

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Materia prima

La materia prima a utilizar fue naranja fresca (*Citrus sinensis*) de la variedad Valencia, la cual se obtuvo de un mercado de la ciudad de Puebla. Se seleccionó la fruta que no se encontró dañada, la cual se lavó y peló con un cuchillo casero. La cáscara se pesó con una balanza analítica.

A fin de caracterizar las naranjas utilizadas para la extracción, se midió el grosor de las cáscaras y se determinó el índice de madurez de las mismas, utilizando la ecuación 1 (Barbosa-Cánovas *et al.*, 2003), en donde el porcentaje de azúcares se expresa como el contenido de sólidos solubles (°Bx) obtenido con la ayuda de un refractómetro Atago 1T (Japón) y el porcentaje de acidez, expresado como porcentaje de ácido cítrico, obtenido utilizando el método 942.15 de la AOAC (2005).

$$\text{Índice de madurez} = \frac{\% \text{ azúcares}}{\% \text{ acidez (ác.cítrico)}} \quad (\text{Ec.1})$$

Las cepas puras de *Aspergillus flavus*, se obtuvieron de la colección del laboratorio de control de calidad de la UDLAP, las cuales se mantienen en cuñas de agar papa dextrosa (BD Bioxon, Mex.) y se resiembran cada dos semanas.

## 6.2 Métodos

### 6.2.1 Extracción del aceite

La obtención de los aceites esenciales se realizó mediante un equipo de destilación con arrastre de vapor, como el que se muestra en la figura 3, el cual consta de los siguientes componentes: parrilla, dos frascos de vidrio Pyrex de 2L, frasco de ½L para la recepción del destilado, cabeza del destilador, condensador adaptado al refrigerante, auto-separador con válvula, abrazaderas, mangueras de agua y telas de asbesto.



Figura 3. Equipo de destilación con arrastre de vapor

La metodología recomendada para la utilización del equipo comienza por el llenado del recipiente en contacto con la parrilla con agua destilada (2/3 del mismo), así como unas cuantas perlas de ebullición. Posteriormente, la muestra, previamente molida o fraccionada, se coloca en el recipiente superior al primero; alrededor de dicho recipiente, por la parte exterior, se colocan telas de asbesto como aislante para optimizar el calentamiento. A continuación se enciende el refrigerante para enfriar el agua dentro del condensador, aproximadamente a 0°C y, para iniciar la destilación, se prende la parrilla de calentamiento de manera que durante

todo el proceso el agua se mantenga en ebullición (Sánchez, 2006; Martínez, 2008; Pérez, 2006).

Los vapores generados comienzan a subir después de alrededor de 10 a 20 minutos hacia la cabeza del destilador hasta llegar al condensador, donde se enfrían. El líquido extraído (fase acuosa y fase oleaginosa) se acumula en el auto-separador, donde se puede apreciar la separación de fases. Una vez terminado el proceso (2-4 h) se apaga el equipo y se deja enfriar, para después liberar el agua, por diferencia de densidades, mediante la válvula y obtener el aceite esencial puro (Martínez, 2008; Pérez, 2006).

## 6.2.2 Medición de las propiedades físicas del aceite

### 6.2.2.1 Densidad

La densidad del aceite se determinó mediante un picnómetro de 10mL y haciendo uso de la ecuación 2 (Pomeranz y Meloan, 2000), donde la masa está dada en kg y el volumen en m<sup>3</sup>.

$$\rho = \frac{\text{masa}}{\text{volumen}} \quad (\text{Ec.2})$$

### 6.2.2.2 Índice de refracción

La medición del índice de refracción de los aceites se realizó recurriendo a un refractómetro Atago 1T (Japón), a 25°C.

El equipo debe calibrarse a 0 con agua destilada, para después secar con papel y colocar una gota de muestra sobre el cristal. Para la lectura, se gira la perilla hasta que la zona oscura quede en el centro de las líneas de la pantalla (López-Malo *et al.*, 2008).

### 6.2.2.3 Color

El color del aceite esencial se analizó mediante el modo de transmitancia, usando el colorímetro que aparece en la figura 4 (Colorgard 05, Gardner Laboratory, EE.UU.). Antes de realizar la medición, el colorímetro se calibró con la ayuda del mosaico negro y los parámetros de calibración  $L=100$ ,  $a=0$  y  $b=0$ . A continuación se obtuvieron las coordenadas de color Hunter L, a, b de alrededor de 10 mL de aceite; de manera que (HunterLab, 2001; Pérez, 2006):

L: luminosidad (varía de 0 a 100)

a: contribución verde (-) a rojo (+)

b: contribución azul (-) a amarillo (+)



Figura 4. Colorímetro Gardner Colorgard System 04

### 6.2.3 Composición química del aceite

Los principales compuestos del aceite se determinaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Para esto, se realizó un análisis de cromatografía de gases mediante el equipo Varian Star 3400cX (EE.UU.), acoplado un espectrómetro de masas Varian Saturn 2000 (EE.UU.) (figura 5) con la trampa a una temperatura de 170°C. El cromatógrafo está equipado con la columna Zebron ZB-1 (30m de largo x 0.32mm de diámetro interno x 0.25µm de espesor de la película). El gas acarreador utilizado fue helio y tiene una presión de aproximadamente 12 psi.

La temperatura del inyector fue de 200°C. La columna se manejó a 75°C durante 4 minutos. Posteriormente, la temperatura se incrementó 8°C por minuto hasta llegar a 200°C, manteniéndose así durante 6 minutos. La cantidad inyectada de aceite fue de 3µL (Pérez, 2006).

Los compuestos presentes se identifican mediante el análisis del patrón de fragmentación de masas y la base de datos Star Tool Bars (NIST) de los compuestos de referencia. Dada la confiabilidad de la base de datos utilizada, no fue necesaria la presencia de un estándar (Pérez, 2006).



Figura 5. Cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas

#### 6.2.4 Determinación de la concentración mínima inhibitoria

Una vez obtenida la cepa del microorganismo puro, se realizó un lavado de esporas de las cuñas, con 9mL de agua peptonada estéril. El agua que lleva esporas del lavado se recuperó en un tubo estéril, para después realizar el conteo de esporas en una cámara de Neubauer y obtener el recuento en espora por mililitro, buscando obtener un contenido mínimo de  $10^7$  esporas por mililitro.

##### 6.2.4.1 Dilución del aceite en agar

En 7 frascos de dilución previamente esterilizados, se agregaron 40mL de agar papa dextrosa, también estéril. A cada frasco se adicionó el aceite esencial de naranja para conseguir las siguientes concentraciones: 0, 500, 1000, 2000, 4000, 8000 y 16000 ppm; se agitaron vigorosamente hasta que quedó bien integrado el aceite en el agar para entonces verter el agar en cajas petri de 6 x 1.5cm y esperar a que solidificara.

La inoculación del microorganismo se llevó a cabo en el agar papa dextrosa, en cajas petri, con 7 $\mu$ L del lavado de esporas previamente descrito.

Las cajas petri inoculadas se dejaron a temperatura ambiente en recipientes cerrados. El crecimiento se monitoreó, midiendo cada 24 horas el diámetro de las colonias existentes para determinar la velocidad de crecimiento radial y el tiempo lag, ajustando los datos experimentales a una modificación de la ecuación de Gompertz (ecuación 3) (Char *et al.*, 2006):

$$\ln\left(\frac{D_t}{D_o}\right) = A \exp\{-\exp[(v \cdot e/A)(\lambda - t) + 1]\} \quad (\text{Ec. 3})$$

donde  $D_t$  es el diámetro de la colonia al tiempo  $t$ ,  $D_o$  es el diámetro inicial promedio de la colonia,  $A$  es el crecimiento máximo en la fase estacionaria,  $v$  es la velocidad de crecimiento máxima y  $\lambda$  es el tiempo lag.

Aquella concentración utilizada de aceite, para la cual no se presentó crecimiento de *Aspergillus flavus* por al menos, tres semanas, correspondió a la concentración mínima inhibitoria para dicho moho (López-Malo, 2009).

#### 6.2.4.2 Generación de vapores

El agar papa dextrosa se virtió en cajas petri de 6 x 1.5 cm y se dejó solidificar. El microorganismo obtenido a partir de la suspensión de esporas, se inoculó en el centro de la caja, adicionando 7 $\mu$ L de la suspensión de esporas.

El aceite de naranja se colocó en la parte inferior de recipientes de tapa transparente y cierre hermético, sin mantener contacto directo con las cajas petri inoculadas. Éstas se colocaron abiertas, suspendidas sobre una base en el interior de la cámara, como se muestra en la figura 6 (Inouye, 2003). El interior de los recipientes se cubrió con papel contac para proteger las paredes de contaminación directa por el aceite esencial, ya que es difícil removerlo con el lavado de los recipientes (Inouye *et al.*, 2001)

Para cámaras de 1.7L de capacidad se evaluaron concentraciones de 0.6, 1.2, 2.4, 4.7 y 9.4 mL de aceite por litro de aire. Los recipientes se mantuvieron a temperatura ambiente.

De igual manera que en la metodología anterior, el crecimiento de las colonias se monitoreó cada 24 horas, midiendo el diámetro de las mismas y se determinaron los parámetros de la cinética de crecimiento ajustando los datos experimentales a la ecuación 3. Igualmente, aquella concentración de aceite en la cámara, para la cual no se presentó crecimiento del microorganismo durante al menos, tres semanas, correspondió a la concentración mínima inhibitoria para *Aspergillus flavus* (López-Malo, 2009).



Figura 6. Sistema cerrado herméticamente para generación de vapores