

## 6 MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Materias primas

Para efectos del presente trabajo se empleó como materia hojas de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) seco, procedente de Tequismanalco (Puebla), adquirido en el Mercado de Cholula; y leche de vaca adquirida en la ex-hacienda San Martinito, Puebla.

### 6.2 Métodos

#### 6.2.1 Extracción de aceite esencial de romero

Para la extracción del aceite esencial de romero se utilizó el sistema de destilación por arrastre de vapor de la UDLAP. El proceso se llevó a cabo de acuerdo a la metodología de Martínez (2008). Como primer paso, se llenó con agua destilada el recipiente inferior, en contacto con la parrilla, hasta 2/3 de su capacidad y se añadieron perlas de ebullición. A continuación, se colocó el romero seco en el frasco de vidrio superior del equipo, el cual se recubrió con una tela de asbesto, que hace las veces de aislante, para lograr un mejor calentamiento. Antes de comenzar la destilación, se puso a funcionar el sistema de refrigeración para enfriar el agua dentro del condensador a una

temperatura aproximada de 4 °C. Posteriormente, se encendió la parrilla de calentamiento asegurando que el recipiente inferior siempre tuviera la cantidad suficiente de agua en ebullición.

Durante la destilación, los vapores generados suben hasta la cabeza del destilador para luego enfriarse en el condensador. El extracto se acumula en el auto-separador donde se pueden observar la fase acuosa y oleaginosa en su separación.



**Fig. 9. Sistema de extracción por arrastre de vapor**



**Fig. 10. Autoseparador**

Una vez concluido el proceso (3 h), se apaga el equipo y se deja enfriar. El agua es liberada por diferencia de densidades por medio de la válvula y el aceite esencial se recolecta en un frasco de vidrio.

## 6.2.2 Evaluación de las características físicas del aceite esencial de romero

### 6.2.2.1 *Índice de refracción*

La medición del índice de refracción se realizó utilizando un refractómetro Abbe (ATAGO, Japón) de acuerdo a lo propuesto por Stirton (1964).

### 6.2.2.2 *Densidad*

Para determinar la densidad ( $\rho$ ) del aceite esencial de romero, se usó un matraz aforado de 2 mL que fue llenado con el aceite y colocado en un baño con agua destilada a 25 °C por 15 min. Mediante la ecuación 5.1, utilizada por Martínez (2008), se obtuvo dicho valor.

$$\rho = \frac{m}{v} \quad (5.1)$$

Donde,  $m$  es la masa del aceite esencial y  $v$  es el volumen del matraz (constante).

### *6.2.2.3 Color*

El color del aceite esencial de romero se evaluó con el modo de transmitancia, utilizando un colorímetro (Gardner-Color, Gardner System 05, Alemania). El equipo se calibró empleando una placa negra y una blanca para, posteriormente, obtener las coordenadas de color Hunter L, a y b (Kramer y Twigg, 1973).

## 6.2.3 Evaluación de las características físicas del polvo de romero

El polvo de romero se obtuvo por medio de una trituración simple, utilizando una licuadora.

### *6.2.3.1 Humedad*

La humedad del romero seco se determinó por diferencia de pesos en secado, de acuerdo a lo establecido por la AOAC (2000), método 934,06.

### *6.2.3.2 Tamaño de partícula*

La determinación del tamaño de partícula del polvo de romero se realizó utilizando un tamizador de agitación automática (Sieve Shaker Kit, KECK, EE.UU.), con el cual se estableció el peso que ocupa la muestra en cada sección de los tamices

respecto a un peso total inicial de la muestra (18 g aproximadamente). En la Tabla VIII se muestran los números de tamices utilizados y sus aperturas de malla correspondientes.

**Tabla VIII. Dimensiones de los tamices utilizados**

No. Tamiz	Apertura de malla
20	841 $\mu\text{m}$
35	500 $\mu\text{m}$
50	297 $\mu\text{m}$
80	177 $\mu\text{m}$

La muestra se agitó durante 5 min de tal forma que al final se notará una distribución homogénea al centro y mínima en los extremos. A partir de esta información se realizaron las curvas de distribución granulométrica para determinar el diámetro mediano,  $d_{50}$ , que describe la dispersión del diámetro de la muestra (Jiménez, 2007).

#### 6.2.4 Cuantificación de los compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos totales se determinaron utilizando el método de Folin-Ciocalteu de acuerdo a Singleton y Rossi (1965). La mezcla de ácido fosfowolfrámico y fosfomolibdico, de coloración amarilla, representan el reactivo de Folin-Ciocalteu.

Dichos compuestos se reducen al interactuar con los compuestos fenólicos originando óxido de wolframio y molibdeno, de color azul, los cuales exhiben una amplia absorción de luz, con máximo a 765 nm. La intensidad de la absorción de luz a esa longitud de onda es proporcional a la concentración de los compuestos fenólicos.

#### *6.2.4.1 Determinación en aceite esencial de romero*

Se añaden 2 mL de agua destilada y 100 µL de aceite esencial de romero en tubo de ensaye y luego se adiciona 200 µL de reactivo de Foli-Ciocalteau. Una vez mezclados y después de 3 min, se incorpora 1 mL de carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) al 20%.

Transcurridos 60 min, se mide la absorbancia a 765 nm usando un espectrofotómetro visible (Varian Cary 100 Conc., E.U.A.). Para preparar el blanco, se seguirá el procedimiento descrito anteriormente, con excepción de la adición de la muestra.

#### *6.2.4.2 Determinación en polvo de romero*

Para la obtención de los extractos acuosos se siguió la metodología propuesta por Ersus y Yurdagel (2006) utilizando los siguientes sistemas extractantes: agua, etanol al 96% - agua (relación 50:50 y 70:30 v/v)) y etanol al 96% - ácido clorhídrico 1.5 N (85:15 v/v).

Para los extractos de polvo de romero, se colocó 0,1 g de polvo de romero en un matraz volumétrico de 25 mL y se aforó con el agente extractante. La mezcla se transfirió a un vaso de precipitados y se mantuvo en agitación, a temperatura ambiente, por 2 h. Posteriormente, se filtró en un embudo Büchner a través de papel Whatman No. 1. El extracto obtenido se colocó en tubos de ensaye forrados con papel aluminio y se almacenó en refrigeración durante 1 día.

Para realizar la cuantificación en el romero en polvo se prosiguió con la metodología ya mencionada (sección 6.2.4.1)

#### *6.2.4.3 Determinación en queso fresco*

Para los extractos de queso fresco, se colocaron 5 g de queso fresco triturado en el matraz volumétrico de 25 mL y se prosiguió de la misma manera que para la obtención de polvo de romero, con la diferencia de que el filtrado se llevó a cabo utilizando tela de manta.

La determinación de los compuestos fenólicos totales en el queso fresco se realizó de acuerdo a la metodología descrita en la sección 6.2.4.1.

#### *6.2.4.4 Curva estándar*

Se utilizó ácido gálico como referencia para poder cuantificar el contenido de compuestos fenólicos totales en el extracto. La curva estándar de ácido gálico se realizó midiendo la absorbancia a 765 nm en un rango de 0-0,33 mg/mL, de acuerdo a la metodología establecida en la sección 6.2.4.1. Los resultados fueron expresados como mg de ácido gálico/100 mL de extracto.

Posteriormente, se elaboró una grafica con los resultados obtenidos, en donde la concentración final de ácido gálico se ubica en el eje de las abscisas y la absorbancia resultante está en el eje de las ordenadas. A partir de dicha gráfica se realizó una regresión lineal, la cual permite calcular el contenido de compuestos fenólicos totales en las muestras.

#### *6.2.4.5 Cálculos*

El valor obtenido de absorbancia para cada muestra evaluada, se sustituyó en la ecuación de la curva estándar de ácido gálico para obtener la concentración de compuestos fenólicos totales en equivalentes de ácido gálico.

En el Apéndice A se encuentra un ejemplo de cálculo de la concentración de compuestos fenólicos totales, en el aceite esencial de romero y en los extractos de polvo de romero y quesos.



### 6.2.5 Medición de la capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante se determinó utilizando el método ABTS desarrollado por Re *et al.* (1999) y modificado por Kuskoski *et al.* (2004). La metodología descrita por este autor, se basa en la medición de la capacidad de la muestra, de captar a los radicales de naturaleza cromógena ABTS•+ (ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazonil)-6-sulfónico) mediante la pérdida de color. La pérdida de color es proporcional a la capacidad antioxidante de la muestra.

#### 6.2.5.1 *Obtención del radical ABTS•+*

La formación del radical se llevó a cabo por medio de la reacción de 0,0033 g de persulfato de potasio con 0,0194 g de ABTS. Los reactivos se colocan en un frasco y se les añaden 4 mL de agua destilada. Se agita la mezcla y se cubre el frasco con papel aluminio, dejándolo reposar en la oscuridad y a temperatura ambiente por 16 horas.

#### 6.2.5.2 *Determinación en aceite esencial de romero*

Se realizó una dilución inicial etanol al 96% - aceite esencial de romero en proporción 13:1 v/v. Por otro lado, se diluyen 100 µl de radical ABTS•+ por cada 11 mL de etanol absoluto hasta obtener una absorbancia (A) de  $0.70 \pm 0.02$  a 754 nm ( $A_{\text{inicial}}$ ). En seguida, se mezclan, en una celda de cuarzo, 3980 µl de la solución radical (ABTS•+ con etanol) y

20µl de la solución de aceite esencial de romero diluido en etanol (1:13 v/v) para medir la absorbancia después de concluida la reacción (7 min) en un espectrofotómetro UV-Visible (Varian Cary 100 Conc., E.U.A.) a 754 nm ( $A_{final}$ ).

#### *6.2.5.3 Determinación en polvo de romero*

Para la determinación en el romero en polvo, se utilizaron los extractos acuosos obtenidos para la cuantificación de compuestos fenólicos y se prosiguió con la metodología descrita en la sección 6.2.3.2, con la excepción de que no se realizó ninguna dilución a los extractos.

#### *6.2.5.4 Determinación en queso fresco*

Para la determinación en el romero en polvo, se utilizaron los extractos acuosos obtenidos para la cuantificación de compuestos fenólicos y se prosiguió con la metodología descrita en la sección 6.2.3.2, con la excepción de que no se realizó ninguna dilución a los extractos.

#### 6.2.5.5 Curva estándar

Para conocer la capacidad antioxidante de la muestra, se empleó un antioxidante sintético de referencia conocido como Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico). Para ello, se realizó una curva estándar de Trolox en un rango de 0-0,2 mg/mL, midiéndose la absorbancia de este rango a 754 nm siguiendo la metodología descrita en la sección 6.2.3.2. Los resultados fueron expresados como mg de Trolox/100 mL de extracto.

Posteriormente, se elaboró una gráfica, con los resultados obtenidos, en donde la concentración final de Trolox se ubica en el eje de las abscisas y el porcentaje de inhibición resultante está en el eje de las ordenadas. Con la gráfica obtenida, se realizó una regresión lineal que permite llevar a cabo el cálculo de la capacidad antioxidante de la muestra.

#### 6.2.5.6 Cálculos

El porcentaje de inhibición del radical se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{Abs_{inicial} - Abs_{final}}{Abs_{inicial}} \times 100 \quad (5.3)$$

El porcentaje de inhibición obtenido se sustituyó en la ecuación de la curva estándar del antioxidante de referencia, Trolox.

En el Apéndice B se encuentra un ejemplo de cálculo de la concentración de compuestos fenólicos totales, en el aceite esencial y en los extractos de polvo y queso.

#### 6.2.6 Elaboración de queso fresco

El queso fresco blanco se elaborará de acuerdo al procedimiento propuesto por Ortiz de Montellano (2010) y se describe a continuación:

- a) **Pasterización de la leche.** Se pasterizó la leche de vaca en un pasterizador de tipo lento (Vigusa, México) a 82 °C por 10 min y se dejó enfriar hasta alcanzar los 38 °C aproximadamente.
- b) **Adición del cuajo.** Una vez alcanzados 38 °C, se adicionó 1 mL de cuajo por cada litro de leche, a lo largo de todo el recipiente, sin dejar de remover la materia. Después de la adición, se dejó reposar la leche por 40 min.
- c) **Cortado.** Se cortó la cuajada, con liras, en cubos de aproximadamente un 1 cm de lado y se dejó reposar por 30 min aproximadamente, a temperatura ambiente.
- d) **Desuerado.** El suero se escurrió utilizando en un colador y añadiendo agua tibia (40 °C aproximadamente), mientras se movía la cuajada, para facilitar y agilizar el proceso. Durante esta etapa se expulsó la mayor parte del suero posible, para evitar que en etapas posteriores el suero arrastrara compuestos de interés.

- e) **Adición del aceite/polvo de romero.** Para el queso preparado con aceite esencial, se agregaron 0,025 mL de aceite esencial de romero por cada 1000 g de cuajada; mientras que para el queso preparado con polvo, se adicionaron 0,2g de polvo de romero por cada 1000 g de cuajada. Ambas cuajadas se mezclaron perfectamente de forma manual.
- f) **Moldeado.** La cuaja se introdujo en moldes redondos de PVC de 100g de queso prensado.
- g) **Prensado.** Los quesos se prensaron con una prensa tipo holandés (Vigusa, México) durante 24 horas, a temperatura ambiente. Durante esta operación el desuerado fue mínimo, sin embargo se llevó acabo para mantener la forma y compactación de los quesos.
- h) **Salado superficial.** Después de desmoldados, se agregaron 5 g de sal, aproximadamente, por cada pieza de queso y se dejó absorber por 14 h. La cantidad de sal no absorbida fue removida de los quesos.
- i) **Empacado.** Los quesos se empacaron al vacío utilizando bolsas “pouch” para vacío de polietileno.

### 6.2.7 Almacenamiento del queso fresco

El queso fresco se almacenó en refrigeración a 4 °C durante 5, 10, 15 y 20 días para realizar la evaluación de sus características físicas, microbiológicas, antioxidantes y sensoriales.

### 6.2.8 Evaluación de las características físicas del queso fresco

#### 6.2.8.1 *Textura*

Se midieron cubos de aproximadamente 1 cm de lado, con ayuda de un Vernier, y se les determinó el parámetro de textura utilizando un texturómetro TA.XT2 Texture Analyzer (Texture Technologies Corporation, E.U.A.). El análisis de textura por compresión requirió de un émbolo cilíndrico de aluminio de 3.6 mm de diámetro, la velocidad programada fue de 1 mm/s y la distancia recorrida fue del 25% del total del espesor de las muestras.

#### 6.2.8.2 *Color*

El color se medirá por reflectancia mediante el colorímetro Gardner-Color (Gardner System 05, Alemania). Con los parámetros colorimétricos obtenidos, se evaluará la diferencia de color neta ( $\Delta E$ ) mediante la siguiente ecuación:

$$\Delta = \sqrt{(L - L_0)^2 + (a - a_0)^2 + (b - b_0)^2} \quad (5.4)$$

Donde L, a y b son valores al tiempo t y L<sub>0</sub>, a<sub>0</sub> y b<sub>0</sub> son valores al tiempo 0 (Kramer y Twigg, 1973).

### 6.2.8.3 Humedad

Se determinó secando la muestra en una estufa al vacío (100 mmHg) a 100 °C y por diferencia de pesos, de acuerdo al método 926.08 (AOAC, 2000).

## 6.2.9 Evaluación del contenido microbiano del queso fresco

### 6.2.9.1 Bacterias mesófilas aeróbicas

La evaluación del contenido de bacterias mesófilas aeróbicas se realizó por siembra en profundidad, utilizando agar nutritivo. Los cultivos se incubaron por 24 h a 37 °C.

### 6.2.9.2 Mohos y Levaduras

La evaluación del contenido de hongos se realizó por siembra en profundidad, utilizando agar DRBC (agar base: Rosa de Bengala). Los cultivos se incubaron a 25 °C durante 5 días.

#### 6.2.10 Evaluación sensorial del queso fresco

Se realizaron pruebas sensoriales afectivas a los 0, 10 y 20 días de almacenamiento para identificar el nivel de agrado de los quesos adicionados y control, utilizando una escala hedónica de 9 puntos, donde 9 corresponde a “me gusta muchísimo” y 1, a “me disgusta muchísimo”, con un grupo de 20 jueces no entrenados. Los parámetros evaluados fueron: apariencia, color, textura, olor, textura al degustar, sabor, aceptación textura en general y aceptación en general.

#### 6.2.11 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron por medio de Análisis de Varianza y Pruebas de Tukey, utilizando el software Minitab 14.