sí.

OPINIÓN DEL CATEDRÁTICO GUÍA

Esta investigación se basó en el estudio de las propiedades antifúngicas del aceite esencial de dos especies de canela contra dos hongos comunes y muy perjudiciales que tienen una gran afectación tanto en la contaminación de alimentos y granos en almacenamiento, como infecciones en animales y seres humanos.

La primera parte del estudio se centró en encontrar las mejores condiciones de obtención del aceite esencial a escala de laboratorio, en las cuales se identificó el mayor rendimiento y la mejor calidad de los aceites. Los aceites obtenidos se analizaron por Espectroscopía Infrarroja de Transformada de Fourier (FTIR), obteniendo un alto grado de correlación (> 95%) respecto al aceite esencial de referencia, y se logró identificar la presencia de los dos compuestos más abundantes en el aceite de canela, el cinamaldehído y el eugenol.

En segundo lugar, se investigó el efecto inhibitorio de los aceites esenciales obtenidos contra *Aspergillus flavus* y *Rhizopus stolonifer*, comparándolo con un aceite esencial de canela de referencia, encontrando las concentraciones a las cuales los aceites esenciales demostraron efecto inhibitor del crecimiento de ambos hongos.

Cabe mencionar que esta segunda parte fue todo un reto por lo difícil que resultó trabajar con estos dos hongos en el laboratorio; hubo mucho trabajo de fondo relacionado al acondicionamiento, pruebas preliminares, y pruebas que se repitieron por lo difícil de mantener el crecimiento de los hongos en condiciones controladas y libres de contaminación que no están plasmadas en el documento. Sin embargo, la tesista demostró tenacidad y persistencia, logrando el cumplimiento de los objetivos propuestos en la investigación.

Del presente estudio se obtuvieron resultados satisfactorios, indicando la tecnología de extracción más adecuada para obtener el aceite esencial con los mayores rendimientos y calidad, así como los tratamientos que demostraron el mayor efecto antifúngico contra cada hongo.

Tomando en cuenta todo el trabajo y esfuerzo que plasmó en este estudio la Br. Lidia Baquedano, incluyendo una extensa revisión de literatura, iniciativa para resolver problemas, aplicación de diseños experimentales, trabajo experimental ordenado y acucioso, aplicación de conceptos aprendidos durante sus estudios de grado y aprendizaje de nuevos conocimientos, en especial en la parte de microbiología, doy fe de que Lidia desarrolló un trabajo de calidad a como lo dictan los estándares de nuestra institución.

Por las razones expuestas, solicito respetuosamente a los miembros del jurado otorgar la máxima calificación a este trabajo, fruto del esfuerzo, iniciativa y compromiso de la Bachiller Lidia Baquedano Palacios, concediéndole así el título de Ingeniero Químico.

MSc. Juan Manuel Alonso Santos
Tutor

RESUMEN

Este estudio tuvo como propósito evaluar dos métodos de extracción de aceite esencial para las cortezas de *Cinnamomum zeylanicum* y *Cinnamomum burmannii*. Dicha evaluación se realizó con base en el rendimiento y calidad de los aceites esenciales que se obtuvieron dadas sus diferencias en el contenido de sus principios activos. Posteriormente se evaluaron las propiedades antifúngicas de estos aceites esenciales a diferentes concentraciones por el método de inhibición de difusión en pozos con la finalidad de demostrar el efecto inhibitorio sobre cepas de *Aspergillus flavus* y *Rhizopus stolonifer*, que suelen contaminar los cultivos de hortalizas y frutas, así como alimentos procesados listos para su consumo. Estos hongos provocan grandes pérdidas económicas en diferentes industrias procesadoras de alimentos y agrícolas debido a que la mayoría de las cosechas se pierden por la contaminación ocasionada.

Para llevar a cabo los objetivos de esta investigación se realizó un diseño experimental factorial 2^3 cuyas variables de respuesta determinaron la mejor combinación entre método de extracción (arrastre por vapor e hidrodestilación), variedad de canela (*C. zeylanicum* y *C. burmannii*) y cantidad de material vegetal utilizado en la extracción (50 y 100 g). Posteriormente mediante un diseño factorial mixto se determinó la actividad antifúngica de los aceites obtenidos a diferentes concentraciones. A la vez se compararon los resultados de inhibición con un aceite esencial de referencia de la corteza de *C. verum*.

Los resultados indicaron que el método de arrastre por vapor es el método con el que se obtienen mejores resultados en el rendimiento de los aceites esenciales, tanto para *C. zeylanicum* y *C. burmannii* empleando 100 y 50 g de material vegetal respectivamente para la extracción. En la inhibición de *A. flavus* el aceite de la variedad *C. zeylanicum* a una concentración del 3% es el que presentó los mayores halos de inhibición, y se determinó que el método de extracción de aceite esencial para este hongo no tiene diferencia significativa en los resultados. Al contrario, para la inhibición de *R. stolonifer*, el mejor método de extracción de aceite es el de arrastre por vapor, empleando la variedad *C. zeylanicum*, y presenta su efecto antifúngico a partir de concentraciones del 25%, este efecto es exponencial, pues a mayor concentración de aceite, el halo de inhibición en *R. stolonifer* es mayor, siendo la concentración del 100% la de mayor efectividad.

Estos resultados ofrecen una perspectiva favorable para aprovechar de manera integral el cultivo de canela en nuestro país, ya que todas las partes de la planta contienen compuestos con potencial para combatir microorganismos. Estos descubrimientos pueden ser el punto de partida para futuros proyectos que se centren en la creación de pesticidas naturales, soluciones para la preservación de alimentos y productos farmacéuticos.

TABLA DE CONTENIDO

Dedicatoria	i
Agradecimientos	ii
Opinión del catedrático guía	iii
Resumen	iv
Tabla de Contenido	v
Índice de Tablas.....	vii
Índice de Figuras	vii
Lista de Abreviaturas	ix
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo General	3
2.2 Objetivos Específicos	3
3 MARCO TEÓRICO.....	4
3.1 La Canela	4
3.1.1 Características del árbol de canela	4
3.1.2 Diferencias entre <i>C. zeylanicum</i> y <i>C. burmannii</i>	4
3.2 Aceite esencial de canela	5
3.2.1 Aceite esencial de referencia	5
3.2.2 Composición química del aceite esencial de canela	5
3.3 Métodos de extracción de aceites esenciales	6
3.3.1 Arrastre por vapor de agua	6
3.3.2 Hidrodestilación	6
3.4 Calidad de los aceites esenciales.....	7
3.5 Rendimiento de los aceites esenciales de canela.....	7
3.6 Factores que afectan el rendimiento y la calidad de los aceites esenciales	7
3.7 Identificación de los compuestos químicos de los aceites esenciales de canela	8
3.8 Hongos evaluados.....	9
3.8.1 <i>Aspergillus flavus</i>	9
3.8.2 <i>Rhizopus stolonifer</i>	10
3.8.3 Cultivo monospórico	11
3.8.4 Concentraciones de los aceites esenciales y esporas	11
3.8.5 Método de Kirby Bauer modificado	11
3.8.6 Escala de Duraffourd.....	12
4 HIPÓTESIS	13

5	METODOLOGÍA	14
5.1	Material vegetal	14
5.1.1	Preparación del material.....	14
5.2	Extracción del aceite esencial de canela	14
5.2.1	Extracción por el método de arrastre por vapor de agua	14
5.2.2	Extracción por el método de hidrodestilación	16
5.3	Evaluación del rendimiento y la calidad de las extracciones de aceites esenciales.....	16
5.3.1	Cálculo del rendimiento de los aceites esenciales.....	16
5.3.2	Identificación de compuestos químicos y valoración de la calidad de los aceites esenciales por FTIR	17
5.4	Evaluación del efecto antifúngico de los aceites esenciales	17
5.4.1	Desarrollo de cultivos monospóricos.....	19
5.4.2	Cálculo de la concentración de esporas.....	21
5.4.3	Preparación de las concentraciones de aceites esenciales.....	22
5.4.4	Inhibición por el método de difusión en pozos.....	23
5.4.5	Cálculo del efecto inhibitorio	24
6	RESULTADOS.....	26
6.1	Rendimiento de los aceites esenciales	26
6.2	Identificación del Cinamaldehído y Eugenol mediante FTIR de cada uno de los aceites esenciales	28
6.3	Efecto inhibitorio de los aceites esenciales	32
6.3.1	Efecto de inhibición del aceite esencial de canela sobre <i>A. flavus</i>	32
6.3.2	Efecto de inhibición del aceite esencial de canela sobre <i>R. stolonifer</i>	35
7	CONCLUSIONES	38
8	RECOMENDACIONES	39
9	BIBLIOGRAFÍA	40
10	ANEXOS.....	43

LISTA DE TABLAS

Tabla 3.1 Compuestos mayoritarios en los aceites esenciales de <i>C. zeylanicum</i> (Paranagama <i>et al.</i> , 2020) y <i>C. burmannii</i> (Ying <i>et al.</i> , 2019).	6
Tabla 4.1 Descripción de las hipótesis planteadas en este trabajo.....	13
Tabla 5.1 Detalle de los factores y niveles para crear el diseño experimental factorial 2^3 ...16	16
Tabla 5.2 Descripción del diseño factorial 2^3	17
Tabla 5.3 Preparación de concentraciones en base a 1 mL de solución para <i>A. flavus</i>	22
Tabla 5.4 Preparación de concentraciones en base a 1 mL de solución para <i>R. stolonifer</i> . .23	23
Tabla 5.5 Factores y niveles para crear el diseño experimental factorial mixto.....	23
Tabla 5.6 Descripción del diseño experimental mixto.	23
Tabla 6.1 Promedio del porcentaje de rendimiento de las extracciones de aceite esencial de canela.	26
Tabla 6.2 Rangos de transmitancia de los espectros de aceites esenciales para la identificación de cinamaldehído y eugenol.	28
Tabla 6.3 Porcentaje de correlación entre los aceites esenciales extraídos comparados con aceite de referencia.	31
Tabla 6.4 Porcentaje de inhibición de <i>A. flavus</i> con respecto al control positivo	33
Tabla 6.5 Porcentaje de inhibición de <i>R. stolonifer</i> con respecto al control positivo.....	35
Tabla 6.6 Efecto antifúngico de las cinco diferentes concentraciones de aceites esenciales de canela según su método de extracción y referencia contra <i>A. flavus</i> y <i>R. stolonifer</i>	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 Ramas de canela de <i>C. zeylanicum</i> (izquierda) y <i>C. burmannii</i> (derecha).....	4
Figura 3.2 Espectros infrarrojo del (a) cinamaldehído y (b) eugenol.	9
Figura 3.3 <i>Aspergillus flavus</i> (a) Morfología en PDA; (b) Foto microscópica (Chowdhury <i>et al.</i> , 2018).	10
Figura 3.4 <i>Rhizopus stolonifer</i> (a) Morfología en PDA; (b) Foto microscópica (Farrera <i>et al.</i> , 2007).	10
Figura 5.1 Variedades de canela (a) <i>C. zeylanicum</i> ; (b) <i>C. burmannii</i>	14
Figura 5.2 Equipo para la extracción de arrastre por vapor de agua.	15
Figura 5.3 Equipo para separación de extracto-solvente (Martínez y Talavera, 2018).	15
Figura 5.4 Equipo para la extracción por hidrodestilación.	16

Figura 5.5 Hongos evaluados: <i>A. flavus</i> (a) en placa, (b) conidios; <i>R. stolonifer</i> (c) en placa, (d) conidios.	18
Figura 5.6 Desarrollo de <i>A. flavus</i> en: (a) 24 horas; (b) 48 horas; (c) 72 horas (anverso de la placa); (d) 72 horas (reverso de l placa).	18
Figura 5.7 Crecimiento de <i>R. stolonifer</i> en: (a) 24 horas; (b) 48 horas (anverso de la placa); (c) 48 horas (reverso de la placa).	19
Figura 5.8 Diluciones seriadas (a) barrido de Tween en <i>A. flavus</i> ; (b) recolección de muestra de <i>A. flavus</i> ; (c) dilución 10^{-1} <i>A. flavus</i> ; (d) recolección de muestra de <i>R. stolonifer</i> ; (e) dilución 10^{-1} <i>R. stolonifer</i> ; (f) serie de dilución de <i>A. flavus</i> (g) serie de dilución de <i>R. stolonifer</i>	20
Figura 5.9 Cultivos monospóricos (a) selección de colonias; (b) <i>A. flavus</i> con 11 días de desarrollo; (d) <i>R. stolonifer</i> desarrollado por completo en 3 días.	20
Figura 6.1 Gráfica de factores que influyen en el rendimiento de aceite esencial de canela.	27
Figura 6.2 Diagrama de comparación de los factores que influyen en el rendimiento de aceite esencial.	27
Figura 6.3 Espectro infrarrojo del aceite esencial arrastre por vapor- <i>C. zeylanicum</i>	29
Figura 6.4 Espectro infrarrojo del aceite esencial arrastre por vapor- <i>C. burmannii</i>	29
Figura 6.5 Espectro infrarrojo del aceite esencial hidrodestilación- <i>C. zeylanicum</i>	30
Figura 6.6 Espectro infrarrojo del aceite esencial hidrodestilación- <i>C. burmannii</i>	30
Figura 6.7 Espectro infrarrojo del aceite esencial de referencia <i>C. verum</i>	31
Figura 6.8 Seriado de diluciones hasta 10^4 UFC/mL de (a) <i>A. flavus</i> ; (b) <i>R. stolonifer</i>	32
Figura 6.9 Factores que influyen en el porcentaje de inhibición de <i>A. flavus</i>	34
Figura 6.10 Gráfica de efectos principales en el porcentaje de inhibición de <i>A. flavus</i>	34
Figura 6.11 Factores que influyen en el porcentaje de inhibición de <i>R. stolonifer</i>	36
Figura 6.12 Gráfica de efectos principales en el porcentaje de inhibición de <i>R. stolonifer</i>	36

LISTA DE ABREVIATURAS

AB	Aceite esencial de <i>C. burmannii</i> extraído con arrastre por vapor de agua
AZ	Aceite esencial de <i>C. zeylanicum</i> extraído con arrastre por vapor de agua
AR	Aceite esencial de canela de referencia
ΣC	Suma de las colonias contadas en dos placas de las dos diluciones consecutivas
cm^{-1}	Número de onda
d	Factor de dilución correspondiente a la primera dilución elegida
HB	Aceite esencial de <i>C. burmannii</i> extraído con hidrodestilación
HZ	Aceite esencial de <i>C. zeylanicum</i> extraído con hidrodestilación
m_{AE}	Masa del aceite esencial (g)
m_{MV}	Masa de material vegetal (g)
N	Número de Unidades Formadoras De Colonias por mililitro (UFC/mL)
$\frac{1}{n}$	Factor de dilución en cada tubo
PDA	Agar papa dextrosa
P_R	Porcentaje de rendimiento (%)
UFC	Unidades formadoras de colonias
V	Volumen de inóculo utilizado en cada placa (mL)

1 INTRODUCCIÓN

La canela es una especia conocida a nivel mundial y de acuerdo con su origen existen variedades de canela con diferentes características físicas de sabor, textura y calidad. Esto hace que difiera la cantidad de compuestos presentes en el aceite esencial que se obtiene de sus cortezas; el cual posee un aroma dulce y una gran variedad de propiedades antibacterianas, antifúngicas y antioxidantes, que en su mayoría por su diversidad de usos benefician a diferentes industrias.

Los aceites esenciales, se extraen por varios métodos como, expresión en frío, destilación por vapor de agua, hidrodestilación, extracción con solventes volátiles, enfleurage, entre otros. Por el contenido de cinamaldehído y eugenol, el aceite esencial de canela es clasificado como un aceite esencial fenilpropanoide. La canela se ha utilizado para tratamientos de dolores bucales y desordenes periodontales, se ha encontrado que contiene resinas cianogénicas y ácido hidrociánico los cuales tiene propiedades antibacteriales, así como taninos con acción hemostática y astringente (Martínez, 1996).

Existen diferentes métodos de extracción para obtener el aceite esencial de canela, la elección del método depende de la parte de la planta de donde se hará la extracción y el uso que se le vaya a dar al aceite esencial obtenido. Generalmente se suele extraer de la corteza de canela y los métodos más comunes son: el método de arrastre por vapor de agua e hidrodestilación.

El trabajo de Senhaji *et al.*, (2006) probó el efecto inhibitorio de las propiedades antifúngicas del aceite esencial de canela extraído por el método de hidrodestilación. Se evaluó su efecto antifúngico por la técnica de microambiente de Kellner y Kober sobre *A. flavus* IP1202-1, *A. Níger* ATCC16404, *A. parasiticus* NRRL2999 y *P. cyclopium* IP1231-80. El estudio determinó que el aceite esencial de canela a una concentración de 0.5% inhibe totalmente el crecimiento de estos hongos.

La actividad antifúngica del quitosano y los aceites esenciales de tomillo, clavo y canela sobre *R. stolonifer* de Ovares Rodríguez (2016) fue evaluada por dos métodos: *in vitro* e *in situ*. *R. stolonifer* es causante de la pudrición blanda de muchas hortalizas, una enfermedad post cosecha que ocasiona pérdidas económicas importantes. Uno de los tratamientos más efectivos para inhibir este microorganismo *in vitro* fueron los tres aceites esenciales a una concentración de 0.3 mg/mL. Se concluyó que el tratamiento individual con quitosano es una alternativa natural para controlar la pudrición blanda en frutos de tomates.

En el trabajo de Kabuba y Huberts (2009) se evaluó el efecto insecticida y repelente del aceite esencial de canela, los ectoparásitos disminuyen la productividad del ganado, debido a la resistencia farmacológica los antiparasitarios no suelen ser tan eficaces. Las moscas (moscas domesticas) provocan enfermedades virales, bacterianas, fúngicas y parasitarias provocando estrés en los animales y disminución en la producción de la leche y carne. Realizaron métodos de prueba *in vitro* e *in vivo*, prepararon una nanoemulsión de aceite esencial de canela, las moscas fueron separadas y tratadas con la forma libre de aceite esencial de *C. zeylanicum* y su forma de nanoemulsión rociando 100 µL/grupo. En el estudio se demostró que el aceite esencial de *C. zeylanicum* a una concentración del 10% es capaz de matar el 100% de las

moscas, además de su efecto repelente contra *Haematobia irritans*, aunque la nanoemulsión con aceite esencial de *C. zeylanicum* al 5% mostró un 100% de efectividad. El efecto insecticida del aceite esencial se produce por la penetración del aceite esencial en los tejidos del parásito, modificando las principales funciones fisiológicas de la mosca.

La comparación de los métodos de extracción para obtener aceite esencial de las variedades de canela *Cinnamomum zeylanicum* y *Cinnamomum burmannii*, contribuye a definir cuál de estos métodos utilizar para obtener un mayor rendimiento y una mejor calidad basado en la cantidad de los principios activos que estos contengan y la eficacia antifúngica que demuestren en el proceso de inhibición del crecimiento de las cepas de *A. flavus* y *R. stolonifer*.

Con los resultados obtenidos se pretende motivar el diseño y desarrollo de la formulación de productos que ayuden a mejorar la conservación de los alimentos, higiene, desinfección y prevención de contaminación ocasionadas por estos hongos en la industria agrícola y de procesos de alimentos, además de incentivar el desarrollo de tratamientos para evitar o combatir enfermedades dermatológicas o micotóxicas en el ser humano al ingerir alimentos contaminados por estos hongos.

En Nicaragua se cultiva muy poco la canela, pero se pueden extraer los principios activos de los desperdicios de hojas, corteza y hasta la raíz del mismo árbol que se da en las cosechas para aprovechar los compuestos antioxidantes y antimicrobianos que se obtienen de cualquier parte de esta planta con diferentes propiedades y usos, incentivando el desarrollo de proyectos e investigaciones que colaboren no solo a la ciencia, sino también al desarrollo económico del país.

En este trabajo se obtuvo aceite esencial de canela de las variedades de canela *C. zeylanicum* y *C. burmannii*, en ambas variedades se emplearon los métodos de extracción con vapor de agua e hidrodestilación. Los métodos de extracción fueron evaluados mediante el porcentaje de rendimiento de aceite obtenido, la comparación de cinamaldehído y eugenol presentes en los aceites esenciales con un aceite de referencia y la inhibición *in vitro* de los hongos *Aspergillus flavus* y *Rhizopus stolonifer*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

- Evaluar dos métodos de extracción de aceites esenciales de la corteza de *Cinnamomum zeylanicum* y *Cinnamomum burmannii* y su efecto antifúngico sobre los microorganismos patógenos *Aspergillus flavus* y *Rhizopus stolonifer*.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar la influencia de los métodos de extracción por arrastre con vapor de agua e hidrodestilación en el rendimiento y calidad de los aceites esenciales de las variedades de corteza *C. zeylanicum* y *C. burmannii*.
- Evaluar el efecto antifúngico de los aceites esenciales de las cortezas de *C. zeylanicum* y *C. burmannii* mediante la inhibición *in vitro* de *A. flavus* y *R. stolonifer* por el método de difusión en pozo basado en la técnica del antibiograma de Kirby Bauer.
- Comparar el efecto antifúngico de los aceites esenciales obtenidos de las cortezas *C. zeylanicum* y *C. burmannii* con un aceite esencial comercial de referencia de *C. verum*.

3 MARCO TEÓRICO

3.1 La Canela

Es una planta originaria del sur de la India y Sri Lanka. Crece en zonas tropicales y húmedas, es cultivada principalmente en Brasil, Indonesia, Islas Occidentales e Islas del Océano Pacífico. De la corteza interna del árbol de canela se obtiene la especia también conocida como canela que es una de las especias más utilizadas por todo el mundo (Britannica, 2023). De las hojas, corteza y raíces del árbol de canela se extrae aceite esencial que posee propiedades antioxidantes, antibacterianas y antifúngicas (Geilfus, 1994).

3.1.1 Características del árbol de canela

El género *Cinnamomum*, comprende más de 250 especies de árboles y arbustos conocidos como caneleros que pertenecen a la familia Lauraceae, son árboles perennes con hojas opuestas, coriáceas y ovaladas. Las hojas jóvenes son de color rojizo, las cuales al madurar adquieren un color verde oscuro, sus flores son pequeñas, de color amarillo pálido y sus frutos son drupas ovoides con una semilla (Accame, 2009).

3.1.2 Diferencias entre *C. zeylanicum* y *C. burmannii*

Se conoce como “canela verdadera” a la canela de Ceilán (*Cinnamomum zeylanicum* o *Cinnamomum verum* J.Presl) pues es la de mayor valor comercial. La canela de Ceilán contiene mayores cantidades de compuestos fenólicos y aromáticos como eugenol y cinamaldehído, siendo este último el compuesto al que mayormente se le atribuye el olor y sabor característico de la canela (dos Santos, 2021).

La “canela falsa” se obtiene de variedades de canela como *Cinnamomum cassia*, *Cinnamomum aromaticum*, *Cinnamomum loureiroi* y *Cinnamomum burmannii*. Estas variedades, a diferencia de la canela de Ceilán, tienen en su composición química un alto contenido de cumarina, un compuesto que puede presentar un efecto hepatotóxico al consumirse en cantidades superiores a 0.1 mg/kg (dos Santos, 2021).



Figura 3.1 Ramas de canela de *C. zeylanicum* (izquierda) y *C. burmannii* (derecha).

En la figura 3.1 pueden verse las diferencias físicas entre *C. zeylanicum* y *C. burmannii*. La canela de Ceylán (*C. zeylanicum*) es originaria de Sri Lanka y el sur de la India, las ramas de canela son de color marrón claro a medio, de sabor ligeramente dulce y se obtienen al enrollar y dejar secar varias capas finas y quebradizas de la corteza. Por otro lado, la canela de Indonesia (*C. burmannii*) es de color marrón rojizo oscuro y sabor picante y sus ramas se obtienen de una capa única de corteza más gruesa y dura (Kawatra, 2015).

3.2 Aceite esencial de canela

Se define como aceite esencial al producto obtenido de materia prima natural por destilación al vapor (ISO 9235:2021). Los aceites esenciales son líquidos oleosos aromáticos, la esencia o aroma de las plantas se debe a que los aceites esenciales tienen fragancias y sabores característicos (Adinew, 2014).

El aceite esencial de canela es un líquido volátil, hidrofóbico, ligeramente viscoso, generalmente de color amarillo, de aroma dulce, especiado y amaderado (Stevens y Allred, 2022). Se utiliza en las industrias alimentaria, farmacéutica y de perfumes. También es reconocido por sus propiedades antibacterianas, antifúngicas, antiinflamatorias y antioxidantes (Rincón Aguilar, 2014).

3.2.1 Aceite esencial de referencia

El aceite esencial de canela de referencia (*C. verum*) se compró a la empresa Plant Therapy, ubicada en 621 Washington St. S. Suite 100, Twin falls, ID83301 US.

3.2.2 Composición química del aceite esencial de canela

La composición del aceite esencial varía según la parte de la planta de la que se extraiga, puede contener hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, cetonas, fenoles y ésteres (Adinew, 2014). Algunos componentes frecuentes en el aceite esencial de la corteza de canela son: cinamaldehído, eugenol, acetato de eugenol, acetato de cinamilo, alcohol cinámico, metil eugenol, benzaldehído, cuminaldehído, benzoato de bencilo, linalol, hidrocarburos monoterpénicos, cariofileno y safrol (Haddi *et al.*, 2017).

El cinamaldehído (3-fenilprop-2-enal) y el eugenol (4-alil-2-metoxifenol) son fenilpropanoides sintetizados a lo largo de la vía del shikimato en las plantas a partir del aminoácido fenilalanina. El cinamaldehído (C_9H_8O) contiene un anillo de benceno, una cadena corta de carbono y un grupo aldehído. El eugenol ($C_{10}H_{12}O_2$) contiene un anillo de benceno, con un grupo hidroxilo y un grupo éter en orto-conformación y una cadena alilo en para-conformación con el grupo hidroxilo (Stevens y Allred, 2022).

Los fenilpropanoides, también conocidos como polifenoles o compuesto fenólicos, son metabolitos secundarios que, junto con los alcaloides y los terpenoides, participan activamente matando directamente al microorganismo patógeno, degradando su pared celular o restringiendo su invasión al resto de la planta (Jiménez *et al.*, 2003).

La tabla 3.1 muestra que el compuesto mayoritario, tanto en *C. zeylanicum* y *C. burmannii* es el cinamaldehído. En *C. zeylanicum* los dos componentes principales representa el 54.65% de los compuestos presentes en el aceite esencial y en *C. burmannii* representan el 60.11%.

Tabla 3.1 Compuestos mayoritarios en los aceites esenciales de *C. zeylanicum* (Paranagama *et al.*, 2020) y *C. burmannii* (Ying *et al.*, 2019).

Compuesto en <i>C. zeylanicum</i>	%	Compuesto en <i>C. burmannii</i>	%
Cinamaldehído	50.5	(E)-Cinamaldehído	34.44
Eugenol	4.15	Eugenol	25.67
Linalol	3.70	Cumarina	16.82
Cumarina	2.8	Borneol	3.28

3.3 Métodos de extracción de aceites esenciales

La extracción es una técnica de separación de compuestos orgánicos de una mezcla de reacción o de sus fuentes naturales por medio de un disolvente. La destilación es uno de los métodos más antiguos, simples y extendidos para extraer aceite esencial de canela, especialmente a nivel comercial. En el proceso de destilación de la corteza de canela, los vapores de agua se utilizan como disolvente que impulsa a temperatura de ebullición las moléculas del aceite esencial (Haddi *et al.*, 2017).

3.3.1 Arrastre por vapor de agua

Este proceso se realiza con el vapor generado por el calentamiento del agua a través de una caldera. El vapor de agua a presión más alta que la atmosférica rompe las células o canales oleíferos de la corteza de canela que se apoya sobre una malla suspendida, arrastrando así una mezcla volátil, luego de atravesar un refrigerante la mezcla se condensa y posteriormente es recolectada y separada en una fracción acuosa (Stashenko, 2009).

Para separar el aceite esencial de la mezcla acuosa, se agrega un disolvente que tenga un punto bajo de ebullición. Al calentar la nueva mezcla de disolvente-aceite esencial, se recupera el disolvente y se obtiene el aceite esencial de canela.

3.3.2 Hidrodestilación

A diferencia del arrastre por vapor de agua, la corteza de canela se sumerge en el agua, la cual se calienta con constante agitación para evitar aglomeraciones o sedimentación en el fondo del recipiente. Dentro del sistema, se genera vapor que atraviesa un condensador donde luego se recolecta la mezcla de agua con aceite esencial. A la mezcla se agrega un disolvente con un punto de ebullición bajo, que se separa fácilmente del aceite esencial al calentarse (Stashenko, 2009).

3.4 Calidad de los aceites esenciales

Los aceites esenciales varían de calidad en dependencia de la variedad de la planta, la parte de la planta, de su origen geográfico, del método de obtención, las condiciones de extracción, almacenamiento, envejecimiento entre otros. Los parámetros de calidad en los aceites esenciales garantizan que la esencia posea características analíticas determinadas por su composición química y el contenido de las sustancias de interés, así como de sus propiedades fisicoquímicas y organolépticas (Ovares Rodríguez, 2016).

Los parámetros de calidad de los aceites esenciales se clasifican en seis categorías (Albarracín y Gallo, 2003):

- **Características organolépticas:** olor, sabor y apariencia.
- **Determinaciones físicas:** densidad, índice de refracción y poder rotatorio, índice de congelación, punto de inflamación y rango de destilación.
- **Índices químicos:** acidez, éster y saponificación.
- **Características cromatográficas:** perfil cromatográfico por cromatografía de gases.
- **Características espectroscópicas:** perfil del espectro infrarrojo.
- **Otras determinaciones:** pesticidas y metales pesados.

En este trabajo se consideró como parámetro de calidad del aceite el perfil del espectro infrarrojo de los aceites en comparación con un aceite de canela de referencia.

3.5 Rendimiento de los aceites esenciales de canela

Ovares Rodríguez (2016) determina el rendimiento como la relación que hay entre la masa de aceite esencial obtenido con respecto a la masa de material vegetal utilizado. Se calculó el rendimiento mediante la siguiente ecuación:

$$P_R = \frac{m_{AE}}{m_{MV}} \times 100\% \quad (3.1)$$

Donde:

P_R : Porcentaje de rendimiento (%)

m_{AE} : Masa del aceite esencial (g)

m_{MV} : Masa de material vegetal (g)

3.6 Factores que afectan el rendimiento y la calidad de los aceites esenciales

De acuerdo con Kabuba y Huberts (2009), los principales factores que influyen en el rendimiento y calidad de los aceites esenciales son:

- **Método de destilación:** la temperatura del vapor puede alterar las características de destilación y se debe elegir un método en función del punto de ebullición de los compuestos contenidos en el aceite esencial y la naturaleza de la planta.
- **Diseño adecuado de los equipos:** el diseño incorrecto del tanque, condensador o los separadores pueden provocar la pérdida del aceite y un alto capital de inversiones.
- **Material de construcción de los equipos:** algunos aceites esenciales son de naturaleza corrosiva por lo que es preferible que se destilen con material resistente como aluminio, cobre o acero inoxidable.
- **Condición de la materia prima:** algunos materiales como raíces y las semillas no producen aceite esencial si se destilan en su estado natural, estos deben ser triturados, pulverizados o empapados en agua.
- **Llenado de materia prima y distribución de vapor:** la carga inadecuada de la planta puede provocar una canalización del vapor y causar una destilación incompleta.
- **Parámetros operativos como la presión de entrada de la tasa de inyección de vapor:** el adecuado control de las tasas de inyección y la presión en las unidades operadas por caldera para optimizar la temperatura de extracción y la temperatura máxima de rendimiento del condensado no deben de ser demasiado altas ya que se puede provocar la pérdida del aceite debido a la evaporación.
- **Tiempo de destilación:** los diferentes componentes del aceite esencial se destilan en el orden de su punto de ebullición, por lo tanto, las fracciones de mayor punto de ebullición son las últimas en aparecer cuando, por lo general, se destila muy poco aceite. Si la destilación termina demasiado pronto, se perderán los componentes de alto punto de ebullición.

3.7 Identificación de los compuestos químicos de los aceites esenciales de canela

La Espectroscopia de Transmisión de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR), es utilizada para interpretar y caracterizar sustancias a través de la interpretación espectral, observando el resultado entre la radiación infrarroja y la muestra analizada. Consiste en un dibujo compuesto por bandas y picos en donde en el eje de abscisas están representados todos los valores de número de onda (cm^{-1}) del infrarrojo medio, mientras que en el eje de las ordenadas están representados los valores de la intensidad de absorción o transmisión (Mondragón Cortez, 2015).

En el espectro infrarrojo, cada pico representa un tipo específico de vibración representando los estados excitados producidos al hacer un barrido en todo el intervalo de longitudes de onda en el infrarrojo medio. Existe una gran variedad de tablas de asignación de banda o picos organizadas por compuestos o por grupos de familias químicas, de esta manera se facilita la interpretación de los compuestos contenidos en los extractos obtenidos de la corteza de canela haciendo una comparación visual de éstas (Mondragón Cortez, 2015).

En la figura 3.2 se muestran los espectros infrarrojos del cinamaldehído y el eugenol, que fueron tomados del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología de Estados Unidos.

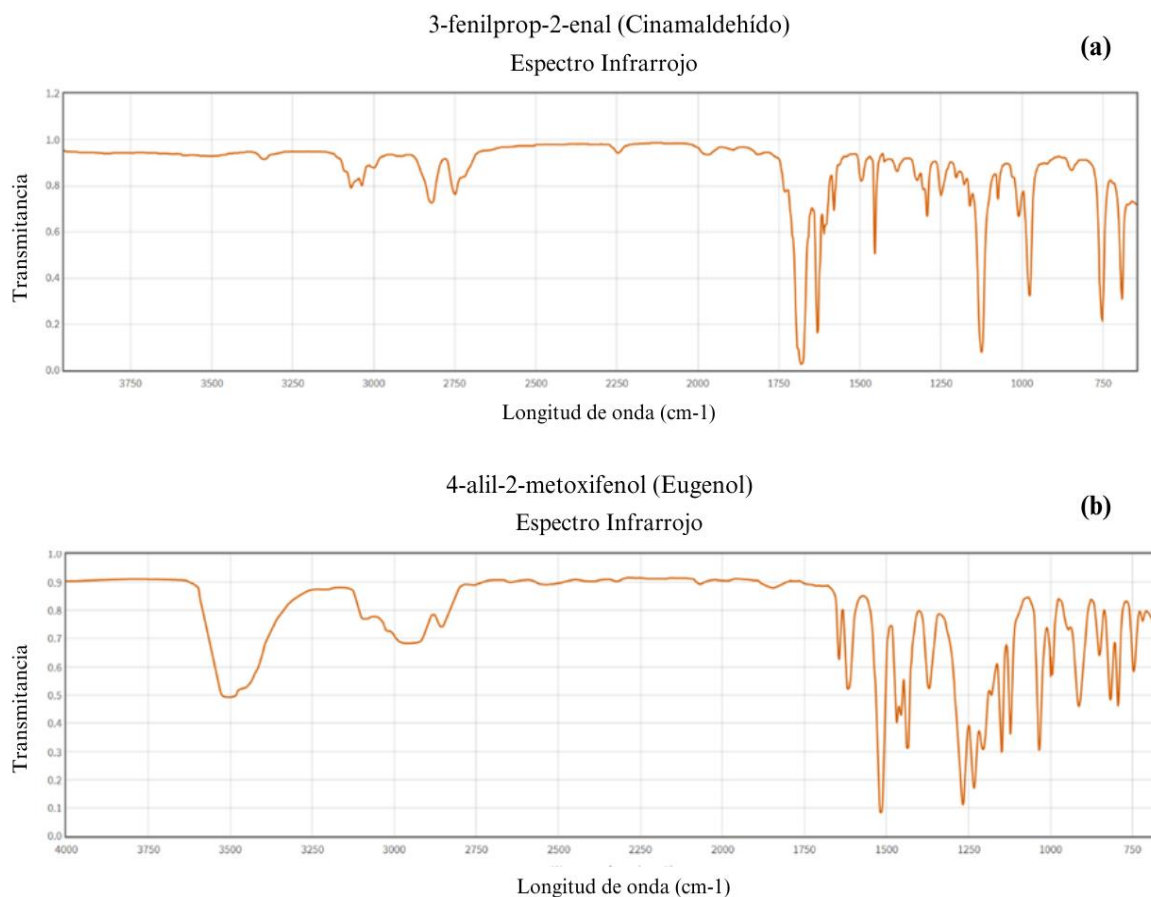


Figura 3.2 Espectros infrarrojo del (a) cinamaldehído y (b) eugenol.

3.8 Hongos evaluados

3.8.1 *Aspergillus flavus*

Es un hongo saprofítico que está presente en el suelo como conidios y en los tejidos vegetales como micelios. Produce un policétido carcinogénico y mutagénico secundario que infecta cultivos de semillas antes y después de las cosechas. Es un patógeno que causa enfermedades como las aspergilosis ó aflatoxicosis, al inhalarlo o al ingerir alimentos contaminados (Amaiike y Keller, 2011).

En la figura 3.3 se muestran colonias de *A. flavus* que crecen rápidamente en cinco o siete días entre 25 y 37 °C. Las colonias son de color verde-amarillo y la textura es pulverulenta con surcos radiales, rugosas o granulosas, ocasionalmente algodonosas en el centro o margen de la colonia y el reverso de la colonia es incoloro (Lemos, 2015).

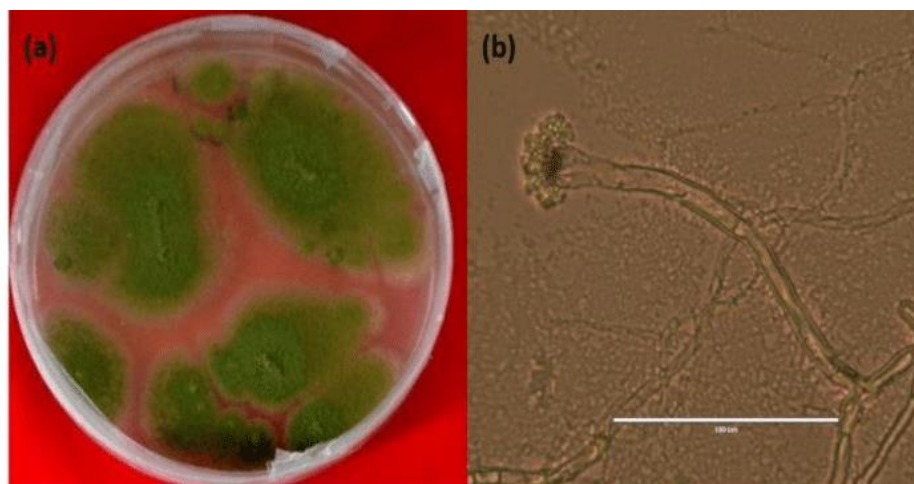


Figura 3.3 *Aspergillus flavus* (a) Morfología en PDA; (b) Foto microscópica (Chowdhury *et al.*, 2018).

3.8.2 *Rhizopus stolonifer*

Es un hongo fitopatógeno, el cual suele desarrollarse a diferentes temperaturas y humedades relativas, su velocidad de crecimiento y la excreción de enzimas pécticas del hongo degradan y disuelven las pectinas de la lámina media de los vegetales, frutas y hortalizas causando la enfermedad conocida como pudrición blanda. Sus esporas pueden sobrevivir largos períodos de tiempo sin agua y soportar temperaturas elevadas, germinando sobre tejidos vegetales (Velázquez-del Valle *et al.*, 2008).

En la figura 3.4 se presenta la morfología de una colonia de *R. stolonifer* en medio PDA, la cual se obtuvo de aislamientos de pudrición blanda de frutos maduros. Se identifican micelios de color blanco a marrón con puntuaciones negras, hifas cenocíticas y esporangióforos de color marrón producidos sobre estolones que se adhirieron al sustrato por medio de rizoides (Farrera *et al.*, 2007).

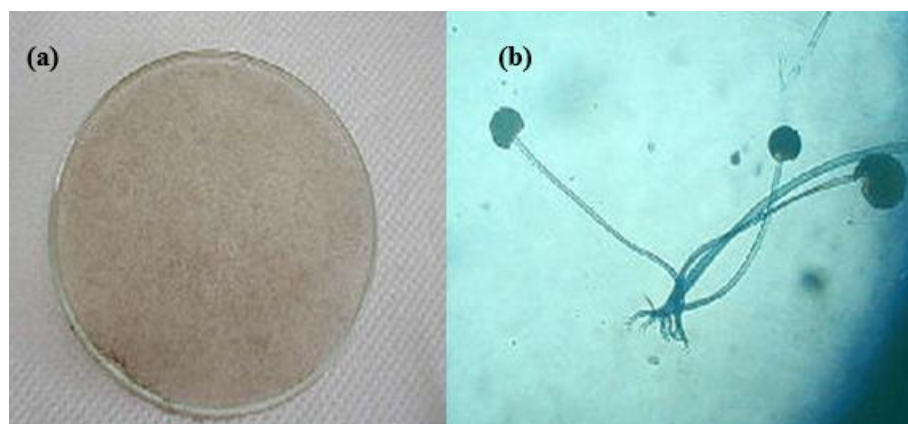


Figura 3.4 *Rhizopus stolonifer* (a) Morfología en PDA; (b) Foto microscópica (Farrera *et al.*, 2007).

3.8.3 Cultivo monospórico

Esta técnica es requerida para contar con un grupo representativo de la población de los microorganismos patógenos, con el objetivo de obtener cultivos puros generados a partir de una sola espora, el cual se rige de una serie de procedimientos con los cuales se garantiza la identidad del cultivo (Gilchrist, 1995).

3.8.4 Concentraciones de los aceites esenciales y esporas

Para este trabajo se realizaron pruebas preliminares en las que se determinó que las concentraciones de prueba para inhibir *A. flavus* son 0.25%, 0.50%, 1%, 2% y 3%, siguiendo así la metodología de Xing *et al.*, (2010). Por otra parte, estas mismas concentraciones para inhibir *R. stolonifer* no son efectivas, por lo que se utilizaron concentraciones mayores de 5%, 25%, 50%, 75% y 100% de aceite esencial de canela.

La concentración de microorganismos presentes en las pruebas de inhibición debe de estar estandarizados para evitar el crecimiento exhaustivo que impida el análisis de los resultados o que proporcione resultados errados en la respuesta del extracto vegetal a evaluar (Ramírez y Castaño, 2009). En este trabajo, la concentración estándar de esporas fue de $10^4 - 10^5$ conidias/mL, tal como lo sugiere Xing *et al.*, (2010).

3.8.5 Método de Kirby Bauer modificado

El método de Kirby Bauer modificado con la técnica de pozos, es una técnica basada en el método originalmente descrito por Bauer *et al.*, (1966). Este método, en disco o en pozo fue estandarizado y es actualmente recomendado por el comité de ensayo de susceptibilidad del NCCLS (Comité Nacional de Normas de Laboratorio Clínico) de los Estados Unidos.

El método se basa en la relación entre la concentración de la sustancia necesaria para inhibir una cepa bacteriana en una placa de agar con un medio de cultivo adecuado y sembrado homogéneamente con la bacteria u hongo a ensayar y sobre la cual se ha depositado un papel filtro de 6 mm de diámetro, o se ha sembrado un pozo impregnado con una cantidad de la sustancia (Ramírez y Castaño, 2009).

El papel filtro Whatman se compone de celulosa, los grupos hidroxilos libres presentes hacen que la superficie del papel sea hidrofílica, impidiendo la difusión del aceite en el agar. Los compuestos apolares pueden no ser influenciados por los grupos hidroxilos y difundirse fácilmente en el agar. Esto puede explicar en parte la más alta sensibilidad detectada cuando el método se utiliza directamente en pozo (Ramírez y Castaño, 2009).

En el trabajo de Moreno-Limón *et al.*, (2011) realizaron la técnica de pozos en medio PDA, donde sembraron por extensión con un asa Drigalsky, cepas de *A. flavus* y *Penicillium sp* en cada una de las placas, luego realizaron seis perforaciones de 5 mm de diámetro distribuidas equidistantes en las placas de Petri en los cuales colocaron cada uno de los tratamientos en diferentes concentraciones.

3.8.6 Escala de Duraffourd

La escala de Duraffourd se utiliza para la evaluación cualitativa del efecto inhibitorio *in vitro* según el diámetro de la zona de inhibición. Se clasifica como sensibilidad nula (-) a un diámetro menor o igual a 8 mm, sensible (+) a un diámetro de 9-14 mm, muy sensible (++) entre los 15-19 mm y altamente sensible (+++) si el diámetro de inhibición es mayor o igual a 20 mm (Velásquez Villafuerte, 2017).

4 HIPÓTESIS

Para el presente trabajo se plantearon cuatro hipótesis de investigación, relacionadas con los objetivos específicos del trabajo:

Tabla 4.1 Descripción de las hipótesis planteadas en este trabajo.

Hipótesis Nulas	Hipótesis Alternativas
Hipótesis nula 1 H ₀₁ : Ninguno de los métodos de extracciones influye significativamente en el rendimiento de los aceites esenciales de las dos variedades de canela.	Hipótesis alternativa 1 H _{a1} : Al menos uno de los métodos de extracción influye significativamente en el rendimiento de los aceites esenciales de las dos variedades de canela.
Hipótesis nula 2 H ₀₂ : Ninguno de los métodos de extracción influye significativamente en la calidad de los aceites esenciales de las variedades de canela.	Hipótesis alternativa 2 H _{a2} : Al menos uno de los métodos de extracción influye significativamente en la calidad de los aceites esenciales de las variedades de canela.
Hipótesis nula 3 H ₀₃ : Las concentraciones de los aceites esenciales no influyen significativamente en el efecto antifúngico contra alguno de los hongos <i>A. flavus</i> o <i>R. stolonifer</i> .	Hipótesis alternativa 3 H _{a3} : Las concentraciones de los aceites esenciales sí influyen significativamente en el efecto antifúngico contra alguno de los hongos <i>A. flavus</i> o <i>R. stolonifer</i> .
Hipótesis nula 4 H ₀₄ : Los aceites esenciales no demuestran efecto inhibitorio sobre alguno de los hongos <i>A. flavus</i> o <i>R. stolonifer</i> .	Hipótesis alternativa 4 H _{a4} : Los aceites esenciales demuestran efecto inhibitorio sobre al menos uno de los hongos <i>A. flavus</i> o <i>R. stolonifer</i> .

5 METODOLOGÍA

5.1 Material vegetal

La variedad de canela *C. zeylanicum* se obtuvo en la zona de especias del mercado Roberto Huembes y la variedad *C. burmannii* se compró en el supermercado La Colonia, ambos lugares ubicados en Managua, Nicaragua.



Figura 5.1 Variedades de canela (a) *C. zeylanicum*; (b) *C. burmannii*.

5.1.1 Preparación del material

Para la extracción de aceite esencial se trituraron aproximadamente 1.5 kg de cada una de las variedades de corteza de canela. Para las extracciones de arrastre por vapor de agua y de hidrodestilación se empleó en cada método de extracción 750 g de corteza de canela de cada variedad. Se realizaron por quintuplicado extracciones con 50 g y 100 g de corteza de canela.

5.2 Extracción del aceite esencial de canela

A continuación, se detallan los dos métodos de extracción de aceite esencial de canela empleados en este trabajo.

5.2.1 Extracción por el método de arrastre por vapor de agua

Para este método de extracción se utilizó el equipo de la figura 5.2 el cual consiste de una manta de calentamiento de 220 V, 500 Watt y temperatura nominal de 450 °C, con capacidad para un balón de 2000 mL. Dentro de la manta de calentamiento se colocó un balón de fondo plano con 1400 mL de agua, se ajustó sobre este, un balón de biomasa con capacidad de 2000 mL, al cual se le introdujo en el fondo una malla sobre la cual se depositó la corteza de canela.

El equipo comenzó a funcionar al conectar la manta térmica que calentó el balón de fondo plano con el agua que al ebulir generó el vapor de agua para el proceso de extracción. En su paso por el balón de biomasa, el vapor traspasó las células de la corteza de canela extrayendo

el aceite esencial. En la cabeza del balón de biomasa se ajustó un codo que transportó la mezcla vapor de agua-aceite esencial hacia el condensador. En la salida del condensador se colocó un Erlenmeyer para recuperar el extracto acuoso.

El extracto acuoso recolectado se mezcló con diclorometano con el fin de separar el aceite esencial del agua en un embudo de separación. Al separarse la mezcla, se decantó el agua para obtener la nueva mezcla de diclorometano- aceite esencial. Se obtuvo el aceite esencial de canela al separar el diclorometano por evaporación en un rotavapor (Figura 5.3).



Figura 5.2 Equipo para la extracción de arrastre por vapor de agua.

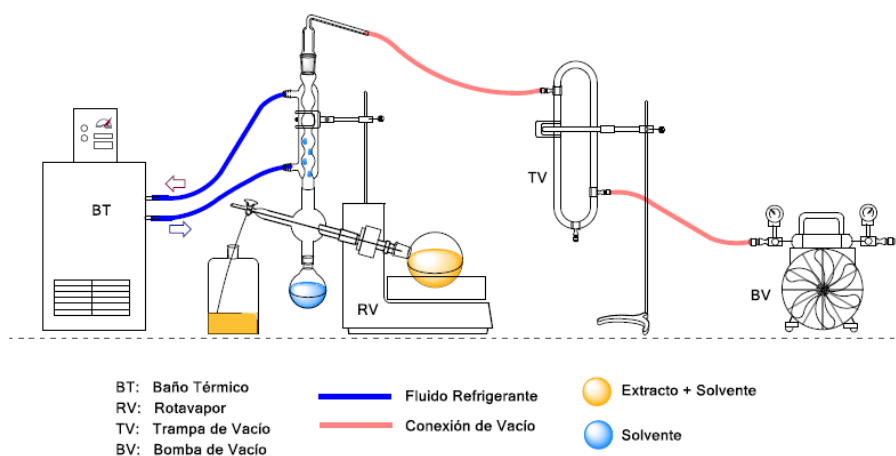


Figura 5.3 Equipo para separación de extracto-solvente (Martínez y Talavera, 2018).

5.2.2 Extracción por el método de hidrodestilación

Para el método de hidrodestilación se introdujeron los lotes de corteza de canela dentro de un balón pera con 1400 mL de agua, luego como se muestra en la figura 5.4, el balón se colocó en un rotavapor para que el balón se calentara en baño maría con agua a 100 °C y rotación media, para este proceso se utilizó una bomba de vacío para mejorar la extracción. Una vez recolectada la mezcla de agua y aceite esencial, se agregó diclorometano para posteriormente decantar el agua y obtener la nueva mezcla de diclorometano-aceite esencial.

Para separar el diclorometano del aceite esencial de canela, se introdujo la nueva mezcla en el rotavapor. En esta etapa no fue necesario la bomba de vacío porque el diclorometano ebulle a bajas temperaturas, entre los 60 y 70 °C.



Figura 5.4 Equipo para la extracción por hidrodestilación.

5.3 Evaluación del rendimiento y la calidad de las extracciones de aceites esenciales

5.3.1 Cálculo del rendimiento de los aceites esenciales

Se seleccionó un diseño factorial 2^3 en el que se identificaron para este diseño tres factores: método de extracción (A), variedad de canela (B) y cantidad de material (C), cada uno cuenta con dos niveles: arrastre por vapor de agua (-) e hidrodestilación (+), *C. zeylanicum* (-) y *C. burmannii* (+) y 50 g (-) y 100 g (+), respectivamente. En la tabla 5.1 se muestran los detalles de los factores y niveles del experimento.

Tabla 5.1 Detalle de los factores y niveles para crear el diseño experimental factorial 2^3 .

Factores	Niveles	
Método de extracción (A)	Arrastre por vapor de agua (-)	Hidrodestilación (+)
Variedad de canela (B)	<i>C. zeylanicum</i> (-)	<i>C. burmannii</i> (+)
Cantidad de material (C)	50 g (-)	100 g (+)

Las extracciones se realizaron por quintuplicado y la variable respuesta fue el porcentaje de rendimiento de extracción de los aceites esenciales. El diseño experimental se describe en la tabla 5.2.

Tabla 5.2 Descripción del diseño factorial 2³.

Corrida	A	B	C	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4	Réplica 5
1	-	-	-					
2	+	-	-					
3	-	+	-					
4	+	+	-					
5	-	-	+					
6	+	-	+					
7	-	+	+					
8	+	+	+					

Para calcular el peso del aceite esencial obtenido en cada lote de extracción, se pesó un balón pera de capacidad de 1000 mL limpio y seco, al que se le agregó la mezcla de diclorometano-aceite esencial. Después de separar todo el diclorometano, se pesó el balón pera que contenía el aceite esencial de canela. Se calculó el peso del aceite esencial obtenido en cada extracción por la diferencia de peso en el balón antes y después de recuperar el diclorometano.

Las cuatro muestras de aceites esenciales de canela obtenidos se guardaron en frascos con gotero rotulados de color ámbar de 60 mL. Posteriormente, con la ecuación 3.1 se determinó el porcentaje de rendimiento de las extracciones.

5.3.2 Identificación de compuestos químicos y valoración de la calidad de los aceites esenciales por FTIR

Mediante la Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) se identificaron las bandas de absorción de los enlaces que caracterizan diferentes grupos funcionales para confirmar la presencia de los grupos funcionales característicos del cinamaldehído y del eugenol. Las bandas de absorción de los aceites extraídos se compararon con las bandas de absorción del aceite de canela de referencia para verificar la calidad de los aceites esenciales extraídos (Ver tabla 6.2).

5.4 Evaluación del efecto antifúngico de los aceites esenciales

El Laboratorio de Biotecnología del Programa de Investigación, Estudios Nacionales y Servicios del Ambiente (UNI-PIENSA) proporcionó de su Banco de Microorganismos los hongos *A. flavus* (TSIII-1212) y *R.stolonifer* (QVID-07) que se presentan en la figura 5.5.

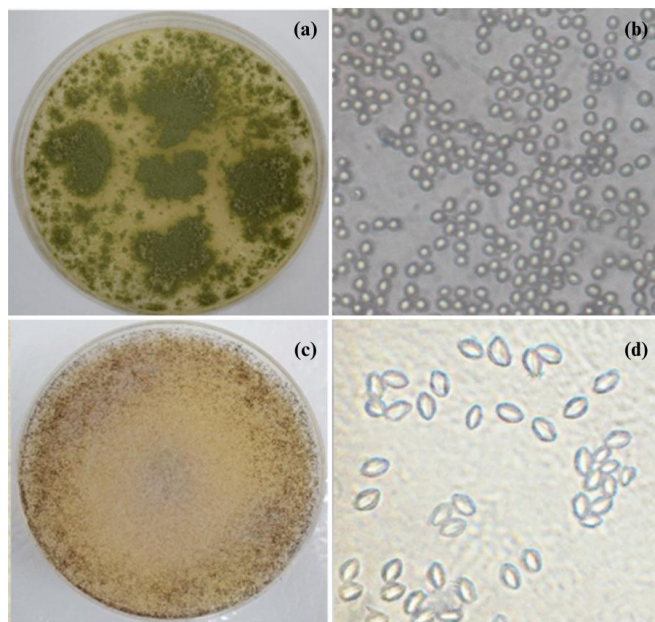


Figura 5.5 Hongos evaluados: *A. flavus* (a) en placa, (b) conidios; *R. stolonifer* (c) en placa, (d) conidios.

Para la reproducción de *A. flavus*, se tomó con un palillo estéril una pequeña cantidad de esporas, se sembraron en 5 puntos diferentes dentro una placa Petri con medio PDA. El desarrollo del hongo se evidencia en la figura 5.6. Para la reproducción de *R. stolonifer*, con un palillo estéril se tomó una pequeña cantidad de esporas que se inoculó en el centro de la placa Petri con medio PDA, el crecimiento del hongo se presenta en la figura 5.7.

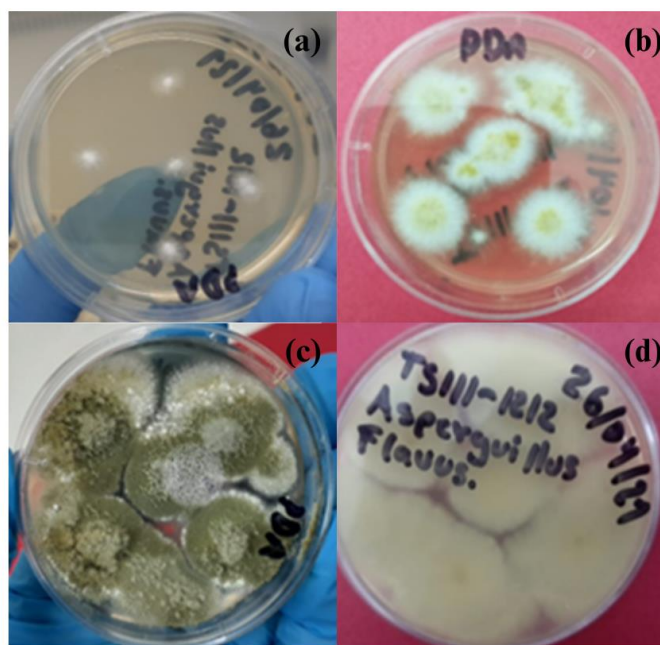


Figura 5.6 Desarrollo de *A. flavus* en: (a) 24 horas; (b) 48 horas; (c) 72 horas (anverso de la placa); (d) 72 horas (reverso de la placa).

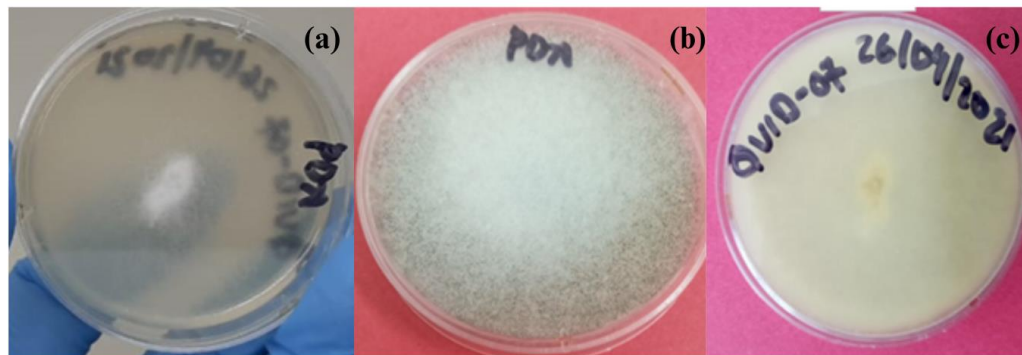


Figura 5.7 Crecimiento de *R. stolonifer* en: (a) 24 horas; (b) 48 horas (anverso de la placa); (c) 48 horas (reverso de la placa).

5.4.1 Desarrollo de cultivos monospóricos

La obtención de los cultivos monospóricos de *A. flavus* y *R. stolonifer* se basó en el procedimiento de Ames de Icochea (2004):

- **Siembra de los microorganismos:** Cada hongo se sembró por triplicado en placas Petri de 90 mm de diámetro con medio de cultivo PDA rotuladas con nombre y fecha de siembra.
- **Preparación del Tween 80 al 0.1%:** De la formulación comercial, se preparó una dilución al 10% tomando 1 mL de Tween 80 y agregándolo a 9 mL de agua destilada. Para llevar el Tween al 0.1% se tomó 1 mL de la solución al 10% y se agregó a 99 mL de agua destilada. La dilución de Tween 80 al 0.1% se esterilizó en autoclave a 121 °C y 15 psi por 15 minutos.
- **Dilución seriada:** Al desarrollarse los hongos por completo, se seleccionó una placa de cada uno, a la que se agregó 3 mL de Tween 80 al 0.1%. Con un asa Drigalsky se dispersó el Tween para liberar la mayor cantidad de esporas posible. Con una pipeta se tomó 1 mL de la muestra y se agregó en un tubo de ensayo con 9 mL de agua esterilizada para obtener la dilución 10^{-1} . Antes de una nueva dilución se agitó en un vortex durante 15 segundos la dilución precedente. La serie culminó al obtener diluciones de 10^{-8} en *A. flavus* y 10^{-7} en *R. stolonifer* (figura 5.8).
- **Siembra de diluciones:** Dentro de una cámara de flujo laminar, se sembró en placas Petri con medio PDA y por duplicado 200 μ L de las diluciones en los dos últimos tubos de la serie de cada hongo. La dilución se distribuyó en toda la placa mediante un asa Drigalsky estéril para esparcir bien las esporas.
- **Incubación:** Los hongos se incubaron hasta observar pequeñas colonias aisladas. La temperatura de incubación estuvo en un rango de 27 a 29 °C. Las diluciones de *A. flavus* se incubaron durante 24 horas y *R. stolonifer* durante 16 horas.
- **Aislamiento:** Con una hoja de bisturí estéril se cortó una colonia aislada en formación y se transfirió a una nueva placa Petri con medio PDA donde se desarrolló hasta llenar la placa. En total, se aislaron cuatro de *A. flavus* y cuatro colonias de *R. stolonifer* (Figura 5.9).

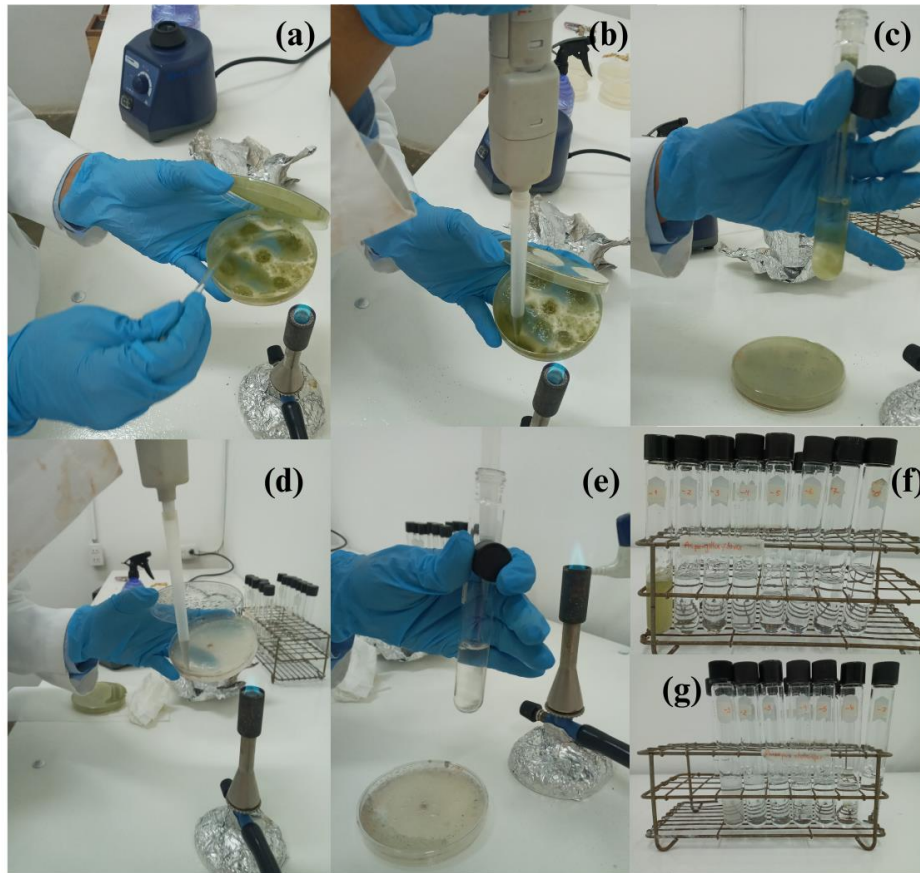


Figura 5.8 Diluciones seriadas (a) barrido de Tween en *A. flavus*; (b) recolección de muestra de *A. flavus*; (c) dilución 10^{-1} *A. flavus*; (d) recolección de muestra de *R. stolonifer*; (e) dilución 10^{-1} *R. stolonifer*; (f) serie de dilución de *A. flavus* (g) serie de dilución de *R. stolonifer*.

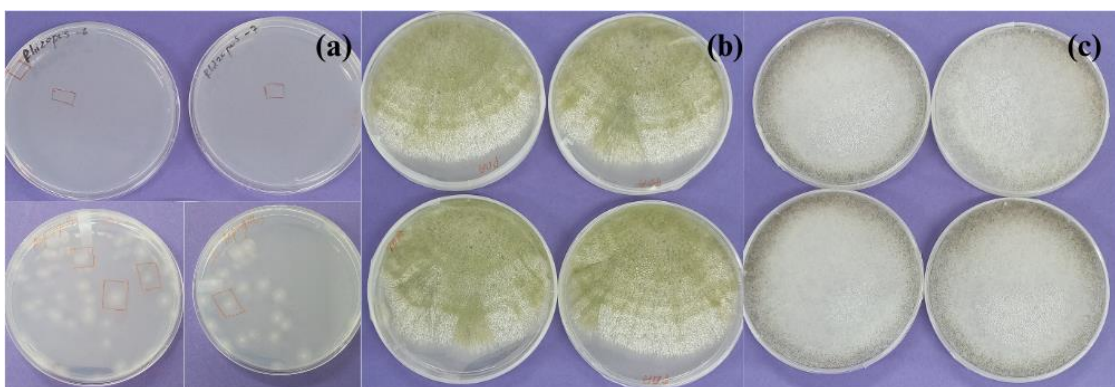


Figura 5.9 Cultivos monospóricos (a) selección de colonias; (b) *A. flavus* con 11 días de desarrollo; (c) *R. stolonifer* desarrollado por completo en 3 días.

5.4.2 Cálculo de la concentración de esporas

Para determinar la concentración de esporas se siguió el Método Horizontal para el Recuento de Microorganismos parte II: Recuento de Colonias a 30 °C Mediante la Técnica de Siembra en Superficie (ISO 4833-2:2013). La ventaja de este método en comparación con el método de profundidad, es que la morfología de las placas se observa con mayor facilidad y al no exponer a los microorganismos al calor del medio de agar fundido se obtienen recuentos más altos (ISO 7218:2007).

5.4.2.1 Diluciones decimales

Se preparó la suspensión inicial barriendo 3 mL de Tween 80 al 0.1% en un cultivo monospórico. Se transfirió con una pipeta 1 mL de la suspensión inicial a un tubo con 9 mL de agua estéril. La dilución se mezcló durante 15 segundos en un vortex para obtener la dilución 10^{-2} . Se repitió esta operación hasta llegar a la dilución 10^{-6} . En cada dilución se utilizó una pipeta estéril para obtener un número apropiado de microorganismos y realizar el recuento (ISO 6887-1:1999).

5.4.2.2 Inoculación e incubación

En la inoculación de los hongos se utilizaron placas Petri con medio PDA, con un mínimo de 3 mm de espesor, planas y sin burbujas de aire ni humedad en su superficie. Mediante una pipeta estéril se sembró por duplicado 0.1 mL de dos diluciones consecutivas (10^{-5} y 10^{-6}) al centro de la placa (ISO 6887-1:1999).

El inóculo se extendió cuidadosamente, de manera uniforme y lo más rápido posible sobre la superficie del agar, sin tocar las paredes de la placa Petri con el asa Drigalsky que se esterilizó para distribuir cada inóculo. Las placas se dejaron a temperatura ambiente para que el agar absorbiera el inóculo. Luego de 14 minutos se invirtieron las placas y se incubaron a 30 °C $\pm$ 1 °C por 24 horas.

5.4.2.3 Duración del procedimiento

El tiempo de preparación de la suspensión inicial y de las diluciones decimales sucesivas fue de 30 minutos. El tiempo transcurrido entre el final de la preparación de la suspensión inicial y el instante en el que se realizó la siembra no superó los 45 minutos (ISO 6887-1:1999).

5.4.2.4 Recuento y selección de colonias

Después del periodo de incubación, se seleccionaron las placas que contenían menos de 300 colonias (ISO 4833-2:2013). Se contaron las colonias con un contador manual bajo una luz tenue, las colonias diminutas fueron incluidas en el recuento y las “colonias diseminadas” o dispuestas en rosario se consideraron como una sola colonia (ISO 7218:2007).

5.4.2.5 Método de cálculo para determinar la concentración de esporas

Se calculó la concentración de esporas según la ISO 7218:2007. El cálculo se hizo en tres cultivos monospóricos distintos con las concentraciones 10^{-5} y 10^{-6} por duplicado. El número de microorganismos presentes en la muestra se obtuvo a partir de la ecuación 5.1 que se calcula como la media corregida de dos diluciones consecutivas. El resultado se expresa

como un número de microorganismos N por mL con un número entre 1.0 y 9.9 multiplicado por la potencia de 10 adecuada, o como un número entero con dos cifras significativas.

$$N = \frac{\sum C}{V \times 1,1 \times d} \quad (\text{Ec. 5.1})$$

Donde:

N: Número de Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/mL)

$\sum C$: Suma de las colonias contadas en dos placas de las dos diluciones consecutivas

V: Volumen de inóculo utilizado en cada placa (mL)

d: Factor de dilución correspondiente a la primera dilución elegida

Para determinar la concentración de las diluciones presentes en cada tubo de dilución se empleó la ecuación 5.2 a partir del promedio del número de unidades formadoras de colonias por mililitro de los tres cultivos monospóricos.

$$\text{Concentración final} = N \times \frac{1}{n} \quad (\text{Ec. 5.2})$$

Donde:

N: es el número de microorganismos (UFC/mL)

$\frac{1}{n}$: indica el factor de dilución de cada tubo

5.4.3 Preparación de las concentraciones de aceites esenciales

Se prepararon soluciones de 1 mL de los aceites esenciales extraídos de *C. zeylanicum* y *C. burmannii*, así como del aceite esencial de referencia (*C. verum*). Cada solución se preparó utilizando agua estéril y Tween 20 al 0.1% para facilitar la dilución del aceite esencial en el agua. Las soluciones se agitaron constantemente en el vortex hasta su emulsión.

Para evaluar el efecto antifúngico de los aceites esenciales en *A. flavus* se prepararon concentraciones de 0.25%, 0.50%, 1%, 2% y 3% (tabla 5.3). Para *R. stolonifer* se prepararon concentraciones de aceite esencial de 5%, 25%, 50%, 75% y 100% (tabla 5.4).

Tabla 5.3 Preparación de concentraciones en base a 1 mL de solución para *A. flavus*.

Concentraciones	0.25%	0.50%	1%	2%	3%
Aceite esencial	2.5 µL	5 µL	10 µL	20 µL	30 µL
Tween 20 al 0.1%	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL
Agua destilada	977.5 µL	975 µL	970 µL	960 µL	950 µL

Tabla 5.4 Preparación de concentraciones en base a 1 mL de solución para *R. stolonifer*.

Concentraciones	5%	25%	50%	75%	100%
Aceite esencial	50 µL	250 µL	500 µL	750 µL	1000 µL
Tween 20 al 0.1%	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	0 µL
Agua destilada	930 µL	730 µL	480 µL	230 µL	0 µL

5.4.4 Inhibición por el método de difusión en pozos

Para determinar el efecto inhibitorio se empleó un diseño experimental mixto, en el que se tienen tres factores: método de extracción, variedad de canela y concentración de aceite. Dos de los factores cuentan con dos niveles, siendo estos el método de extracción (A) y variedad de canela (B), el tercer factor, la concentración de aceite esencial (C), cuenta con cinco niveles.

Debido a que las concentraciones de aceite esencial cambian en dependencia del hongo a evaluar, se realizó un diseño experimental mixto para cada hongo. Los detalles de los factores y niveles del diseño experimental se presentan en la tabla 5.5.

Tabla 5.5 Factores y niveles para crear el diseño experimental factorial mixto.

Factores	Niveles				
Métodos de extracción (A)	Arrastre por vapor (-)		Hidrodestilación (+)		
Variedades de canela (B)	<i>C. zeylanicum</i> (-)		<i>C. burmannii</i> (+)		
Concentración de aceite para <i>A. flavus</i> (C)	0.25% (C ₁)	0.50% (C ₂)	1% (C ₃)	2% (C ₄)	3% (C ₅)
Concentración de aceite para <i>R. stolonifer</i> (C)	5% (C ₁)	25% (C ₂)	50% (C ₃)	75% (C ₄)	100% (C ₅)

Las pruebas de inhibición se realizaron por triplicado, la variable respuesta fue el halo de inhibición de los aceites esenciales (cm). La tabla 5.6 muestra en detalle el diseño experimental que se empleó para las pruebas de cada hongo.

Tabla 5.6 Descripción del diseño experimental mixto.

Corrida	A	B	C	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
1	-	-	C ₁			
2	-	-	C ₂			
3	-	-	C ₃			
4	-	-	C ₄			
5	-	-	C ₅			
6	+	-	C ₁			
7	+	-	C ₂			
8	+	-	C ₃			
9	+	-	C ₄			
10	+	-	C ₅			

Corrida	A	B	C	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
11	-	+	C ₁			
12	-	+	C ₂			
13	-	+	C ₃			
14	-	+	C ₄			
15	-	+	C ₅			
16	+	+	C ₁			
17	+	+	C ₂			
18	+	+	C ₃			
19	+	+	C ₄			
20	+	+	C ₅			

Para determinar el efecto de inhibición de los aceites esenciales de canela, se prepararon en cada prueba 28 placas Petri para cada hongo con medio de cultivo PDA. Los experimentos se realizaron por triplicado, inoculando cada placa con 100 μ L de la dilución correspondiente a una suspensión de esporas de 10^4 UFC/mL. Posteriormente, en el centro de las placas inoculadas se realizó un pozo con un sacabocado esterilizado de 6 mm de diámetro.

En 26 de las placas, los pozos se llenaron con 25 μ L de las concentraciones de los aceites esenciales preparadas para cada hongo, en las dos placas para los controles de la prueba se agregaron 25 μ L del medicamento como control positivo (itraconazol para *A. flavus* y hexaconazol para *R. stolonifer*) y 25 μ L de agua estéril como control negativo. Las placas se incubaron durante 24 horas para medir del halo de inhibición.

5.4.5 Cálculo del efecto inhibitorio

El efecto inhibitorio de los aceites esenciales se determinó mediante el porcentaje de inhibición. Luego de 24 horas de incubación a 28° C, se midió con una regla milimétrica el halo de inhibición (cm) de los hongos en presencia de los aceites esenciales y los controles positivos y negativos.

Méndez-Úbeda y Páramo-Aguilera (2017) emplean la ecuación 5.3 para calcular el porcentaje de inhibición. En este trabajo, debido a que el método para inocular el hongo en la placa Petri es diferente, se modificó la ecuación 5.3, tomando como referencia el porcentaje de inhibición relativo al control positivo. El porcentaje de inhibición se calculó según la ecuación 5.4.

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \left(\frac{D.C.C - D.C.P}{D.C.C} \right) \times 100 \quad (\text{Ec. 5.3})$$

Donde:

D.C.C: representa el diámetro de la colonia de control negativo (cm)

D.C.P: representa el diámetro de la colonia de prueba con aceite esencial (cm)

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \left(\frac{D.C.P}{D.C.C} \right) \times 100 \quad (\text{Ec. 5.4})$$

Donde:

D.C.P: representa el diámetro de la colonia de prueba con aceite esencial (cm)

D.C.C: representa el diámetro de la colonia de control positivo (cm)

Luego de medir el halo de inhibición de los aceites esenciales, se cortó con un bisturí estéril un pequeño cuadro de agar dentro de halo de inhibición y se sembró en una placa con medio PDA que se incubó por 24 horas. Esta prueba de confirmación se hizo en las tres réplicas de la prueba de inhibición con el objetivo de comprobar el efecto antifúngico de los aceites esenciales.

6 RESULTADOS

6.1 Rendimiento de los aceites esenciales

El rendimiento promedio de las extracciones de aceite esencial de canela se muestra en la tabla 6.1 donde puede observarse que los valores de mayor rendimiento, tanto en arrastre por vapor de agua como en hidrodestilación se obtienen con la variedad de canela *C. burmannii*. En base al porcentaje de rendimiento promedio obtenido puede decirse que el método de extracción con el mayor rendimiento es el de arrastre por vapor, utilizando 50 g de canela *C. burmannii*. En el anexo A se presentan las tablas con los rendimientos de aceites esenciales en cada lote de extracción.

Tabla 6.1 Promedio del porcentaje de rendimiento de las extracciones de aceite esencial de canela.

Material Vegetal	Variedad de Canela	Método de Extracción	Rendimiento de Aceite Esencial (%)
50 g	<i>C. zeylanicum</i>	Arrastre por vapor	1.88
		Hidrodestilación	1.48
	<i>C. burmannii</i>	Arrastre por vapor	3.71
		Hidrodestilación	2.74
100 g	<i>C. zeylanicum</i>	Arrastre por vapor	2.39
		Hidrodestilación	1.23
	<i>C. burmannii</i>	Arrastre por vapor	3.03
		Hidrodestilación	2.92

En la figura 6.1 que se obtuvo del diseño factorial 2^3 puede observarse que hay dos factores y la interacción de los tres factores empleados que influyen significativamente en el rendimiento del aceite esencial. El factor de mayor influencia significativa es la variedad de canela que se emplea en la extracción, por lo que una de las variedades influye significativamente en el rendimiento del proceso de extracción. El segundo factor que influye en el rendimiento del aceite esencial es el método de extracción que se emplee, pues al menos uno de ellos genera mayores resultados.

La cantidad de material vegetal para la extracción, ya sean 50 g o 100 g de corteza de canela, no es por sí solo un factor que incida en el rendimiento de las extracciones de aceite esencial. Sin embargo, la combinación de los factores: variedad de canela, método de extracción y cantidad de material vegetal utilizado sí tiene una influencia significativa en el rendimiento.

En el diagrama de la figura 6.2 se comparan los datos de rendimiento obtenido en las extracciones de aceite esencial. Para la extracción de aceite esencial de *C. zeylanicum* con arrastre por vapor se muestra que se obtienen rendimientos más altos usando 100 g de canela.

Diagrama de Pareto de efectos estandarizados

(la respuesta es Rendimiento; $\alpha = 0.05$)

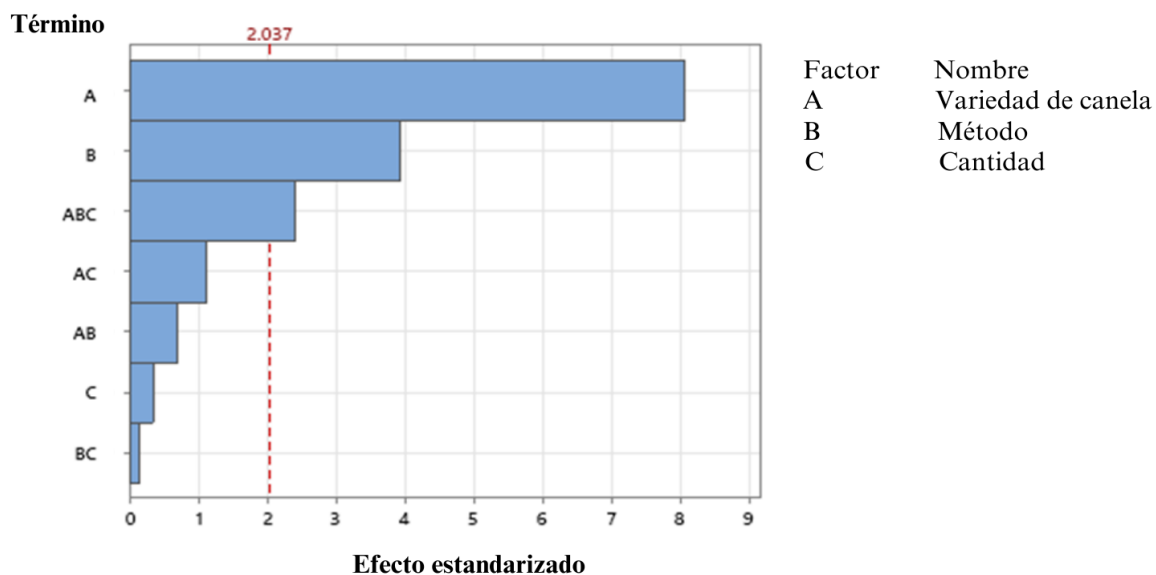


Figura 6.1 Gráfica de factores que influyen en el rendimiento de aceite esencial de canela.

Diagrama de Caja y Bigote de Rendimiento

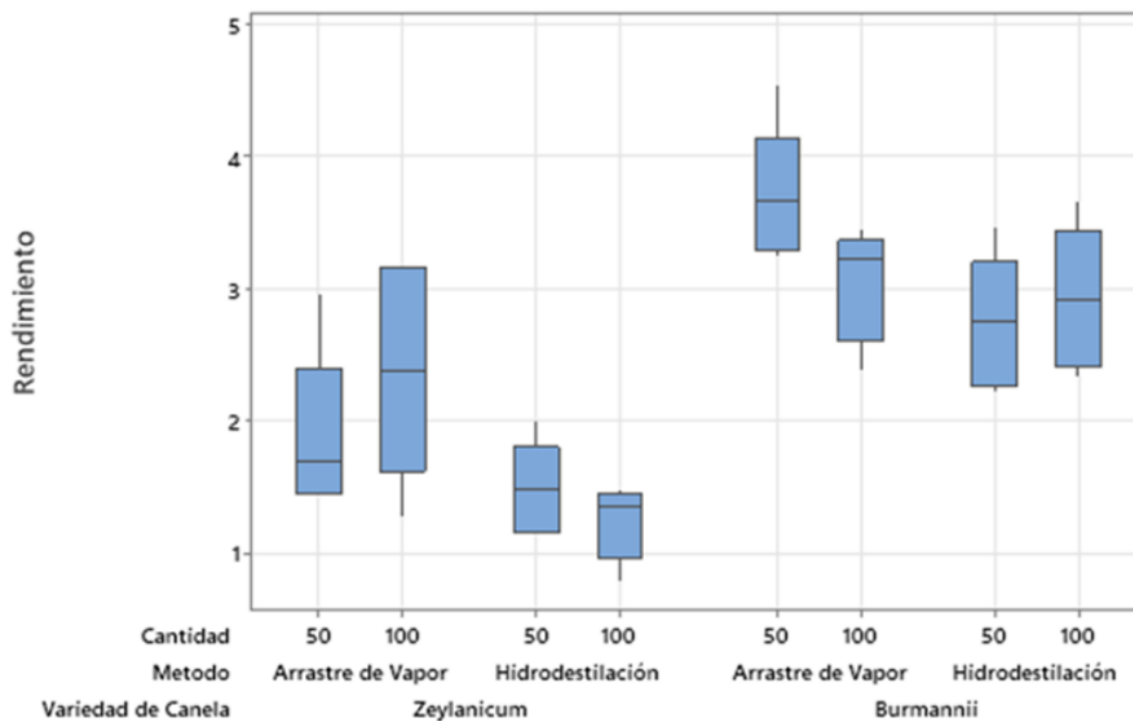


Figura 6.2 Diagrama de comparación de los factores que influyen en el rendimiento de aceite esencial.

Los rendimientos en la extracción de aceite esencial de *C. zeylanicum* mediante hidrodestilación, son bajos comparados con los rendimientos de arrastre por vapor. Para este método de extracción emplear la menor cantidad de material vegetal da mayores resultados que usando 100 g de canela.

En el caso de la variedad *C. burmannii* los rendimientos en ambos métodos de extracción, fueron superiores que los rendimientos de aceite esencial obtenidos a partir *C. zeylanicum*. Para *C. burmannii*, la extracción mediante arrastre por vapor con 50 g de material vegetal es la que brinda los mayores resultados. Las extracciones por hidrodestilación, de 100 g de material vegetal resultan ser ligeramente superior a las extracciones con 50 g de canela.

6.2 Identificación del Cinamaldehído y Eugenol mediante FTIR de cada uno de los aceites esenciales

El espectro infrarrojo de los aceites esenciales de canela extraídos por arrastre de vapor e hidrodestilación y el aceite esencial de referencia se muestran en las figuras 6.3 a 6.7. En todos los espectros infrarrojo puede verse una fuerte banda de absorbancia en la región 1650-1750 cm^{-1} que indica la presencia de un grupo carbonilo ($\text{C}=\text{O}$), que es el grupo característico de los aldehídos.

Tabla 6.2 Rangos de transmitancia de los espectros de aceites esenciales para la identificación de cinamaldehído y eugenol.

Compuesto	Enlace	Frecuencia (cm ⁻¹)	Aceite Esencial				Referencia
			Arrastre		Hidrodestilación		
			Zey.	Bur.	Zey.	Bur.	
Cinamaldehído	-C=O	1650-1750	1677	1676	1677	1676	1677
Eugenol	-OH	3200-3600	3484	3536	3493	3505	3475
	-CH ₂	3000-2850	2926	2815	2817	2816	2926
	=CH ₂	1600-1400	1625	1623	1625	1624	1625

Como se muestra en la tabla 6.2, en los aceites esenciales de *C. zeylanicum* y de referencia, la banda de absorbancia característica de los aldehídos se encuentra en la misma longitud de onda. Esta banda de absorción indica la presencia del cinamaldehído en todos los aceites esenciales de canela.

En la figura 6.3 se muestra que el espectro del aceite de *C. zeylanicum* extraído mediante arrastre con vapor, donde el pico característico de los aldehídos está en 1677 cm^{-1} , para *C. burmannii* (figura 6.4) el pico se encuentra en 1676 cm^{-1} .

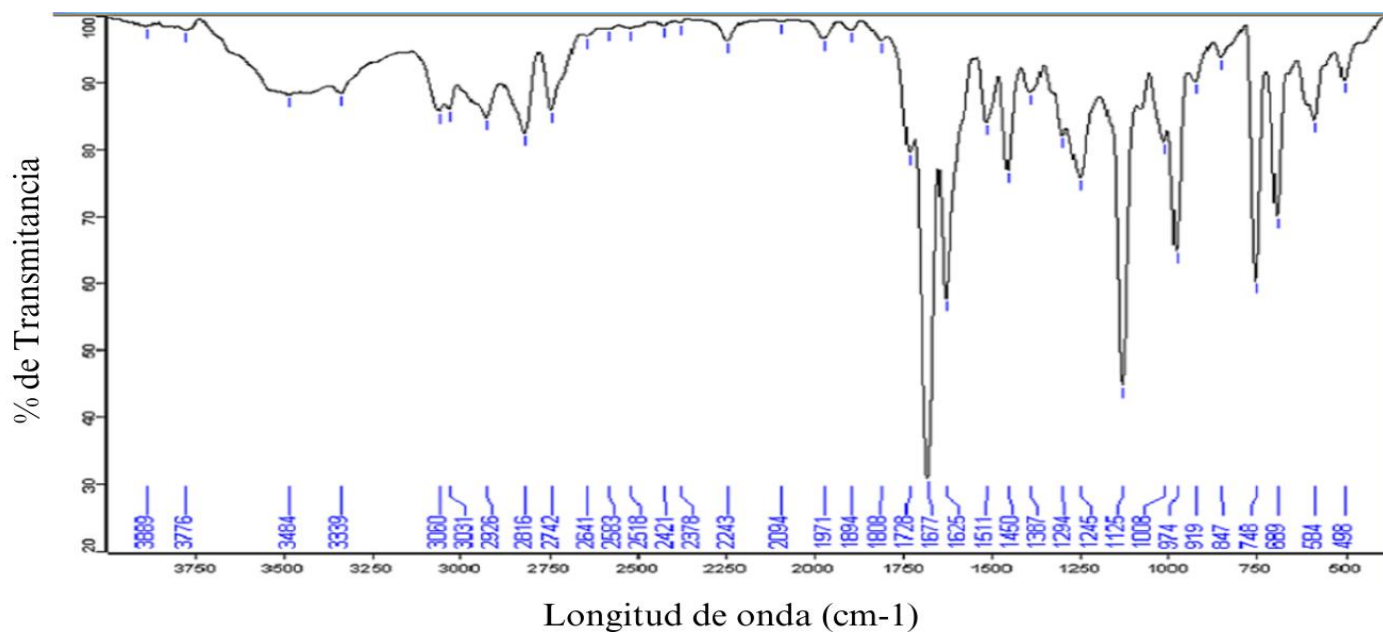


Figura 6.3 Espectro infrarrojo del aceite esencial arrastre por vapor-*C. zeylanicum*.

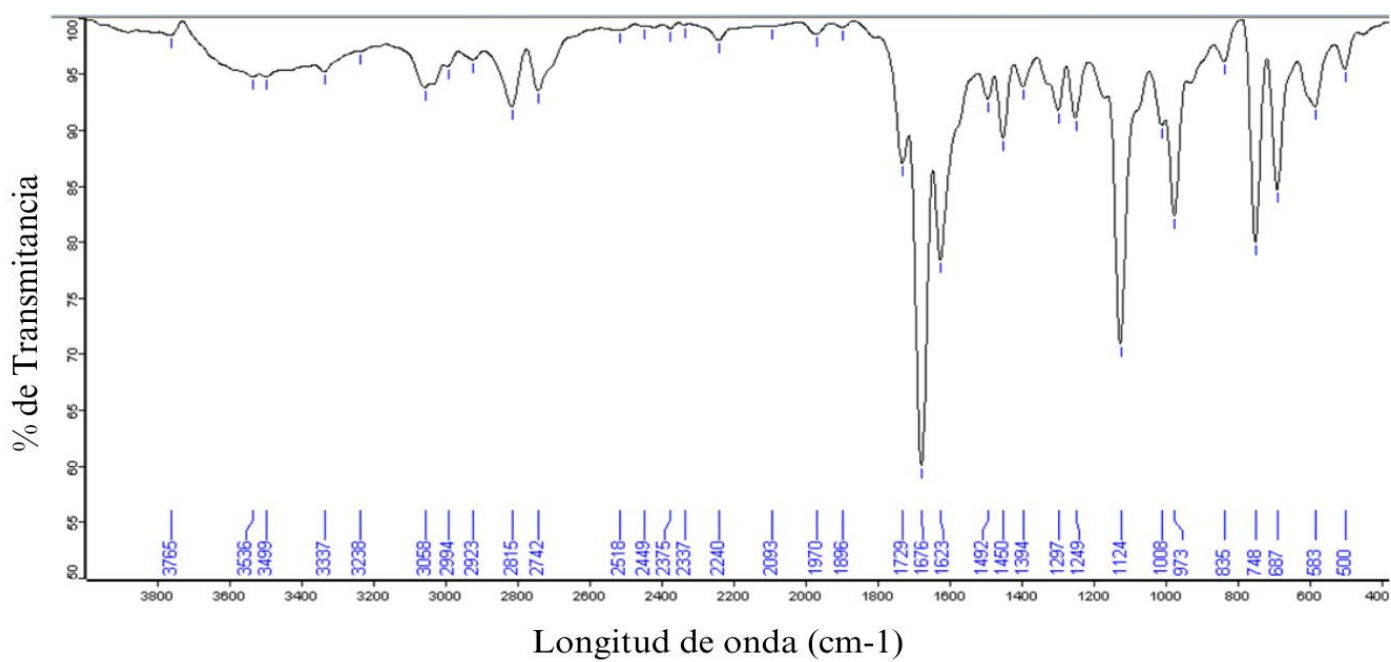


Figura 6.4 Espectro infrarrojo del aceite esencial arrastre por vapor-*C. burmannii*.

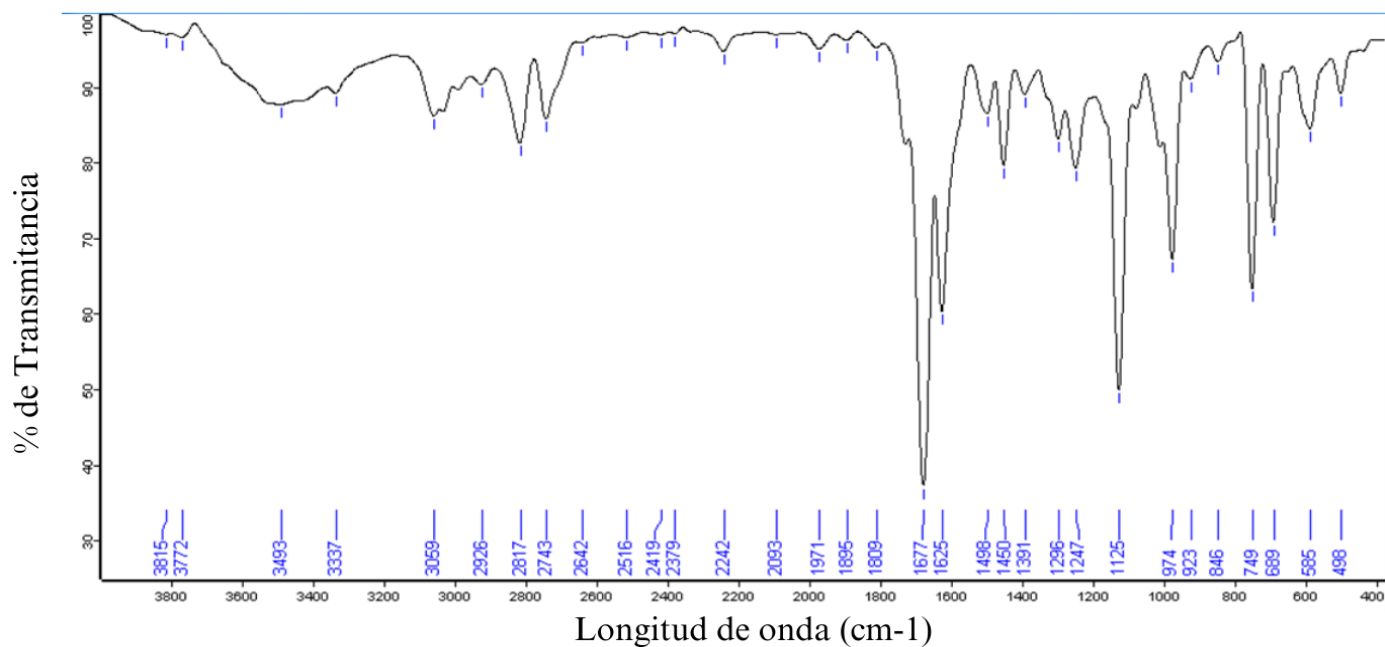


Figura 6.5 Espectro infrarrojo del aceite esencial hidrodestilación-*C. zeylanicum*.

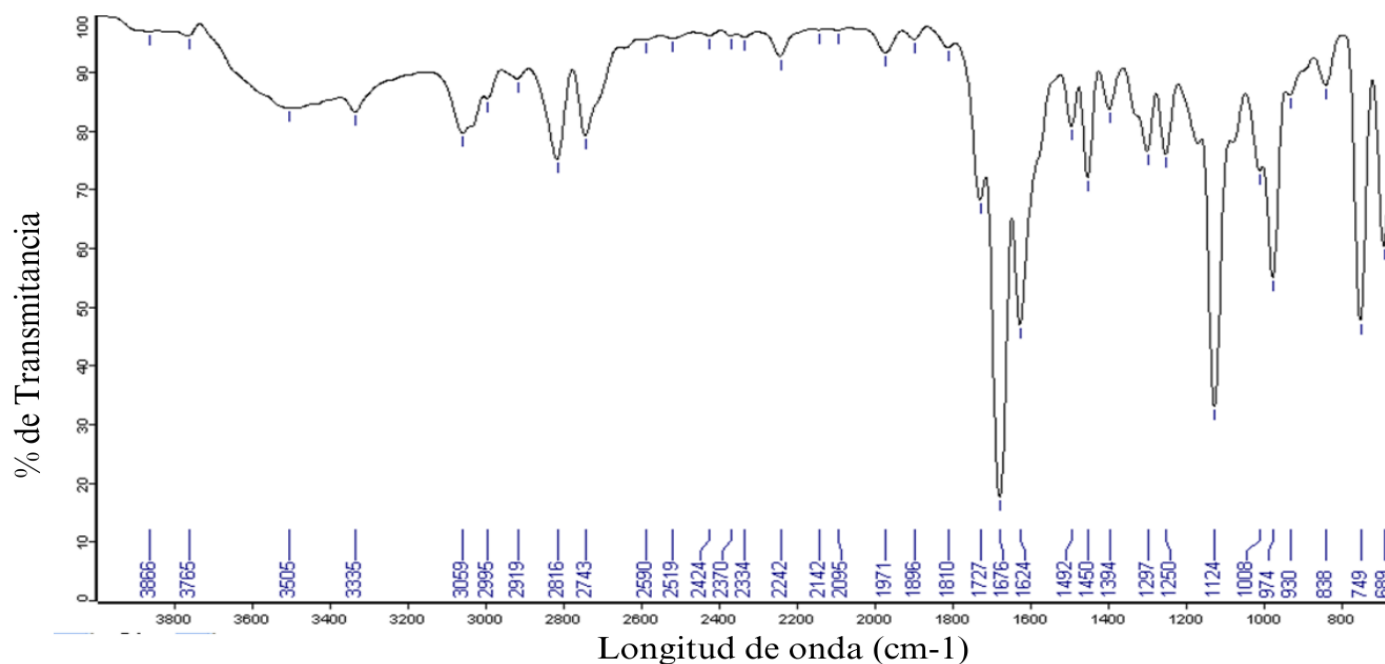


Figura 6.6 Espectro infrarrojo del aceite esencial hidrodestilación-*C. burmannii*.

Tal como en el los aceites de arrastre con vapor, los espectros infrarrojos de los aceites esenciales extraídos mediante hidrodestilación de *C. zeylanicum* tienen un pico característico de un grupo aldehído en 1677 cm^{-1} (figura 6.5), y en el espectro del aceite esencial de *C. burmannii* (figura 6.6) el pico se encuentra en 1676 cm^{-1} .

En el aceite esencial de referencia, el pico característico de los aldehídos, como en los aceites esenciales de *C. zeylanicum*, se encuentra a una longitud de onda de 1676 cm⁻¹.

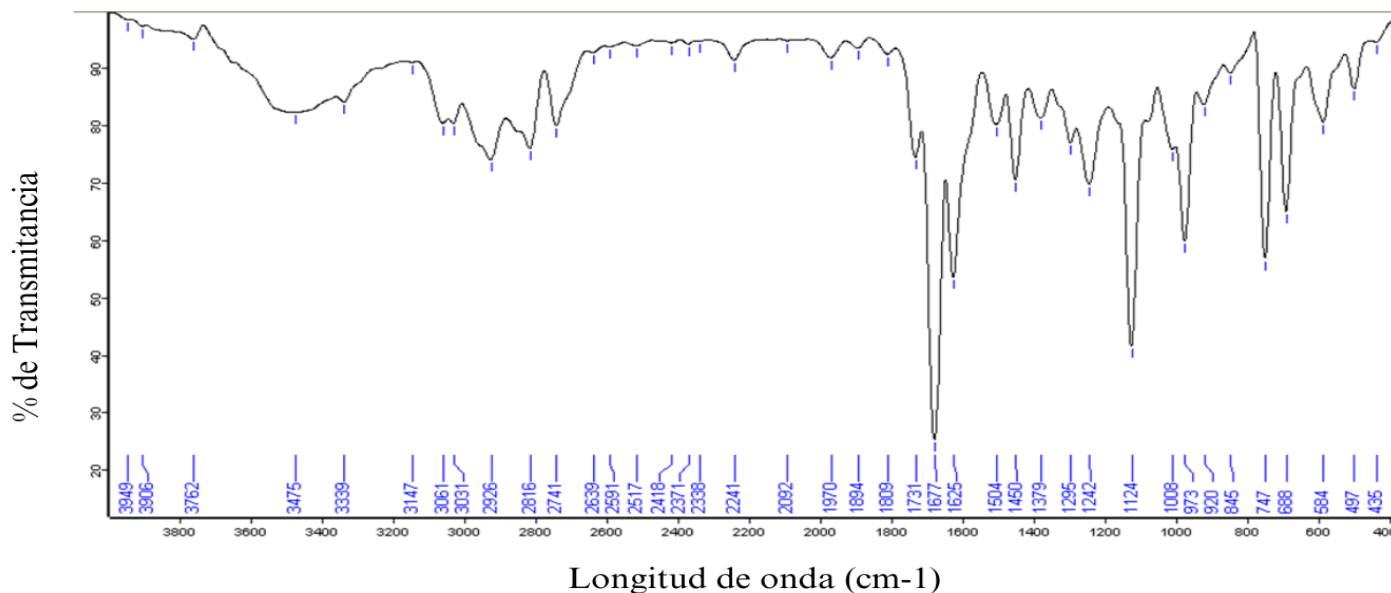


Figura 6.7 Espectro infrarrojo del aceite esencial de referencia *C. verum*.

Los espectros de los aceites esenciales obtenidos presentan bandas de absorbancia que mantienen un alto grado de similitud, por lo que puede deducirse que el método de extracción no afectó significativamente la calidad de los aceites esenciales. Las pequeñas variaciones en los espectros se deben a que la composición de cada aceite esenciales depende de factores como el origen de la canela, las condiciones climáticas, y por supuesto, la variedad de canela.

Tabla 6.3 Porcentaje de correlación entre los aceites esenciales extraídos comparados con aceite de referencia.

Comparación de espectros FTIR de los aceites esenciales extraídos con el aceite esencial de referencia		% Correlación	% Límite
1	Arrastre por vapor – <i>C. zeylanicum</i> vs. A. de referencia	98.77	95
2	Arrastre por vapor – <i>C. burmannii</i> vs. A. de referencia	94.93	95
3	Hidrodestilación – <i>C. zeylanicum</i> vs. A. de referencia	97.14	95
4	Hidrodestilación – <i>C. burmannii</i> vs. A. de referencia	95.83	95

En la tabla 6.3 se presenta una comparación de los espectros infrarrojo de los aceites esenciales extraídos con el aceite esencial de referencia. Los aceites esenciales de arrastre de vapor- *C. zeylanicum* e hidrodestilación- *C. zeylanicum* tienen los mayores porcentajes de correlación con respecto al aceite esencial de referencia (*C. verum*), de 98.77 y 97.14% respectivamente. Esto se entiende porque estos dos aceites esenciales obtenidos y el de referencia provienen de la misma variedad de canela.

En cuanto a los aceites esenciales de *C. burmannii*, aunque sean de una variedad de canela diferente también muestran buenos porcentajes de correlación, el aceite esencial obtenido con arrastre por vapor de 94.93% y el de hidrodestilación 95.83%.

6.3 Efecto inhibitorio de los aceites esenciales

Al calcular la concentración de esporas de cada dilución con la ecuación 4.2 se determinó que los tubos de dilución 10^{-3} y 10^{-4} de *A. flavus* y *R. stolonifer* respectivamente, eran los que contenían suspensiones de 10^4 UFC/mL. La hoja de cálculo se detalla en el anexo B.

Para probar el efecto inhibitorio de los aceites esenciales de canela, se prepararon las diluciones que se muestran en la figura 6.8.

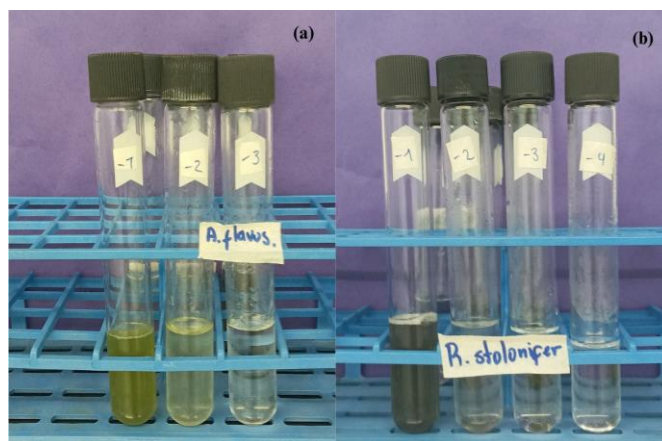


Figura 6.8 Seriado de diluciones hasta 10^4 UFC/mL de (a) *A. flavus*; (b) *R. stolonifer*.

6.3.1 Efecto de inhibición del aceite esencial de canela sobre *A. flavus*

Los halos de inhibición de los aceites esenciales en *A. flavus* fueron clasificados según la escala de Duraffourd. En el anexo C se encuentran las fichas obtenidas, donde se determinó que *A. flavus* es altamente sensible a todas las concentraciones de aceite esencial (0.25, 0.50, 1, 2 y 3%), tanto para los aceites esenciales de *C. zeylanicum* y *C. burmannii* extraídos ya sea con arrastre por vapor de agua como con hidrodestilación, pues superaron los 20 mm.

En la tabla 6.4 se muestran los resultados obtenidos en las tres pruebas de inhibición, los halos de inhibición de aceite esencial se compararon con el halo de inhibición del Itraconazol, cuyos resultados fueron 2, 2.2. y 2.2 cm en cada prueba. Los porcentajes inhibición obtenidos por encima de cien por ciento indican que el efecto antifúngico de todas las concentraciones de aceite esencial es superior que al control positivo en esta prueba.

Tabla 6.4 Porcentaje de inhibición de *A. flavus* con respecto al control positivo

Tipo de Aceite	Concentración de Aceite Esencial (%)	Halo de Inhibición (cm)			Porcentaje de Inhibición (%)			
		Prueba			Prueba			Promedio
		1	2	3	1	2	3	
Arrastre-zeylanicum	0.25	3.6	3.6	3	180	164	136	160
	0.50	3.4	3	3.4	170	136	155	154
	1	3.6	3.6	3	180	164	136	160
	2	3.8	3.4	3.8	190	155	173	172
	3	4.6	3.6	3	230	164	136	177
Hidro-zeylanicum	0.25	3.2	3	3.6	160	136	164	153
	0.50	3.6	4	3.4	180	182	155	172
	1	3.4	4.4	4	170	200	182	184
	2	4.6	4	3.4	230	182	155	189
	3	4.4	4.2	4.4	220	191	200	204
Arrastre-burmannii	0.25	3.2	3	2.8	160	136	127	141
	0.50	4	4.2	4.4	200	191	200	197
	1	3.4	3	2.4	170	136	109	138
	2	3.8	3.4	3.6	190	155	164	169
	3	4	3.8	4	200	173	182	185
Hidro-burmannii	0.25	2.4	2.2	2.6	120	100	118	113
	0.50	4	3	3.6	200	136	164	167
	1	3.6	2.4	2.2	180	109	100	130
	2	3.5	2.4	2.8	175	109	127	137
	3	4.5	2.6	5	225	118	227	190
Referencia	0.25	3.6	2.4	2	180	164	136	160
	0.50	2.6	3	3	170	136	155	154
	1	4	4	3.2	180	164	136	160
	2	4	3.4	4	190	155	173	172
	3	4.1	4.4	4	230	164	136	177

En la figura 6.9 se observa que el factor de mayor influencia significativa en el halo de inhibición es la concentración de aceite esencial, que al menos con una de las variedades de canela se obtienen los mejores resultados de inhibición sobre *A. flavus*. En cuanto al método de extracción del aceite esencial este no influye de manera significativa en la inhibición, por lo que ambos métodos pueden utilizarse para este fin.

La gráfica de interacción (figura 6.10) indica que la mayor concentración de aceite esencial es la que tiene los mejores resultados, la variedad de canela *C. zeylanicum* tiene un mejor efecto inhibitorio sobre *A. flavus*. Como indicaba la figura 6.9 la combinación que estadísticamente da mejores resultados es la combinación de aceite esencial de *C. zeylanicum* al 3%.

Diagrama de Pareto de efectos estandarizados

(la respuesta es % Inhibición; $\alpha = 0.05$)

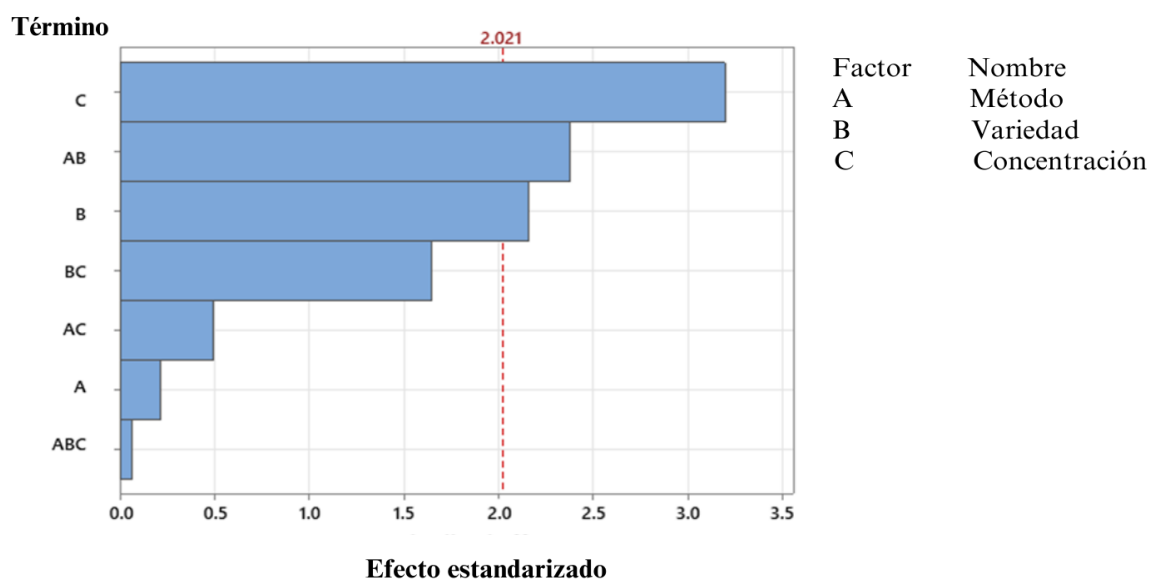


Figura 6.9 Factores que influyen en el porcentaje de inhibición de *A. flavus*.

Gráfica de Efectos Principales para % Inhibición

Media de datos

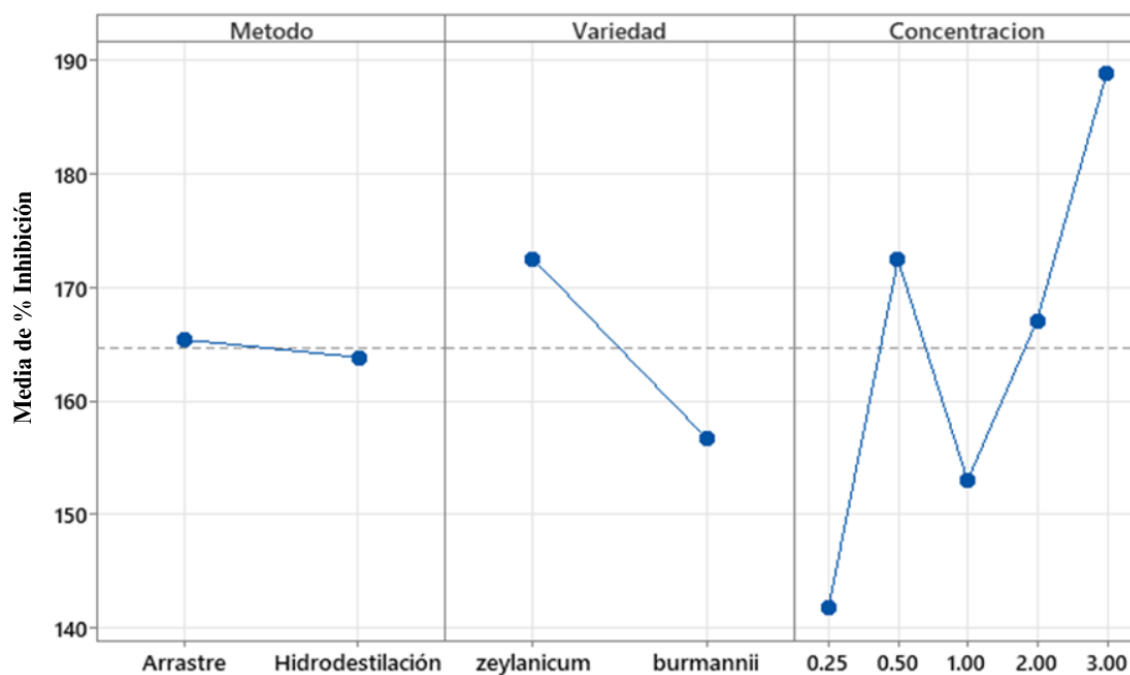


Figura 6.10 Gráfica de efectos principales en el porcentaje de inhibición de *A. flavus*.

6.3.2 Efecto de inhibición del aceite esencial de canela sobre *R. stolonifer*

La escala de Duraffourd para este hongo fue variable en comparación con *A. flavus* los resultados se presentan en el anexo D. La tabla 6.1 indica que, en comparación con el control positivo, el aceite esencial de canela tiene mayores resultados, a excepción del aceite de *C. burmannii*- hidrodestilación cuyo porcentaje de inhibición fue inferior al control positivo.

Tabla 6.5 Porcentaje de inhibición de *R. stolonifer* con respecto al control positivo.

Tipo de Aceite	Concentración de Aceite Esencial (%)	Halo de Inhibición (cm) Prueba			Porcentaje de Inhibición (%) Prueba			
		1	2	3	1	2	3	Promedio
Arrastre-Zeylanicum	5	1	5	1.4	100	250	70	140
	25	1.8	3.8	4	180	190	200	190
	50	2	2.8	4.4	200	140	220	187
	75	2.2	3.4	4.2	220	170	210	200
	100	2	3.8	5	200	190	250	213
Hidro-Zeylanicum	5	1.4	2.4	2.6	140	120	130	130
	25	1.6	2.4	3.6	160	120	180	153
	50	1.8	3	4.6	180	150	230	187
	75	2	2	2.8	200	100	140	147
	100	2.6	3	3.8	260	150	190	200
Arrastre-Burmannii	5	1.6	2	2.8	160	100	140	133
	25	2.4	2.6	2.6	240	130	130	167
	50	2.4	2.2	2.6	240	110	130	160
	75	2.6	2.6	3	260	130	150	180
	100	3	2.8	2.2	300	140	110	183
Hidro-Burmannii	5	1.4	0	0	140	0	0	47
	25	1.4	3	3.6	140	150	180	157
	50	1.6	2	4	160	100	200	153
	75	3	2.8	3.8	300	140	190	210
	100	3	3.2	4	300	160	200	220
Referencia	5	0.8	2	3	80	100	150	110
	25	1	3	2	100	150	100	117
	50	1.8	3	2.8	180	150	140	157
	75	1.8	4	3.2	180	200	160	180
	100	2	2.8	3.2	200	140	160	167

La figura 6.11 muestra que el único factor significativo en la inhibición de *R. stolonifer* es la concentración de aceite esencial. La gráfica de efectos principales (figura 6.12) muestra que con la combinación de la variedad de canela *C. zeylanicum* y el método de arrastre con vapor, se obtienen valores estadísticos superiores.

Diagrama de Pareto de efectos estandarizados

(la respuesta es % Inhibición; $\alpha = 0.05$)

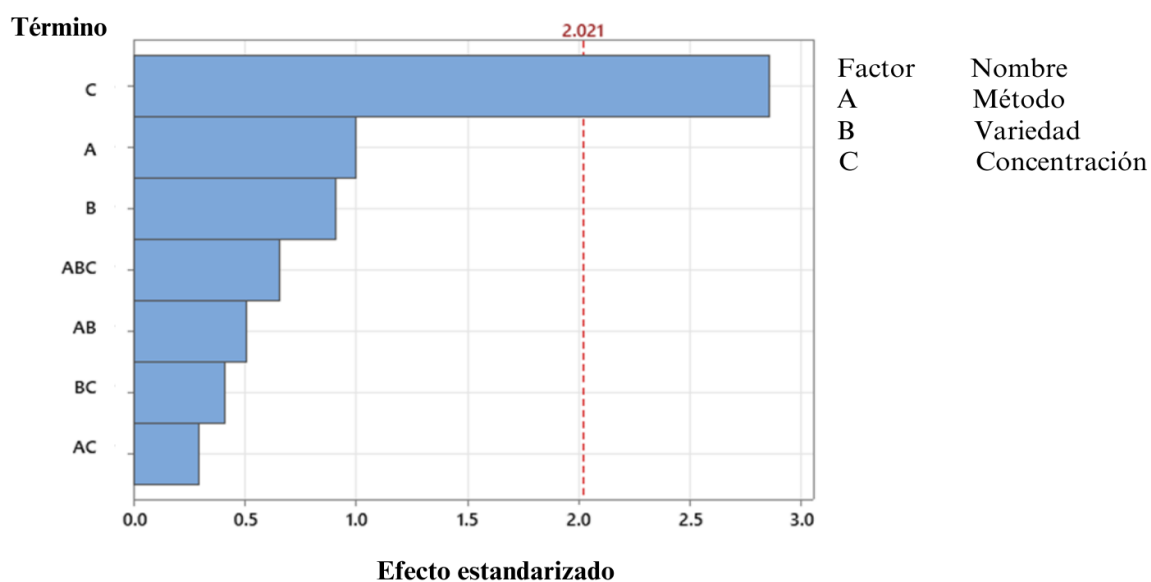


Figura 6.11 Factores que influyen en el porcentaje de inhibición de *R. stolonifer*.

Gráfica de Efectos Principales para % Inhibición

Media de datos

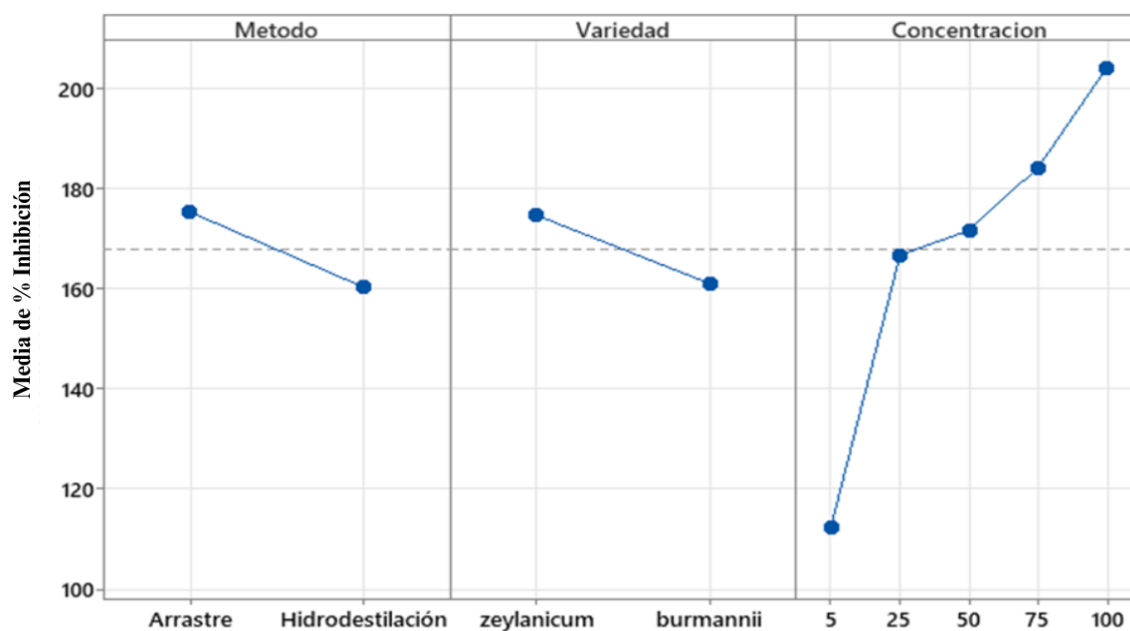


Figura 6.12 Gráfica de efectos principales en el porcentaje de inhibición de *R. stolonifer*.

Para comprobar el efecto antifúngico de las concentraciones de aceite esencial, se realizó un pequeño corte en forma de cuadrado dentro de cada halo de inhibición formado para inocularlo en una nueva placa Petri con medio PDA. Esta prueba se hizo por duplicado con la finalidad de observar a las 24 horas si hay o no hay crecimiento de cada uno de los hongos para determinar el efecto antifúngico del aceite. En la tabla 6.6 se detallan los resultados de la prueba de confirmación, los aceites esenciales de canela tienen un efecto antifúngico sobre *R. stolonifer*.

Tabla 6.6 Efecto antifúngico de las cinco diferentes concentraciones de aceites esenciales de canela según su método de extracción y referencia contra *A. flavus* y *R. stolonifer*.

Concentración de Aceite	Tipo de Aceite Esencial	Efecto antifúngico en <i>A. flavus</i>		Concentración de Aceite	Tipo de Aceite Esencial	Efecto antifúngico en <i>R. stolonifer</i>	
		SI	NO			SI	NO
0.25%	A.Z		×	5%	A.Z		×
	A.B		×		A.B	✓	
	H.Z		×		H.Z		×
	H.B		×		H.B		×
	A.R		×		A.R		×
0.50%	A.Z		×	25%	A.Z	✓	
	A.B		×		A.B	✓	
	H.Z		×		H.Z	✓	
	H.B		×		H.B	✓	
	A.R		×		A.R	✓	
1%	A.Z		×	50%	A.Z	✓	
	A.B		×		A.B	✓	
	H.Z		×		H.Z	✓	
	H.B		×		H.B	✓	
	A.R		×		A.R	✓	
2%	A.Z		×	75%	A.Z	✓	
	A.B		×		A.B	✓	
	H.Z		×		H.Z	✓	
	H.B		×		H.B	✓	
	A.R		×		A.R	✓	
3%	A.Z	✓		100%	A.Z	✓	
	A.B	✓			A.B	✓	
	H.Z	✓			H.Z	✓	
	H.B	✓			H.B	✓	
	A.R		×		A.R	✓	
Itraconazol			×		Hexaconazol	✓	

7 CONCLUSIONES

Basándonos en los resultados el mejor método de extracción según rendimiento y calidad del aceite esencial fue el método de arrastre por vapor de agua para ambas variedades de canela. Mediante este método, con la variedad *C. burmannii* se obtuvo un rendimiento de 3.37% de aceite esencial, con *C. zeylanicum* se obtuvo 2.33% de aceite esencial. Con el método de hidrodestilación para canela *C. burmannii* se obtuvo 2.83% de aceite esencial y el que dio resultados muy bajos fue el método de hidrodestilación con canela *C. zeylanicum* del cual se obtuvo la cantidad de 1.36% de aceite esencial.

Se obtuvieron mejores resultados para ambos métodos con la variedad *C. burmannii* y su parecido en correlación con la calidad del aceite de referencia por FTIR para el método de AB es de 94.93% y con el método HB es de 95.83% lo cual ambos datos están cercanos al límite de correlación del 95%. Sin embargo, con la variedad de canela *C. zeylanicum* para el método de AZ tienen un porcentaje de correlación de 98.77% y con el método de HZ 97.14%.

Respecto al efecto antifúngico de los aceites esenciales, respecto a *A. flavus* si se demostró efecto antifúngico a partir de la concentración del 3% en todos los aceites esenciales extraídos. Sin embargo, el aceite de referencia no tuvo ningún efecto sobre éste en ninguna de las concentraciones al igual que el control positivo que se utilizó para este hongo. En el caso del *R. stolonifer* se demostró efecto antifúngico para todos los aceites esenciales extraídos, el aceite esencial de referencia y el control positivo a partir de las concentraciones del 25% hasta el 100%, a excepción de aceite esencial de AB que demostró efecto antifúngico en todas las concentraciones a partir del 5% hasta el 100%.

Por lo tanto, podemos finalmente concluir que el mejor método en rendimiento, calidad y efecto antifúngico es el de arrastre por vapor de agua con la variedad *C. burmannii* con efecto antifúngico para *A. flavus* a partir de una concentración del 3% y para *R. stolonifer* con una concentración a partir del 5%.

8 RECOMENDACIONES

Según esta evaluación se recomienda utilizar el método de extracción de arrastre por vapor de agua para obtener mejor rendimiento y calidad del aceite esencial, la cantidad de material vegetal puede o no ser significativa para ambas variedades de canela aunque también depende de los costos energéticos y del material vegetal durante el proceso de extracción; en la inhibición de hongos se pueden utilizar ambas variedades de canela a partir de una concentración del 3% para *A. flavus* y del 25% para *R. stolonifer*.

Relacionando todos los factores podemos recomendar el uso de canela *C. burmannii* porque su costo suele ser un poco más barato, su rendimiento y calidad similar o mejor que la canela *C. zeylanicum*, ya que en el proceso de inhibición fue la que presentó mejores resultados para ambos hongos.

En Nicaragua se suele cultivar, aunque en muy poca cantidad la variedad de canela *zeylanicum* proveniente de Sri Lanka, esta investigación puede inspirar a que los desechos de hojas, raíces y tallos se puedan reutilizar para la inhibición de microorganismos ya que todas las partes del árbol de canelo poseen compuestos con potencial antifúngico, antimicrobiano, antibacterial, etc, lo cual puede llevar a futuros proyectos para la elaboración de productos como pesticidas naturales en el cultivo, transporte y almacenamiento de hortalizas, frutas y vegetales, así como también empaques para la conservación de alimentos e incluso la elaboración de productos farmacéuticos.

9 BIBLIOGRAFÍA

- Adinew, B. (2014). GC-MS and FT-IR analysis of constituents of essential oil from Cinnamon bark growing in South-west of Ethiopia. *International Journal of Herbal Medicine*, 1(6), 22-31.
- Albarracín Montoya, G y Gallo Palma, S. (2003). *Comparación de dos métodos de extracción de aceite esencial utilizando Piper Aduncum (Cordoncillo) procedente de la zona cafetera*. Tesis de Grado. Universidad Nacional de Colombia.
- Amaike, S. y Keller, N. P. (2011). *Aspergillus flavus*. *Annual Review of Phytopathology*, 49, 1, 107-133.
- Ames de Icochea, T. (2004). Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. International Potato Center.
- Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC y Turck M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *American Journal of Clinical Pathology*. 45: 493.
- Britannica, T. Editors of Encyclopaedia (consultado el 06/05/22). *cassia*. *Encyclopedia Britannica*. <https://www.britannica.com/topic/cassia-spice>
- Britannica, T. Editors of Encyclopaedia (consultado el 05/06/23). *Encyclopedia Britannica*. <https://www.britannica.com/plant/cinnamon>
- Chowdhury, F. T., Sarker, M., Islam, M. S., Nur, H. P., Islam, M. R., y Khan, H. (2018). Investigation of antimicrobial activity and identification of bioactive volatile metabolites of jute endophytic fungus *Aspergillus flavus*. *Bioresearch Communications-(BRC)*, 4(1), 476-482.
- dos Santos Lopes, J. (2021). *Aplicação de técnicas espectroscópicas e métodos quimiométricos na diferenciação de canela verdadeira e canela falsa*. Doctoral dissert. Universidade Estadual Do Sudoeste Da Bahia.
- Farrera P, R. E., Zambrano V, A. E. y Ortiz M, F. A. (2007). Identificación de hongos asociados a enfermedades del fruto de la fresa en el municipio Jáuregui del estado Táchira. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 24, 269-281.
- Gilchrist, L. (1995). Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada. CIMMYT.
- Geilfus, F. (1994). El árbol al servicio del agricultor: Manual de agroforestería para el desarrollo rural (Vol. 1). Enda-Caribe.
- Haddi, K., Faroni, L. R., y Oliveira, E. E. (2017). Cinnamon oil. In *Green pesticides handbook* (pp. 117-150). CRC Press.
- International Organization for Standardization. (2021). ISO 9235:2021, Aromatic Natural Materials—Vocabulary.
- International Organization for Standardization. (2013). ISO 4833-2: 2013: Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of microorganisms. Colony-count technique at 30° C by the surface plating technique.

- International Standard Organization. (2007). ISO 7218: 2007; amend 2013 (E); Microbiology of food and animal feeding stuffs—General requirements and guidance for microbiological examinations.
- International Standard Organization. (1999). ISO 6887-1: 1999, Microbiology of food and animal feed items. Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination—Part 1: General rules for initial suspension and decimal dilutions.
- Jiménez, G. S., Ducoing, H. P., y Sosa, M. R. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista mexicana de fitopatología*, 21(3), 355-363.
- Kabuba, J. y Huberts, R. (2009). Steam extraction of essential oils: investigation of process parameters. *The Canadian Journal of chemical Engineering*, 87, 6, 915-920.
- Kawatra, P., y Rajagopalan, R. (2015). Cinnamon: Mystic powers of a minute ingredient. *Pharmacognosy research*, 7(Suppl 1), S1.
- Lemos, A. G. (2015). *Hongos endófitos presentes en especies forrajeras de la región pampeana, evaluación de su potencial como agentes antagónicos y productores de metabolitos bioactivos*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional De Rosario.
- Liang, Y., Li, Y., Sun, A. y Liu, X. (2019). Chemical compound identification and antibacterial activity evaluation of cinnamon extracts obtained by subcritical n-butane and ethanol extraction. *Food Science & Nutrition*, 7, 6, 2186-2193.
- Martínez, A. (1996). Aceites Esenciales. *J. NAT. PROD*, 59, 1, 77-79.
- Martínez Ruiz, K. I. y Talavera Blandón, G. A. (2018). *Influencia de tres métodos de concentración y secado en el contenido de vitamina C y eficiencia antioxidante del extracto de las hojas de moringa oleífera*. Universidad Nacional de Ingeniería.
- Méndez-Úbeda, J. M., Hernández, M. F., y Páramo-Aguilera, L. A. (2017). Aislamiento e identificación de *Bacillus subtilis* y evaluación del antagonismo in vitro frente hongos fitopatógenos. *Nexo*, 30(2), 96-110.
- Mondragón Cortez, P. (2015). Espectroscopia de infrarrojo para todos... y 51 espectros de alimentos consumidos en México. *Neural Regeneration Research*.
- Moreno-Limón, S., González-Solís, L. N., Salcedo-Martínez, S. M., Cárdenas-Ávila, M. y Perales-Ramírez, A. (2011). Efecto antifúngico de extractos de gobernadora (*Larrea tridentata* L.) sobre la inhibición in vitro de *Aspergillus flavus* y *Penicillium* sp. *Polibotánica*, 32, 193-205.
- Ovares Rodríguez, J. (2016). *Determinación de los rendimientos y caracterización de aceites esenciales obtenidos por hidrodestilación a partir de Lippia alba y Rosmarinus officinalis*. Tesis de Grado. Universidad de Costa Rica.
- Paranagama, P. A., Dayananda, K. R., y Hewage, J. W. (2020). Chemistry and Bioactive Compounds of *Cinnamomum zeylanicum* Blume. *Cinnamon: Botany, Agronomy, Chemistry and Industrial Applications*, 251-271.
- Ramirez, L. S., y Castaño, D. M. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et technica*, 15(42), 263-268.

- Rincón Aguilar, C. M. (2014). *Actividad biológica de la familia Lauraceae*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia.
- Sánchez Miranda, L. (2013). *Determinación de compuestos funcionales en canela (Cinnamomum zeylanicum)* (Ingeniería Bioquímica). Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, México.
- Senhaji, O., Faid, M. y Kalalou, I. (2006). Étude du pouvoir antifongique de l'huile essentielle de cannelle. *Phytothérapie*, 2006 v.4 no.1, no. 1, pp. 24-30.
- Stashenko, E. E. (2009). *Aceites esenciales*, Universidad Industrial de Santander.
- Stevens, N., y Allred, K. (2022). Antidiabetic potential of volatile cinnamon oil: A review and exploration of mechanisms using in silico molecular docking simulations. *Molecules*, 27(3), 853.
- Velázquez-Del Valle, M. G., Bautista-Baños, S., Hernández-Lauzardo, A. N., GuerraSánchez, M. G. y Amora-Lazcano, E. (2008). Estrategias de control de *Rhizopus stolonifer* Ehrenb. (Ex Fr.) Lind, agente causal de pudriciones postcosecha en productos agrícolas. *Revista mexicana de fitopatología*, 26, 1, 49-55.
- Velásquez Villafuerte, D. B. (2017). *Evaluación de la actividad antimicrobiana, antioxidante y citotoxicidad de los extractos etanólico y acuoso de Tagetes multiflora kunth "chinche"*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Xing, Y., Li, X., Xu, Q., Yun, J., y Lu, Y. (2010). Antifungal activities of cinnamon oil against *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus flavus* and *Penicillium expansum* in vitro and in vivo fruit test. *International journal of food science & technology*, 45(9), 1837-1842.

10 ANEXOS

ANEXO A Rendimiento de las extracciones de aceite esencial de canela

Tabla A.1 Rendimiento de aceite esencial usando 50 g de canela en la extracción.

Método de Extracción		Variedad de Canela									
		<i>C. zeylanicum</i>					<i>C. burmannii</i>				
Arrastre por vapor	Lote de extracción	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
	Material vegetal (g)	50	50.39	50.02	50.22	50.03	50.11	52.03	50.2	50.06	50.01
	Aceite esencial (g)	0.92	0.73	1.48	1.73	0.85	2.28	1.74	1.84	1.62	1.87
	Rendimiento (%)	1.84	1.45	2.96	1.45	1.70	4.55	3.34	3.67	3.24	3.74
Hidrodestilación	Lote de extracción	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
	Material vegetal (g)	50.51	50.22	50.05	50.2	52.5	50.4	50.67	50.55	50.2	50.09
	Aceite esencial (g)	1.01	0.59	0.57	0.81	0.78	1.48	1.17	1.12	1.74	1.38
	Rendimiento (%)	2.00	1.17	1.14	1.61	1.49	2.94	2.31	2.22	3.47	2.75

Tabla A.2 Rendimiento de aceite esencial usando 100 g de canela en la extracción.

Método de Extracción		Variedad de Canela									
		<i>C. zeylanicum</i>					<i>C. burmannii</i>				
Arrastre por vapor	Lote de extracción	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
	Material vegetal (g)	100	100	100.5	100	100	100	100.4	100.26	100	100
	Aceite esencial (g)	1.28	1.96	2.39	3.17	3.15	3.45	3.3	2.39	2.83	3.22
	Rendimiento (%)	1.28	1.96	2.38	3.17	3.15	3.45	3.29	2.38	2.83	3.22
Hidrodestilación	Lote de extracción	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
	Material vegetal (g)	100	100	100	100	100	100.1	100	100.7	100	100.29
	Aceite esencial (g)	1.49	0.79	1.13	1.36	1.4	2.91	2.47	3.25	3.66	2.35
	Rendimiento (%)	1.49	0.79	1.13	1.36	1.40	2.91	2.47	3.23	3.66	2.34

ANEXO B Cálculo de concentración de hongos

Tabla B.1 Cálculo del Número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL).

Dilución	Cultivo monospórico <i>A. flavus</i>			Cultivo monospórico <i>R. stolonifer</i>		
	Núm. 1	Núm. 2	Núm. 3	Núm. 1	Núm. 2	Núm. 3
Dilución 10^{-5} (1)	106	127	95	62	117	174
Dilución 10^{-5} (2)	99	109	103	62	78	137
Dilución 10^{-6} (1)	7	13	7	12	17	28
Dilución 10^{-6} (2)	11	25	7	10	18	21
N, UFC/mL (1)	1.03×10^7	1.27×10^7	9.27×10^6	6.73×10^7	1.22×10^8	1.84×10^8
N, UFC/mL (2)	1.00×10^7	1.22×10^7	1.00×10^7	6.55×10^7	8.73×10^7	1.44×10^8

N promedio en *A. flavus*= 1.07×10^7 UFC/mL

N promedio en *R. stolonifer*= 1.12×10^8 UFC/mL

Tabla B.1 Concentración de esporas en cada tubo de dilución (UFC/mL).

Tubo de dilución	Cultivo monospórico	
	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i>
1	1.07×10^6	1.12×10^7
2	1.07×10^5	1.12×10^6
3	1.07×10^4	1.12×10^5
4		1.12×10^4

ANEXO C Sensibilidad de *A. flavus* según la escala de Duraffourd.

Tabla C.1 Aceite esencial de *C. zeylanicum* extraído mediante arrastre por vapor.

ESCALA DE DURAFFOURD									
CONCENTRACIONES DE PRUEBA	Nula (-):0-8 mm		Sensible (+): 9-14 mm		Muy Sensible (++):15-20mm		Altamente Sensible (+++): > 20 mm		Total
	N	%	N	%	N	%	N	%	
0.25%							3	100	3
0.50%							3	100	3
1%							3	100	3
2%							3	100	3
3%							3	100	3
Itraconazol					1	33.3	2	66.7	3
Agua destilada	3	100							3

Tabla C.2 Aceite esencial de *C. zeylanicum* extraído mediante hidrodestilación.

ESCALA DE DURAFFOURD									
CONCENTRACIONES DE PRUEBA	Nula (-):0-8 mm		Sensible (+): 9-14 mm		Muy Sensible (++):15-20mm		Altamente Sensible (+++): > 20 mm		Total
	N	%	N	%	N	%	N	%	
0.25%							3	100	3
0.50%							3	100	3
1%							3	100	3
2%							3	100	3
3%							3	100	3
Itraconazol					1	33.3	2	66.7	3
Agua destilada	3	100							3

Tabla C.3 Aceite esencial de *C. burmannii* extraído mediante arrastre por vapor.

ESCALA DE DURAFFOURD									
CONCENTRACIONES DE PRUEBA	Nula (-):0-8 mm		Sensible (+): 9-14 mm		Muy Sensible (++):15-20mm		Altamente Sensible (+++): > 20 mm		Total
	N	%	N	%	N	%	N	%	
0.25%							3	100	3
0.50%							3	100	3
1%							3	100	3
2%							3	100	3
3%							3	100	3
Itraconazol					1	33.3	2	66.7	3
Agua destilada	3	100							3

Tabla C.4 Aceite esencial de *C. burmannii* extraído mediante hidrodestilación.

ESCALA DE DURAFFOURD									
CONCENTRACIONES DE PRUEBA	Nula (-):0-8 mm		Sensible (+): 9-14 mm		Muy Sensible (++):15-20mm		Altamente Sensible (+++): > 20 mm		Total
	N	%	N	%	N	%	N	%	
0.25%							3	100	3
0.50%							3	100	3
1%							3	100	3
2%							3	100	3
3%							3	100	3
Itraconazol					1	33.3	2	66.7	3
Agua destilada	3	100							3

Tabla C.5 Aceite esencial de referencia (*C. verum*).

ESCALA DE DURAFFOURD									
CONCENTRACIONES DE PRUEBA	Nula (-):0-8 mm		Sensible (+): 9-14 mm		Muy Sensible (++):15-20mm		Altamente Sensible (+++): > 20 mm		Total
	N	%	N	%	N	%	N	%	
0.25%					1	33.33	2	66.67	3
0.50%							3	100	3
1%							3	100	3
2%							3	100	3
3%							3	100	3
Itraconazol					1	33.3	2	66.7	3
Agua destilada	3	100							3

ANEXO D Sensibilidad de *R. stolonifer* según la escala de Duraffourd.

Tabla D.1 Aceite esencial de *C. zeylanicum* extraído mediante arrastre por vapor.

ESCALA DE DURAFFOURD									
CONCENTRACIONES DE PRUEBA	Nula (-):0-8 mm		Sensible (+): 9-14 mm		Muy Sensible (++):15-20mm		Altamente Sensible (+++): > 20 mm		Total
	N	%	N	%	N	%	N	%	
5%			2	66.7			1	33.3	3
25%					1	33.3	2	66.7	3
50%					1	33.3	2	66.7	3
75%							3	100	3
100%					1	33.3	2	66.7	3
Hexaconazol			1	33.3	2	66.7			3
Agua destilada	3	100							3

Tabla D.2 Aceite esencial de *C. zeylanicum* extraído mediante hidrodestilación.

ESCALA DE DURAFFOURD									
CONCENTRACIONES DE PRUEBA	Nula (-):0-8 mm		Sensible (+): 9-14 mm		Muy Sensible (++):15-20mm		Altamente Sensible (+++): > 20 mm		Total
	N	%	N	%	N	%	N	%	
5%			1	33.3			2	66.7	3
25%					1	33.3	2	66.7	3
50%					1	33.3	2	66.7	3
75%					2	66.7	1	33.3	3
100%							3	100	3
Hexaconazol			1	33.3	2	66.7			3
Agua destilada	3	100							3

Tabla D.3 Aceite esencial de *C. burmannii* extraído mediante arrastre por vapor.

ESCALA DE DURAFFOURD									
CONCENTRACIONES DE PRUEBA	Nula (-):0-8 mm		Sensible (+): 9-14 mm		Muy Sensible (++):15-20mm		Altamente Sensible (+++): > 20 mm		Total
	N	%	N	%	N	%	N	%	
5%					2	66.7	1	33.3	3
25%							3	100	3
50%							3	100	3
75%							3	100	3
100%							3	100	3
Hexaconazol			1	33.3	2	66.7			3
Agua destilada	3	100							3

Tabla D.4 Aceite esencial de *C. burmannii* extraído mediante hidrodestilación.

CONCENTRACIONES DE PRUEBA	ESCALA DE DURAFFOURD								Total
	Nula (-):0-8 mm		Sensible (+): 9-14 mm		Muy Sensible (++):15-20mm		Altamente Sensible (+++): > 20 mm		
	N	%	N	%	N	%	N	%	
5%	2	66.7	1	33.3					3
25%			1	33.3			2	66.7	3
50%					2	66.7	1	33.3	3
75%							3	100	3
100%							3	100	3
Hexaconazol			1	33.3	2	66.7			3
Agua destilada	3	100							3

Tabla D.5 Aceite esencial de referencia (*C. verum*).

CONCENTRACIONES DE PRUEBA	ESCALA DE DURAFFOURD								
	Nula		Sensible		Muy Sensible		Altamente Sensible		Total
	(-):0-8 mm		(+: 9-14 mm		(++):15-20mm		(+++): > 20 mm		
	N	%	N	%	N	%	N	%	
5%	1	33.3			1	33.3	1	33.3	3
25%			1	33.3	1	33.3	1	33.3	3
50%					1	33.3	2	66.7	3
75%					1	33.3	2	66.7	3
100%					1	33.3	2	66.7	3
Hexaconazol			1	33.3	2	66.7			3
Agua destilada	3	100							3

ANEXO E Halos de inhibición de los aceites esenciales en *A. flavus* y *R. stolonifer*.

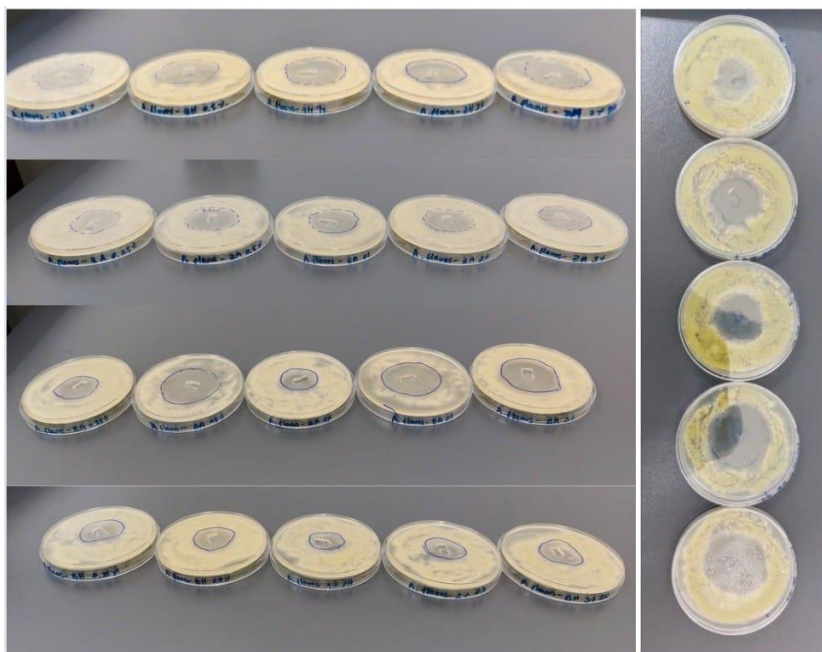


Figura E.1 Halos de inhibición de los aceites esenciales HZ, AZ, AB, HB y de AR a concentraciones de 0.25, 0.5, 1, 2 y 3% en *A. flavus*.

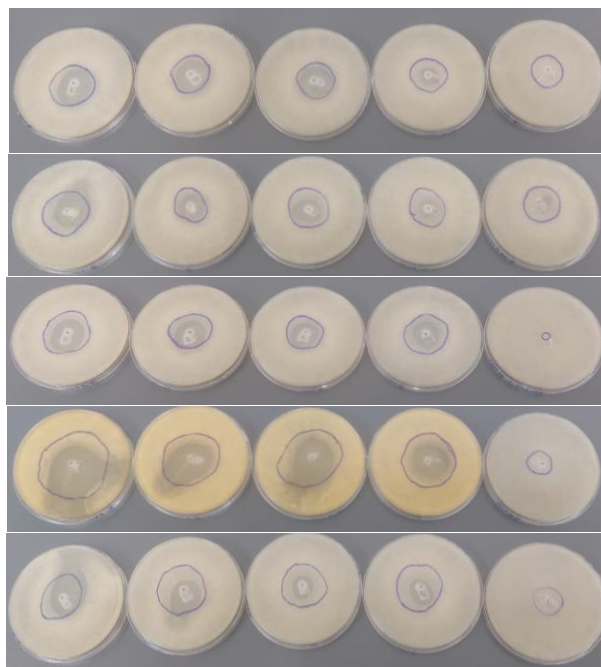


Figura E.2 Halos de inhibición de los aceites esenciales con concentraciones de (100, 75, 50, 25, 5) %, donde la 1^{er} imagen corresponde a AB, HB, HZ, AZ, AR.