

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Materias primas

En esta investigación se emplearon como materias primas cálices de flor de jamaica, variedad de la región Chiautla, y hojas de laurel, procedentes del Estado de Puebla. Éstas fueron adquiridas deshidratadas en la central de abastos de la ciudad de Puebla.

6.2 Métodos

6.2.1 Obtención de extractos acuosos de flor de jamaica

Para obtener extractos de flor de jamaica, se usó la metodología propuesta por Ersus y Yurdagel (2006) con las siguientes modificaciones: se emplearon como sistemas extractantes agua, etanol al 96%, etanol al 96%-agua (relación 50:50 y 70:30 v/v), y etanol al 96%-HCl 1.5 N (85:15 v/v).

Para cada una de las soluciones extractantes, en un vaso de precipitados se colocaron 2.5 g de flor de jamaica previamente triturada en una licuadora, y se añadieron 25 mL del agente extractante. La mezcla se cubrió con papel aluminio y se mantuvo en agitación y a temperatura ambiente durante 2 h. Posteriormente, se filtró en un embudo Büchner a través de papel Whatman No. 2. El extracto obtenido se colocó en frascos de plástico y se realizaron las determinaciones de forma inmediata. A lo largo de este informe, se hará referencia al etanol al 96% empleado, simplemente como etanol.

6.2.2 Obtención del extracto para microencapsulación a partir del extracto con mayor capacidad antioxidante

Para la obtención del extracto empleado en la microencapsulación se colocaron 600 g de flor de jamaica en 6 L de agente extractante. La mezcla se cubrió con papel aluminio

y se mantuvo en agitación y a temperatura ambiente durante 2 h. Después se centrifugó durante 10 min a 4500 rpm. Luego se filtró en un embudo Büchner a través de papel Whatman No. 2. Posteriormente, se llevó a cabo la eliminación de disolvente en porciones de 500 mL en un evaporador rotatorio (Büchi, 461, Suiza) a 35°C. El extracto concentrado restante se aforó a 1.050 L y se cubrió con papel aluminio para protegerlo de la luz. Se empleó 1L para el proceso de microencapsulación y los 50 mL restantes se emplearon en la caracterización del extracto. El extracto se caracterizó en base a sólidos solubles totales (°Bx), concentración de compuestos fenólicos, antocianinas monoméricas totales, actividad antioxidante y color.

6.2.3 Purificación de la goma de mezquite

La purificación de la goma de mezquite se efectuó usando modificaciones a la técnica desarrollada por Beristain *et al.* (2002). Se seleccionaron aquellas porciones con menos impurezas, se pesaron 200g de muestra y se adicionó agua destilada hasta ajustar a un volumen de 2L. La mezcla se mantuvo en agitación hasta disolver completamente los cristales de goma. La solución obtenida fue filtrada en manta de cielo con el fin de excluir las impurezas más grandes; después fue filtrada en un embudo Büchner a través de papel Whatman # 4, 1 y 2, hasta eliminar completamente las impurezas. La solución filtrada se colocó en bandejas y se almacenó en un congelador a -40°C durante 24 h para llevar a cabo el proceso de liofilización. Las muestras congeladas se colocaron en la cámara de un liofilizador (Labconco, LYPH LOCK6, EE.UU.) para iniciar el proceso de deshidratación a una temperatura de condensación de -50°C y una presión de vacío de 10 micrones de Hg, sin calentamiento en placas calefactoras. Concluido el proceso de liofilización, se colocó el producto deshidratado en un mortero y se trituró con un pistilo hasta obtener un polvo fino.

6.2.4 Obtención del microencapsulado

En un vaso de precipitados se pesaron 1, 2, 3, 4 y 5 g de goma de mezquite purificada y se añadieron 100mL de extracto de flor de jamaica. La mezcla se agitó mediante un agitador magnético hasta disolver por completo la goma de mezquite. Después se midieron los sólidos solubles totales (°Bx) (Refractómetro ATAGO, Japón) a cada uno de los cinco sistemas. Posteriormente la mezcla de extracto líquido-goma fue alimentada en un secador por aspersion (Büchi, Mini spray drier B-290, Suiza) a razón de 10 ± 0.04 mL/min, a una temperatura del aire de entrada de $180 \pm 2^\circ\text{C}$ y temperatura de aire de salida de $104 \pm 2.34^\circ\text{C}$. La potencia del aspirador fue del 100%, y la de la bomba fue del 35%, y el nivel de limpiador de la espuma fue de 1.

6.2.5 Almacenamiento

Los microencapsulados se almacenaron en una incubadora (Lab Line Instruments, Imperial III), a 25°C en ausencia de luz, por un periodo de cinco semanas.

6.2.6 Cuantificación de compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos totales se determinaron por el método de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965). El reactivo Folin-Ciocalteu es una mezcla de ácidos de coloración amarilla (fosfowolfrámico y fosfomolibdico). Estos compuestos se reducen al interaccionar con los compuestos fenólicos dando origen a óxidos de coloración azul (óxidos de wolframio y molibdeno), los cuales exhiben una amplia absorción de luz, con un máximo a 765nm. La intensidad de la absorción de luz a esa longitud de onda, es proporcional a la concentración de compuestos fenólicos.

6.2.6.1 Determinación en extractos de flor de jamaica

En un matraz aforado de 50 mL se añadieron 50 μL de extracto y 2.5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu. Se mezclaron perfectamente y después de 3 min, se incorporaron 5 mL de carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 20%; en seguida, se aforó a 50 mL con agua

destilada y se mezcló perfectamente. Después de 30 min se midió la absorbancia a 765nm usando un espectrofotómetro UV-Visible (Varian Cary 100 Conc., EE.UU.). El blanco usado se preparó siguiendo el procedimiento anterior, sólo que sin añadir la muestra.

6.2.6.2 Determinación en el extracto empleado en la microencapsulación

En un matraz aforado de 50 mL se colocaron 5 μ L del extracto usado en la microencapsulación, y se siguió la metodología de acuerdo a la Sección 6.2.6.1.

6.2.6.3 Determinación en microencapsulados

Para llevar a cabo la cuantificación en los microencapsulados, se pesaron 0.1 g de extracto en polvo en un tubo de ensayo y se añadieron 3 mL de agua; la mezcla se cubrió con papel parafilm y se agitó hasta disolver completamente el extracto en polvo. Posteriormente se tomaron 150 μ L de muestra líquida y se colaron en un matraz aforado de 50 mL y se siguió la metodología ya mencionada (Sección 6.2.6.1).

6.2.6.4 Cálculos

El valor de absorbancia obtenido para cada una de las muestras evaluadas, se sustituyó en la ecuación de la curva estándar de ácido gálico que se muestra en la figura 6.1; en donde y es igual a la absorbancia y x es igual a la concentración.

El contenido de compuestos fenólicos se expresó como miligramos equivalentes de ácido gálico en 100mL de extracto de flor de jamaica, mientras que para los extractos en polvo (microencapsulados) se expresó como miligramos equivalentes de ácido gálico en 1 g de sólidos solubles de jamaica.

En el Apéndice A se encuentra un ejemplo de cálculo de la concentración de los compuestos fenólicos, en los extractos y en los microencapsulados.

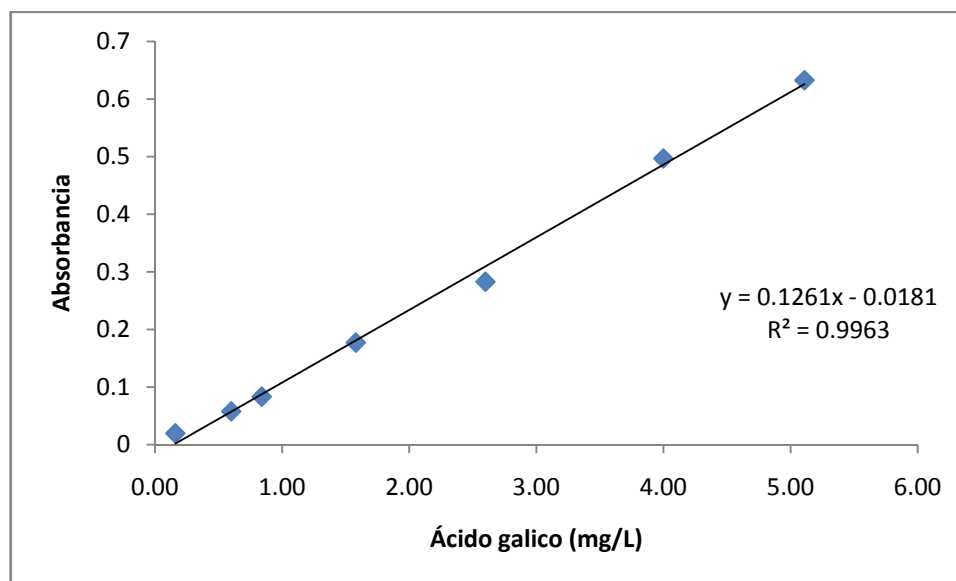


Fig. 6.1. Curva estándar de ácido gálico (Jiménez, 2008).

6.2.7 Evaluación de antocianinas monoméricas totales

La determinación de antocianinas monoméricas totales se llevó a cabo de acuerdo a la metodología descrita por Giusti y Wrolstad (2001). Ésta se basa en las transformaciones estructurales que sufren las antocianinas monoméricas con un cambio en el pH; estos compuestos adquieren la conformación de catión flavilio (color rojo intenso) a pH 1 y la forma hemiacetal (incolores) a pH 4.5.

6.2.7.1 Determinación en extractos de flor de jamaica

Para las determinaciones en los extractos de flor de jamaica, en un tubo ensayo se colocaron 7 mL de solución buffer pH=1 y en otro tubo, se colocaron 7 mL de solución buffer pH=4.5 (ver Apéndice B para la preparación de las soluciones buffer). Posteriormente, se añadieron 200 μ L de extracto de flor de jamaica a cada tubo, se cubrieron con papel parafilm y se agitaron. Para cada solución, se midió la absorbancia a 520 nm (longitud de onda de máxima absorbancia de las antocianinas) y a 700 nm en un espectrofotómetro UV-visible usando agua destilada como blanco. La absorbancia final se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$A = (A_{520nm} - A_{700nm})_{pH1.0} - (A_{520nm} - A_{700nm})_{pH4.5} \quad (\text{Ec. 1})$$

El valor de absorbancia calculado se sustituyó en la Ec. 2 para obtener la concentración de antocianinas monoméricas totales en la muestra:

$$\text{Antocianinas monoméricas} \left(\frac{mg}{L} \right) = \frac{A * PM * FD * 1000}{\epsilon * l} \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde PM y ϵ , corresponden al peso molecular y la absorptividad molar de la antocianina que predomina en la muestra; y FD es el factor de dilución (vol. total/vol. extracto).

Dado que no se conoce la absorptividad molar del pigmento predominante en la jamaica, se emplearon los datos correspondientes a la cianidina-3-glucósido (PM : 449.2 g/mol y ϵ : 26 900), ya que es la antocianina más común en la naturaleza.

6.2.7.2 Determinación en el extracto empleado en la microencapsulación

En un tubo ensayo se colocaron 7mL de solución buffer pH=1 y en otro tubo, se colocaron 7 mL de solución buffer pH=4.5. Posteriormente, se añadieron 100 μ L del extracto empleado en la microencapsulación y se siguió la metodología antes mencionada (Sección 6.2.7.1).

6.2.7.3 Determinación en microencapsulados

Para las determinaciones en los microencapsulados, se pesaron 0.1 g de extracto en polvo en un tubo de ensayo y se añadieron 3 mL de agua; la mezcla se cubrió con papel parafilm y se agitó perfectamente hasta disolver el extracto en polvo; después, se tomaron 800 μ L y se añadieron a un tubo ensayo con 7mL de solución buffer pH=1. Se tomaron otros 800 μ L y se añadieron a otro tubo con 7 mL de solución buffer pH=4.5 de acuerdo a la metodología antes mencionada (Sección 6.2.7.1).

El resultado obtenido se expresó como miligramos equivalentes de cianidina-3-glucósido en 100 mL de extracto de flor de jamaica y en los extractos en polvo (microencapsulados) se expresó como miligramos equivalentes de cianidina-3-glucósido en 1 g de sólidos solubles de jamaica.

En el Apéndice A se encuentra un ejemplo de cálculo de la concentración de antocianinas monoméricas totales en los extractos de flor de jamaica y en los microencapsulados.

6.2.8 Medición de la capacidad antioxidante

La actividad antioxidante se determinó mediante la metodología ABTS desarrollada por Re *et al.* (1999) y modificada por Kuskoski *et al.* (2004).

6.2.8.1 Preparación del radical ABTS•+

La formación del radical ABTS•+ se realizó mediante la reacción de persulfato de potasio (2.45 mM) con ABTS (2,2'azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico)) (7mM). Para esto, se colocaron 0.0033 g de persulfato de potasio y 0.0194 g del reactivo ABTS en un frasco y se añadieron 5 mL de agua destilada. La mezcla se agitó perfectamente y el frasco se cubrió con papel aluminio dejándolo reposar 16 h en oscuridad y a temperatura ambiente.

6.2.8.2 Determinación en extractos de flor de jamaica

El extracto de flor de jamaica fue diluido en etanol absoluto en diferentes proporciones dependiendo del agente extractante, con el fin de producir un porcentaje de inhibición del radical ABTS•+ entre el 20 y el 80% concluida la reacción; ya que este intervalo, se encuentra dentro de la curva estándar del antioxidante de referencia Trolox (Fig. 3.2). El porcentaje de inhibición se calculó de acuerdo a la Ec. 3 que se muestra en la sección 6.2.8.6.

Para el extracto con agua se usó una dilución 1:13 (v/v), para el extracto con etanol se empleó una dilución 1:12 (v/v), para el extracto con etanol-agua 50:50 se usó una dilución 1:11 (v/v); para el extracto con etanol-agua 70:30 se empleó una dilución 1:12 (v/v) y para el extracto con etanol-HCl se empleó una dilución 1:11.

6.2.8.3 Análisis

Se diluyeron 150 μL de radical ABTS $\bullet+$ con 15 mL de etanol absoluto en un vaso de precipitado cubierto con papel aluminio, para obtener una absorbancia de 0.70 ± 0.02 , a 754 nm en un espectrofotómetro UV-visible (longitud de máxima absorbancia).

En seguida, en una celda de cuarzo se colocaron 980 μL de la solución radical ABTS $\bullet+$ -etanol, y al alcanzar una absorbancia de 0.7 ± 0.02 , se tomó como la absorbancia inicial; posteriormente, en la misma celda, se añadieron 20 μL del extracto diluido en etanol absoluto. La mezcla se agitó cuidadosamente y se dio inicio a la reacción a 754 nm. Concluida la reacción (7 minutos después) se llevó a cabo la medición de la absorbancia, la cual se tomó como absorbancia final.

6.2.8.4 Determinación en el extracto para microencapsulación

El extracto se diluyó en etanol en una relación 1:50 (v/v) y se colocó en un dispositivo Vortex durante dos minutos. La mezcla fue centrifugada (Hermle, Z383K, Alemania) a 4500 rpm durante tres minutos y se realizó el análisis siguiendo la metodología ya mencionada (Sección 6.2.8.3).

6.2.8.5 Determinación en microencapsulados

Para las determinaciones en los microencapsulados se pesaron 0.1 g de extracto en polvo en un tubo de ensayo y se añadieron 3 mL de agua; la mezcla se cubrió con papel parafilm y se agitó hasta disolver completamente el extracto en polvo. La muestra líquida se diluyó en etanol en una relación 1:30 (v/v) y se colocó en un dispositivo Vortex durante dos minutos. Las mezclas fueron centrifugadas (Hermle, Z383K,

Alemania) a 4500 rpm durante tres minutos y se realizó el análisis de acuerdo en lo mencionado en la Sección 6.2.8.3.

6.2.8.6 Cálculos

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

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{Abs.inicial} - \text{Abs.final}}{\text{Abs.inicial}} \times 100 \quad (\text{Ec.3})$$

Donde:

Abs. Inicial: Absorbancia inicial.

Abs final: Absorbancia final.

El porcentaje de inhibición obtenido se sustituyó en la ecuación de la curva estándar del antioxidante de referencia Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) (Fig. 6.2).

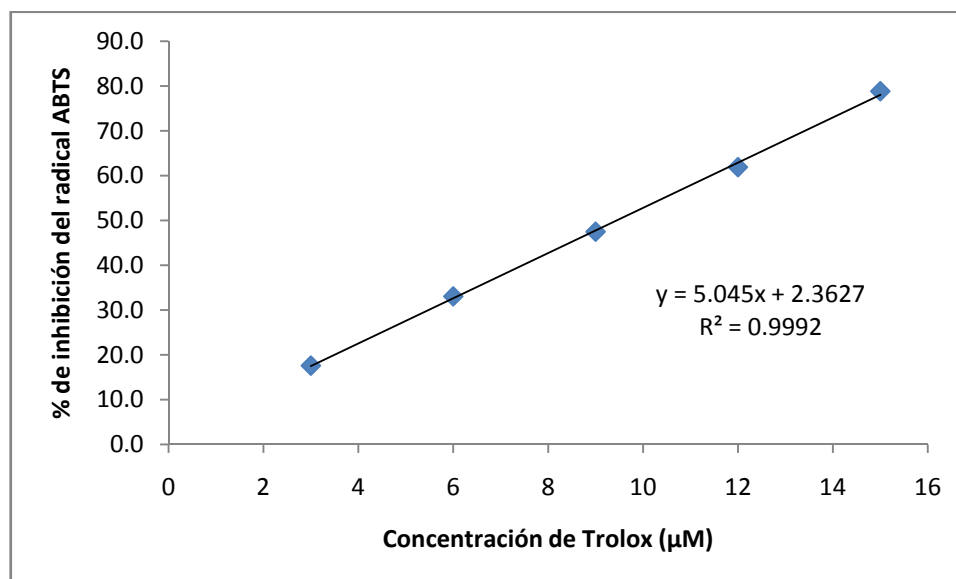


Fig. 6.2. Curva estándar del antioxidante de referencia Trolox (Jiménez, 2008).

Los resultados de actividad antioxidante se expresaron como μmol equivalente a Trolox en 100 mL de extracto y en los extractos en polvo (microencapsulados) se expresó como μmol equivalente a Trolox en 1g de sólidos solubles de jamaica. En el Apéndice A se encuentra un ejemplo de cálculo detallado para obtener el valor correspondiente a la actividad antioxidante en los extractos y en los microencapsulados.

6.2.9 Purificación de antocianinas

La purificación de antocianinas se realizó siguiendo la metodología descrita por Rodríguez-Saona y Wrolstad (2001) con la finalidad de eliminar ciertos compuestos (Fig. 6.3).

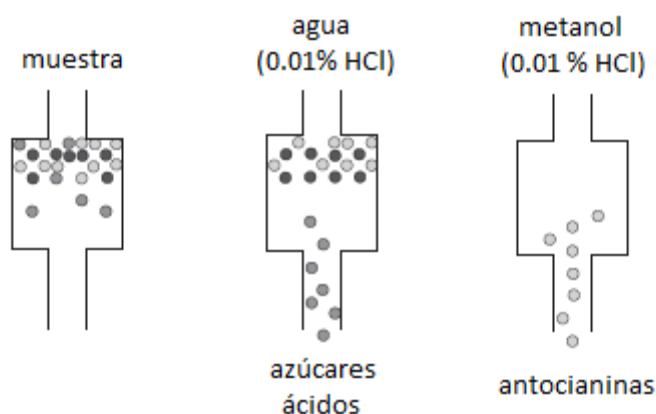


Fig. 6.3. Purificación de antocianinas.

En una probeta se midieron 12.5 mL de extracto de flor de jamaica; éste se colocó en un matraz de bola y empleando un evaporador rotatorio (Büchi, 461, Suiza), se llevó a cabo la eliminación del disolvente a 35°C en condiciones de vacío (56 cm de Hg). Concluida la concentración, el concentrado se redisolvió al volumen inicial usando agua destilada (12.5 mL). Este procedimiento se realizó para todos los extractos, a excepción del extracto con agua.

Posteriormente, a través de un cartucho C_{18} (matriz C_{18} unida a sílica: Sep-Pak® de 300 mg, marca Waters) (Figura 6.3), se hicieron pasar dos volúmenes de metanol y

tres de agua ácida (0.01% de HCl en agua destilada v/v) con la finalidad de acondicionar el cartucho. Después se hicieron pasar por el cartucho 250 μ L del extracto concentrado y enseguida se lavó con dos volúmenes de agua ácida y dos volúmenes de metanol ácido (0.01% v/v HCl en metanol); el residual conteniendo únicamente metanol ácido se recuperó en un matraz de bola y el metanol fue eliminado en un evaporador rotatorio a una temperatura 35°C en condiciones de vacío (56 cm de Hg). Finalmente, las antocianinas purificadas se redisolviaron en 500 μ L de agua destilada, se filtraron a través de una membrana de 45 μ m y se inyectaron en el HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Resolución).

6.2.10 Determinación del perfil antociánico

La identificación de antocianinas se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en un cromatógrafo (Waters, 600 controller, EE.UU.) con arreglo de diodos y UV (Waters, 996 photodiode array detector, EE.UU.). El procesamiento de la información cromatográfica se efectuó con el sistema Waters Empower™2. Con modificaciones a la metodología desarrollada por Lee y Wrolstad (2004), la separación de compuestos se realizó en una columna C₁₈ de fase reversa (LiCrospher®, 100 RP-18, Alemania) de 25 x 0.4 cm de longitud, 5 μ m de tamaño de partícula, a un flujo de 1.5 mL/min. El volumen inyectado fue de 50 μ L. La separación se realizó en gradiente isocrático utilizando una mezcla de acetonitrilo (grado HPLC) y una solución de ácido fórmico al 4.5% en agua (grado HPLC), de acuerdo a las condiciones mostradas en la tabla 6.1. La detección se llevó a cabo a 520 nm.

Tabla 6.1. Condiciones de análisis para la separación de antocianinas por HPLC.

Tiempo (min)	% de Acetonitrilo	% de Ácido fórmico al 4.5%
0	10	90
11	13	87
21	100	0

6.2.10.1 Cálculos

Para la cuantificación de las antocianinas identificadas en los cromatogramas, se hizo una relación a partir de los datos obtenidos por el estándar y los datos obtenidos en este estudio.

Los resultados obtenidos de la concentración total de las antocianinas identificadas, se expresaron como miligramos de cloruro de cianidina-3-O-glucósido en 100 mL de extracto de flor de jamaica. En el Apéndice A se muestra un ejemplo del cálculo detallado para la cuantificación de las antocianinas identificadas en el perfil antociánico.

6.2.11 Humedad

La humedad de los microencapsulados se determinó por secado y diferencia de pesos de acuerdo al método 934.06 de la A.O.A.C (2000).

6.2.12 Evaluación del color en extractos y microencapsulados de flor de jamaica

La medición de los parámetros colorimétricos en los extractos de flor de jamaica se llevó a cabo en un colorímetro (Gardner-Color, Gardner System 05, Alemania) empleando un aditamento de transmitancia de acuerdo a lo descrito por Kramer (1973). Para la determinación, se calibró el equipo con una placa negra y una placa blanca. En una celda de cuarzo para transmitancia, se colocaron 20 mL de muestra directa del extracto y se midieron las coordenadas colorimétricas correspondientes a la escala de Hunter: L (luminosidad), a (variación verde a rojo) y b (variación azul a amarillo). Con base en los parámetros descritos, se calculó la pureza (C) y el tono (H) por medio de las siguientes fórmulas:

$$Pureza (C) = \sqrt{a^2 + b^2} \quad (Ec. 4)$$

$$Tono (H) = \tan^{-1} (b/a) \quad (Ec. 5)$$

Para los extractos en polvo (microencapsulados), la medición de los parámetros de color se llevó a cabo mediante pruebas de reflectancia y transmitancia. Para la primera, se utilizó una celda de cuarzo para reflectancia en donde se colocaron 0.7 g de muestra. Para la segunda, fue necesario disolver 0.1 g de polvo en 7.5 mL de agua; esta solución se colocó en la celda de cuarzo para transmitancia y se llevaron a cabo las determinaciones ya mencionadas. Con base en las coordenadas colorimétricas obtenidas, se calculó la diferencia neta de color entre el punto inicial y final del almacenamiento de los microencapsulados de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Diferencia neta de color } (\Delta E) = \sqrt{(a - a_o)^2 + (b - b_o)^2 + (L - L_o)^2} \quad (\text{Ec. 6})$$

Donde:

a_o, b_o, L_o : Valores correspondientes al punto inicial del almacenamiento

a, b, L : Valores correspondientes al punto final del almacenamiento

6.2.13 Medición del pH

El pH de los extractos de flor de jamaica se midió por inmersión directa del electrodo de un potenciómetro Jemway 3310 (Reino Unido).

6.2.14 Obtención de extracto etéreo

Este proceso se efectuó de acuerdo al método 963.15 de la A.O.A.C (2000). Se pesaron 5 g de muestra en un cartucho de celulosa para extracción y se colocaron en el sistema de extracción Soxhlet. Como disolvente se usó hexano (100 mL), mismo que se añadió a un matraz Soxhlet puesto previamente a peso constante. Se armó el sistema de extracción, se encendió la placa de calentamiento y se dejó hervir durante 4-6 horas. Concluida la extracción, se apagó el sistema y se evaporó el disolvente; se eliminó la humedad colocando el matraz en una estufa a 50°C. Finalmente, el matraz fue

colocado en un desecador y fue pesado para hacer el cálculo correspondiente al rendimiento usando la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento (\% extracto etéreo)} = \frac{P_f \text{ matraz} - P_i \text{ matraz}}{\text{Peso muestra}} \quad (\text{Ec.7})$$

Donde:

Pf matraz: peso final del matraz Soxhlet (g)

Pi matraz: peso inicial del matraz Soxhlet (g)

Peso muestra: peso de la muestra de laurel (g)

6.2.15 Obtención del aceite esencial por destilación por arrastre de vapor

Para este proceso se empleó un sistema de destilación por arrastre de vapor de la UDLAP. La extracción se llevó a cabo de acuerdo a la metodología empleada por Viveros (2008). El recipiente inferior (aquel en contacto con la parrilla) se llenó con agua destilada hasta ocupar 2/3 partes del mismo; posteriormente se colocaron 150 g de laurel en el frasco de vidrio superior del equipo; alrededor de dicho recipiente se colocó una tela de asbesto para lograr un mejor calentamiento. Para iniciar la destilación, se encendió la parrilla de calentamiento asegurando durante todo el proceso que hubiera suficiente agua en el recipiente inferior y que ésta se encontrara en ebullición. Concluido el proceso (3 h) se apagó el equipo y se dejó enfriar; la mezcla obtenida se dejó reposar. El agua fue liberada por diferencia de densidades por medio de la válvula del frasco inferior y el aceite esencial puro fue recolectado en un frasco de vidrio; éste fue almacenado a 4°C, protegiéndolo de la luz.

Una vez recuperada la cantidad suficiente de aceite esencial de laurel, éste fue centrifugado a 4500 rpm a 4°C durante 20 minutos; enseguida se llevaron a cabo las determinaciones correspondientes a su caracterización fisicoquímica.

6.2.16 Densidad

La densidad del aceite esencial de laurel se determinó mediante el uso de un matraz aforado de 5mL. Éste se llenó con el aceite y se colocó en un baño con agua destilada a 25°C durante 15 minutos. La densidad se calculó mediante la relación masa/volumen (Ec. 8) utilizada por Viveros (2008):

$$\rho = \frac{\text{masa}}{\text{volumen}} \quad (\text{Ec. 8})$$

6.2.17 Índice de refracción

Para la determinación del índice de refracción del aceite esencial de laurel a 25°C, se utilizó un refractómetro Abbe (ATAGO, Japón) de acuerdo a lo propuesto por Stirton (1964).

6.2.18 Evaluación del color del aceite esencial

Se evaluó el color del aceite esencial de laurel en un colorímetro (Gardner-Color, Gardner System 05, Alemania) empleando un aditamento de transmitancia. Para esto, se calibró el equipo usando una placa negra y una placa blanca. Después, se colocaron 6.5 mL del aceite en una celda de cuarzo para transmitancia y se obtuvieron los parámetros colorimétricos L, a y b (Kramer, 1973).

6.2.19 Preparación del inóculo para la determinación de la actividad antimicrobiana

(Prueba de sensibilidad a los antimicrobianos)

Para la llevar a cabo las pruebas microbiológicas se usaron cepas de los microorganismos *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Escherichia coli* ATCC 35218, obtenidas de la colección de cepas del Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la UDLAP. Para el *S. aureus* se prepararon 100 mL de caldo BHI (Infusión Cerebro Corazón) y para el *E. coli* se prepararon 100 mL de caldo Caso (caldo soya), los cuales fueron esterilizados en un autoclave (Yamato Scientific America Inc., SM300, E.E.U.U) de

acuerdo a las condiciones recomendadas por el fabricante: 121°C durante un tiempo de 15 minutos a 15 lb de presión. Posteriormente, las cepas se inocularon en los caldos con una azada y fueron incubadas a 35°C durante un periodo de 18-24 h, en el cual la presencia de turbidez en los caldos indicó el crecimiento del microorganismo. Una vez crecido el microorganismo, se prepararon cuatro cajas petri con 15 mL de agar nutritivo previamente esterilizado de acuerdo a las condiciones mencionadas anteriormente, y se dejaron solidificar.

6.2.20 Evaluación de la actividad antimicrobiana (prueba de sensibilidad a los antimicrobianos)

Para las determinaciones de la efectividad antimicrobiana se siguió la metodología propuesta por Galas y Ceriana (2001). Se sembraron los microorganismos de forma masiva en las cajas petri con agar nutritivo: en dos cajas petri se sembró el *S. aureus* y en las otras dos el *E. coli*. Posteriormente, se cortaron discos de papel filtro de 1 cm de diámetro y se empaparon con 2 mL del aceite esencial de laurel; éstos se colocaron por triplicado en cada una de las cajas petri que contenían el agar nutritivo. Posteriormente, se incubaron a 35°C durante 24 h y se observó la presencia de un halo de inhibición de crecimiento del microorganismo.

