



**Centro de Investigación en Alimentación
y Desarrollo, A.C**

**CAPACIDAD ANTIMICROBIANA Y ESTABILIDAD
TERMICA DE ACEITE ESENCIAL DE ROMERO
(*Rosmarinus officinalis*) ENCAPSULADO EN β -
CICLODEXTRINA.**

Por:

L.T.A. Dalila García Sotelo

TESIS APROBADA POR LA


COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

Como requisito parcial para obtener el grado de


MAESTRÍA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

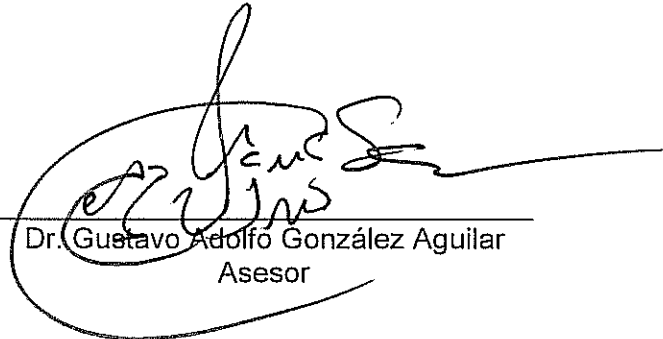
Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Dalila García Sotelo, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias



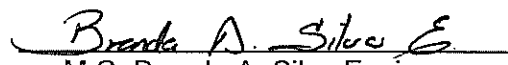
Dr. Jesús Fernando Ayala Zavala
Director de Tesis



Dr. Emilio Álvarez Parrilla
Asesor



Dr. Gustavo Adolfo González Aguilar
Asesor

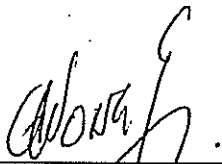


M.C. Brenda A. Silva Espinoza
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



Dr. Pablo Wong González

Director general

AGRADECIMIENTOS

Para CONACYT por el apoyo prestado durante el posgrado.

Para el CIAD.

A mi asesor y mi comité de tesis por todo el apoyo y confianza.

Al Dr. Manuel Pérez Tello por el apoyo brindado en los análisis TGA y DSC en el departamento de ingeniería química y metalurgia de la UNISON.

Al M.C Jorge Mercado por su apoyo en el CG-MS.

A la M.C. Karla Martínez Robinson por su apoyo en los análisis de infrarrojo.

Al M.C Reynaldo Cruz, al M.C Luis Ortega Ramírez y Francisco J. Vázquez por su apoyo en el laboratorio.

.

DEDICATORIA

A mis familiares y amigos que me apoyaron siempre en todos los sentidos a continuar con esta meta personal y profesional. A quien me dijo una vez que desistiera, porque me hizo ponerme el reto de terminar esta meta. Al Dr. Fernando que me dio la oportunidad de continuar creciendo profesionalmente. A mis compañeros de laboratorio que hicieron más amenos los días pesados y agradables la estancia, gracias por tantas risas.

CONTENIDO

	pagina
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE CUADROS	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xii
I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	4
Aceite esencial de romero como antimicrobiano natural.	6
Control de la volatilidad de AR para su uso en la industria de alimentos.	12
Encapsulación en β CD para control de volatilidad de terpenos.	12
III. HIPÓTESIS	16
IV. OBJETIVOS	17
Objetivos Específicos	17
V. MATERIALES Y MÉTODOS	18
Etapa 1. Evaluación de la capacidad antimicrobiana de aceite esencial de romero y su estabilidad en condiciones críticas de temperatura.	18
Caracterización del AR (CG-MS).	18
Concentración mínima bactericida y/o fungicida (CMB/CMF).	19
Curvas de sensibilidad al AR para bacterias y levaduras.	20
Análisis termogravimétrico (TGA) y calorimétrico (DSC) del AR.	20
Diseño de experimentos y análisis de datos.	21
Etapa 2: Determinación de la Actividad Antimicrobiana de las Cápsulas (AR: β CD) y su Estabilidad en Condiciones Críticas de Temperatura.	21
Proceso de encapsulación.	21
Cromatografía de Gases de las Cápsulas.	22
Espectroscopia de infrarrojo (IR) de las cápsulas.	23
Análisis termogravimétrico (TGA) y calorimétrico (DSC) de las cápsulas.	23
Capacidad antimicrobiana de las cápsulas.	23

Diseño de experimentos y análisis de datos.	24
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
Etapa 1. Actividad Antimicrobiana del Aceite Esencial de Romero y su Estabilidad en Condiciones Críticas de Temperatura.	25
Caracterización del AR.	25
Capacidad antimicrobiana del AR.	27
Análisis termogravimétrico (TGA) y calorimétrico (DSC) del aceite de romero.	34
VII. CONCLUSION ETAPA 1	36
Etapa 2: Actividad Antimicrobiana de las Cápsulas (AR- β CD) y su Estabilidad en Condiciones Críticas de Temperatura.	36
Encapsulación del AR en la β CD.	36
Capacidad antimicrobiana de las cápsulas.	41
Espectroscopia de infrarrojo (IR) de las cápsulas.	43
Análisis termogravimétrico (TGA) y calorimétrico (DSC) del las cápsulas.	46
VIII. CONCLUSIÓN ETAPA 2	49
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de acción propuesto de terpenos sobre bacterias, donde la interacción de estos, generando apertura de poros en la membrana, liberando el contenido citoplasmático y protones. Adaptada de (Burt, 2004; Ortega-Ramirez, 2013)	8
Figura 2. Mecanismo de acción antifúngico reportado de terpenos, donde se unen a enzimas de pared y membrana, mediante puentes de hidrogeno con sus sitios activos. Alterando la adhesión, contenido de iones, síntesis de ergosterol y muerte finalmente. Adaptado de (Rodriguez-García, 2013).....	9
Figura 3. Perfil de volátiles del aceite de romero por GC-MS. 1) 3-careno, 2) canfeno, 3) α -pineno, 4) β -pineno, 5) β -cimeno, 6) <i>D</i> -limoneno, 7) eucaliptol, 8) β -linalool, 9) alcanfor, 10) borneol, 11) α -terpinol, 12) bornil acetato, 13) copaeno, 14) cariofileno y 15) γ -cadineno.....	26
Figura 4. Curva de sensibilidad de <i>S. Typhimurium</i> al AR.....	30
Figura 5. Curva de sensibilidad de <i>L. monocytogenes</i> al AR.....	30
Figura 6. Curva de sensibilidad de <i>C. tropicalis</i> al AR.	32
Figura 7. Curva de sensibilidad de <i>S. pastorianus</i> al AR.	32
Figura 8. Análisis termogravimétrico y calorimétrico del aceite de romero.	35
Figura 9. Cuenta de Terpenos identificados por CG-FID en las diferentes cápsulas probadas (AR: β CD).	40
Figura 10. Espectro IR del AR, β CD y cápsula (16:84).....	44
Figura 11. Análisis termogravimétrico (TGA) y calorimétrico (DSC) del AR, β CD y 16:84 (AR: β CD).....	47

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. CMI y CMB del aceite de romero contra bacterias y levaduras. Resultados expresados en mg/mL.....	28
Cuadro 2. Parámetros de crecimiento de sensibilidad de las bacterias y levaduras al AR.....	33
Cuadro 3. Recuperación de AR en las cápsulas a diferentes proporciones de β CD.....	39
Cuadro 4. Concentración de cápsulas requerida para lograr efecto inhibitorio y bactericida/fungicida en las diferentes proporciones de (AR: β CD).....	42

RESUMEN

La presencia y crecimiento de microorganismos patógenos y deteriorativos es un riesgo que compromete la inocuidad y calidad alimentaria. Dentro de las tendencias para atacar este problema se encuentra el uso de antimicrobianos naturales, de los cuáles el aceite esencial de romero (AR) ha sido reconocido por poseer tal actividad. Sin embargo, los compuestos activos del AR son terpenos volátiles, sensibles a la temperatura, lo que puede ocasionar la pérdida de su actividad antimicrobiana. Como una solución a esta problemática, el presente estudio planteó la encapsulación del AR en β -ciclodextrina (β CD), la cual es un oligosacárido cíclico, capaz de atrapar compuestos hidrofóbicos en su interior. Los de los compuestos volátiles identificados en el AR fueron: 1,8 cineol (52%), 3-careno (9.6%) y alcanfor (9.3%). *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes*, *Candida tropicalis* y *Saccharomyces pastorianus* fueron sensibles a la presencia del AR libre mostrando concentraciones mínimas inhibitorias de 10, 10, 4.5 y 2.5 mg/mL, respectivamente. Los análisis termogravimétricos indican que la descomposición del AR inició desde los 43°C, perdiendo el 50% de su masa a los 100°C, hasta su descomposición total a los 130°C. Los análisis de infrarrojo señalan la formación de interacciones de puentes de hidrogeno entre el AR y la β CD. Siendo la proporción 16:84 (AR: β CD) la que presentó mayor cantidad de compuestos volátiles encapsulados. Los análisis termogravimétricos del AR encapsulado indican que la descomposición inició desde los 75°C, perdiendo el 10% de su masa, hasta su descomposición total a los 290°C, lo que indicó la protección de la β CD sobre AR. El AR encapsulado presentó concentraciones mínimas inhibitorias de 200, 193, 28 y 42 mg/mL para *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes*, *C. tropicalis* y *S. pastorianus*, respectivamente. En base a lo anterior podemos concluir que la encapsulación de AR en β CD ofrece protección a los volátiles atrapados

expuestos a aumento de temperatura, manteniendo sus propiedades antimicrobianas.

Palabras clave: inocuidad alimentaria, aceite de romero, encapsulación.

ABSTRACT

The presence and growth of pathogenic and deteriorative microorganisms is a risk that compromises food safety and quality. The use of natural antimicrobials is among the trends to solve this problem, being the rosemary essential oil (RO) recognized to possess such activity. However, the bioactive compounds of RO are volatile terpenes that are sensitive to the increment of temperature, which can affect its antimicrobial activity. As a solution to this problem, this study proposed the encapsulation of RO in β -cyclodextrin (β CD), which is a cyclic oligosaccharide capable of trapping hydrophobic compounds inside. 1.8 cineol (52%), 3-carene (9.6%) and camphor (9.3%) were among the identified volatile compounds in the RO. *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes*, *Candida tropicalis* and *Saccharomyces pastorianus* were sensitive to the free RO, showing minimal inhibitory concentrations of 10, 10, 4.5 and 2.5 mg/mL, respectively. The thermogravimetric analyses for RO indicated its decomposition at 43°C, losing 50% of its weight at 100°C, to decompose completely around 130°C. The infrared spectrum confirmed the formation of molecular interactions between RO and β CD. The 16:84 (RO: β CD) ratio showed higher amount of encapsulated volatile compounds. The thermogravimetric analyses of the encapsulated RO showed its decomposition at 75°C, losing 10% of its weight, to decompose completely around 290°C, these results indicated the protection of β CD on RO. The RO capsules showed minimal inhibitory concentrations of 200, 193, 28 and 42 mg/mL for *S. typhimurium*, *L. monocytogenes*, *C. tropicalis* y *S. pastorianus*, respectively. Based in these results it can be conclude that the encapsulation of RO within β CD offered protection to the trapped volatiles during the increment of temperature, preserving its antimicrobial properties.

Keywords: food safety, rosemary oil, encapsulation.

I. INTRODUCCION

El consumo de alimentos contaminados con bacterias patógenas como *Salmonella sp.* y *Listeria sp.*, se debe a la falta de inocuidad al momento de la preparación de estos. Consumir estos ocasiona problemas de salud que pueden llegar hasta la muerte, además de gastos por hospitalizaciones e incapacidades laborales. *Salmonella* causa 600,000 muertes anualmente a nivel mundial y 3,000 mueren a causa de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's) (Centers for Disease Control and Prevention 2014). Por otro lado, las levaduras son la segunda causa más importante después de las bacterias de la alteración de los alimentos, cuando éstas se encuentran en grandes concentraciones, afectan la calidad de productos alimenticios como yogurt, embutidos y vegetales frescos (Kopper et al., 2009). Tanto las bacterias como las levaduras ocasionan que muchos productos alimenticios sean rechazados y destruidos cuando no cumplen las especificaciones microbiológicas para su consumo humano.

El uso de extractos de plantas es señalado como una opción natural segura, para reducir la presencia y crecimiento microbiano en alimentos, ya que se ha reportado resistencia o inmunidad de los microorganismos a los efectos de los antimicrobianos a los que eran sensible anteriormente (Caroline Smith DeWaal & Susan Vaughn Grooters, 2013; Organización Mundial de la Salud, 2012). Esta resistencia es consecuencia del uso y abuso de los conservadores sintéticos como el hipoclorito de sodio, poliacrilamida, bromuro de potasio, cloro (lavado de frutas y verduras) entre otros, que se utilizan en la industria alimentaria como

antimicrobianos (FDA, 2013) (Raybaudi-Massilia, Mosqueda-Melgar, Soliva-Fortuny, & Martín-Belloso, 2009). Por lo anterior, en años recientes surgió la necesidad de desarrollar nuevos conservadores de alimentos. Dentro de estos, los aceites esenciales y extractos de plantas, son una opción natural que además de conservar la vida de anaquel, funcionan como antioxidantes, aromatizantes y saborizantes (Burt, 2004).

Los terpenos de los aceites de plantas y especies han demostrado ser un poderoso aliado para conservar la inocuidad y calidad de alimentos. El aceite de anís por ejemplo gracias al linalool que posee ha demostrado actividad fungicida contra *C. parapsilosis*, *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei* (Kosalec, Pepeljnjak, & Kustrak, 2005), el aceite de orégano y sus terpenos (timol y carvacrol) tienen efecto bactericida contra especies de *Vibrio* (Gastélum Franco et al., 2007), Otros terpenos como el α -terpineol, isopulegol, citronelal, citronelol, linalool y acetato de citronelilo han exhibido actividad antimicrobiana contra *E. coli.*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* (Maguna, Romero, Garro, & Okulik, 2006). Otros terpenos como carvacrol, cinamaldehído, ácido cinámico y eugenol han sido usados en frutas cortadas: manzana, pera, uva, durazno, melón verde, tomate, kiwis, melones y como recubrimientos comestibles de manzana, melón, pera, naranja, fresa y tomate para alargar su vida útil.

El aceite de romero (AR) ha demostrado ser un poderoso antimicrobiano contra bacterias, hongos y levaduras (Dorman & Deans, 2000), gracias a que es rico en compuestos volátiles, principalmente terpenos (Maguna, Nuñez, Okulik, & Castro, 2005; Verma et al., 2012). El mecanismo de acción propuesto para los terpenoides consiste en la disrupción de la membrana celular bacteriana por los compuestos lipofílicos mediante 3 posibles vías: aumentando la permeabilidad de la membrana a iones pequeños, afectando la estabilidad estructural de la membrana y desestabilizando el empaquetamiento de la bicapa lipídica,

cualquiera de los tres anteriores produce la muerte en la célula bacteriana (Maguna et al., 2005). El mecanismo de acción de AR sobre hongos y levaduras aún no está bien definido, sin embargo, podría ser parecido al modo de acción del aceite esencial de tomillo, el cual se describe actúa causando daño irreversible a la pared, membrana celular y organelos, así como lesión a la membrana citoplasmática causando reducción considerable del contenido de ergosterol (Necha & Barrera, 2009).

La volatilidad es la principal característica de los terpenos que componen al AR y que puede comprometer su actividad antimicrobiana. Exposición a fluctuaciones de temperatura y luz, ocasionan que componentes del AR se volatilicen y oxiden (Weissinger y col., 2001). Yeh y colaboradores en el 2013, comprobaron que compuestos fenólicos, como el cinamaldehído, principal terpenoide del aceite esencial de canela, se vio disminuido (casi en 80%) por el aumento de temperatura de 25 a 100°C en tan solo 8 horas. Efecto similar fue encontrado por J. Fernando. Ayala-Zavala, Gonzalez-Aguilar, Alvarez-Parrilla, De la rosa, and Vega-Vega (2012) con el aceite esencial de canela donde el mismo terpenoide se disminuyó cuando se aumentó de temperatura a 150°C y se exponía a luz UV.

El encapsulamiento es una opción que permite mantener la estabilidad de los compuestos volátiles. J. Fernando. Ayala-Zavala et al. (2012) encapsularon el aceite esencial de canela en β -ciclodextrina (β CD) y vieron que la cantidad de cinamaldehído se conservaba cuando se sometía altas temperaturas y luz UV. Encapsular los volátiles consiste en utilizar β CD (oligosacárido) como anfitrión por ser capaz de atrapar compuestos hidrofóbicos como huésped en su interior apolar (Bhandari, D'Arcy, & Bich, 1998; Marques, 2010). Por lo anterior el presente trabajo planteo la encapsulación del AR en β CD para proteger a los compuestos volátiles del aumento de temperatura y así conservar su capacidad antimicrobiana.

II. ANTECEDENTES

Las distintas y recientes prácticas de alimentación, preparación y almacenamiento de los productos alimenticios, requieren de una calidad e inocuidad más rigurosa. En México en el año 2010 se registraron 4,923,459 casos de infecciones intestinales diarreicas asociadas a las ETA's y según la Organización Mundial de la Salud, entre un 70 y un 80 por ciento de los casos de diarrea que se producen se deben a la ingestión de agua y alimentos contaminados (Jiménez Edeza & Chaidez Quiroz, 2013).

Dentro de los 31 principales patógenos identificados causantes de ETA's se encuentra *Salmonella* no tifoidea, *Listeria* sp., norovirus y *Campylobacter* entre otras (CDC, 2011). *Listeria monocytogenes* es el agente causante de la enfermedad conocida como listeriosis humana, la cual se contrae por consumir alimentos contaminados. Su habitad o reservorio natural es el suelo, agua y plantas de donde la contraen animales y humanos. *Salmonella* sp. produce la enfermedad conocida como salmonelosis, la cual puede ser contraída por los humanos por la ruta fecal-oral, por lo que es común aislarla de muestras de intestinos de animales y seres humanos (Hitchins & Jinneman, April 2011).

La principal causa de rechazos y destrucción de productos alimenticios se debe a la contaminación con microorganismos patógenos como *Salmonella*, *Listeria* y *Shigella* (Lezama, 1999). Por ejemplo las frutas y hortalizas como alcachofas,

germinados de frijol, tomate, germinados de alfalfa, sidra de manzanas, coliflor, apio, berenjena, pimiento, melón, sandía, lechuga y rábano, han sido susceptibles de la contaminación con *Salmonella* spp. (Camelo, 2003). Mientras que la contaminación con *L. monocytogenes* abarca germinados de frijol, repollo, repollo cortado, pepino, papa, rábano, hongos comestibles, ensaladas, tomates y otras hortalizas, aunque también se reportan brotes en carnes y mariscos. Estos casos indican que a pesar de que los brotes en alimentos van en disminución, las buenas prácticas de higiene y manufactura por parte de los productores de alimentos aún siguen siendo deficientes (CSPI, 2014).

Además de las bacterias patógenas existen microorganismos que si bien no causan problemas de salud, si afectan la calidad sensorial de alimentos. *Candida tropicalis* y *Saccharomyces pastorianus* son ejemplos de estos agentes deteriorativos. A pesar de que no existen muchos reportes de *C. tropicalis* en los alimentos, se han encontrado en muestras de frutas frescas como el durazno y chirimoya, mientras que *S. pastorianus* se ha aislado de muestras de frutas como piña y jobo (Montemayor & Gamero, 1962). Ambas levaduras por sus requerimientos de humedad y temperatura han demostrado sobrevivir y proliferar aun en condiciones de envasado. En años recientes se ha visto que *C. tropicalis* es resistente a los antifúngicos sintéticos como la flucitosina, lo que hace más difícil el tratamiento en pacientes con candidemia (Desnos-Ollivier et al., 2008). La resistencia de los microorganismos a los desinfectantes permitidos en la industria alimentaria, hace que el control de las ETA's se vea afectado. Por ejemplo, el uso del cloro actualmente requiere de tiempos y concentraciones mayores para surtir su efecto letal (Solano Cornejo, 2013).

Aceite Esencial de Romero como Antimicrobiano Natural.

La planta de romero (*Rosmarinus officinalis*) es arbusto originario de la región Mediterránea que crece en climas cálidos, semicálidos, semisecos y templados. Puede alcanzar 1.5 metros de altura; es muy aromático, de color verde y ramificado, y las hojas son opuestas sin soporte, angostas como agujas, de color verde en el anverso y blanquecinas en el reverso, tiene pocas flores que se encuentran en la unión del tallo y pueden ser de color blanco, rosa o azul (BDMTM, 2009). Las hojas de la planta de romero contienen entre 1,0 y 2,5% de aceite esencial, éste es de color amarillo pálido y de sabor alcanforado (Mangena & Muyima, 1999). Está constituido por monoterpenos como el 1,8-cineol, α -pineno, alcanfor, α -terpineol, canfeno, borneol, acetato de bornilo, limoneno, linalol, mirceno y verbenona; y por sesquiterpenos como β -cariofileno (López-Luengo. 2008) (Zu et al., 2012). Entre los más abundantes están el acetato de bornilo, canfeno, alcanfor, 1,8 cineol y α - β -pineno (Mangena & Muyima, 1999; Romeu, Ferret, & Finalé, 2007).

La composición y concentración de los terpenos en la planta de romero y su aceite esencial, puede variar según la parte recolectada, grado de desarrollo, época de recolección, procedencia geográfica, pH y clima (Verma et al., 2012). Sin embargo, se ha visto que la composición del AR no muestra cambios cuando se extrae de plantas de una misma región aunque se cambie la época del año (Coy Barrera & Eunice Acosta, 2013).

La actividad antimicrobiana del AR ha sido constatada y atribuida a compuestos terpenicos como el pineno y canfeno los cuales tienen acción contra bacterias Gram positivas como *E.coli*, *Acinetobacter Iwoffi*, *Shigella flexneri*,

Streptococcus Pyogenes y contra levaduras como *Candida albicans*, *Erwinia amylovora*, *Dekkera bruxellensis* y *H. vineae*, y además en algunos hongos filamentosos (Mangena & Muyima, 1999). El mecanismo de acción antibacteriano de los terpenoides de los aceites se ha propuesto como la disrupción de la membrana celular por los compuestos lipofílicos mediante 3 posibles vías: aumentando la permeabilidad de este organelo al paso de iones pequeños, afectando su estabilidad estructural y desestabilizando el empaquetamiento de la bicapa lipídica, cualquiera de los tres anteriores produce la muerte en la célula bacteriana (Maguna et al., 2005) (**fig.1**). Por otro lado, el mecanismo de acción de los aceites sobre hongos y levaduras aún no está bien definido, sin embargo, podría ser parecido al modo de acción del aceite esencial de tomillo el cual se describe actúa causando daño irreversible a la pared, membrana celular y organelos, así como lesión a la membrana citoplasmática causando reducción considerable del contenido de ergosterol (Necha & Barrera, 2009). Otros autores describen el mecanismo antifúngico de los compuestos monoterpenoides fenólicos uniéndose a enzimas claves de pared celular y membrana celular, mediante puentes de hidrogeno con sus sitios activos. Lo que trae como consecuencia cambio en la adhesión celular, contenido de iones, síntesis de ergosterol, provocando todo esto la muerte celular (Daferera, Ziogas, & Polissiou, 2000) Marei *et al.*, 2012.

Terpenos como los del AR y otros han demostrado actuar como antimicrobianos, Gallucci et al. (2009) mostraron el efecto de monoterpenos como a carvacrol, timol y carvona, eugenol y geraniol frente a *S. aureus* donde obtuvieron CMI de 3.8, 7.5, 33.43 y 222.25 g/L, respectivamente; y donde *B. cereus* fue inhibido fuertemente por carvacrol y timol (CMI de 3.8 y 7.5 g/L). Carvacrol ha sido añadido en alimentos para conservar la inocuidad, en un estudio fue combinado con temperatura, mostrando que el tiempo de inactivación *B. cinerea* fue un 75% menor en jugo de manzana, mango, y

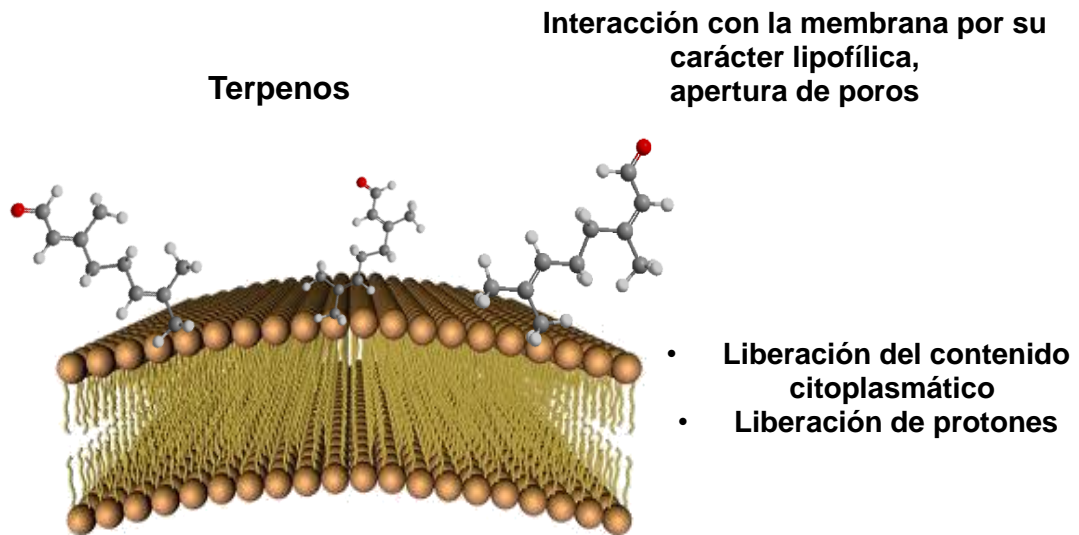


Figura 1. Mecanismo de acción propuesto de terpenos sobre bacterias, donde la interacción de estos, generando apertura de poros en la membrana, liberando el contenido citoplasmático y protones. Adaptada de (Burt, 2004; Ortega-Ramirez, 2013)

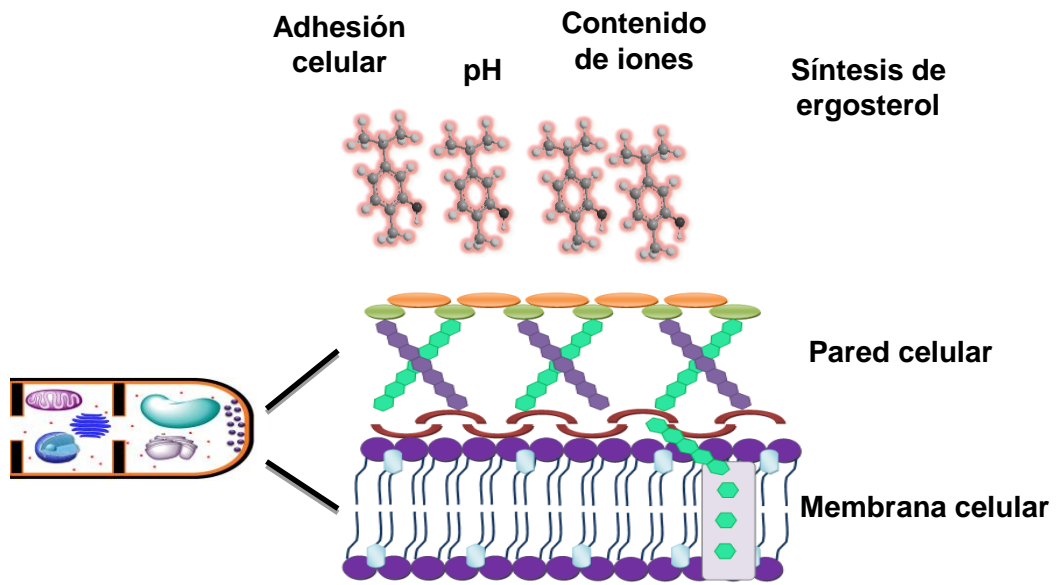


Figura 2. Mecanismo de acción antifúngico reportado de terpenos, donde se unen a enzimas de pared y membrana, mediante puentes de hidrogeno con sus sitios activos. Alterando la adhesión, contenido de iones, síntesis de ergosterol y muerte finalmente. Adaptado de (Rodríguez-García, 2013).

tomate, y en un 85% para el caso de jugo de naranja (Ait-Ouazzou, Espina, García-Gonzalo, & Pagán, 2013). Carvacrol en forma de vapores disminuyó el crecimiento de *B. cinerea* en bayas de uvas en el rango de 0.005-1.0 mL/L (Martínez-Romero et al., 2007); en kiwi fresco cortado (5-15 mM) redujo las cuentas bacterianas en 4 log UFC/g, durante 21 días a 4 °C, sin embargo se afectaron las características sensoriales (Roller & Seedhar, 2002).

El efecto de 1,8 cineol sobre las bacterias (*L. monocytogenes*, *A. hydrophila* y *P. fluorescens*) inoculadas en verduras frescas cortadas fue evaluado por de Sousa et al. (2012), donde se vio que la aplicación del 1,8 cineol solo o combinado en concentraciones subinhibitorias, causó la reducción de la cuenta en 2.9–7.3 log cfu/g en las bacterias después de 5 min de exposición. También se aplicó en la flora nativa de vegetales frescos mesofílicos, psicofílicos, enterobacterias, hongos y levaduras en las mismas condiciones, donde la CMI fue 4.3, 3.5, 4.5, 3.2 log cfu/g, respectivamente. En ambos experimentos fue mayor la reducción en la cuenta de microorganismos cuando se aplicó la combinación de 1,8 cineol con carvacrol.

Convencionalmente el uso del AR en la industria alimentaria se basa en la explotación de sus propiedades sensoriales, ya que por ser tan aromático funciona como un potenciador de sabor y olor; y debido a las propiedades antimicrobianas y antioxidantes tiene la capacidad de conservar la inocuidad y vida útil de alimentos. La capacidad antioxidante que presenta ayuda a prevenir la degradación oxidativa de lípidos, haciéndolo un aliado en la prevención de oxidación y deterioro de alimentos, por ejemplo, en mezcla para quesos (Olmedo, Nepote, & Grosso, 2013). El AR también se ha utilizado en forma de recubrimientos comestibles para fresas, carne tipo churrasco (Baleta & Duran, 2010) y tilapia nilótica (Albarracín H, Alfonso A, & Sánchez B, 2012). (Raybaudi-Massilia et al., 2009), así como sobre la superficie de calabazas

(*Cucurbita moschata Dutch*) donde demostró efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *L. monocytogenes*, Ponce *et al.* (2008)

Sin embargo, aún son pocas las aplicaciones en la industria de los alimentos, debido tal vez a que el poder antimicrobiano se ve afectado por reacciones entre los compuestos bioactivos y los componentes del alimento, y a condiciones inadecuadas de almacenamiento que hacen que se volaticen, inactiven o degraden sus terpenoides (Yeh *et al.*, 2013). Aumentar la cantidad de aceite esencial que se utiliza como antimicrobiano podría ser una alternativa para conservar esta acción y alargar la vida de anaquel de los alimentos. Sin embargo, se ha visto que esto afecta la preferencia del consumidor, pues se alteran las características sensoriales del alimento implicado (Chalchat, Michet, & Pasquier, 1998).

Los beneficios del AR a la salud humana surgen de la capacidad antimicrobiana *In vitro* que ha demostrado y a la capacidad antioxidante que presenta. por esto, su uso no se limita a una sola área de aplicación (Romeu *et al.*, 2007). La medicina es una área en la cual busca aprovechar los beneficios del AR y se ha trabajado en pruebas (*In vitro*) donde se ha visto por ejemplo, la acción anti proliferativa de células del cáncer (Yesil-Celiktas, Sevimli, Bedir, & Vardar-Sukan, 2010), y otras enfermedades degenerativas.

Control de la Volatilidad de AR para su Uso en la Industria de Alimentos.

La industria alimentaria hace uso de los terpenos como una fuente de saborizantes y aromas naturales, además de que presentan una alternativa para el aseguramiento de la inocuidad (Raybaudi-Massilia et al., 2009). La mayoría de estos bioactivos en los aceites naturales son de naturaleza química volátil, lo que los oxida o descompone fácilmente en presencia de oxígeno, luz o calor. Condiciones por ejemplo, de almacenamiento donde se combina tiempo y alta temperatura, aceleran las reacciones de degradación. (Zu et al., 2012). Yeh y colaboradores en el 2013, comprobó que compuestos fenólicos, como el cinamaldehído, principal compuesto del aceite esencial de canela, se ve disminuido (casi en 80%) por el aumento de temperatura, cuando se pasó de 25 a 100°C en tan solo 8 horas.

Encapsulación en β CD para Control de Volatilidad de Terpenos.

Encapsular los compuestos bioactivos de algunos aceites esenciales ha demostrado ser una alternativa muy viable para conservar la acción bioactiva. Las ciclodextrinas están demostrando ser una opción como matriz de encapsulación, ya que se les considera GRAS o seguras para su uso en alimentos, y a la capacidad para formar complejos de inclusión. Es decir, pueden incluir una molécula no polar completa o parte de ella en la cavidad de su anillo, dependiendo del tamaño y polaridad de ésta (Contreras-Quiñones. 2001). Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos formados por 6, 7 y 8 unidades de D-glucosa (α , β y γ ciclodextrinas respectivamente), unidas a

través de enlaces glucosídicos α -(1-4), y son resultado de la degradación enzimática de la ciclodextrina glicosiltransferasa. Las ciclodextrinas cuentan con conformación 4C_1 (silla) y presenta una estructura tridimensional en forma de cono truncado rígido, debido a los puentes de hidrogeno intermoleculares entre los grupos 3-OH y 2-OH en la periferia de la cavidad superior. La cavidad interna (diámetro) varía según el tipo de CD, siendo de 4.7-5.3, 6.0-6.5 y 7.5-8.3 Å, para α , β y γ , respectivamente (Del Valle, 2004).

En las aberturas y el exterior de la molécula, se encuentran posicionados los grupos hidroxilos los cuales dan solubilidad acuosa, debido a la habilidad de formar puentes de hidrógeno con las moléculas de agua del medio. Su estructura molecular es cíclica en el exterior hidrofílica y relativamente lipofílica en la cavidad interior, con los grupos OH en la cara interior más libres para interaccionar con otras moléculas (Martínez & Gómez, 2007). Dentro de los diferentes tipos de CD la β CD es la menos soluble en agua, la más accesible en precios y disponibilidad por lo que ha sido la más utilizada en diversas industrias (Del Valle, 2004).

Las CD han sido reconocidas como uno de los materiales más importantes que sirven de matriz para encapsular moléculas orgánicas en medios acuosos; donde la hidrofobicidad del huésped puede conducir a la formación de complejos estables con la cavidad hidrofóbica de la CD (Muñoz-Botella y col., 1995). Esta habilidad para formar complejos de inclusión con moléculas que fungen como huésped de la CD se da en función de dos factores claves. El primero es estérico y depende del tamaño relativo de la cavidad de la CD y del tamaño de la molécula huésped. Si el huésped es de un tamaño incompatible al de la cavidad de la CD, una interacción es poco probable. El segundo factor es las interacciones termodinámicas entre los diferentes componentes que involucran la reacción de formación del complejo CD-huésped-solvente. Para

que un complejo se forme debe existir una fuerza energética favorable que dirija al huésped hacia la cavidad de la CD (Del Valle, 2004).

La eficiencia del proceso de encapsulación depende de las propiedades tanto del huésped como de la CD, sin embargo, cuando se da la inclusión la CD ofrece protección al huésped. La α -CD puede formar complejos con moléculas de menor peso o compuestos con cadenas alifáticas, la β -CD forma complejos con compuestos aromáticos y heterocíclicos, y la γ -CD puede formar complejos con moléculas más grandes como macrociclos y esteroides. Cuando el huésped es encapsulado, éste puede sufrir cambios en sus propiedades químicas y físicas: protección contra la luz y el oxígeno, modificación de su reactividad química, reducción de su volatilidad y aumento en su solubilidad acuosa. Con lo anterior se obtienen diversas ventajas, además de las ya mencionadas es posible facilitar el manejo de sustancias altamente hidrofóbicas, transformar compuestos líquidos o gaseosos a sólidos, protección contra degradación microbiana, enmascarar olores, sabores y colores, y una de las más importantes es posible controlar la liberación del huésped encapsulado (Madene, Jacquot, Scher, & Desobry, 2006).

Estas propiedades de las ciclodextrinas las ha hecho ser utilizadas tanto en el área de alimentos como en farmacéutica, ya que son útiles para enmascarar olores y sabores desagradables, disminuir la incompatibilidad fármaco-excipientes, mejorar la estabilidad física y química de compuestos volátiles y de principios activos que sean hidrolizables, oxidables o fotosensibles (Espinosa & Hernández, 2005). La característica de formar complejos de inclusión por medio de enlaces no covalentes, los cuales estabilizan a una gran variedad de moléculas en medios tanto líquidos como sólidos, las hace idóneas para atrapar moléculas lipofílicas como los del AR (Espinosa & Hernández, 2005).

La estabilidad de los complejos que forman las ciclodextrinas con diferentes moléculas las vuelve muy útiles para encapsular compuestos que se requieren se liberen controladamente. Compuestos volátiles de aceite de tomillo, canela y ajo se han encapsulado en matrices de β -ciclodextrina para utilizarse como antifúngicos y preservar la inocuidad de alimentos (Del Toro-Sánchez et al., 2010). J. Fernando. Ayala-Zavala et al. (2012) demostró que al encapsular aceite esencial de canela en β CD, los compuestos fenólicos principalmente cinamaldehído se conservaban estables y sin disminución significativa cuando se aumentaba de temperatura hasta por 150°C o se exponía a 15 minutos de luz UV. Sin embargo la estabilidad de la cápsula va depender de las moléculas que la componen, por ejemplo del tamaño y naturaleza de la molécula de la cavidad como algunos compuestos fenólicos y terpenicos (Kayaci, Ertas, & Uyar, 2013).

III. HIPÓTESIS

La encapsulación en β -ciclodextrina da estabilidad térmica al aceite antimicrobiano de romero.

IV. OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la estabilidad térmica de cápsulas antimicrobianas de aceite de romero en β -ciclodextrina

Objetivos Específicos

- Evaluar la capacidad antimicrobiana de aceite esencial de romero y su estabilidad en condiciones críticas de temperatura
- Determinar la actividad antimicrobiana de las cápsulas (AR- β CD) y su estabilidad en condiciones críticas de temperatura.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

Etapa 1. Evaluación de la Capacidad Antimicrobiana de Aceite Esencial de Romero y su Estabilidad en Condiciones Críticas de Temperatura.

Caracterización del AR (CG-MS).

El AR fue adquirido en Sigma-Aldrich (W29920-0. Milwaukee, USA) y la caracterización de éste se llevó a cabo mediante cromatografía de gases acoplado a masas (CG-MS), saturn 2100T (Varian, México), columna capilar DB-5 (30m x 0.25mm) con incremento de temperatura de 65 a 290°C a una tasa de 1°C/min, mantenida 3 min. Posteriormente, la temperatura se aumentó a una tasa de 10°C/min, mantenida 3 min usando Helio como gas acarreador y un flujo de 1mL/min. Para la detección se utilizó un sistema de ionización de electrones con una energía de ionización de 70 eV. Las temperaturas del inyector y transferencia MS fueron 100 y 290°C respectivamente. La identificación de los constituyentes se basó en la comparación de los espectros de masas de estos contra los encontrados en la base de datos de sistema CG-MS NIST 98 (National Institute of Standard and Technology, Maryland, EUA).

Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Las cepas utilizadas fueron bacterias como *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo Typhimurium (ATCC® 14028™) y *Listeria monocytogenes* (ATCC® 7644™), y levaduras como *Candida tropicalis* (ATCC® 1369™) y *Saccharomyces pastorianus* (ATCC® 2345™). Se utilizó el método de microdilución en tubos donde se partió de diluciones de AR a diferentes concentraciones (1 a 20 mg/mL), en caldo nutritivo Mueller Hinton (BD DIFCO, USA) para bacterias y papa dextrosa (BD DIFCO USA) para levaduras. Se tomó una alícuota de 295 µL de cada dilución de AR y se transfirieron a un pozo de microplaca 96 pozos fondo plano (Costar Corning, NY), inoculada con 5 µL de la bacteria o levadura ajustada a 0.5 McFarland (1.5×10^8 UFC/mL), después de haber sido incubada a 35 y $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 y 120 ± 2 h para bacterias y levaduras, respectivamente. Cumplido el tiempo de incubación de las microplacas se leyeron a una absorbancia de 600nm en espectrofotómetro (Omega BMG LABTECH, Alemania). Cada concentración de AR fue probada por triplicado.

Concentración mínima bactericida y/o fungicida (CMB/CMF).

Se partió de la CMI leída, homogenizando el contenido de los pocillos con micropipeta y sembrando 100 µL en placas Petri con agar cuenta estándar, por duplicado. Se incubaron a $35 \pm ^\circ\text{C}$ por 24 h y $25 \pm ^\circ\text{C}$ por 120 horas, para bacterias y levaduras respectivamente. Finalmente se revisaron las placas y

reportó como CMB la concentración menor de AR (mg/mL) donde no se presentó crecimiento microbiano tras la resiembra.

Curvas de sensibilidad al AR para bacterias y levaduras.

Una vez encontrada la CMI del AR para cada microorganismo, se realizaron curvas de sensibilidad para conocer su efecto sobre los parámetros cinéticos de crecimiento microbiano. El crecimiento microbiano fue expresado como un aumento en la densidad óptica (DO) a 600 nm, estos datos fueron procesados utilizando la función de Baranyi (Baranyi et al., 1993), calculando el tiempo de la fase lag (h), tasa máxima de crecimiento (μ_{max} , DO/h), y el crecimiento máximo en la fase estacionaria (Y_{max} , DO) (Truchado et al., 2012).

Análisis termogravimétrico (TGA) y calorimétrico (DSC) del AR.

Tanto el DSC como el TGA el fueron realizados en el equipo Thermal Advantage Analysis, SDT2960, los análisis se realizaron con temperaturas de escaneo entre 25 y 400°C, a una velocidad de barrido de 10°C/min. Se mantuvo a la misma temperatura la muestra y la referencia mediante un controlador, utilizando N₂ como gas para purgar, a una velocidad de 50 mL/min.

Diseño de experimentos y análisis de datos.

EL diseño experimental consistió en un completo al azar. Donde la capacidad antimicrobiana, tiene como factor la concentración de aceite mg/mL y como variables de respuesta la fase lag, μ_{max} y Y_{max} . La medición de los análisis TGA y DSC del AR tuvieron como factor la temperatura (25 a 400°C), y como variables de respuesta el porcentaje de masa y el flujo de calor. Esto como ayuda del paquete estadístico NCSS, 2007, y realizando un análisis de varianza y comparación de medias entre tratamientos con una mínima diferencia significativa LSD ($P < 0.05$).

Etapa 2: Determinación de la Actividad Antimicrobiana de las Cápsulas (AR: β CD) y su Estabilidad en Condiciones Críticas de Temperatura.

Proceso de encapsulación.

La encapsulación del AR en la matriz de β -ciclodextrina se llevó a cabo siguiendo el método de co-precipitación para formar los complejos (Bhandari, D'Arcy, & Padukka, 1999). Las proporciones probadas de AR: β CD fueron de 0:100, 4:96, 8:92, 12:88 y 16:84. Una cantidad de AR (10% p/v) fue disuelta en etanol (ACS, USA) y luego mezclado lentamente en una solución de 10 ± 0.02 g

de β CD (Cavamax W7, Wacker Bio-chem, USA.) disuelta en 100 mL de etanol:agua (1:2), a $55\pm 0.2^\circ\text{C}$ con agitación constante. Se retiró el calentamiento al terminar de adicionar el AR, se tapó, agitó por 4h a temperatura ambiente y se guardó en refrigeración a 4°C por toda una noche. El complejo de AR- β CD se recuperó por filtración del precipitado de la mezcla, secado en estufa a 50°C por 24h. Se guardó y mantuvo en sequedad a 25°C por 24h hasta alcanzar el equilibrio en el contenido de humedad (peso constante). Se almacenaron a 25°C en frasco hermético. Se calculó la cantidad de polvo recuperado en base seca, por deducción de su contenido de humedad.

Cromatografía de gases de las cápsulas.

Se utilizó cromatografía de gases acoplada a flama (CG-FID) para cuantificar el área total de volátiles en las cápsulas formadas (0:100, 4:96, 8:92, 12:88, 16:84). El equipo Star 3400 cx (Varian, México) fue usado con las condiciones siguientes: columna capilar DB-5 (30m x 0.25mm) con incremento de temperatura de inicial de 55°C a 65°C y una tasa de $1^\circ\text{C}/\text{min}$, mantenida 3 minutos. Posteriormente, la temperatura se aumentó 290°C a una tasa de $10^\circ\text{C}/\text{min}$ y se mantuvo por 10 minutos más. Fue usado nitrógeno como gas acarreador a un flujo de $1\text{mL}/\text{min}$. Las temperaturas del inyector y detector fueron 100 y 290°C , respectivamente. Se registró el área total de los picos del cromatograma de cada proporción AR: β CD, los resultados se expresaron como unidades de área.

Espectroscopia de infrarrojo (IR) de las cápsulas.

Se prepararon pastillas en prensa, mezclando KBr con las cápsulas de AR- β CD probadas. Para posteriormente analizarlas en el equipo Nicolet Protegé 460 con las siguientes condiciones de escaneo: rango de longitud de onda: 400-4000 cm^{-1} ; resolución 4 cm^{-1} . Números de escaneos, 64; velocidad de escaneo, 0.63; detector, DTGS. Se utilizó una biblioteca Aldrich de espectros de infrarrojo para la identificación.

Análisis termogravimétrico (TGA) y calorimétrico (DSC) de las cápsulas.

Ambos estudios de los complejos (AR- β CD) fueron realizados en el equipo Thermal Analysis, SDT2960, como se describió anteriormente para el AR libre.

Capacidad antimicrobiana de las cápsulas.

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida y fungicida (CMB y CMF) de las cápsulas contra bacterias y levaduras mencionadas anteriormente.

Diseño de experimentos y análisis de datos.

EL diseño experimental y manejo de datos fue un un completo al azar. Donde la encapsulación tuvo como factor las proporciones de AR:βCD y como variables de respuesta el porcentaje de recuperación de AR. Cuantificación en CG-FID tuvo como factor a las proporciones de AR:βCD y como variables de respuesta el área total de los picos. Los Análisis TGA y DSC del AR tuvieron como factor a la temperatura (25 a 400°C) y como variables de respuesta el porcentaje de masa y flujo de calor. Esto como ayuda del paquete estadístico NCSS, 2007, y realizando un análisis de varianza y comparación de medias entre tratamientos con una mínima diferencia significativa LSD ($P < 0.05$).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Etapa 1. Actividad Antimicrobiana del Aceite Esencial de Romero y su Estabilidad en Condiciones Críticas de Temperatura.

Caracterización del AR.

El AR se encontró constituido principalmente por compuestos monoterpenos, donde los 4 componentes mayoritarios fueron: 1,8 cineol (eucaliptol) con 52%, 3-careno con 9.6%, alcanfor con 9.3% y α -pineno 6.1%. Además se encontraron en bajas concentraciones compuestos que se identificaron como el *cis*-sabinol, 6-canfenol, γ -cadineno y copaeno (**fig.1**). Los compuestos mayoritarios identificados en este AR coinciden con los encontrados por Mangena and Muyima (1999), aunque en menor cantidad el 1,8 cineol 31%, en mayor el alcanfor 30% y canfeno 6%. Romeu et al. (2007) reportó con el 21.5% al 1,8 cineol, 18% alcanfor, 15.3% α -pineno y canfeno 5.7%. La composición y concentración de los terpenos del AR, puede variar según la parte recolectada, grado de desarrollo, época de recolección, procedencia geográfica, pH y clima (Verma et al., 2012). Sin embargo, se ha visto que la composición del AR no

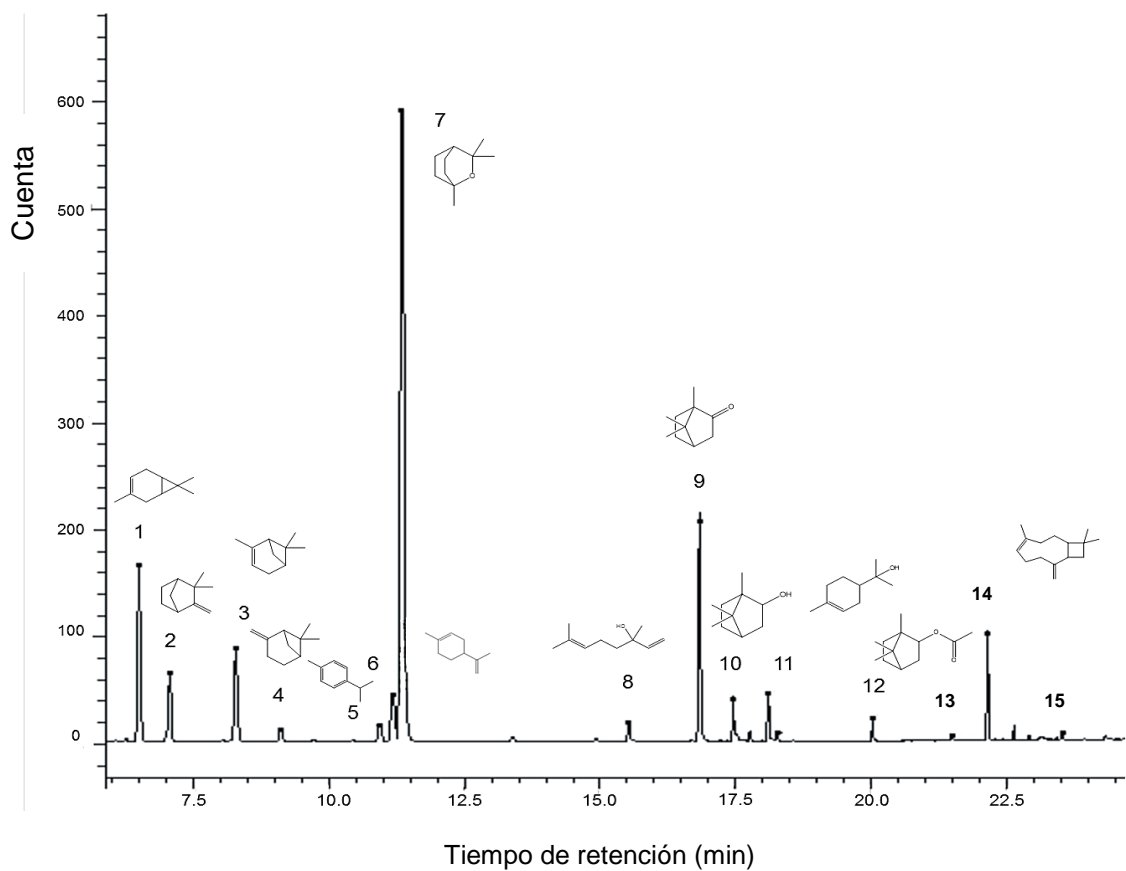


Figura 3. Perfil de volátiles del aceite de romero por GC-MS. 1) 3-careno, 2) canfeno, 3) α -pineno, 4) β -pineno, 5) β -cimeno, 6) *D*-limoneno, 7) eucaliptol, 8) β -linalool, 9) alcanfor, 10) borneol, 11) α -terpinol, 12) bornil acetato, 13) copaeno, 14) cariofileno y 15) γ -cadineno.

muestra cambios cuando se extrae de plantas de una misma región aunque se cambie la época del año (Coy Barrera & Eunice Acosta, 2013).

Los terpenos identificados en el AR han demostrado efectividad para inhibir el crecimiento de microorganismos en matrices alimentarias. Por ejemplo, el 1,8 cineol mostró ser una opción como sanitizante antimicrobiano de vegetales frescos mínimamente procesados, con valores de CMI entre 5-20 $\mu\text{L}/\text{mL}$, sobre *L. monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* y *Pseudomonas fluorescens* (de Sousa et al., 2012). Por otro lado, el α -pineno también ha demostrado actividad antibacteriana al actuar sobre *Staphylococcus aureus* (Maguna et al., 2006). Además, el alcanfor y 1,8 cineol fueron utilizados para inhibir *Rhizoctonia solani* en papa, donde se evidenció que el 1,8 cineol y alcanfor inhibieron arriba del 70% y debajo del 50%, respectivamente, ambos en concentraciones de 0.5% p/v (Vaillant Flores et al., 2009).

Capacidad antimicrobiana del AR.

Se determinó como CMI para ambas bacterias (*S. Typhimurium* y *L. monocytogenes*) 10 mg/mL de AR (**cuadro 1**). Estos valores difieren de lo reportado por Castaño P, Ciro G, Zapata M, and Jiménez R (2010) quienes reportan valores de 0.51 y 28.48 mg/mL para *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes*, respectivamente. Las levaduras fueron más sensibles al AR con concentraciones de sólo 4.5 y 2.5 mg/mL, para *C. tropicalis* y *S. pastorianus*, respectivamente. Las CMBs para *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes*, *C. tropicalis* y *S. pastorianus* fueron de 12, 14, 6.5 y 4.5 mg/mL, respectivamente (**cuadro 1**). El AR demostró tener capacidad

Cuadro 1. CMI y CMB del aceite de romero contra bacterias y levaduras. Resultados expresados en mg/mL.

Bacterias	CMI / CMB	Levaduras	CMI / CMF
S. Typhimurium (ATCC 14028)	10/12	<i>C. tropicalis</i> (ATCC 1369)	4.5/6.5
<i>L. monocytogenes</i> (ATCC 7644)	10/14	<i>S. pastorianus</i> (ATCC 2345)	2.5/4.5

antibacteriana y antifúngica, siendo las levaduras más sensibles al AR que las bacterias.

Cuando *S. Typhimurium* se sometió a una concentración de 10 mg/mL de AR, se obtuvo una fase de adaptación o lag de 13.15 h, una tasa de crecimiento máximo o μ_{max} de 0.03 DO/h y un crecimiento máximo o y_{max} de 0.40 DO. Siendo la extensión de la fase lag de *S. Typhimurium* expuesta al AR de 12.0 h con respecto al testigo (**fig.4**). Para *L. monocytogenes* expuesta a una concentración de 10 mg/mL de AR se obtuvo una fase lag de 17.60 h, una μ_{max} de 0.06 DO/h y una y_{max} de 0.02 DO; siendo la extensión de la fase de adaptación de 16.34 h con respecto al testigo (**fig.5**). *C. tropicalis* y *S. pastorianus* presentaron una extensión en la fase lag de 47.8 h y 23.8 h cuando se aplicaron concentraciones de 4.5 y 2.5 mg/mL de AR (**fig.6 y fig.7**), con respecto a los testigos. La tasa de crecimiento para *C. tropicalis* expuesta al AR fue de 0.01 y 0.02 DO/h (4.5 y 5.5 mg/mL, respectivamente), mientras que su testigo mostró valores de 0.07 DO/h. *S. pastorianus* mostró una μ_{max} de 0.09 y 0.07 DO/h cuando se expuso a concentraciones de 1.5 y 2.5 mg/mL de AR (**cuadro 2**).

El mecanismo por el cual se produce la inhibición de microorganismos expuestos a compuestos terpénicos aún no está bien dilucidado; sin embargo, se han descrito varios sitios de acción. Algunos autores establecen que los compuestos bioactivos del aceite, inactivan enzimas celulares cuando penetran la membrana, pero que va depender de la velocidad de penetración de la sustancia en la célula. Otro posible modo de acción es que los compuestos lipofílicos alteren la permeabilidad de la membrana, logrando la ruptura y la final liberación de iones y material genético, causando la muerte celular.

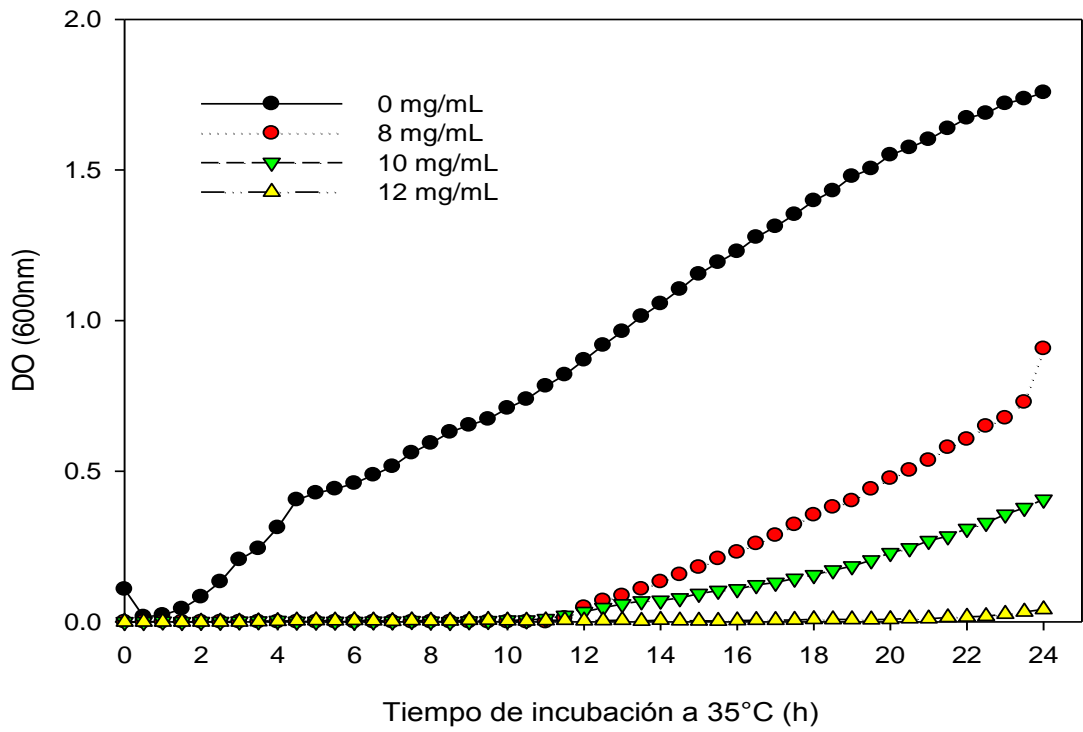


Figura 4. Curva de sensibilidad de *S. Typhimurium* al AR

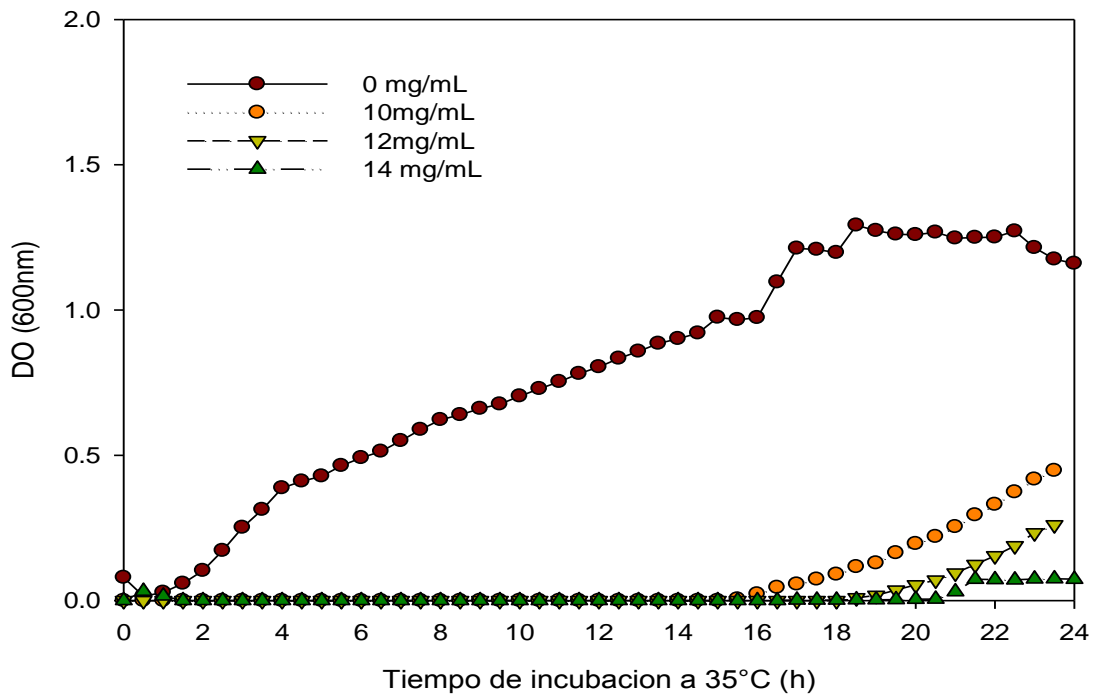


Figura 5. Curva de sensibilidad de *L. monocytogenes* al AR

Ortega-Ramirez (2013) Reportó que el aceite de *cimbopogon citratus* fue efectivo para inhibir diferentes bacterias patógenas inoculadas en espinacas, presentando una reducción en Log de UFC/g para *E. coli* de 1.09, 0.78 para *salmonella*, 1.12 para *L. monocytogenes* y 2.04 Log de UFC/g para *S. aureus*. (Rodriguez-García, 2013) reportó el efecto antifúngico del aceite esencial de orégano, rico en terpenos como β -pineno, terpineno, eucaliptol, careofileno, timol y carvacrol. Las distintas concentraciones de aceite de orégano agregadas a PDA (15.7, 25.9 y 36.1 mg/mL) inhibieron el desarrollo micelial de *A. alternata*. Esta misma autora formuló recubrimientos comestibles de pectina adicionados con aceite esencial de orégano, para recubrir frutos de tomate inoculados con el hongo *A. alternata*. Observando que los tratamientos testigo, pectina y pectina con aceite de orégano (15.7 mg/mL) fueron los que presentaron mayor crecimiento micelial del hongo. En el caso del tratamiento de pectina con aceite de orégano a 25.9 mg/mL y 36.1 mg/mL fueron los más efectivos para inhibir el crecimiento del hongo. Almeida y Suarez (2014) reportaron valores de 0.68 y 0.75 mg/mL de aceite esencial del rizoma de *Renealmia thyrsoides* y aceite esencial de *Thymus vulgaris*, respectivamente contra *Candida tropicalis* ATCC 13803.

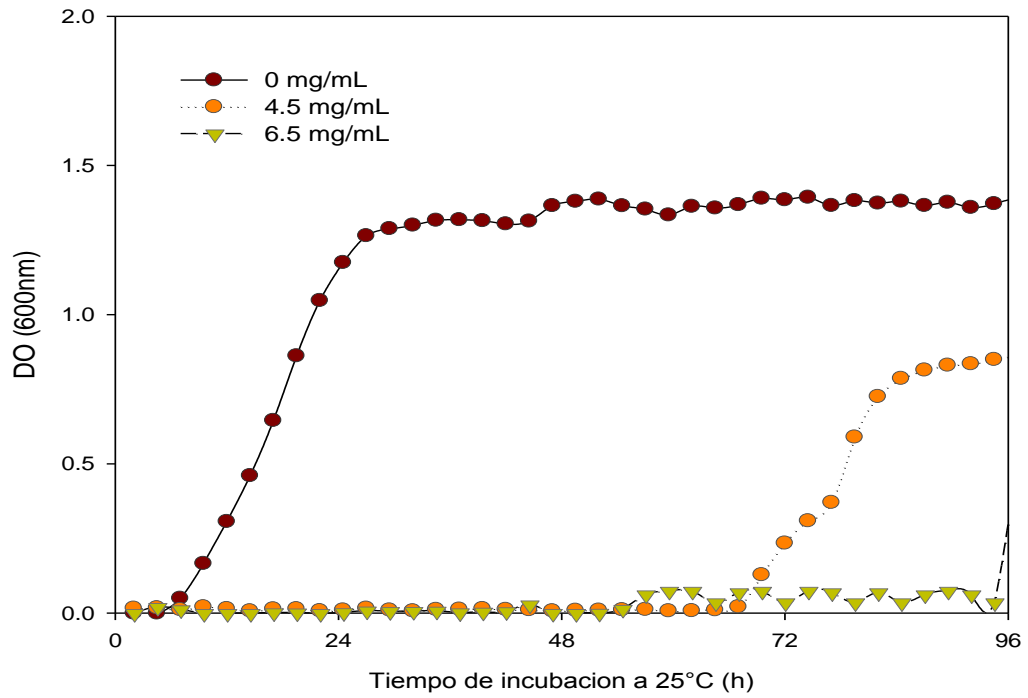


Figura 6. Curva de sensibilidad de *C. tropicalis* al AR.

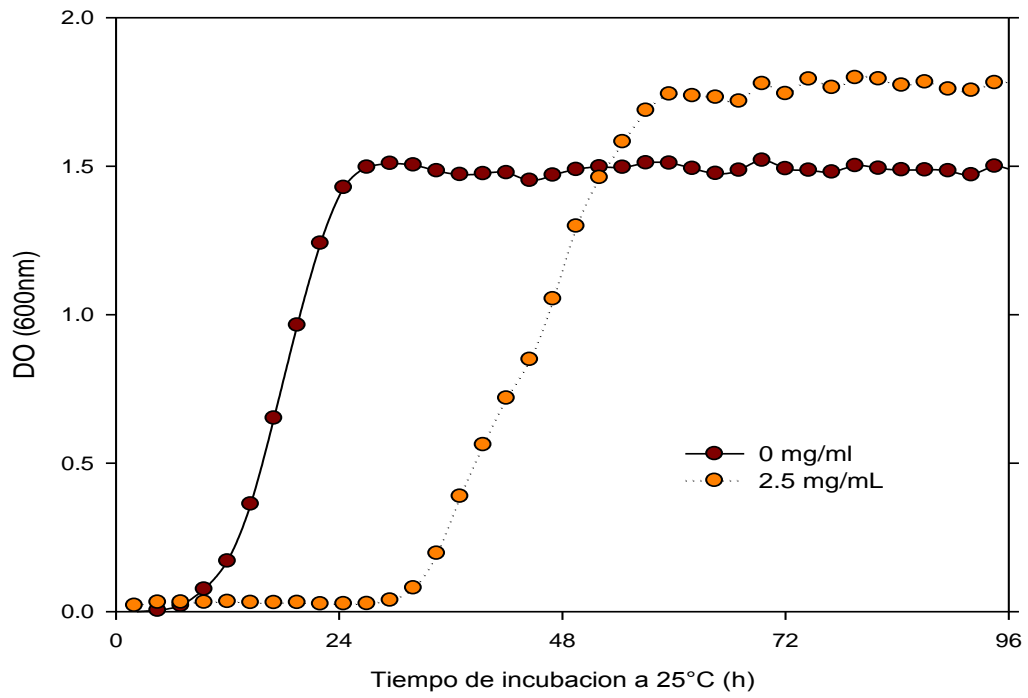


Figura 7. Curva de sensibilidad de *S. pastorianus* al AR.

Cuadro 2. Parámetros de crecimiento de sensibilidad de las bacterias y levaduras al AR.

	Concentración de AR(mg/mL)	Lag (h)	μ_{max} (DO/h)	Ymax (DO)
<i>S. Typhimurium</i>	0	1.16 ^a	0.08	1.75
	8	12.50 ^b	0.06	0.00
	10	13.15 ^c	0.03	0.40
<i>L. monocytogenes</i>	0	1.26 ^a	0.66	1.29
	10	17.60 ^b	0.06	0.02
	12	19.59 ^c	.005	0.00
<i>C. tropicalis</i>	0	5.4 ^a	0.07	1.40
	4.5	53.2 ^b	0.01	0.87
	5.5	53.9 ^c	0.02	0.51
<i>S. pastorianus</i>	0	9.3 ^a	0.11	1.53
	1.5	25.1 ^b	0.09	1.37
	2.5	33.1 ^c	0.07	1.82

*Diferente literal entre columna indica diferencia significativa por bacteria $p \leq 0.05$.

Análisis termogravimétrico (TGA) y calorimétrico (DSC) del aceite de romero.

EL TGA del AR indicó que la pérdida de masa de éste fue rápida y en una sola etapa (evaporación), en función del tiempo y temperatura entre los 40°C y 140°C, con una pérdida de masa máxima entre 102°C y 130°C. Lo anterior demuestra la inestabilidad y evaporación total de los terpenos expuestos a temperaturas mayores a los 40°C. En el DSC se confirma la evaporación del AR, donde se pudo observar que presentó un pico endotérmico a los 117°C, con una T_{max} entre 85°C y 145°C mostrando un cambio de fase o vaporización de los terpenos contenidos en el AR (**fig.8**). Lo anterior coincide con las temperaturas observadas de pérdida de masa del TGA en cuanto a la pérdida de volátiles al aumentar la temperatura del sistema.

La pérdida de masa y vaporización del AR coincide con las temperaturas de ebullición reportadas para sus terpenos mayoritarios: 1,8 cineol (176°C), 3-careno (170°C), alcanfor (204°C) y α -pineno (155°C), lo que nos indica la pérdida de éstos en función de la temperatura. La temperatura de evaporación del AR aquí reportada (130°C) fue mayor que la del aceite de naranja (118.1°C), pero menor al aceite de hierba de limón (166.7°C) y albahaca (164.2°C) reportadas por Martins, Sbaite, Benites, and Maciel (2011). Como se pudo observar la pérdida de terpenos en el AR se da en un rango de temperaturas comúnmente utilizadas en el procesamiento de alimentos, lo que resalta la importancia de buscar alternativas que brinden protección a estos como la encapsulación.

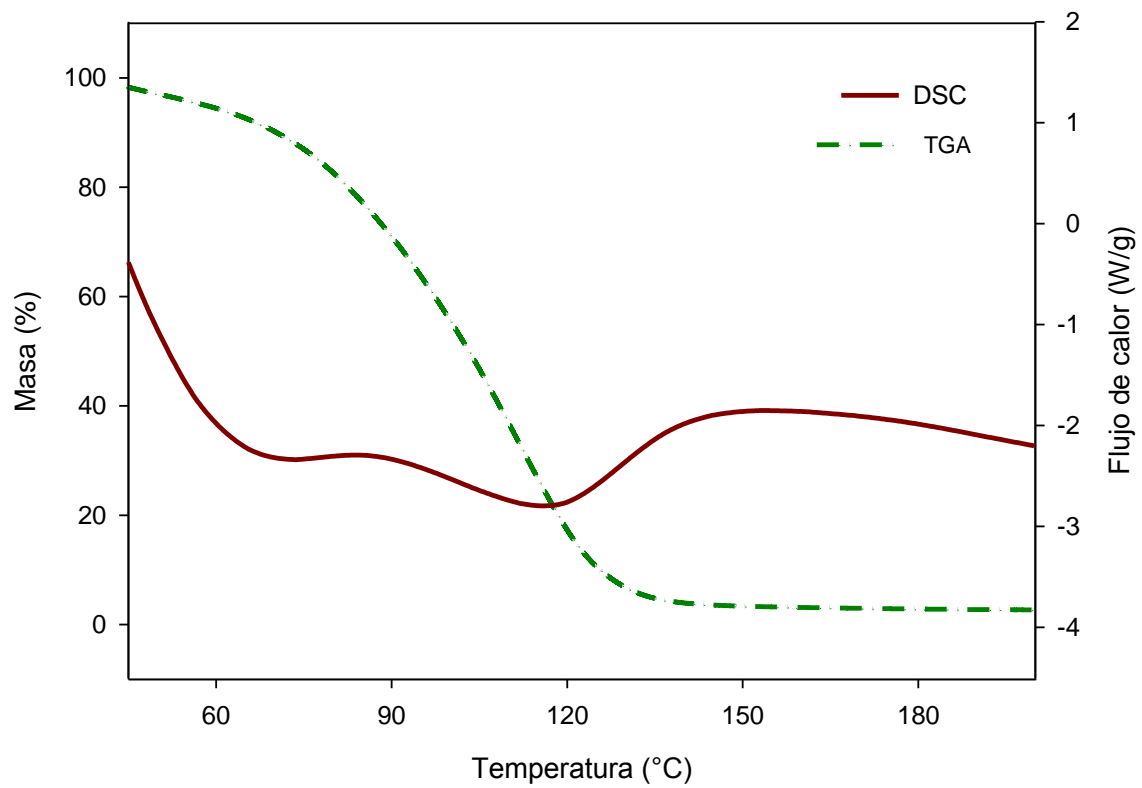


Figura 8. Análisis termogravimétrico y calorimétrico del aceite de romero.

VII. CONCLUSION ETAPA 1

Los resultados de esta etapa nos permiten concluir que el AR es un aceite esencial con capacidad antibacteriana y antifúngica, sensible al aumento de temperatura, perdiendo sus compuestos volátiles que le confieren sus propiedades bioactivas. Lo anterior justifica el uso de la encapsulación para proteger tales compuestos y las propiedades de interés del AR.

Etapa 2: Actividad Antimicrobiana de las Cápsulas (AR- β CD) y su Estabilidad en Condiciones Críticas de Temperatura.

Encapsulación del AR en la β CD.

El peso final de las cápsulas de AR fue menor que el peso inicial de la β CD y AR agregados en el proceso (**cuadro 3**). El porcentaje de recuperación en peso

de las cápsulas fue indirectamente proporcional a la cantidad de AR adicionado al proceso. Siendo significativamente mayor ($p \leq 0.05$) el porcentaje de recuperación en las proporciones con menos aceite 4:96 y 8:92 (88.09% y 87.98%), comparado con las proporciones 12:88 y 16:84 (84.6% y 82.8%). No se observaron diferencias significativas ($p \geq 0.05$) entre las proporciones 4:96 y 8:92, así como tampoco entre las proporciones 12:88 y 16:84. Estos resultados nos indican que las cantidades menores de aceite agregado en las proporciones de AR: β CD presentan mayor porcentaje de recuperación en peso de las cápsulas. La proporción AR: β CD que presentó mayor área total (800 conteos de área, c.a.) fue la 16:84, y por lo tanto mayor cantidad de terpenos (**fig.9**), seguida de las proporciones 8:92, 12:88 y 4:96 (571, 558, 334 c.a., respectivamente). Por lo anterior se puede inferir que las cápsulas de la proporción 16:84 fueron las que mayor cantidad de terpenos lograron atrapar. Sin embargo, solo se encontraron diferencias ($p \leq 0.05$) de las proporciones más altas con la de menor AR agregado. Estos resultados nos muestran que a pesar de que hubo una mayor recuperación en peso de cápsulas para la proporción más baja de AR: β CD, el contenido de volátiles atrapados fue mayor en las proporciones más altas de aceite adicionado.

Una posible inclusión máxima de AR en la β CD se dio en las proporciones 4:96 y 8:92, ya que no aumentó el porcentaje de recuperación (**cuadro 3**). El tamaño de las moléculas del AR es un factor importante en la encapsulación, Kayaci et al. (2013) comprobó que el tamaño y forma entre el anfitrión CD y el huésped (eugenol) es un importante factor para formar complejos de inclusión, ya que el eugenol no pudo ser encapsulado en cavidades pequeñas de α CD.

A pesar de que en la proporción 16:84 se detectó el valor más alto de volátiles no se encontró diferencia significativa con las proporciones intermedias. Estos resultados coinciden con los encontrados por Del Toro-Sánchez et al. (2010),

quienes alcanzaron el mayor contenido de volátiles en la proporción 16:84, pero la inclusión máxima de aceite de tomillo en β CD desde la proporción 8:92 en adelante. Un comportamiento similar se observó en la encapsulación de aceite de canela y ajo reportados por J Fernando Ayala-Zavala et al. (2008) donde la proporción 16:84 de aceite de canela en β CD mostró la mayor cantidad de eugenol, y la mayor cantidad de disulfuro de alilo del aceite de ajo se encontró en las proporciones 12:88 y 16:84, sin diferencia significativa. Además reportaron una inclusión máxima del disulfuro de alilo del ajo y el eugenol en la proporción 12:88, para ambos.

A pesar de que en este estudio no se realizó la identificación de los compuestos atrapados en las diferentes cápsulas se espera que el perfil de estos cambie en las diferentes proporciones evaluadas. Bhandari et al. (1999) analizaron los cambios en perfil de volátiles de aceite esencial de limón encapsulado en β CD, encontrando 10 volátiles mayoritarios de los cuales el sabineno, terpinoleno, linalool, y neral, no fueron afectados por el proceso de encapsulación. Sin embargo, se observó un efecto significativo del proceso de encapsulación sobre la proporción de α -pineno y limoneno, lo cual afectó la proporción de componentes totales en el aceite encapsulado. Por lo anterior podemos recomendar continuar con la identificación de terpenos del AR atrapados en las diferentes proporciones de β CD.

Cuadro 3. Recuperación de AR en las cápsulas a diferentes proporciones de β CD

Proporción (AR:βCD)	Peso inicial seco (g) AR:βCD	Peso final seco (g) AR:βCD	Recuperación %
4:96	10.42	9.18 \pm 0.12	88.09 ^{a*}
8:92	10.90	9.59 \pm 0.12	87.98 ^a
12:88	11.40	9.65 \pm 0.12	84.64 ^b
16:84	11.91	9.87 \pm 0.12	82.87 ^b

*Diferente literal entre renglones indica diferencia significativa ($p \leq 0.05$). Promedio de dos valores

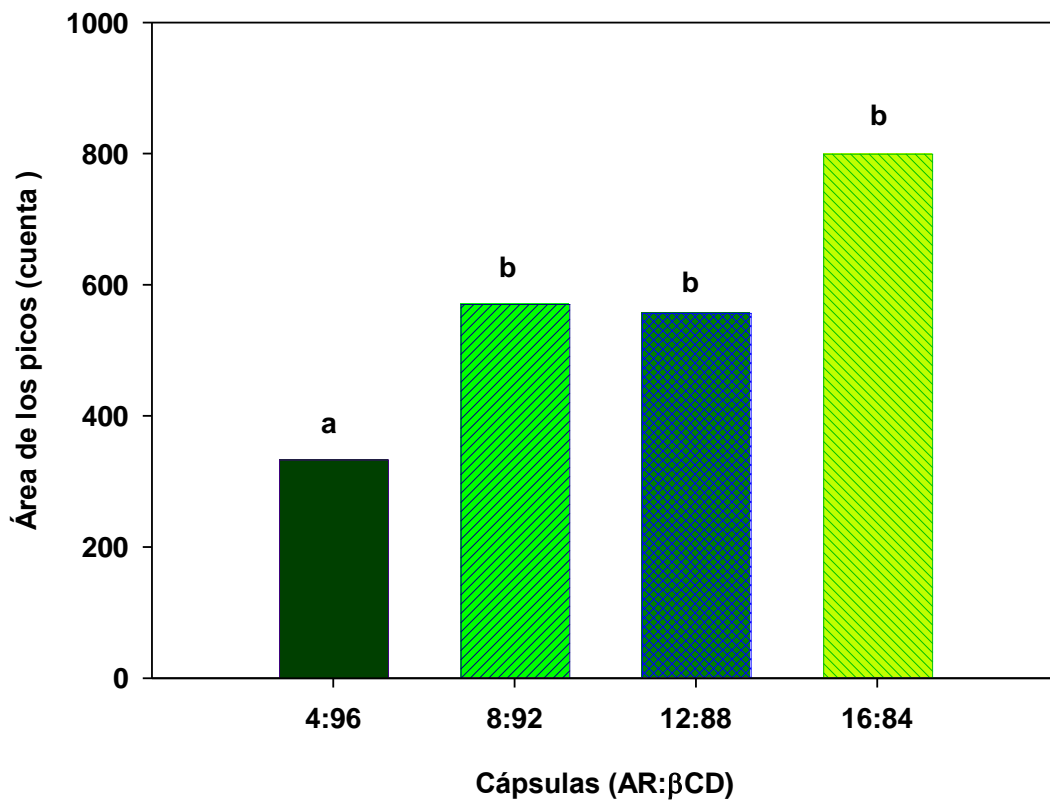


Figura 9. Cuenta de Terpenos identificados por CG-FID en las diferentes cápsulas probadas (AR:βCD).

Capacidad antimicrobiana de las cápsulas.

Se requirió una mayor concentración de cápsulas de las proporciones bajas de AR para inhibir el crecimiento microbiano en el siguiente orden: 4:96, 8:92, 12:88, 16:84 (143.75, 111.25; 105 y 105 mg/mL, respectivamente) (**cuadro 4**) Lo que supone que la proporción 4:96 fue la de menor efecto antimicrobiano. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ($p \geq 0.05$) entre proporciones, pero si entre microorganismos. Las bacterias requirieron mayores concentraciones de cápsulas ($p \leq 0.05$) 200 y 193 mg/mL (*S. Typhimurium* y *L. monocytogenes*, respectivamente) para alcanzar la CMI, comparado con las levaduras 28 y 42 mg/mL (*C. tropicalis* y *S. pastorianus*, respectivamente), sin haber diferencias entre ambas bacterias, ni entre ambas las levaduras. Debemos recordar que el aceite libre al igual que el encapsulado mostró un mayor poder antifúngico que antibacteriano.

Al igual que la CMI se requirió mayor cantidad de cápsulas de las proporciones con menor cantidad de AR para detener el crecimiento microbiano 4:96 (187.5 mg/mL); 12:88 y 16:84 (143.7 mg/mL, ambas); 8:92 (131 mg/mL), sin presentar diferencias significativas ($p \geq 0.05$) entre la CMB y la CMF (**cuadro 4**). El efecto de la CMB en los microorganismos si presentó diferencias significativas ($p \leq 0.05$), siendo las bacterias las que requirieron mayor concentración de cápsulas: *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes* 262 y 225 mg/mL, respectivamente. *C. tropicalis* y *S. pastorianus* 50 y 68 mg/mL, respectivamente, sin presentar diferencia significativa ($p \geq 0.05$) entre ambas bacterias, ni entre ambas levaduras.

Los resultados anteriores difieren de los publicados por Alfredo, Quispe-Condori, Quito-Vidal, and Beltrán-Cárdenas (2010) donde no se reportó

Cuadro 4. Concentración de cápsulas requerida para lograr efecto inhibitorio y bactericida/fungicida en las diferentes proporciones de (AR:βCD).

Proporción	microorganismo	CMI (mg/mL)	CMB/CMF (mg/mL)
4:96^a	<i>S. Typhimurium</i>	200 ^a	250 ^a
	<i>L. monocytogenes</i>	250 ^a	300 ^a
	<i>C. tropicalis</i>	25 ^b	50 ^b
	<i>S. pastorianus</i>	100 ^b	150 ^b
8:92^a	<i>S. Typhimurium</i>	200 ^a	250 ^a
	<i>L. monocytogenes</i>	200 ^a	200 ^a
	<i>C. tropicalis</i>	20 ^b	25 ^b
	<i>S. pastorianus</i>	25 ^b	50 ^b
12:88^a	<i>S. Typhimurium</i>	200 ^a	300 ^a
	<i>L. monocytogenes</i>	175 ^a	200 ^a
	<i>C. tropicalis</i>	20 ^b	25 ^b
	<i>S. pastorianus</i>	25 ^b	50 ^b
16:84^a	<i>S. Typhimurium</i>	200 ^a	250 ^a
	<i>L. monocytogenes</i>	150 ^a	200 ^a
	<i>C. tropicalis</i>	50 ^b	100 ^b
	<i>S. pastorianus</i>	20 ^b	25 ^b

*Diferente literal entre columna indica diferencia significativa a una $p \leq 0.05$.

actividad antifúngica (mohos y levaduras de la cascara de tomate) cuando se aplicó 25 mg cápsulas de aceite esencial de orégano en β CD (sin halo de inhibición). Por el contrario Del Toro-Sánchez et al. (2010) reportan que cápsulas de aceite de tomillo y β CD si tuvieron efecto sobre crecimiento micelial de *A. Alternata* con el 55.6% de inhibición a 5.0 mg/mL de cápsulas.

Espectroscopia de infrarrojo (IR) de las cápsulas.

Con el propósito de caracterizar las posibles interacciones moleculares que pueden tomar lugar entre los componentes del AR y la β CD se analizaron los espectros de infrarrojo del aceite libre, la β CD libre y la cápsula. El espectro obtenido del AR muestra una banda a $2925\text{-}2966\text{ cm}^{-1}$, la cual corresponde a los grupos alifáticos CH, CH₂, CH₃, aromáticos C–H en 3070 y una banda en 3461 atribuido a los grupos hidroxilo –O–H de sus componentes (**Fig.10**). Por otro lado, el espectro IR de la β CD muestra bandas características reportadas por otros estudios (Agudelo, 2012), donde se puede apreciar en 3394 cm^{-1} una banda ancha que corresponde al estiramiento –O–H, la banda cercana a 2923 cm^{-1} corresponde al estiramiento de los enlaces –C–H, y la banda 1643 cm^{-1} corresponde al modo de deformación del agua O–H–O contenida en la β CD (**fig.10**). Las bandas que se encuentran entre 1421 cm^{-1} y 1334 cm^{-1} corresponden a las tensiones –C–H dentro y fuera del plano de la estructura carbonada, las bandas entre 1160 cm^{-1} y 1029 cm^{-1} corresponden a las tensiones –C–O–C de los enlaces glucosídicos que conforman las uniones de las unidades de glucosa en el anillo; y la banda en 1081 cm^{-1} corresponde a la tensión –C–O–H de los hidroxilos que se encuentran en la β CD. Es importante

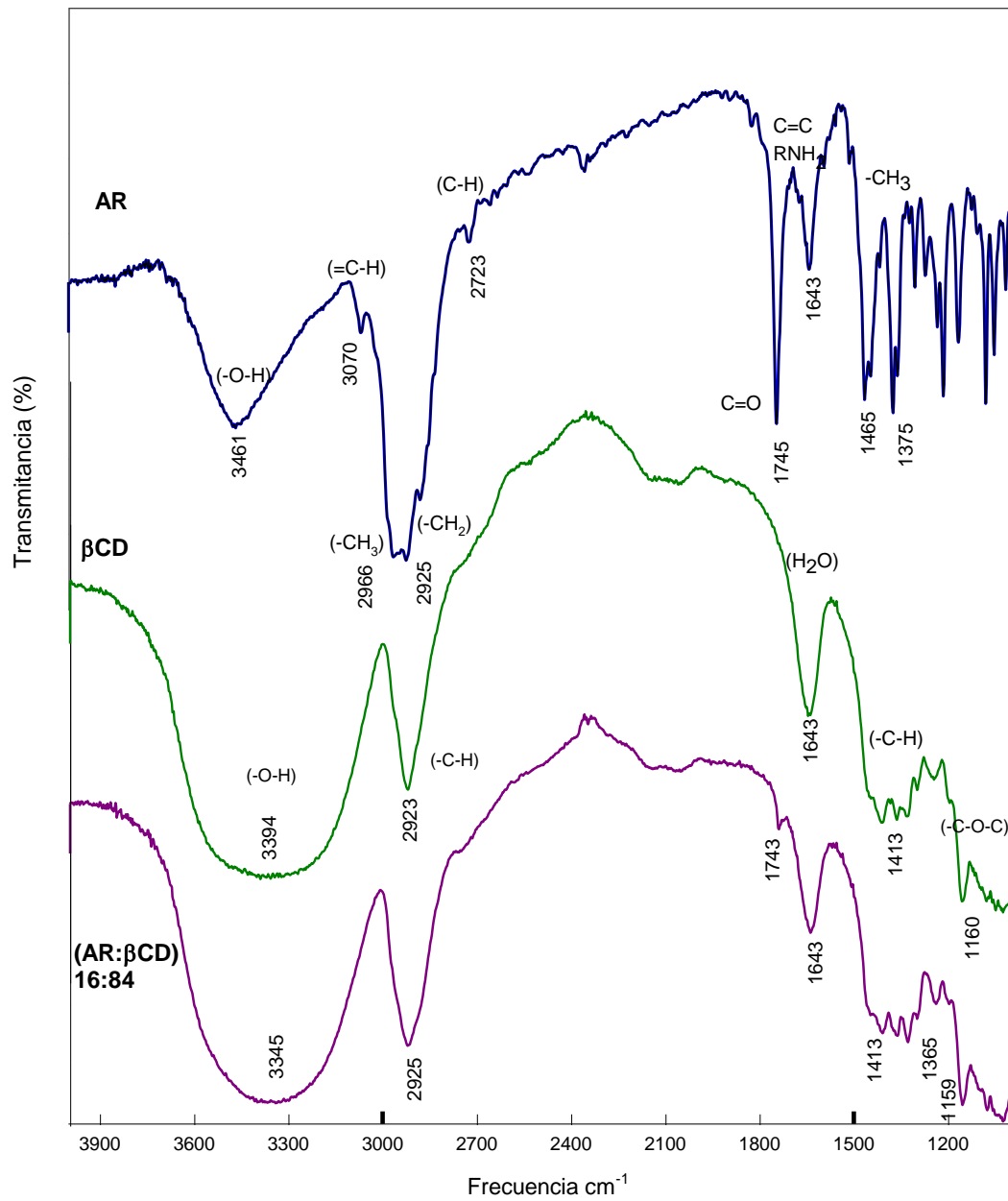


Figura 10. Espectro IR del AR, βCD y cápsula (16:84)

resaltar que las señales de mayor interés son las correspondientes a los grupos O-H en ambos componentes de la cápsula, es decir que cualquier cambio en la frecuencia y forma de la señal es indicativo de una interacción por puentes de hidrogeno.

Al analizar el espectro de la cápsula se observaron cambios en las señales características del AR, donde la banda a 3461 cm^{-1} desapareció al igual que las bandas 3070 cm^{-1} y 2966 cm^{-1} , las bandas de 2723 cm^{-1} y 2356 cm^{-1} la cuales fueron opacadas por el espectro de la β CD. Sin embargo la señal correspondiente a los grupos C=O de los constituyentes del AR aparecen en el espectro de la cápsula (**Fig.10**). Y el resultado que indica la formación de puentes de hidrogeno entre los terpenos del AR y la β CD al formar la cápsula, es el desfase batocrómico observado para la señal de los grupos O-H de 3394 a 3345 cm^{-1} , lo que da un desfase de 49 cm^{-1} . Lo anterior nos indica que ocurrieron interacciones moleculares por puentes de hidrogeno entre los grupos OH de la β CD y los compuestos bioactivos del AR (terpenos).

La teoría para explicar la formación de puentes de hidrogeno intermoleculares por medio del desfase de una banda característica, yace en la Ley de Planck. Primeramente, la aparición de la señal asignada por un enlace dado, en este caso enfoquemos la atención en el enlace O-H, se da por la vibración de los átomos participantes en tal unión al ser expuesto al haz de luz infrarroja, presentando una señal en el espectro a una frecuencia (ν) dada. Considerando lo anterior, la ley de Planck relaciona la energía vibración al del enlace causado por la incidencia del haz infrarrojo mediante la fórmula: $E=h\nu$, donde h es la constante de Planck ($6.62606896 \times 10^{-34}\text{ J s}$). por lo anterior al darse un desfase en la frecuencia de la señal de los grupos O-H de la β CD para encapsular a los componentes del AR hacia valores menores (ν_{OH} para la β CD pura = 3394 cm^{-1} , ν_{OH} para la β CD en la cápsula = 3345 cm^{-1}), se asume que el

O-H está siendo compartido mediante puentes de hidrogeno recordando la composición atómica de los constituyentes del AR encontramos la presencia de grupos hidroxilos los cuales son capaces de acoplarse con los OH de la β CD.

Resultados similares se observaron en la formación de cápsulas de aceites esenciales de ajo y tomillo. Donde se reportó el desfase en la frecuencia de ν_{OH} de 21 cm^{-1} y 18 cm^{-1} al encapsular aceite de ajo y tomillo, respectivamente; comparado con nuestro estudio que arrojó un desfase de 49 cm^{-1} al encapsular AR, este desfase mayor nos indica una interacción más fuerte de los componentes del AR con lo hidroxilos de la β CD, comparado con lo observado para el aceite de ajo y de tomillo. Este tipo de interacción es parte de los factores que podrían dar estabilidad a los terpenos en la cápsula de β CD

Análisis termogravimétrico (TGA) y calorimétrico (DSC) de las cápsulas.

La encapsulación ofreció protección al AR frente al proceso de evaporación causado por el incremento de temperatura (**fig.11**). Lo anterior los podemos observar al comparar la pérdida de masa del AR libre y del AR encapsulado, donde la pendiente en la pérdida de masa del AR libre es claramente más pronunciada comparado con la pendiente del AR encapsulado, muy similar a la pérdida de masa observada para la β CD pura. Se pudo observar una mayor pérdida de peso para la β CD pura comparada con la cápsula y esto puede atribuirse a la humedad presente en la muestra analizada.

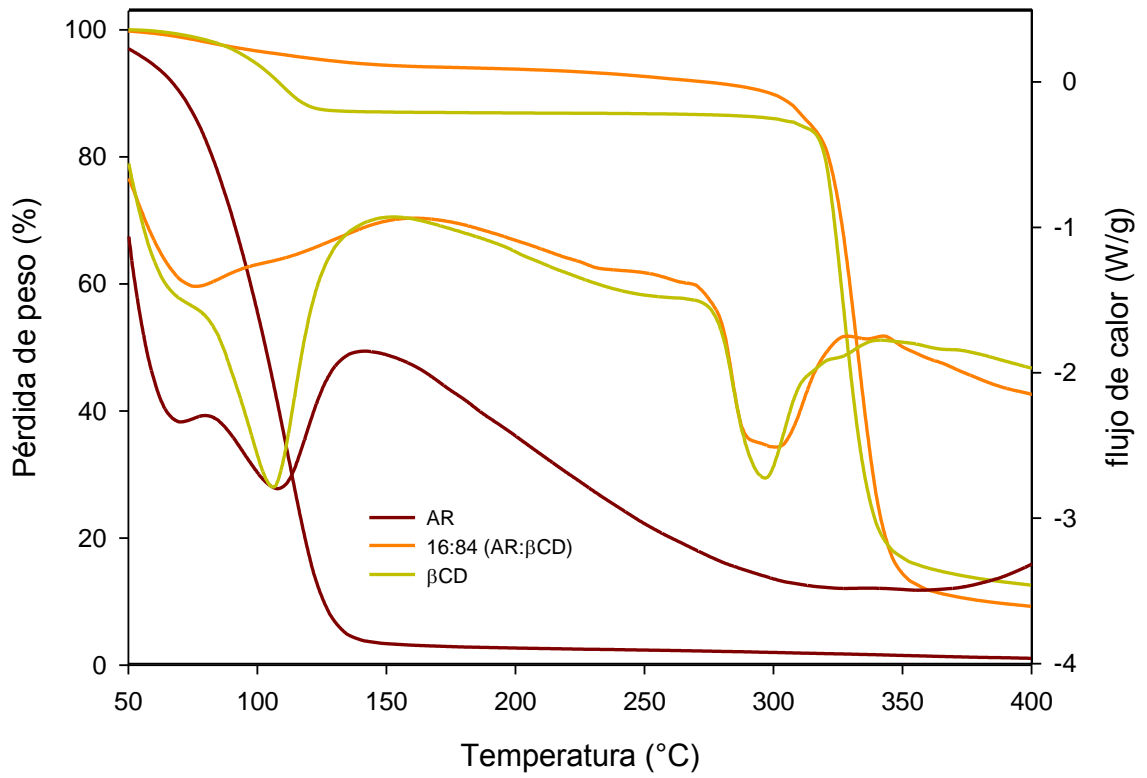


Figura 11. Análisis termogravimétrico (TGA) y calorimétrico (DSC) del AR, βCD y 16:84 (AR:βCD).

La DSC demostró que el pico endotérmico debido a la evaporación del AR libre alrededor de los 73°C, desapareció casi por completo en los termogramas de las cápsulas (**fig.11**). Lo anterior confirmó que efectivamente se protegió a los terpenos volátiles del efecto de la temperatura. La β CD pura presentó dos picos endotérmicos, el primero alrededor de los 100°C (atribuido a la evaporación del agua presente en la muestra), y el segundo a los 328°C (atribuido a la descomposición de la molécula por fusión térmica). Como se pudo observar la única señal observada en el DSC de las cápsulas es la fusión de la β CD , lo que nos permite hipotetizar que incluso hasta esa temperatura puedan estar presentes aun los terpenos del AR.

VIII. CONCLUSIÓN ETAPA 2

Se logró la inclusión del aceite de romero AR en la matriz de β CD formando el complejo (AR- β CD). Se evidenció que la encapsulación controla la naturaleza volátil de los terpenos del AR; ya que su estabilidad se mantuvo ante aumento de temperaturas por encima de su punto de evaporación. La encapsulación en la β CD demostró además mantener la capacidad antimicrobiana del AR, evidenciando que la cápsula AR: β CD es una opción para conservar la inocuidad de alimentos y otros productos.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Agudelo, J. I. D. (2012). *Preparación y caracterización de compuestos de asociación y/o inclusión entre β -ciclodextrina y compuestos de coordinación de rodio (III) y níquel (II) y su actividad biológica*. Magister en Ciencias-Química, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Ait-Ouazzou, A., Espina, L., García-Gonzalo, D., & Pagán, R. (2013). Synergistic combination of physical treatments and carvacrol for *Escherichia coli* O157:H7 inactivation in apple, mango, orange, and tomato juices. *Food Control*, 32(1), 159-167. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.036>
- Albarracín H, W., Alfonso A, C., & Sánchez B, I. C. (2012). Aplicación de aceites esenciales como conservantes para mejorar el tiempo de vida útil en tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*). *Vitae (Medellín)*, 19(1), 34-40.
- Alfredo, M.-C., Quispe-Condori, S., Quito-Vidal, M. R., & Beltrán-Cárdenas, S. K. (2010). *Ciencia y Tecnología de Alimentos*.
- Ayala-Zavala, J. F., Gonzalez-Aguilar, G. A., Alvarez-Parrilla, E., De la rosa, L. A., & Vega-Vega, V. (2012). Encapsulación de antioxidantes en la industria de alimentos. In G.-A. Álvarez-Parrilla, De la Rosa, Ayala-Zavala, U. A. d. C. Juárez & C. d. I. e. A. y. D. A.C. (Eds.), *Antioxidantes En Alimentos y Salud* (pp. 527-552). México: Clave editorial.
- Ayala-Zavala, J. F., Oms-Oliu, G., Odriozola-Serrano, I., González-Aguilar, G. A., Álvarez-Parrilla, E., & Martín-Belloso, O. (2008). Bio-preservation of fresh-cut tomatoes using natural antimicrobials. *European Food Research and Technology*, 226(5), 1047-1055.
- Baleta, L. C., & Duran, D. (2010). Efecto del masajeado con CaCl₂ y aceite de romero sobre la terneza y la actividad bacteriana del corte de carne tipo churrasco Argentino. @ *limentech, Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 9(1).
- Bhandari, B. R., D'Arcy, B. R., & Bich, L. L. T. (1998). Lemon oil to beta-cyclodextrin ratio effect on the inclusion efficiency of beta-cyclodextrin and the retention of oil volatiles in the complex. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(4), 1494-1499. doi: 10.1021/jf970605n

- Bhandari, B. R., D'Arcy, B. R., & Padukka, I. (1999). Encapsulation of lemon oil by paste method using beta-cyclodextrin: Encapsulation efficiency and profile of oil volatiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(12), 5194-5197. doi: 10.1021/jf9902503
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.
- Camelo, A. F. L. (2003). *Manual para la preparación y venta de frutas y hortalizas, del campo al mercado*. Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación Retrieved from <http://www.fao.org/docrep/006/y4893s/y4893s00.htm#Contents>.
- Caroline Smith DeWaal, J. D., & Susan Vaughn Grooters, M. P. H. (2013). *Antibiotic Resistance In Foodborne Pathogens*. Washington, DC: CSPI.
- Castaño P, H. I., Ciro G, G., Zapata M, J. E., & Jiménez R, S. L. (2010). Actividad bactericida del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis* L. sobre algunas bacterias de interés alimentario. *Vitae*, 17, 149-154.
- Centers for Disease Control and Prevention , C. (2014). CDC and Food Safety. *CDC 24/7: Saving lives. protecting people* Retrieved 22-may, 2014, from <http://www.cdc.gov/foodsafety/cdc-and-food-safety.html>
- Coy Barrera, C. A., & Eunice Acosta, G. (2013). Actividad antibacteriana y determinación de la composición química de los aceites esenciales de romero (*Rosmarinus officinalis*), tomillo (*Thymus vulgaris*) y cúrcuma (*Curcuma longa*) de Colombia. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(2), 237-246.
- CSPI, C. f. s. i. t. p. i. (2014). *Outbreak alert 2014, A review of foodborne illness in America from 2002-2011*. Washington, DC 20005: Center for Science in the Public Interest;
- Chalchat, J. C., Michet, A., & Pasquier, B. (1998). Study of clones of *Salvia officinalis* L. Yields and chemical composition of essential oil. *Flavour and Fragrance Journal*, 13(1), 68-70. doi: 10.1002/(sici)1099-1026(199801/02)13:1<68::aid-ffj698>3.0.co;2-8
- Daferera, D. J., Ziogas, B. N., & Polissiou, M. G. (2000). GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on

Penicillium digitatum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6), 2576-2581.

de Sousa, J. P., de Azerêdo, G. A., de Araújo Torres, R., da Silva Vasconcelos, M. A., da Conceição, M. L., & de Souza, E. L. (2012). Synergies of carvacrol and 1, 8-cineole to inhibit bacteria associated with minimally processed vegetables. *International journal of food microbiology*, 154(3), 145-151.

Del Toro-Sánchez, C. L., Ayala-Zavala, J. F., Machi, L., Santacruz, H., Villegas-Ochoa, M. A., Alvarez-Parrilla, E., & González-Aguilar, G. A. (2010). Controlled release of antifungal volatiles of thyme essential oil from β -cyclodextrin capsules. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 67(3-4), 431-441. doi: 10.1007/s10847-009-9726-3

Del Valle, E. M. (2004). Cyclodextrins and their uses: a review. *Process biochemistry*, 39(9), 1033-1046.

Desnos-Ollivier, M., Bretagne, S., Bernède, C., Robert, V., Raoux, D., Chachaty, E., . . . Group, Y. (2008). Clonal population of flucytosine-resistant *Candida tropicalis* from blood cultures, Paris, France. *Emerging infectious diseases*, 14(4), 557.

Dorman, H. J. D., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2), 308-316. doi: 10.1046/j.1365-2672.2000.00969.x

Espinosa, B., & Hernández, G. (2005). Formación, evaluación y caracterización del complejo de inclusión piroxicam/hidroxipropil- β -ciclodextrina. *Trabajo*, 36(1).

FDA, F. a. D. A. (2013). *CFR - Code of Federal Regulations*. U.S.A: U.S.A.gob Retrieved from <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?fr=173.315>.

Gallucci, M., Oliva, M., Casero, C., Dambolena, J., Luna, A., Zygadlo, J., & Demo, M. (2009). Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. *Flavour and fragrance journal*, 24(6), 348-354.

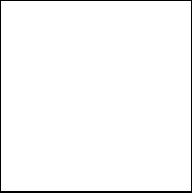
Gastélum Franco, M. G., Paredes Aguilar, M. d. I. C., Silva Vázquez, R., Castaño Tostado, E., Figueroa Cárdenas, J. d. D., Martínez Peniche, R.

- Á., . . . Taba, S. (2007). Efecto antimicrobiano del orégano mexicano (*Lippia berlandieri* Schauer) y de su aceite esencial sobre cinco especies del género *Vibrio*. *Revista Fitotecnia Mexicana*.
- Hitchins, A. D., & Jinneman, K. (April 2011). Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* Bacteriological Analytical Manual (BAM): Food and Drug Administration. Retrieved from <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm2006949.htm>.
- Jiménez Edeza, M., & Chaidez Quiroz, C. (2013). *La inocuidad de los alimentos en México* SAGARPA-SEDESOL-INSP-FAO, 2013.
- Kayaci, F., Ertas, Y., & Uyar, T. (2013). Enhanced Thermal Stability of Eugenol by Cyclodextrin Inclusion Complex Encapsulated in Electrospun Polymeric Nanofibers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. doi: 10.1021/jf402923c
- Kopper, G., Calderón, G., Schneider, S., Domínguez, W., Gutiérrez, G., Rosell, C., & Mejía, D. (2009). Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico.
- Kosalec, I., Pepeljnjak, S., & Kustrak, D. (2005). Antifungal activity of fluid extract and essential oil from anise fruits (*Pimpinella anisum* L., Apiaceae). *ACTA PHARMACEUTICA-ZAGREB*-, 55(4), 377.
- Lezama, L. F. H. (1999). *Problemas relativos a la calidad e inocuidad de los alimentos y su repercusión en el comercio*. (ISSN 1014-806X). FNA/ANA Retrieved from <http://www.fao.org/waicent/faoinfo/economic/esn/nutri.htm>.
- Madene, A., Jacquot, M., Scher, J., & Desobry, S. (2006). Flavour encapsulation and controlled release—a review. *International journal of food science & technology*, 41(1), 1-21.
- Maguna, F. P., Nuñez, M. B., Okulik, N. B., & Castro, E. A. (2005). Relación entre la estructura molecular de terpenoides y su actividad antimicótica sobre *Candida albicans*. *Universidad Nacional del Nordeste Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*, E-057.
- Maguna, F. P., Romero, A. M., Garro, O. A., & Okulik, N. B. (2006). Actividad Antimicrobiana de un grupo de Terpenoides. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas en Internet. Argentina: Facultad de Agroindustrias*.

- Mangena, T., & Muyima, N. (1999). Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of *Artemisia afra*, *Pteronia incana* and *Rosmarinus officinalis* on selected bacteria and yeast strains. *Letters in applied microbiology*, 28(4), 291-296.
- Marques, H. M. C. (2010). A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. *Flavour and Fragrance Journal*, 25(5), 313-326. doi: 10.1002/ffj.2019
- Martínez-Romero, D., Guillén, F., Valverde, J. M., Bailén, G., Zapata, P., Serrano, M., . . . Valero, D. (2007). Influence of carvacrol on survival of *Botrytis cinerea* inoculated in table grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 115(2), 144-148. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.015>
- Martínez, G., & Gómez, M. A. (2007). CICLODEXTRINAS: COMPLEJOS DE INCLUSIÓN CON POLÍMEROS. *Revista Iberoamericana de Polímeros, Volumen 8(4)*, 300-312.
- Martins, P., Sbaite, P., Benites, C., & Maciel, M. (2011). Thermal characterization of orange, lemongrass, and basil essential oils. *CHEMICAL ENGINEERING*, 24.
- Montemayor, L. D., & Gamero, B. H. d. (1962). Parte II Estudio de Especímenes de Micología General. *Mycopathologia et mycologia applicata*, 18(1-2), 63-83. doi: 10.1007/bf02055145
- Necha, L. L. B., & Barrera, L. J. G. (2009). Actividad antifúngica de aceites esenciales y sus compuestos sobre el crecimiento de *Fusarium* sp. aislado de papaya (Carica papaya).
- Olmedo, R. H., Nepote, V., & Grosso, N. R. (2013). Preservation of sensory and chemical properties in flavoured cheese prepared with cream cheese base using oregano and rosemary essential oils. *LWT - Food Science and Technology*, 53(2), 409-417. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2013.04.007>
- Organizacion Mundial de la Salud, O. (2012). Resistencia a los antimicrobianos (RAM). *centro de prensa* Retrieved 24-05, 2014, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>
- Ortega-Ramirez, L. A. (2013). *Sinergismo Antibacteriano entre Compuestos Terpénicos de Cymbopogon citratus y Azufrados de Allium cepa.*

Maestría en Ciencias, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Hermosillo, Sonora.

- Raybaudi-Massilia, R. M., Mosqueda-Melgar, J., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2009). Control of Pathogenic and Spoilage Microorganisms in Fresh-cut Fruits and Fruit Juices by Traditional and Alternative Natural Antimicrobials. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 8(3), 157-180.
- Rodriguez-García, I. (2013). *Aceite esencial de Orégano Adicionado a Recubrimientos de Pectina como Tratamiento Antifúngico, Antioxidante y Saborizante en Frutos de Tomate*. Maestría en Ciencias, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Hermosillo, Sonora.
- Roller, S., & Seedhar, P. (2002). Carvacrol and cinnamic acid inhibit microbial growth in fresh-cut melon and kiwifruit at 4° and 8°C. *Letters in Applied Microbiology*, 35(5), 390-394. doi: 10.1046/j.1472-765X.2002.01209.x
- Romeu, C. R., Ferret, E. B., & Finalé, Y. D. (2007). Caracterización fitoquímica del aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) y evaluación in vitro de su actividad acaricida. *Fitosanidad*, 11(2), 75-78.
- Solano Cornejo, M. Á. (2013). Modelamiento de la cinética de desinfección superficial de tomates (*Lycopersicum esculentum*) frescos usando soluciones de cloro. *Scientia Agropecuaria*, 4(1), 27-35.
- Vaillant Flores, D., Romeu Carballo, C., Ramos Ramos, E., González García, M., Ramírez Ochoa, R., & González Pentón, J. (2009). Efecto inhibitorio in vitro de cinco monoterpenos de aceites esenciales sobre un aislado de *Rhizoctonia solani* en papa (*Solanum tuberosum* L.). *Fitosanidad*, 13, 197-200.
- Verma, M., Anand, R., Shawl, A., Kitchlu, S., Shahi, A., Chandra, S., . . . Khajuria, R. (2012). Variation in the Composition of the Essential Oils of *Rosmarinus officinalis* L. Grown in Sub-Tropical Region of Jammu and Temperate Region of Kashmir, India. *Asian Journal of Chemistry*, 24(6).
- Yeh, H.-F., Luo, C.-Y., Lin, C.-Y., Cheng, S.-S., Hsu, Y.-R., & Chang, S.-T. (2013). Methods for Thermal Stability Enhancement of Leaf Essential Oils and Their Main Constituents from Indigenous Cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. doi: 10.1021/jf401536y

- 
- Yesil-Celiktas, O., Sevimli, C., Bedir, E., & Vardar-Sukan, F. (2010). Inhibitory Effects of Rosemary Extracts, Carnosic Acid and Rosmarinic Acid on the Growth of Various Human Cancer Cell Lines. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65(2), 158-163. doi: 10.1007/s11130-010-0166-4
- Zu, G., Zhang, R., Yang, L., Ma, C., Zu, Y., Wang, W., & Zhao, C. (2012). Ultrasound-Assisted Extraction of Carnosic Acid and Rosmarinic Acid Using Ionic Liquid Solution from *Rosmarinus officinalis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(9), 11027-11043.