



## CAPÍTULO IV

---

### 6. MATERIALES Y METODOS

#### 6.1. Materia prima

- Puré de manzana mínimamente procesado marca Santa Clara.
- Canela ( Cinnamoun cyminum), vainillina ( Sigma Chemical, Co, St. Luis, MO) y sorbato de potasio ( Sigma Chemical, Co, St. Luis, MO)

#### 6.2. Preparación de los extractos

Pesar 5 g. de Sorbato de Potasio, el cual será aforado con 100ml de agua destilada, para la vainillina se seguirá el mismo procedimiento pero aforando con etanol, para obtener soluciones al 5 %.

Para el extracto de canela se seguirá el procedimiento descrito por Manderfeld y Col., 1997:

Licuar la canela durante 45 s. a alta velocidad en una licuadora de laboratorio Osterizer ( John Ester Manufacturing Company Milwaukee, WI). Lavar tres veces 10g de la muestra licuada con 150 ml de acetato de etilo (ANS (ACS) Química Meyer, México). Filtrar la mezcla con papel filtro Whatman, No 4 en un matraz Erlenmeyer.



## CAPÍTULO IV

---

Remover el acetato de etilo del filtrado por evaporación en condiciones de vacío en un rotovapor Brinkmann Büchi (RE111 Suiza) a 35°C. Finalmente solubilizar el extracto obtenido después de la evaporación en la cantidad necesaria de etanol (Merck KGaA, 64271Darmstadt, Alemania) para remover del matraz, y posteriormente aforar. Registrar el peso inicial de la materia prima, el peso del extracto obtenido y la cantidad de etanol utilizada para posteriormente calcular el rendimiento y la concentración del extracto de la siguiente manera:

$$\text{Concentración} = \frac{\text{g del extracto obtenido después de la evaporación}}{\text{mL de etanol utilizado para solubilizar}}$$

### 6.3.- Microorganismos

Se utilizarán cepas de *Aspergillus parasiticus* y *Penicillium digitatum* de la colección del laboratorio de Alimentos de la Universidad de las Américas- Puebla. Las cepas se mantendrán en cuñas inclinadas de agar papa dextrosa a temperatura ambiente y se resembrarán continuamente para mantenerlas viables.

(López- Malo, 1995)



### 6.4.- Preparación del inóculo.

Para la preparación de la suspensión de esporas de mohos, los mohos se harán crecer en cuñas de agar papa-dextrosa durante 10 días a 25°C. Las esporas se removerán, lavando la superficie del cultivo con 10 mL de agua destilada estéril. Las suspensiones de esporas se ajustaran para contener 10<sup>6</sup> de esporas por ml (López-Malo, 1995)

### 6.5.-Preparación de los sistemas modelo.

Al puré de manzana se le medirá la actividad de agua con un higrómetro de punto de rocío Decagon CX-1 (Decagon Devices, Inc., Pullman, WA) calibrado y operado como lo describe López- Malo *et. al.* (1993). El pH se determinara con un potenciómetro Beckman pH meter modelo 50 (Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA).

Se pesaran 100 g. de puré y se le añadirán 50 ml de una solución de sacarosa de 32.5° Brix. Después será colado para homogenizar la mezcla. Se la agregaran por cada 100mL de puré con sln de sacarosa 5 gramos de agar papa-dextrosa. El puré con agar se esterilizara durante 15 minutos a 110 °C y se añadirá la cantidad necesaria de los extractos de canela, vainilla y sorbato para obtener las concentraciones mínimas inhibitorias de cada microorganismo.



### 6.6. Medición del crecimiento

Los agares se verterán en cajas Petri y después de solidificarse se inocularan los mohos. Los mohos serán inoculados en el agar de fruta por el método de gota. A cada caja se le añadirán dos gotas de 5  $\mu$ l de cada moho. Los sistemas se introducirán en incubadoras a temperatura controlada (Lab-line, Inc. Melrose, Park, Il), a 25 °C durante 7, 14 y 21 días. Se medirá el crecimiento o no crecimiento de los mohos.

### 6.7.-Determinación de los efectos de la mezcla

Se obtendrán las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) tanto para cada antimicrobiano como para las posibles mezclas utilizadas. Las CMI de los antimicrobianos empleados en forma individual se definieron como la cantidad de agente antimicrobiano que inhibió el crecimiento de *A. parasiticus* y *P. digitatum* durante 21 días a 25°C

Una vez determinadas las CMI individuales se aplicaron los diseños tipo tablero de ajedrez ( Davidson y Paris, 1989) para evaluar los efectos sobre el crecimiento de *Aspergillus parasiticus* y *Penicillium digitatum* de las diferentes mezclas binarias de agentes antimicrobianos. (Tabla 6.7)



## CAPÍTULO IV

**Tabla 6.7. Diseño tipo ajedrez usado para determinar la actividad antimicrobiana de dos compuestos en combinación.**

		Agente A				
		0	62.5	125	500	1000
Agente B	0	0/0	62.5/0	125/0	500/0	1000/0
	62.5	0/62.5	62.5/62.5	125/62.5	500/62.5	1000/62.5
	125	0/125	62.5/125	125/125	500/125	1000/125
	500	0/500	62.5/500	125/500	500/500	1000/500
	1000	0/1000	62.5/1000	125/1000	500/1000	1000/1000

### 6.8.- Determinación de las concentraciones fraccionales inhibitorias

Las CMI se transformaran a las concentraciones fraccionales inhibitorias (CFI). Las concentraciones fraccionales inhibitorias de una agente antimicrobiano individual (A) es la relación de la CMI del antimicrobiano en combinación con un segundo compuesto (AB) a la CMI del antimicrobiano por si solo (A), es decir, la concentración de un compuesto necesaria para inhibir el crecimiento tiene un valor de 1, y la concentración necesaria del compuesto para inhibir el crecimiento cuando se combina con otro agente antimicrobiano se expresa como una fracción:

$$CFI_A = (CMI_{AB}) / CMI_A$$

$$CFI_B = (CMI_{BA}) / CMI_B$$



## CAPÍTULO IV

---

Después se obtendrá el índice CFI para las diferentes combinaciones ( vainillina-sorbato de potasio, extracto de canela- sorbato de potasio).

$$\text{CFI índice} = \text{CFI}_A + \text{CFI}_B$$

El cálculo de un índice CFI produce un solo número que nos indicara el tipo de efecto existente. Teóricamente un CFI igual o próximo a 1 indica aditividad, menor que 1 sinergia y mayor que 1 antagonismo.

Para visualizar estas interacciones se realizaron isobogramas, utilizando los datos de las CFI directamente. Una línea recta, marca que el efecto es aditivo, si la curva es desviada hacia la izquierda de la línea recta el efecto es sinérgico, y si es desviada hacia la derecha es antagónico.