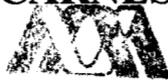


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
IZTAPALAPA**

CB S

**POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**EFECTO BACTERIOSTÁTICO DE ACEITES  
ESENCIALES DE AJO (*Allium sativum*) Y CEBOLLA  
(*Allium cepa*) SOBRE DOS MICROORGANISMOS  
PRESENTES EN CARNES.**



COORDINACION DE SERVICIOS  
DOCUMENTALES - BIBLIOTECA

**TESIS QUE PRESENTA:**

**El Ing. JAVIER MORALES LÓPEZ**

**PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA**

**DIRECTORAS:**

**Dra. MARÍA ISABEL GUERRERO LEGARRETA**

**Dra. EDITH PONCE ALQUICIRA**

**México D.F.**

**Julio de 1999**

222254

Dedico esta tesis a mi Madre Vivian Esquivo Rechy, quien hizo posible la realización del presente trabajo y también hizo posible el sueño de hacer realidad la investigación y el desarrollo de un anticancerígeno. También a mi Madre Alba Zabeth López Forero por su impulso y amor, donde quiera que estés; Madre. A la compañía INFOODS. A mi Familia, a ti Papá porque era tu sueño ser científico investigador y me enseñaste que es fuente de luz un libro abierto. A mis sobrinas Natalia María y Eileen Jimena así como a sus Padres Eileen y Rafico. A mis hermanos. Pero muy especialmente al ciclópeo pueblo de México y su cultura milenaria; con mi eterna gratitud. Al pueblo de Colombia, porque en cada uno de sus hijos y su trabajo hay una contribución para que cambien las cosas y construir un mejor país; éste es mi aporte.

Deseo agradecer a la Doctora María Isabel Guerrero Legarreta, Directora del Grupo de Investigación de Bioquímica de Macromoléculas, en primer término, el escuchar así como dirigir y diseñar metodológicamente la propuesta presentada al Comité de Admisión del posgrado en Biotecnología de la UAM-I; en segundo término su enseñanza y disciplina para aprender y conocer el método científico. También le agradezco a la Doctora Mercedes Guadalupe López Pérez su enseñanza, su tiempo en el laboratorio de Química de Productos Naturales del Centro de Investigación de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional - Irapuato, Gto. (CINVESTAV-IPN) y los amplios aportes que fueron fundamentales en el conocimiento de los constituyentes de los aceites así como la interpretación y revisión de los resultados, a la Maestra Elsa Bósquez Molina por sus consejos y en especial por su interpretación de la vida, a la Doctora Edith Ponce Alquicira por sus comentarios e ideas y al Maestro Rubén Moreno, Coordinador del Panel de Evaluación Sensorial de la Universidad Iberoamericana, por su apoyo y tiempo en la evaluación del chorizo tipo español.

Un agradecimiento muy especial a Otto Klemperer por enseñarme a conocer un ser humano de pensamiento atemporal, a Beethoven, en la magistral dirección de sus sinfonías y en particular el segundo movimiento de la “Heróica”. También mi admiración a Sergei Rachmaninoff por sus cuatro conciertos sinfónicos. Al Caribe colombiano aquella tierra Chimila, Africana y Europea. A la tierra Vallenata!. Y en general, a los que con su trabajo han aportado al desarrollo del pensamiento humano, con ideas y métodos que son el resultado de la energía que requiere el cerebro para desarrollarlas y no son otra cosa que combustible obtenido a partir de los alimentos que consumimos como necesidad fundamental de la existencia.

Fue de casa en casa arrastrando dos lingotes metálicos, y todo el mundo se espantó al ver que los calderos, las pailas, las tenazas y los anafes se caían de su sitio, y las maderas crujían por la desesperación de los clavos y los tornillos tratando de desenclavarse, y aun los objetos perdidos desde hacía mucho tiempo aparecían por donde más se les había buscado, y se arrastraban en desbandada turbulenta detrás de los fierros mágicos de Melquiades. —Pregonaba el gitano con áspero acento— “Las cosas tienen vida propia, todo es cuestión de despertarles el ánimo”. Y también decía Melquiades, “La ciencia ha eliminado las distancias, dentro de poco, el hombre podrá ver lo que ocurre en cualquier lugar de la tierra, sin moverse de su casa.”

....

....

Entonces dio otro salto para anticiparse a las predicciones y averiguar la fecha y las circunstancias de su muerte. Sin embargo, antes de llegar al verso final ya había comprendido que no saldría jamás de ese cuarto, pues estaba previsto que la ciudad de los espejos (o los espejismos) sería arrastrada por el viento y desterrada de la memoria de los hombres en el instante que Aureliano Babilonia acabara de descifrar los pergaminos, y que todo lo escrito en ellos era irrepitible desde siempre y para siempre, porque las estirpes condenadas a cien años de soledad no tenían una segunda oportunidad sobre la tierra.

Gabriel García Márquez, Cien Años de Soledad

## RESUMEN

Se determinó el efecto antimicrobiano del aceite esencial de ajo (*Allium sativum*) y cebolla (*Allium cepa*) sobre dos cepas puras, una está vinculada con la descomposición de alimentos *Pseudomonas fragi* y *Lactobacillus pentosus* es utilizado en procesos de bioconservación de algunos alimentos fermentados. El propósito central fue conocer las concentraciones de inhibición de los aceites esenciales de ajo (*Allium sativum*) y de cebolla (*Allium cepa*) por separado así como el efecto sinérgico cuando se combinaron 2:1, 1:1, 1:2; en total cinco tratamientos con cinco niveles de concentración propuestas, (0.03, 0.36, 3.69, 49.6 y 196  $\mu\text{l}$  de aceite(s) esencial(es)/ml de medio de cultivo), en la cual se reduce el crecimiento celular.

En ajo, el nivel de concentración de 196  $\mu\text{l}/\text{ml}$  inhibió hasta 17.76 % a *P. fragi* y 33.19 % *L. pentosus*. La cebolla presentó menor inhibición comparada con ajo y en las mezclas no se apreció efecto sinérgico que superara a cada aceite por separado. La inhibición en ambos microorganismos disminuyó en la medida que aumentó la concentración del aceite esencial de cebolla. En las concentraciones de 0.039 y 0.39  $\mu\text{l}/\text{ml}$  se favoreció mayor crecimiento de los microorganismos comparado con un blanco al que no se incluyó ningún aceite. En los niveles de 49.6 y 3.9  $\mu\text{l}/\text{ml}$  no hubo diferencia entre si y ambos presentaron valores de alrededor de 12 y 15 % en *L. pentosus* y *P. fragi*, respectivamente.

Los aceites esenciales probados se obtuvieron mediante el método de arrastre de vapor en condiciones de vacío estándar y se reportó para cebolla un rendimiento de 42 % por arriba de las referencias bibliográficas y de la misma forma 35 % para ajo. La caracterización por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas indicó que los 10 compuestos alifáticos identificados en ajos contienen azufre, mientras que en cebollas de los 20 identificados, dos de los más abundantes son aldehídos carentes de azufre, de los 18 restantes 9 son cíclicos de los cuales dos contienen nitrógeno, los 9 restantes son alifáticos. También sobre los aceites se determinó el contenido de grupos sulfhidrilo y se encontró que el de ajo contiene 25 % más que el de cebolla y entre las

combinaciones de los aceites, la cantidad de grupos sulfhidrilo disminuyó en forma que bajó la concentración de aceite esencial de ajo.

Con el fin de conocer si las concentraciones inhibitorias de aceites esenciales eran aceptadas o rechazadas al ser incorporadas en chorizo tipo español como sazónadores, se probaron concentraciones de 49.6 y 196  $\mu\text{l/ml}$ , y con ellos se mejoran los atributos sensoriales del producto cárnico, la mejor combinación, y según el panel de evaluación, fue la de ajo y cebolla en proporción 1:2 en nivel de 196  $\mu\text{l/ml}$ .

De la misma forma, los objetivos particulares incluyeron además de montar y adaptar metodologías de manera secuencial, entre otros, establecer el método de extracción, prueba analítica de cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas (GC-MS) y química con el reactivo de Ellman; prueba específica para caracterizar grupos sulfhidrilo. Los bioensayos se realizaron en caldos de cultivo selectivos, con los tratamientos y niveles señalados, para medir la absorbancia a 560 nm respecto del tiempo, el cual es un método indirecto de medir el crecimiento celular. Para evaluar las curvas de crecimiento y medir su modificación de acuerdo con la concentración y combinación de los aceites se realizaron regresiones lineales y se calculó mediante integrales definidas, las áreas bajo la curva en intervalos que llegan hasta el inicio de la fase estacionaria de cada microorganismo.

La importancia de la técnica de extracción de los aceites esenciales de ajo y cebolla mediante arrastre de vapor en condiciones de vacío estándar radica, además del bajo costo al compararlo con otros métodos como el de ( $\text{CO}_2$ ) en estado líquido (fluidos supercríticos) y la extracción por solventes, en que con la metodología empleada se pueden obtener esencias puras, ya que no se arrastran oleorresinas ni otras grasas, pesticidas y restos de solventes en la muestra. Por estas razones, se utilizó esta metodología lo que aseguraba la obtención de compuestos con los que se podían experimentar, analizar y comparar con especificaciones y trabajos publicados. El trabajo desarrollado, además de aportar la metodología de extracción de aceites esenciales de ajo y cebolla, pilar ésta tesis, deja la opción de otras investigaciones de interés.

**!Como nos acordamos del pescado que comíamos de  
balde en Egipto, de los pepinos y las sandías y los  
puerros y las cebollas y el ajo!**

**Números 11:5**

**La Biblia.**

## ÍNDICE GENERAL

### ÍNDICE GENERAL

### ÍNDICE DE FOTOS Y AUTORES

### ÍNDICE DE TABLAS

### ÍNDICE DE FIGURAS

1.	RESUMEN	
I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	ANTECEDENTES	6
II.1	Principales microorganismos de descomposición	7
II.1.1.	Grupos bacterianos importantes en alimentos	8
II.1.1.1.	Principales microorganismos de descomposición de carnes rojas	11
II.1.1.2.	<i>Pseudomonas fragi</i>	12
II.1.1.3.	<i>Lactobacillus plantarum</i>	13
II.2.	Metabolismo celular	15
II.2.1.	Mecanismos de acción de aceites esenciales del género <i>Allium</i> sobre microorganismos	17
II.3.	Antecedentes históricos y medicina folklórica	20
II.3.1.	Antecedentes medicinales sistemáticos de ajos y cebollas	22
II.4.	Generalidades químicas de los aceites esenciales	25
II.5.	El género <i>Allium</i>	26
II.6.	Generación y extracción de los compuestos volátiles en <i>Allium</i>	26
II.6.1.	Principios del proceso de extracción por arrastre de vapor en condiciones de vacío estándar	30
II.7.	Análisis de compuestos presentes en aceites esenciales de ajo y cebolla	31
II.7.1.	Fundamento y determinación por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)	31
II.7.2.	Fundamento y determinación química de grupos sulfhidrilo con el reactivo de Ellman	34

II.8.	Fundamento y determinación del crecimiento bacteriano mediante turbidimetría	34
II.8.1.	El Crecimiento bacteriano	35
II.9.	Evaluación sensorial	36
II.9.1.	Prueba de estímulo único	37
II.9.2.	Prueba pareada	37
II.9.3.	Prueba dúo-trío	38
II.9.4.	Prueba triangular	38
III.	OBJETIVOS	39
A)	General	39
B)	Particulares	39
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS	40
IV.1.	Diagrama general de la metodología experimental de la tesis	40
IV.1.1.	Extracción de aceites esenciales	41
IV.1.1.1.	Materiales y equipo	41
IV.1.1.2.	Extracción de volátiles	42
IV.1.1.3.	Pruebas físicas	43
IV.2.	Análisis de compuestos volátiles en los aceites esenciales	44
IV.2.1.	Diagrama de flujo general de la caracterización por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	44
IV.2.2.	Equipo y condiciones de operación	45
IV.2.3.	Análisis de radicales sulfhidrilo	45
IV.3.	Crecimiento de microorganismos en medios sintéticos	46
IV.3.1	Diagrama de flujo general de los bioensayos	47
IV.3.1.1.	Metodología experimental	47
IV.3.1.1.1.	Crecimiento de <i>Pseudomonas fragi</i>	48
IV.3.1.1.2.	<i>Lactobacillus pentosus</i> (31035)	48
IV.4.	Análisis sensorial	49
IV.4.1.	Formulación del producto	49
IV.4.2.	Muestras para el análisis sensorial	50

---

IV.4.2.1.	Ingredientes utilizados	50
IV.4.3.	Procedimiento en la elaboración de la pasta	51
IV.4.3.1.	Preparación y presentación de las muestras	52
IV.4.3.2.	Panel de jueces	53
IV.4.3.3.	Diseño experimental y análisis estadístico	53
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
V.1.	Extracción de aceites	54
V.2.	Análisis de compuestos volátiles en los aceites esenciales de ajo y cebolla	55
V.2.1.	Ajo	56
V.2.2.	Cebolla	69
V.2.3.	Concentración de grupos sulfhidrido SH	93
V.3.	Crecimiento de microorganismos en medios sintéticos	95
V.3.1.	<i>Lactobacillus pentosus</i>	96
V.3.2.	<i>Pseudomonas fragi</i>	103
V.3.3.	Alteración del puente disulfuro -S-S- (-SH)	110
V.3.4.	Modificación del potencial redox en la cadena del flujo de electrones	111
V.3.5.	Alteración de la permeabilidad celular, acción sobre la acetil Co-A	112
V.3.6.	Alteración del potencial de oxidación de la glutatión reductasa	115
V.3.7.	Alteración de la transferencia de electrones durante la síntesis del material genético para la división celular	115
V.4.	Análisis sensorial	116
VI	Conclusiones	123
VII	BIBLIOGRAFÍA	126

## ÍNDICE DE FOTOS Y AUTORES

- Foto 1.** Bifacial hallado en el Sáhara. Colección IFAN, Dakar, Senegal. 1  
Foto, Maximilien Bruggmann, Yverdon, Suiza. (Dos Millones de Años de Industria Alimentaria. Toussaint-Samat, Renaud Alberny, Ian Horman)
- Foto 2.** Vendedor de pescado. Pintura mural, siglo XIII a. de C., isla de 1  
Thera, Grecia. Museo Arqueológico de Atenas. Foto, Erich Lessing / Magnum (Dos Millones de Años de Industria Alimentaria. Toussaint-Samat, Renaud Alberny, Ian Horman)
- Foto 3.** Campesinos egipcios cribando el grano con palas de madera. 2  
Detalle de pintura mural. Tumba de Mennah, Tebas, Egipto. Foto, Erich Lessing / Magnum (Dos Millones de Años de Industria Alimentaria. Toussaint-Samat, Renaud Alberny, Ian Horman)
- Foto 4.** Cal, tequezquite y sal. Minerales utilizados como métodos de 2  
conservar y procesar alimentos. La nixtamalización del maíz con la cal (1 a 3 % y hervir durante 20 a 40 minutos con reposo de 10 a 12 horas) es uno de los aportes de la cultura prehispánica de Meso América al consumo de alimentos en el mundo. Foto, Michel Zabé (Presencia de la Comida Prehispánica. Castelló Yturbide, Zabé y Piña Luján)
- Foto 5.** Pez alado, Cultura San Agustín, años 100 a. C. - 800 d. C., 2  
Colombia. Museo del Oro, Santafé de Bogotá, Colombia.
- Foto 6.** Una de las primeras latas de harina lacteada Henri Nestlé, fin del 3  
siglo XIX. Foto, archivos Nestlé (Dos Millones de Años de Industria Alimentaria. Toussaint-Samat, Renaud Alberny, Ian Horman)
- Foto 7.** Tienda de ultramarinos, Florencia, Italia. Foto, F. Sciana / Magnum 3  
(Dos Millones de Años de Industria Alimentaria. Toussaint-Samat, Renaud Alberny, Ian Horman)

<b>Foto 8.</b>	Tienda de especias, Estambul, Turquía. Foto, Maximilien Bruggmann, Yverdon, Suiza (Dos Millones de Años de Industria Alimentaria. Toussaint-Samat, Renaud Alberny, Ian Horman)	4
<b>Foto 9.</b>	Ampliación con el microscopio electrónico de moho filamentoso formando una capa blanca en ciertos quesos. Foto, Archivos Nestlé (Dos Millones de Años de Industria Alimentaria. Toussaint-Samat, Renaud Alberny, Ian Horman)	6
<b>Foto 10.</b>	Fotografía de barrido electrónico de <i>Pseudomonas fragi</i> .	12
<b>Foto 11.</b>	Micrografía de escaneo electrónico de <i>Lactobacillus plantarum</i> . WSO. Escala bar = 1 µm.	13
<b>Foto 12.</b>	Ilustración del siglo XIV da muestras de la profusión de su uso con fines medicinales, cuando no como bulbo comestible, en aquella época.	21
<b>Foto 13.</b>	Ajos después de la operación de limpieza.	41
<b>Foto 14.</b>	Equipo de destilación de aceites esenciales más densos que el agua, con modificación para termopozo y mayor volumen de recuperación de volátiles.	42
<b>Foto 15.</b>	Acumulación del aceite esencial de ajo durante el proceso.	42
<b>Foto 16.</b>	Aceites esenciales de ajo y cebolla contenidos en recipientes de vidrio.	44
<b>Foto 17.</b>	Chorizo tipo español	50
<b>Foto 18.</b>	Las muestras con tratamientos se presentaron individualmente en grupos de 3, dos de las muestras son iguales y una es el blanco. En cada sesión, los 6 jueces degustaron 15 porciones de producto	51
<b>Foto 19.</b>	Prueba triangular para detectar diferencias	52
<b>Foto 20.</b>	Una muestra Chorizo tipo español	52
<b>Foto 21.</b>	Microscopía de barrido electrónico de <i>C. albicans</i> KCCC 14172 crecida en medio de cultivo con agitación a 37 °C. (a) en ausencia de extracto acuoso de ajo (EAA); son células elongadas o	113

esféricas, (b) en presencia de (EAA) se tienen células deformadas y distorcionadas y en algunos casos colapsadas; como lo indica la flecha; CD señala los restos citoplásmicos y la barra (parte inferior de a) es de 4  $\mu$  m. (Mahmoud y Ghannoum, 1988)

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Principales factores que afectan la ecología microbiana de los alimentos.	8
<b>Tabla 2.</b>	Grupos bacterianos importantes en alimentos.	9
<b>Tabla 3.</b>	Género de bacterias importantes en alimentos.	10
<b>Tabla 4.</b>	Composición química promedio del tejido muscular de algunas especies.	11
<b>Tabla 5.</b>	División de las especies de <i>Lactobacillus</i> en grupos.	14
<b>Tabla 6.</b>	Algunas enzimas inhibidas por la alicina encontrada en el ajo ( <i>Allium sativum</i> )	18
<b>Tabla 7.</b>	Espectro de acción del ajo ( <i>Allium sativum</i> ) y cebolla ( <i>Allium cepa</i> ) reportados en microorganismos.	19
<b>Tabla 8.</b>	Generación de algunos compuestos volátiles azufrados en ajo	27
<b>Tabla 9.</b>	Carta comercial de especificaciones fisicoquímicas de los aceites esenciales de ajo ( <i>Allium sativum</i> ) y cebolla ( <i>Alium cepa</i> ). Reineccius, (1994); Extract Mex, (1998).	43
<b>Tabla 10.</b>	Concentración de aceites esenciales añadidos a medios de cultivo	46
<b>Tabla 11.</b>	Tratamientos y niveles de aceites esenciales de ajo y cebolla en la formulación de chorizo español	50
<b>Tabla 12.</b>	Compuestos identificados en el aceite esencial de ajo ( <i>Allium sativum</i> )	57
<b>Tabla 13.</b>	Patrones de fragmentación de 10 compuestos identificados en el	58

aceite esencial de ajo obtenido por el método de arrastre de vapor.

	Metil alil sulfuro. 1.69%, $t_r$ 1.45 min, 88 g/mol	58
	Dimetil disulfuro. 1.11%, $t_r$ 2.37 min, 94 g/mol	59
	3-3'-tio bis, 1-propeno. 4.8%, $t_r$ 3.40 min, 114 g/mol	60
	2 Propenil metil disulfuro. 11.35%, $t_r$ 6.22 min, 120 g/mol	61
	Dimetil trisulfuro. 4.6%, $t_r$ 8.55 min, 126 g/mol	62
	2-Propenil propil disulfuro. 0.24%, $t_r$ 9.7 min, 148 g/mol	63
	3-(alil tio), ácido propiónico. 0.86%, $t_r$ 10.64 min, 146 g/mol	64
	Dialil disulfuro. 35.59 %, $t_r$ 11.35 min, 146 g/mol	65
	Metil, 2-propenil trisulfuro. 16.36%, $t_r$ 13.78 min, 152 g/mol	66
	di-2-propenil trisulfuro. 18.39%, $t_r$ 18.45 min, 178 g/mol	67
<b>Tabla 14.</b>	Compuestos identificados en el aceite esencial de cebolla ( <i>Allium cepa</i> )	71
<b>Tabla 15.</b>	Caracterización mediante espectrometría de masas de 20 compuestos volátiles encontrados en cebolla ( <i>Allium cepa</i> )	72
	Metanetiol. 2.5%, $t_r$ 0.86 min, 48 g/mol	72
	Propanal. 27%, $t_r$ 0.95 min, 58 g/mol	73
	Dimetil disulfuro. 2.8%, $t_r$ 2.40 min, 94 g/mol	74
	2-pentenal, 2-metil(2-etil-t-butanal). 13.82%, $t_r$ 3.63 min, 98 g/mol	75
	Metil propil disulfuro. 1.52%, $t_r$ 5.2 min, 122 g/mol	76
	Metil etil disulfuro. 1.6%, $t_r$ 5.46 min, 108 g/mol	77
	2,5-dimetil-tiofeno. 5.7%, $t_r$ 5.805 min, 112 g/mol	78

	1,3-ditiano. 1.1%, $t_r$ 6.10 min, 120 g/mol	79
	1,3-propan ditiol. 1.1%, $t_r$ 6.34 min, 108 g/mol	80
	1,4-ditiano. 1.8%, $t_r$ 6.91 min, 120 g/mol	81
	Tiazolidina. 8.4%, $t_r$ 8.13 min, 122 g/mol	82
	Dimetil trisulfuro. 3.5%, $t_r$ 10.17 min, 126 g/mol	83
	2-propenil propil disulfuro. 0.90%, $t_r$ 11.53 min, 148 g/mol	84
	1,3-Ditiolano. 1.12%, $t_r$ 12.69 min, 106 g/mol	85
	3,3-tienil- 2- ácido propenóico. 2.6%, $t_r$ 16.30 min, 154 g/mol	86
	Metil tirano. 1.2%, $t_r$ 18.13 min, 74 g/mol	87
	Dipropil trisulfuro. 0.64%, $t_r$ 24.07 min, 182 g/mol	88
	1,2,4-tritiolano, 3,5-dietil. 1.65%, $t_r$ 29.10 min, 180 g/mol	89
	trans-3,5-Dietil-1,2,4-tritiolano. 2.09%, $t_r$ 30.40 min, 180 g/mol	90
	2,5-dimetil-tiazolio. 0.43%, $t_r$ 36.13 min, 113 g/mol	91
<b>Tabla 16.</b>	Compuestos azufrados encontrados en los aceites esenciales de ajo y cebolla.	92
<b>Tabla 17.</b>	Ecuaciones que describen la concentración de los grupos tiol ( $\mu\text{moles/ml}$ ) en los 5 tratamientos probados microbiológicamente	93
<b>Tabla 18.</b>	Concentración de grupos tiol (SH) en $\mu\text{moles/ml}$	94
<b>Tabla 19.</b>	Comparación de las áreas y porcentajes de inhibición a 30 horas en <i>Lactobacillus pentosus</i> . Calculados a partir de las ecuaciones obtenidas con las regresiones y con el aceite esencial de ajo a 196 $\mu\text{l/ml}$ como referencia de la máxima inhibición.	96
<b>Tabla 20.</b>	Ecuaciones de cada curva de crecimiento de <i>Lactobacillus pentosus</i> en la que se encuentran los cálculos del punto teórico máximo, el	102

área bajo la curva o integral a 30 horas y el porcentaje de inhibición tomando como referencia el número menor (ajo a 196  $\mu\text{l/ml}$ ).

<b>Tabla 21.</b>	Comparación de áreas y porcentajes de inhibición a 24 horas en <i>Pseudomonas fragi</i> . Calculados a partir de las ecuaciones obtenidas con las regresiones y con el aceite esencial de ajo a 196 $\mu\text{l/ml}$ como referencia de la máxima inhibición.	103
<b>Tabla 22.</b>	Ecuaciones de cada curva de crecimiento de <i>Pseudomonas fragi</i> en la que se encuentran los cálculos del punto teórico máximo, el área bajo la curva o integral a 24 horas y el porcentaje de inhibición tomando como referencia el número menor (ajo a 196 $\mu\text{l/ml}$ ).	109
<b>Tabla 23.</b>	Resultados de la evaluación sensorial y la comparación de acuerdo con las pruebas de significancia por el método triangular para cada tratamiento	117
<b>Tabla 24.</b>	Planilla de control	119

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Estructura del músculo estriado. Micrografía electrónica de partes de tres miofibrillas en sección longitudinal	11
<b>Figura 2.</b>	Estructura química de la Acetil coenzima A. El enlace tioester de “alta energía” se indica con un segmento curvo; el grupo acetil es reemplazado por hidrógeno.	15
<b>Figura 3.</b>	Rutas catabólicas. El ATP y NADPH son las fuentes de energía libre de reacciones biosintéticas. Ellas son generadas entre la degradación de metabolitos complejos y utilizadas en las diversas funciones biológicas.	16
<b>Figura 4.</b>	Acción de un inhibidor enzimático. Puede ser reversible o irreversible y depende del tipo de uniones que establezca con la enzima. Es irreversible cuando se genera un enlace covalente, con fuerzas electrostáticas es reversible.	17
<b>Figura 5.</b>	Dialil disulfuro o alicina. Sustancia azufrada, inhibidor enzimático del metabolismo celular. Compuesto más abundante en el aceite esencial de ajo.	17
<b>Figura 6.</b>	Ajoeno, estructura química, 2-vinil-4H1,3-ditiína. No CAS [92285-01-3] 2-Propenil 3-(2-propenilsulfinil)-1-propenildisulfuro 4,5,9-tritio-1,6,11 dodecatrieno 9-óxido [92284-99-6, 92285-00-2] Sintetizado por Block y col. en 1986 a partir de alicina calentando en acetona-agua. Djerassi C. y col., 1994.	23
<b>Figura 7.</b>	Dialil trisulfuro. Estructura química $H_2CCHCH_2SSSCH_2CHCH_2$	24
<b>Figura 8.</b>	Estructura química de aceites esenciales de cada grupo en la clasificación de Reineccius en 1994.	25
<b>Figura 9.</b>	Formación de la alicina a partir de aliína por la acción de la alinasa. Reacción estequiométrica.	27
<b>Figura 10.</b>	Compuestos azufrados extraídos de ajo ( <i>Allium sativum</i> ) por diversos métodos.	28
<b>Figura 11.</b>	Compuestos azufrados extraídos de la cebolla, el factor lacrimógeno es	29

	un isómero estructural de la aliína.	
<b>Figura 12.</b>	Representación esquemática de los destiladores de aceites esenciales por arrastre de vapor en condiciones de vacío estándar. Consta de tres partes, dedo refrigerante en la parte superior, cuerpo del destilador y matraz para contener la muestra.	30
<b>Figura 13.</b>	Principio general de un espectrómetro de masas.	31
<b>Figura 14.</b>	Esquematación del fundamento y principios de operación de un espectrómetro de masas.	32
<b>Figura 15.</b>	Representación de un espectrómetro de masas en donde en la primera etapa de activación; las moléculas, iones o átomos son activados al aumentar su nivel energético (energía potencial, parte superior de la rampa). Posteriormente se aceleran al descender y la energía potencial adquirida anteriormente se transforma en energía cinética y es igual para todas.	32
<b>Figura 16.</b>	Espectro de masas, patrón del dialil disulfuro comparado con el patrón de la biblioteca NBS, parte inferior. Se puede apreciar que el fragmento más abundante tiene 41 unidades de masa atómica.	33
<b>Figura 17.</b>	Patrón de fragmentación del dialil disulfuro.	33
<b>Figura 18.</b>	Reactivo de Ellman 5,5-di-tio bis (ácido 2-nitro benzóico) DTNB- $C_{14}H_8N_2O_8S_2$	34
<b>Figura 19.</b>	Reacción del reactivo de Ellman en la formación del pigmento	34
<b>Figura 20.</b>	Curva de crecimiento típica de células bacterianas en cultivo por lote.	35
<b>Figura 21.</b>	Diagrama de flujo general de la extracción de los aceites	41
<b>Figura 22.</b>	Diagrama de flujo general de la caracterización mediante espectrometría de masas	44
<b>Figura 23.</b>	Diagrama de flujo general de los bioensayos	47
<b>Figura 24.</b>	Las Curvas de destilación por arrastre de vapor en la que se aprecia la disminución de la temperatura respecto del tiempo, una vez que se han logrado las condiciones de vacío estándar	54

<b>Figura 25.</b>	Cromatograma de aceite esencial de ajo ( <i>Allium sativum</i> ) obtenido por arrastre de vapor en condiciones de vacío estándar	56
<b>Figura 26.</b>	Cromatograma de aceite esencial de cebolla ( <i>Allium cepa</i> ) obtenido por arrastre de vapor en condiciones de vacío estándar	70
<b>Figura 27.</b>	Prueba del reactivo de Ellman en los cinco tratamientos y los cinco niveles, mismos que se probaron en las cinéticas microbianas	93
<b>Figura 28.</b>	Curvas de crecimiento de <i>Lactobacillus pentosus</i>	97
	<i>Lactobacillus pentosus</i> en presencia de aceite esencial de ajo	97
	<i>Lactobacillus pentosus</i> en presencia de aceite esencial de ajo y cebolla en proporción 2:1	98
	<i>Lactobacillus pentosus</i> en presencia de aceite esencial de ajo y cebolla en proporción 1:1	99
	<i>Lactobacillus pentosus</i> en presencia de aceite esencial de ajo y cebolla en proporción 1:2	100
	<i>Lactobacillus pentosus</i> en presencia de aceite esencial de cebolla	101
<b>Figura 29.</b>	Curvas de crecimiento de <i>Pseudomonas fragi</i>	104
	<i>Pseudomonas fragi</i> en presencia de aceite esencial de ajo	104
	<i>Pseudomonas fragi</i> en presencia de aceite esencial de ajo y cebolla en proporción 2:1	105
	<i>Pseudomonas fragi</i> en presencia de aceite esencial de ajo y cebolla en proporción 1:1	106
	<i>Pseudomonas fragi</i> en presencia de aceite esencial de ajo y cebolla en proporción 1:2	107
	<i>Pseudomonas fragi</i> en presencia de aceite esencial de cebolla	108
<b>Figura 30.</b>	Un posible mecanismo de intercambio de grupos tiol- o intercambio de disulfuro es el catalizado por la glutatión reductasa. La cinta púrpura representa el esqueleto polipeptídico de una proteína. El ataque del grupo tiol o mercapto puede ser ionizado en forma de tiolato.	110
<b>Figura 31.</b>	Diagrama de la cadena del transporte de electrones mitocondriales, indicando la ruta de la transferencia ( <i>negro</i> ) y la bomba de protones	111

(rojo). Los electrones son transferidos entre los Complejos I y III por la coenzima Q, soluble en la membrana; y el Complejo III y IV por el citocromo C entre la membrana y la proteína periférica.

- Figura 32.** Citocromo C. Participa en el transporte de electrones del proceso de obtención de energía desde el alimento hasta el oxígeno. El interior de cada proteína es un grupo prostetico llamado grupo hemo, de color naranja en la ilustración. Alterna entre los estados oxidados y reducidos de hierro y azufre, en contra de la pérdida de electrones que pasan a lo largo de la cadena del transporte de electrones 112
- Figura 33.** Pirofosfato de tiamina 114
- Figura 34.** GSH;  $\gamma$ -glutamyl-cisteinil-glicina, glutation 115
- Figura 35.** Algunas reacciones que involucran a la glutation: (1) detoxificación con la glutation peroxidasa (2) regeneración de GSH a partir de GSSG por la glutation reductasa, (3) modulación de la tiol transferasa; encargada del balance disulfuro de las proteínas y (4) biosíntesis de leucotrienos mediante la glutation -S-transferasa 115
- Figura 36.** Ruta de la transferencia de electrones para la reducción del NDP (Nucleósido de di fosfato) que participa en la formación de desoxiribonucleótidos. El NADPH proporciona equivalentes reductores en el proceso entre los intermediarios de la tioredoxina reductasa, tiorredoxina, y reductasa ribonucleótido 116
- Figura 37.** Hoja maestra de evaluación, para cada juez, en la que se anotaron los comentarios realizados en los grupos de muestras evaluadas 118

**Nuestro universo sería una cosa muy limitada si  
no ofreciera a cada época algo que investigar ...  
La naturaleza no revela sus misterios de una vez  
para siempre.**

**SÉNECA, CUESTIONES NATURALES,  
libro 7, siglo primero**



**Foto 1.** Bifacial hallado en el Sáhara. Colección IFAN, Dakar, Senegal. (Toussaint y col., 1991).

## I. INTRODUCCIÓN

Una necesidad fundamental de la humanidad es alimentarse, podría decirse que la industria alimentaria apareció en el momento que se inventó la primera herramienta, hace ya unos dos millones de años, la historia de nuestra alimentación es tan vieja como la historia de la humanidad.

Desde hace millones de años compartimos con nuestros alimentos una evolución común. La adaptación ha sido recíproca, tratando de mantener el equilibrio biológico, que desde siempre, es uno de los secretos fundamentales de la vida. La producción de alimentos viene participando a través del tiempo en la lucha por la sobrevivencia de la especie, aún vigente hoy.

Surgió, la industria alimentaria, de nuestra necesidad de disponer de recursos, de la historia de la domesticación de nuestros comestibles y del control de nuestra alimentación.



**Foto 2.** Vendedor de pescado. Pintura mural, siglo XIII a. de C., isla de Thera, Grecia. Museo Arqueológico de Atenas. (Toussaint y col., 1991).



**Foto 3.** Campesinos egipcios cribando el grano con palas de madera. Detalle de pintura mural. Tumba de Mennah, Tebas, Egipto. (Toussaint y col., 1991).

Desde el momento que nuestra dieta se diversificó y mejoró, el ser humano se las ingenió para preservar los víveres del deterioro o la descomposición por microorganismos mediante técnicas de conservación, como son: la desecación, el ahumado, el frío, la cocción, la acidificación, la sal, las grasas, la miel, los azúcares y el alcohol.

El fuego, el frío y la sal nos habían permitido hacer las primeras provisiones. El aceite, la miel, el vino y luego los alcoholes enriquecieron

nuestros métodos y prolongaron el tiempo de conservación. Procedimientos ancestrales que sólo serían sustituidos o modificados en el siglo XIX por la química, la biología, la dietética y la tecnología que, en la actualidad, compiten en imaginación y resultados.



**Foto 4.** Cal, tequezquite y sal. Minerales utilizados como métodos de conservar y procesar alimentos. La nixtamalización del maíz con la cal (1 a 3 % y hervir durante 20 a 40 minutos con reposo de 10 a 12 horas) es uno de los aportes de la cultura prehispánica de Meso América al consumo de alimentos en el mundo. (Castelló y col., 1991).



**Foto 5.** Pez alado, Cultura San Agustín, años 100 a. C. - 800 d. C., Colombia. (Museo del Oro, Santa Fé de Bogotá, Colombia., 1994).

Hoy, entre los métodos de conservación también se dispone de aditivos, que según su uso en un comestible, generalmente se clasifica como parte de cinco fracciones de funciones primarias; son estas: mejoramiento en el valor nutricional, conservación, mejoramiento en la textura, adición de color y adición de aroma y sabor. De las cinco, las más fácilmente justificables son el mejoramiento en el valor nutricional y la conservación; al evitar la proliferación de microorganismos indeseables que impiden su consumo posterior.



Foto 6. Una de las primeras latas de harina lacteada Henri Nestlé, fin del siglo XIX. (Toussaint y col., 1991).

incrementado la necesidad de almacenarlos y por consiguiente conservarlos; ejemplos de nuestro tiempo son: la industria de los productos cárnicos, lácteos, botanas, conservas, alimentos de bajas calorías, alimentos sustitutos y otros. En algunos casos, para lograr su conservación, se utilizan compuestos químicos o métodos físicos, pero fue en los umbrales del siglo XX cuando se usaron extensivamente en forma de aditivos, preferentemente de origen natural.

Materias primas son producidas en una región y transportadas hasta otra para su proceso o industrialización, posteriormente se distribuyen en diferentes lugares donde pueden pasar meses o incluso años desde su producción hasta el consumo. Para realizar el manejo y soportar el tiempo de conservación se requiere de un sistema de mercadeo así como un medio efectivo de conservación. Las nuevas formas de preparación de los alimentos han

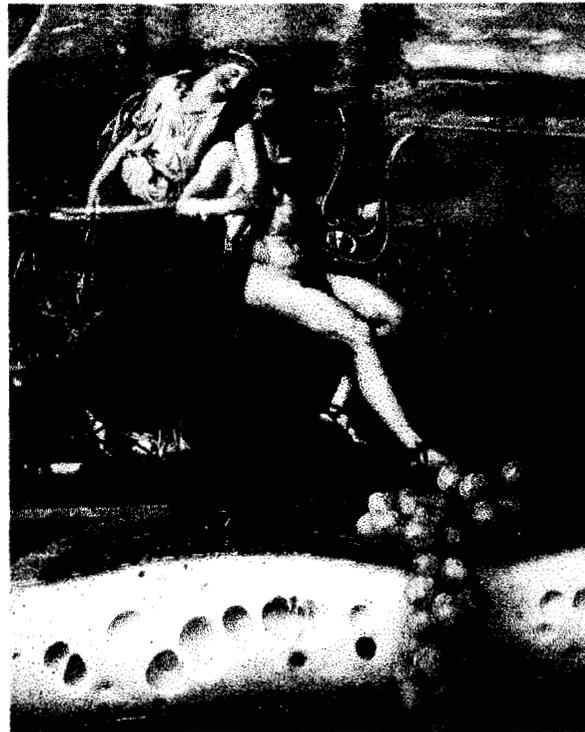


Foto 7. Tienda de ultramarinos, Florencia, Italia. (Toussaint y col., 1991).



Foto 8. Tienda de especias, Estambul, Turquía (Toussaint y col., 1991).

Las fuentes naturales, como las especias y otros vegetales para el control antimicrobiano, se usan con más frecuencia desplazando gradualmente las sustancias sintetizadas industrialmente con el mismo propósito. Un método de conservación empírico en el que se inhibió el crecimiento de microorganismos, siglos atrás, se relaciona con el principio aromático y de sabor de algunos vegetales, debido a los aceites esenciales que son su principio activo y pueden ser inhibidores y saborizantes según la concentración (Conner, 1993; Jeanflis y col., 1991; Farag y col., 1989; Collins y Charles, 1987; Hitokoto y col., 1980; Hargreaves y col., 1975).

Los aceites esenciales y en general los aromas son de primordial importancia en la química del olor y sabor; en productos biológicos proporcionan el aroma distintivo de la fuente de donde provienen y son de los principales atributos sensoriales de los alimentos de consumo humano (Kim y col., 1995; Reineccius, 1994; Maarse y Visscher, 1989; Pafumi, 1986; Zaika y Kissinger, 1981; Shelef y col., 1980).

Los volátiles responsables del sabor y aroma, se sintetizan durante ciertas etapas del desarrollo de plantas, animales y cultivos celulares. Según la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos de Norte América "son sustancias consideradas en el grupo de los aditivos alimentarios de origen natural, tienen estatus regulatorio GRAS o Generalmente Recomendados Como Seguros", se pueden etiquetar como saborizantes 100 % naturales y su uso está limitado por buenas prácticas de manufactura. En el Sistema Internacional de Nomenclatura SIN, no se enumeran y no están sujetas a dosis máximas legales, la cantidad de aceite esencial, se autolimita por razones sensoriales. Esto significa que la cantidad de la sustancia añadida al alimento en la fabricación no excederá la necesaria para obtener la aceptación por parte del consumidor (Leung y Foster, 1996; Davison y Branen, 1993; Tainter y Grenis, 1993;

Smith, 1992). En vegetales, su composición química, proporción, cantidad y calidad depende, en primer término, de la especie botánica -variedad, genética-, y de factores abióticos tales como el medio ambiente, clima, condiciones del suelo y de factores socioculturales como prácticas culturales, estado de desarrollo, manejo poscosecha previo a la extracción y método de extracción (Sass-Kiss y col, 1998; Randle y col., 1994; Chieko y col., 1993; Tung y col., 1994; Mazza y col., 1992).

Los trabajos de investigación sobre aceites esenciales de ajo (*Allium sativum*) y cebolla (*Allium cepa*) en microbiología y medicina, por ser inhibidores de algunas enzimas involucradas en las rutas metabólicas celulares, han generado amplio interés en experimentar para conocer y desarrollar sus potenciales como fármaco así como antimicrobiano y sazoador (Dainty y MacKay, 1992; Talaat y col., 1989; El- Khateib, 1987; Azzouz, 1982; Danker y col., 1979). Milenariamente se han utilizado a los ajos y cebollas en la medicina tradicional o también llamada empírica o folklórica, en tratamientos diversos. Se han publicado estudios que incluyen la generación de los compuestos en el tejido vegetal así como rutas bioquímicas de los aromas producidos con microorganismos, también hay investigaciones en el tratamiento de algunos tipos de cáncer, como antitrombótico, insecticida, antimicrobiano en alimentos, sazoador, y hasta como estimulador de la brotación de yemas de ciruelo japonés (*Prunus salicina* Lindl) en lugares con baja acumulación de frío (Sánchez y col. 1997; Singh y Singh, 1995; Kammerer, 1993; El-Shourbagy, 1993; Fenwick, 1985; Shelef y col. 1984).

Con la presente investigación se reporta el método de extracción de aceites esenciales, por el método de arrastre de vapor en condiciones de vacío estándar, y se probaron como inhibidores del crecimiento celular; dada la tendencia del uso de sustancias de origen natural como métodos de conservar y sazoador alimentos así como posibles principios activos en el desarrollo de medicamentos con sus implicaciones en problemas de salud pública y con la consecuente importancia económica. También se realizó la caracterización cromatográfica y química mediante el reactivo de Ellman de los compuestos volátiles de dos variedades vegetales cultivadas en México de los que no se tenían reportes previos.

**“... en general, la respiración no es otra cosa que una combustión lenta de carbono e hidrógeno, la cual es completamente similar al fenómeno que ocurre en una lámpara o un candil iluminado, y que desde este punto de vista, los animales que respiran son combustible verdadero que se encienden y consumen a si mismos.”**

**ANTOINE LAVOISIER - ARMAND SEGUIN, 1789.**



**Foto 9.** Microfotografía de barrido de moho filamentoso formando una capa blanca en ciertos quesos (Toussaint y col., 1991).

## II. ANTECEDENTES

Cuando los microscopios fueron suficientemente poderosos, Louis Pasteur, en 1860, demostró el proceso de envenenamiento microbiano de los alimentos al establecer que la fermentación es causada por microorganismos. En la actualidad, la industria alimentaria domina tratamientos específicos capaces de impedir o favorecer el desarrollo de los millones de células que amenazan y/o que pueden proliferar en los diversos grupos de alimentos; son ejemplos: la pasteurización, productos enlatados, envasado al vacío, aditivos, alimentos fermentados como quesos, aceitunas, etc. (Toussaint y col. 1991)

Los factores microbiológicos se consideran los más importantes riesgos dentro de la perspectiva de salud pública porque son

capaces de causar de manera extensiva enfermedades en las que el alimento es el vehículo. En la industria alimentaria es básico asegurar la calidad del producto con métodos que eviten la proliferación de microorganismos, como son los programas de Análisis de Riesgos en Puntos Críticos de Control (ARPC) o sus siglas en inglés HACCP. El sistema es de tipo preventivo y se encarga de la seguridad de los alimentos;

está basado en diseñar el proceso desde la producción hasta el consumidor final impidiendo el crecimiento de microorganismos patógenos, mediante el manejo de factores ecológicos del alimento con principios técnicos y científicos (Multon, 1996; Stevenson y Bernard, 1995; Middlekauff y Shubik, 1989).

### **II.1. Principales microorganismos de descomposición**

Los alimentos, se pueden considerar como un medio ambiente selectivo para el crecimiento celular en los que sus variables físicas y composición química seleccionan aquellos microorganismos que poseen los atributos bioquímicos y fisiológicos para proliferar. En otros términos, el que mejor se adapta al ambiente, crece más rápido. Cuando un comestible -de un ambiente definido- es colonizado por células, al ocurrir el crecimiento, cambia el ecosistema de tal forma que modifica las asociaciones que son capaces de desarrollarse. Según Ray (1996), Leistner y Gorris (1995) y Gould (1992), los cinco factores que afectan el metabolismo celular y como consecuencia la ecología microbiana de los alimentos se agrupan en la Tabla 1, la combinación y el manejo de éstos en la práctica para evitar o inducir el desarrollo celular se conocen como tecnología de barrera.

Muchos microorganismos patógenos (bacterias, mohos y virus) pueden contaminar el alimento durante las etapas de su manejo entre la producción y el consumo. La ingestión de algunos microorganismos no es peligrosa para la salud; el sistema digestivo los elimina antes de que puedan causar el menor trastorno. Por el contrario, su multiplicación en los alimentos y la generación de sustancias tóxicas es la causa del problema cuando son ingeridos. Se requiere como medida de control para evitar la proliferación y como consecuencia la generación de toxinas, un proceso adecuado e higiene rigurosa desde el inicio hasta el consumidor.

**Tabla 1.** Principales factores que afectan la ecología microbiana de los alimentos (Ray, 1996; Leitsner y Gorris, 1995; Gould, 1992).

QUÍMICO	FÍSICO	FACTORES DE PROCESO	FACTORES EXTRÍNSECOS	FACTORES IMPLÍCITOS Y MICROBIOLÓGICOS
Nutrientes presentes	Actividad de Agua $a_w$	Cambios en los tipos de microorganismos	Temperatura	Microorganismos presentes
Naturaleza de los solutos	Hielo y sus efectos	Cambios en el número de microorganismos	Humedad relativa	Fase microbiológica lag y velocidad de crecimiento
pH y capacidad de amortiguación	Concentración por congelamiento	Cambios en la composición del alimento	Presión parcial de oxígeno	Efectos sinérgicos
Potencial de óxido reducción	Viscosidad	Cambios en la estructura del alimento	Presencia de otros gases	Efectos antagónicos
Presencia de aditivos y sustancias antimicrobianas	Microestructura Compartimentalización			

### II.1.1. Grupos bacterianos importantes en alimentos

De la cantidad de microorganismos y contaminantes encontrados en alimentos, las bacterias constituyen el grupo más importante entre insectos, helmintos y desechos de aves y roedores. Factores que influyen o son relevantes en el desarrollo celular son: su rápida velocidad de crecimiento, facilidad de proliferar en los más diversos ambientes, facilidad de utilizar sus nutrientes, habilidad de crecer en un intervalo amplio de temperaturas, aerobiosis, pH, actividad de agua ( $a_w$ ), así como el potencial de sobrevivencia -como las esporas a temperaturas altas-. Los factores antes mencionados son los criterios de decisión en la implementación de programas de calidad, respecto de los microorganismos en lugares donde se manejan alimentos.

Las bacterias en alimentos se han dividido y agrupado sobre la base de algunas características similares, recopiladas en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Grupos bacterianos importantes en alimentos (Ray, 1996).

DIVISIÓN	CARACTERÍSTICAS	MICROORGANISMOS
1) Acéticas	Produce ácido acético.	<i>Acetobacter aceti</i>
2) Butíricas	Produce ácido butírico.	algunas <i>Clostridium spp.</i> como <i>Clostridium butyricum</i>
3) Lácticas	Produce relativamente grandes cantidades de ácido láctico a partir de carbohidratos.	<i>Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Lactobacillus</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i> .
4) Propiónicas	Son usadas en fermentación láctea.	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
5) Acidúrica	Capaz de sobrevivir a pH por abajo de 4.	Algunos <i>Lactobacillus, Pediococcus, Lactococcus, Enterococcus, Streptococcus</i> .
6) Coliformes	Son usados como índice de sanitización.	Principalmente <i>Escherichia, Enterobacter, Citrobacter, Klebsiella</i> .
7) Coliformes fecales	Son usados como índice de sanitización.	<i>Escherichia coli</i>
8) Esporulados	Habilidad de producir esporas	<i>Bacillus, Clostridium</i> y <i>Desulfotomaculum spp.</i>
9) Halotolerantes	Capaces de sobrevivir a altas concentraciones de sal (arriba o iguales al 10 %)	Algunos <i>Bacillus, Micrococcus, Staphylococcus, Pediococcus, Vibrio</i> y <i>Corynebacterium</i> .
10) Lipolíticas	Capaz de hidrolizar triglicéridos, debido a la producción de lipasas extracelulares relativamente	<i>Micrococcus, Staphylococcus, Pseudomonas, Alteromonas</i> y <i>Flavobacterium</i>
11) Osmofílica	Pueden crecer en altas concentraciones osmóticas, son mucho menos osmofílicas que las levaduras y mohos.	<i>Staphylococcus, Leuconostoc, Lactobacillus</i>
12) Patógenos entéricos	Causan infecciones gastrointestinales	<i>Salmonella, Shigella, Campylobacter, Yersinia, Escherichia, Vibrio, Listeria, Hepatitis A</i>
13) Productores de gomosidad	Debido a la síntesis de polisacáridos	<i>Xanthomonas, Leuconostoc, Alcaligenes, Enterobacter, Lactococcus</i> y <i>Lactobacillus</i> .
14) Productoras de gas	Producen CO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> S durante el metabolismo de nutrientes.	<i>Leuconostoc, Lactobacillus, Propionibacterium, Escherichia, Enterobacter, Clostridium</i> y <i>Desulfotomaculum</i> .
15) Proteolíticas	Hidrolizan proteínas, debido a la producción de proteinasas extra-celulares.	<i>Micrococcus, Staphylococcus, Bacillus, Clostridium, Pseudomonas, Alteromonas, Flavobacterium, Alcaligenes</i> , algunas <i>Enterobacteriaceae</i> y <i>Brevibacterium</i> .
16) Psicrotroficas	Pueden crecer en temperaturas de refrigeración (menores o iguales de 5 °C)	<i>Pseudomonas, Alteromonas, Alcaligenes, Flavobacterium, Serratia, Bacillus, Clostridium, Lactobacillus, Leuconostoc, Carnobacterium, Brochotrix, Listeria, Yersinia</i> y <i>Aeromonas</i>
17) Sacarolíticas	Hidrolizan carbohidratos complejos.	<i>Bacillus, Clostridium, Aeromonas, Pseudomonas, Enterobacter</i>
18) Termofílicas	Capaz de crecer por arriba de 50 °C	Algunos <i>Bacillus, Clostridium, pediococcus, Streptococcus, Lactobacillus</i>
19) Termodúrica	Capaz de sobrevivir a temperaturas de pasteurización.	Algunos <i>Micrococcus, Enterococcus, Lactobacillus, Pediococcus, Bacillus</i> (esporas) y <i>Clostridium</i> (esporas)

Con base a la clasificación del manual de Bacteriología Determinativa editado por Holt (1993) así como por Ray (1996) en base al Género y Familia, por su importancia, se toman estos grupos de bacterias porque están presentes en alimentos. Se encuentran ordenadas en secciones y se recopilan en la Tabla 3.

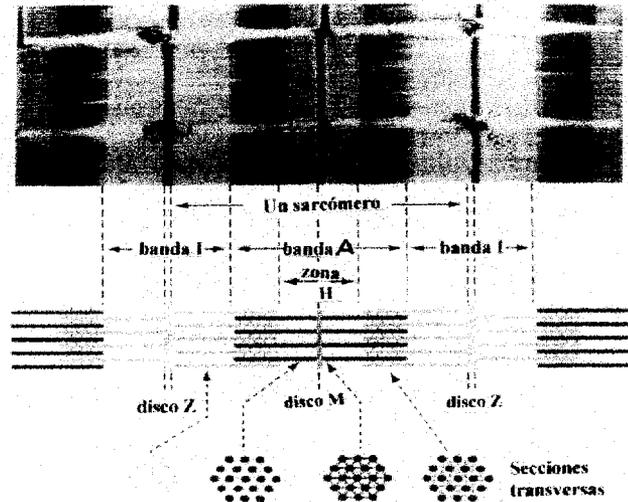
**Tabla 3.** Género de bacterias importantes en alimentos (Ray, 1996; Holt y col., 1993)

Descripción	Familia	Género
Gram-negativos, aeróbico / microaerofílico, móviles, helicoides/ vibrioides	no indicada	<i>Campilobacter</i>
Gram-negativos, aeróbico, bastones y cocci	<i>Pseudomonaceae</i>	<i>Pseudomonas, Xantomonas</i>
	<i>Acetobacteraceae</i> <i>Nisseriaceae</i>	<i>Acetobacter, Gluconobacter</i> <i>Acinetobacter, Moraxella</i>
	no indicado	<i>Alteromonas, Flavobacterium, Alcaligenes, Brucella, Psychrobacter</i>
Gram-negativos, anaeróbicos facultativos, bastones	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Citrobacter, Escherichia, Enterobacter, Edwardsiella, Erwinia, Hafnia, Klebsiella, Morganella, Proteus, Salmonella, Shigella, Serratia, Yersinia,</i>
	<i>Vibrionaceae</i>	<i>Vibrio, Aeromonas, Plesiomonas</i>
Rickettsias	<i>Rickettsiaceae</i>	<i>Coxiella</i>
Gram-positivos cocci	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Micrococcus, Staphylococcus</i>
	no indicado	<i>Streptococcus, Enterococcus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Sarcinia</i>
Gram-positivos, formador de endosporas, bastones y cocci	no indicada	<i>Bacillus,</i>
		<i>Sporolactobacillus, Clostridium, Desulfotomaculum<sup>a</sup></i>
Gram-positivos, no esporulados, bastones regulares	no indicado	<i>Lactobacillus, Carnobacterium, Brochotrix, Listeria,</i>
Gram-positivos, no esporulados, bastones irregulares	no indicado	<i>Corynebacterium, Brevibacterium, Propionibacterium, Bifidobacterium</i>

<sup>a</sup> Las células *Desulfotomaculum* son gram negativas

### II.1.1.1. Principales microorganismos de descomposición de carnes rojas

El músculo animal (Figura 1) es un medio de cultivo rico en nutrientes, está conformado por un manojo de fibras contráctiles rodeado de una cobertura de tejido conjuntivo, que constituye una protección efectiva contra la contaminación externa. Químicamente, en promedio, la carne de los mamíferos contiene 18 % de proteínas, 75 % de agua, el contenido de carbohidratos es bajo y el de grasas muy variable (Bourgeois y Leveau, 1995). La Tabla 4 presenta la composición química promedio del músculo magro para varias especies.



**Figura 1.** Estructura del músculo estriado. Micrografía electrónica de partes de tres miofibrillas en sección longitudinal. Están separadas por aberturas horizontales. La parte clara es la banda I, la cual contiene filamentos delgados arreglados hexagonalmente; la banda A, marcada en oscuro contiene solamente filamentos empacados hexagonalmente; aquellos oscuros de la parte exterior son segmentos que contienen traslapamientos delgados y filamentos delgados; como los discos Z que están anclados; y el disco M aparece como una protuberancia en el centro de cada filamento delgado. La unidad funcional de las miofibrillas, el sarcómero, es la región entre dos discos Z sucesivos en el músculo (Voet y Voet, 1995).

**Tabla 4.** Composición química promedio del tejido muscular de algunas especies (Dainty y Mackey, 1992; Fennema, 1984).

COMPOSICIÓN (%)					
ESPECIES	AGUA	PROTEÍNA	LÍPIDOS	CENIZAS	OTROS COMPUESTOS (% P/V) EN GENERAL
Bacalao	81.2	17.6	0.3	1.2	L (+) Acido láctico 0.9
Cerdo	68 - 70	19 - 20	9 - 11	1.4	Glicógeno 0.1
Cordero	73	20	5 - 6	1.6	Nucleótidos 0.3
Pollo	73.7	20 - 23	4.7	1.0	Azúcares fosfatados 0.1
Res	70 - 73	20 - 22	4 - 8	1.0	Productos de ATP 0.3
Salmón	64	20 - 22	13 - 15	1.3	Aminoácidos 0.4

Tan pronto como se sacrifica un animal, el músculo asume el estado rígido o de *rigor mortis*, esta transformación está acompañada de una caída progresiva del potencial

de óxido-reducción o potencial eléctrico (Eh) del músculo; que en su estado normal es de 250 mV y desciende hasta -50 mV. También ocurre un descenso en el pH de 7.4 hasta 5.5 y éste se produce cuando el glucógeno es convertido hasta ácido láctico. Por otro lado, cesan los mecanismos de defensa del animal haciendo al tejido muscular más vulnerable al crecimiento bacteriano, aunque microbiológicamente, en el momento de la matanza, el músculo está prácticamente libre de microorganismos, cuando de animales sanos se trata (Bourgeois y Leveau, 1995; Voet y Voet, 1995).

Las fuentes iniciales de contaminación del tejido muscular, algunas veces, son los ganglios linfáticos cuando están contaminados con microorganismos. También pueden ser aquellos que se encuentran en el tracto digestivo, donde al cruzar la barrera intestinal son transportados por el flujo sanguíneo con los que se pueden causar contaminaciones profundas (Bourgeois y Leveau, 1995; Dainty y MacKey, 1992). En la superficie de las canales se puede encontrar un gran número de microorganismos de diversos tipos; se puede desarrollar una flora característica que varía de un lugar anatómico a otro y depende en gran medida de la temperatura, pH y la atmósfera gaseosa (Dainty y MacKey, 1992). Típicamente, las canales de carne y algunos productos cárnicos tienen bacterias mesofilas (entre 100 y 10 000 por cm<sup>2</sup>). Una recopilación de los principales microorganismos encontrados en la carne incluyen: *Acinetobacter*, *Brochotrix*,

*Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Aeromonas*, *Corynebacterium*, *Clostridium* y *Arthrobacter* (Bourgeois y Leveau, 1995; Dainty y MacKey, 1992; Van der Zant y Splittstoesser, 1992).

#### II.1.1.2. *Pseudomonas fragi*

El género *Pseudomonas*, pertenece a los procariontes, sus células tienen formas rectas o bastones ligeramente curvos, miden alrededor de 0.5-1.0 x 1.5-5.0 µm (Foto 10).



1 µm

Foto 10. Fotografía de barrido electrónico de *Pseudomonas fragi* (Campbell, 1993).

Se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza. Muchas especies de esta familia acumulan  $\beta$ -hidroxibutirato como material de reserva de carbono, las células se tiñen de forma gram negativa. La mayoría de especies de *Pseudomonas* pueden crecer en condiciones ácidas hasta pH = 4.5, no requiere de factores de crecimiento para su desarrollo. Tienen metabolismo respiratorio estrictamente aeróbico en el cual el oxígeno es el aceptor final de electrones. En pruebas bioquímicas, se conoce que son oxidasa positivas o negativas según la cepa, son catalasa positivas y además quimio organotróficas, son psicrotróficas y pueden crecer a 5 °C aunque su temperatura óptima es entre 10 y 25 °C. (Ray, 1996; Holt y col., 1993).

Algunas cepas de *Pseudomonas* se han utilizado frecuentemente en reacciones de biotransformación ya que tienen la habilidad de romper oxidativamente los enlaces C-C y C-O (Hui y Khachatourians, 1995). Son capaces de metabolizar una amplia variedad de carbohidratos, proteínas y lípidos en alimentos, pero principalmente en carne y pescado producen proteinasas y lipasas extracelulares que son estables térmicamente; por lo que las *Pseudomonaceae* son relevantes en los procesos de conservación de alimentos y constituyen puntos de riesgo en programas de calidad de acuerdo con HACCP.

### II.1.1.3. *Lactobacillus* sp.

Varían ampliamente en cuanto a forma y tamaño, algunos pueden ser muy largos otros pueden ser cocobacilares, pueden estar solos o en cadenas cortas o largas (Foto 11). Los *Lactobacillus* se encuentran ubicados dentro del grupo de los gram positivos no esporulados con forma de bastones. Son anaerobios facultativos, la mayoría de las especies no son móviles, en general son mesofilicas aunque algunas son psicrotrofas, pueden ser homo o hetero fermentadores lácticos (Tabla 5). Pueden crecer



Foto 11. Microfotografía de barrido de *Lactobacillus plantarum*. WSO. Escala bar = 1µm (Hui y Khachatourians, 1995)

a pH entre 3.5 hasta 5 (Ray, 1996; Hui y Khachatourians, 1995). Algunas especies pueden crecer a bajas temperaturas en productos almacenados a temperatura de refrigeración (*L. sake*, *L. curvatus*). Se encuentran en plantas, leche, carne, heces y también forman parte de la flora de productos acuícolas. Muchos son usados en bioprocesos alimenticios (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. plantarum*) y algunos son usados como probióticos (*L. acidophilus*, *L. reuteri*, *L. casei* subsp. *casei*). Diversas cepas producen bacteriocinas, que se pueden usar como bioconservadores de alimentos al impedir el crecimiento de otros microorganismos (*Lactobacillus pentosus*) (Davison y Branen, 1993).

**Tabla 5.** División de las especies de *Lactobacillus* en grupos (Ray, 1996).

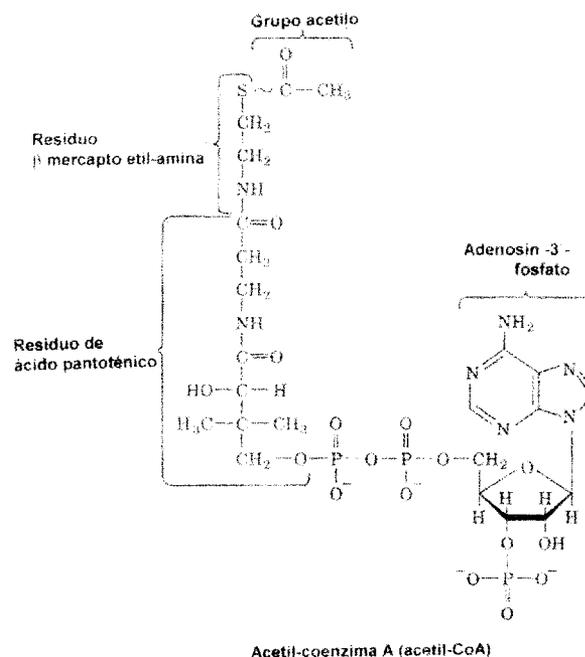
CARACTERÍSTICAS	Grupo I	Grupo II	Grupo III
Designación previa	Thermobacterium	Streptobacterium	Betabacterium
Carbohidratos patrón de fermentación	Obligado homofermentativo	Facultativo heterofermentativo	Obligado heterofermentativo
Productos finales de la fermentación de carbohidratos	Lactato	lactato, acetato, etanol, CO <sub>2</sub> , formato	Lactato, acetato, etanol , CO <sub>2</sub>
Fermentación de las pentosas	negativo	positivo	positivo
Especies representativas	<i>L. delbrueckii</i> subsp. : <i>delbrueckii</i> : <i>bulgaricus</i> : <i>lactis</i> <i>L. leichmannii</i> <i>L. acidophilus</i> <i>L. helveticus</i>	<i>L. casei</i> subsp. : <i>casei</i> : <i>rhamnosus</i> : <i>pseudoplantarum</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. curvatus</i> <i>L. saque</i>	<i>L. fermentum</i> <i>L. divergens</i> <i>L. kefir</i> <i>L. confusus</i> <i>L. brevis</i> <i>L. sanfrancisco</i> <i>L. reuteri</i>

## II.2. Metabolismo celular

El crecimiento rápido de los microorganismos, una vez que se han adaptado al alimento, se debe al acoplamiento de reacciones bioquímicas consecutivas y de transferencia de electrones ejecutadas por las enzimas. El metabolismo celular es la globalidad de procesos dirigidos enzimáticamente mediante los cuales las células utilizan la energía que ellas mismas generan en forma de ATP.

Los organismos vivos no están en equilibrio, para su rápido crecimiento requieren permanentemente el flujo del compuesto más importante a nivel biológico conocido como ATP para mantener funcionando en orden su sistema bioquímico. Este compuesto energético es derivado del ácido fosfórico y derivados de ácidos carboxílicos. El ATP se forma a partir del adenosin mono fosfato (AMP), mediante reacciones acopladas entre la fosforilación oxidativa del sustrato o fuente de carbono y, también se puede generar por otro proceso conocido como la quimiósmosis.

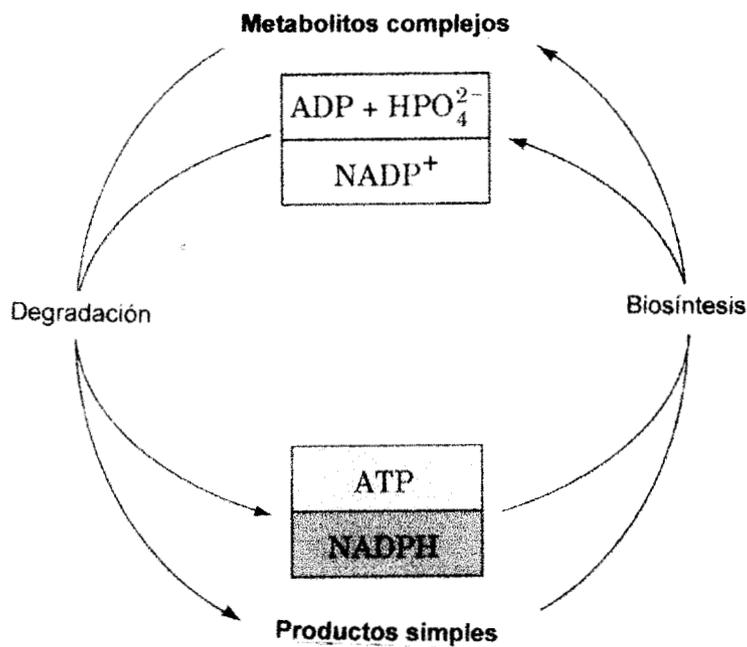
Una característica del metabolismo degradativo es que convierte un gran número de sustancias diversas (carbohidratos, lípidos y proteínas) a intermediarios comunes. Luego estos intermediarios son metabolizados en una ruta oxidativa central que genera pocos productos finales y después a un intermediario común, acetyl - coenzima A (Figura 2); seguido por la oxidación del grupo acetilo hasta  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  por acciones secuenciales del ciclo del ácido cítrico, cadena de transporte de electrones y fosforilación oxidativa. En un sistema alimenticio los sustratos metabolizables son principalmente



**Figura 2.** Estructura química de la Acetil coenzima A. El enlace tioéster de “alta energía” se indica con un segmento curvo; el grupo acetil es reemplazado por hidrógeno (Voet y Voet, 1995).

los carbohidratos, proteínas y lípidos. Los microorganismos en alimentos se consideran heterotrofos y por otro lado, también son quimio-organotrofos usando compuestos orgánicos como donadores de electrones para generar energía (Voet y Voet, 1995; Campbell y col., 1993; Colby, 1987).

Las rutas de las reacciones biológicas se agrupan en dos categorías: las de degradación o de catabolismo y las de biosíntesis o anabolismo (Figura 3). En las rutas catabólicas, los metabolitos complejos son desdoblados exergónicamente hasta productos



**Figura 3.** Rutas catabólicas. El ATP y NADPH son las fuentes de energía libre de reacciones biosintéticas. Ellas son generadas entre la degradación de metabolitos complejos y utilizadas en las diversas funciones biológicas (Voet y Voet, 1995).

simples. Las enzimas son de importancia central en la secuencia complicada de eventos que conducen al crecimiento, maduración, almacenamiento y procesos de transformación de materiales biológicos. Cualquier alteración en el comportamiento normal de las enzimas de un microorganismo puede tener consecuencias de funcionamiento y por lo tanto afectar el desarrollo celular (Voet y Voet, 1995; Campbell y col., 1993).

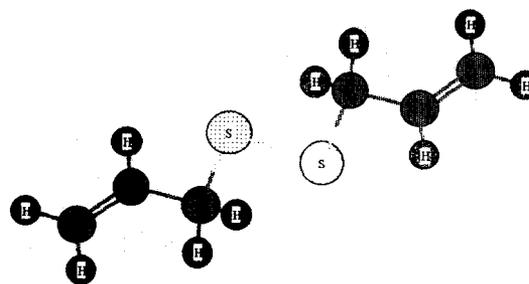
## II.2.1. Mecanismos de acción de aceites esenciales del género *Allium* sobre microorganismos



**Figura 4.** Acción de un inhibidor enzimático. Puede ser reversible o irreversible y depende del tipo de uniones que establezca con la enzima. Es irreversible cuando se genera un enlace covalente, con fuerzas electrostáticas es reversible (Voet y Voet, 1995; Campbell, 1993).

Cualquier compuesto que reduce la velocidad de reacción del metabolismo celular es un inhibidor de enzimas (Figura 4). Se ha comprobado que la cebolla (*Allium cepa*) y el ajo (*Allium sativum*) inhiben la actividad metabólica en microorganismos según la concentración (Whitaker, 1995; Rees y col., 1989; Shashikant y col., 1988; Vries y Klasen, 1979).

En los vegetales del género *Allium* los principales compuestos encontrados en sus aceites esenciales son de naturaleza azufrada. Por poseer estos compuestos dos pares de electrones libres en cada uno de los átomos de azufre cuando forman enlaces sigma (Figura 5), presentan un orbital híbrido de tipo  $SP^3$  (Pierce, 1986), además pueden establecer puentes de hidrógeno. Como inhibidores, son específicos a través de sus grupos tiol o mercapto y modifican el balance de óxido reducción. Hay teorías a nivel celular y mecanismos propuestos en el bloqueo del metabolismo celular, en los que se tiene como común denominador al azufre y su química.



**Figura 5.** Dialil disulfuro o Alicina. Sustancia azufrada, inhibidor enzimático del metabolismo celular. Compuesto más abundante en el aceite esencial de ajo.

La Tabla 6, recopila algunas de las enzimas celulares inhibidas por la alicina encontrada en ajo, así como las referencias donde se reporta.

**Tabla 6.** Algunas enzimas inhibidas por la alicina encontrada en el ajo (*Allium sativum*)

ENZIMA	REFERENCIAS
Acetato kinasa	Focke y col., 1990.
Acetil CoA ligasa	Zollner, 1993.
Acetil Co A sintetasa	Focke y col., 1990.
Alcohol dehidrogenasa	Zollner, 1993.
$\beta$ -hidroxi-decanoil tioester dehidrasa	Weete, 1980.
Colin esterasa	Zollner, 1993.
Colin oxidasa	Zollner, 1993.
Exokinasa	Zollner, 1993.
Fosfatasa alcalina	Zollner, 1993.
Fosfo trans acetilasa	Focke y col., 1990.
Glioxilasa	Zollner, 1993.
Glutation reductasa	Zollner, 1993; Davison y col. 1993; Voet y col 1995.
L- lactato deshidrogenasa	Zollner, 1993.
Papaína	Zollner, 1993.
Sulfhidril reductasa	Davison y col., 1993.
Succinato deshidrogenasa	Zollner, 1993.
Superóxido dismutasa	Zollner, 1993.
Triosa fosfato deshidrogenasa	Zollner, 1993.
Ureasa	Zollner, 1993.
Xantin oxidasa	Sklan y col., 1992.

La Tabla 7 presenta un compendio del espectro de acción de ajo y cebolla sobre diversos microorganismos.

**Tabla 7.** Espectro de acción del ajo (*Allium sativum*) y cebolla (*Allium cepa*) reportados en microorganismos.

MICROORGANISMO	CARACTERÍSTICAS DEL EXTRACTO	CANTIDAD	EFEECTO	REFERENCIAS
<i>Aspergillus flavus</i>	extracto de cebolla	-	-	Sharma y col., 1979.
<i>Aspergillus parasiticus</i>	ajo	0.3-0.4 %	inhibe el crecimiento y la producción de aflatoxina	Graham y Graham, 1987.
<i>Bacillus cereus</i>	acuoso en placas de agar	3 %	germicida 31.3%	Saleem y Al-Delaimi, 1982.
<i>Bacillus cereus</i>	acuoso en placas de agar	5 %	germicida 58.2 %	Saleem y Al-Delaimi, 1982.
<i>Bacillus cereus</i>	acuoso en placas de agar	10 %	germicida 100 %	Saleem y Al-Delaimi, 1982.
<i>Bacillus typhosus</i>	aceite de ajo extraído en alcohol etílico	-	altamente inhibitorio	Cavallito y col., 1945.
<i>Bacillus subtilis</i>	cebolla y ajo deshidratado y reconstituido	-	altamente inhibitorio	Abdou y col., 1972.
<i>Bacillus typhosus</i>	aceite esencial de ajo	1:125000	parcialmente inhibitorio	Cavallito y col., 1945.
<i>Bacillus dysenterae</i>	aceite esencial de ajo	1:125000	parcialmente inhibitorio	Cavallito y col., 1945.
<i>Bacillus enteritidis</i>	aceite esencial de ajo	1:125000	inhibitorio	Cavallito y col., 1945.
<i>Candida albicans</i>	jugo de ajo	1:512	inhibida	Tynecka y Gos., 1973.
<i>Candida albicans</i>	jugo de ajo	1:256	destruida	Tynecka y Gos., 1973.
<i>Candida albicans</i>	extracto acuoso	1:1024	inhibida	Moore y Atkins, 1977.
<i>Candida albicans</i>	extracto acuoso	0.4 mg/ml	ligeramente inhibida	Mahmoud y Ghannoum, 1988.
<i>Candida albicans</i>	extracto acuoso	0.8 mg/ml	inhibida	Mahmoud y Ghannoum, 1988.
<i>Candida albicans</i>	extracto acuoso	1.6 mg/ml	inhibida	Mahmoud y Ghannoum, 1988.
<i>Candida albicans</i>	con extracto acuoso de ajo al 15 %	-	completamente inhibida	Kabelik, 1970.
<i>Candida utilis</i>	-	-	fuertemente inhibitorios	Barone y Tansey, 1977.
<i>Criptococcus</i>	extracto acuoso	1:1024	inhibidas	Moore y col., 1977.
<i>Clostridium botulinum</i>	-	-	-	-
Tipo A	aceite de ajo	1500 µg/g de carne fresca	inhibió toxinas	De wit y col., 1979.
Tipo B	aceite de ajo	1500 µg/g de carne fresca	inhibición completa	De wit y col., 1979.
Tipo E	aceite de ajo	1500 µg/g de carne fresca	no fue inhibido	De wit y col., 1979.
<i>Clostridium perfringes</i>	acuoso en medio de cultivo	5 %	fuertemente inhibitorio	Mantis y col., 1978.
<i>Escherichia coli</i>	cebolla y ajo deshidratado y reconstituido	5 % W/vol	actividad bactericida	Johnson y Paiza, 1989.
<i>Escherichia coli</i>	cebolla y ajo deshidratado y reconstituido	5-10 % W/v	máxima actividad bactericida	Johnson y Paiza, 1989.
<i>Escherichia coli</i>	jugo de ajo	1:128	inhibida	Tynecka y Gos, 1973.
<i>Escherichia coli</i>	jugo de ajo	1.64	muerta	Tynecka y Gos, 1973.
<i>Escherichia coli</i>	extracto de ajo	3 %	concentración inhibitoria mínima	El-khateib y col., 1989.
<i>Lactobacillus plantarum</i>	acuoso en medio de cultivo	más de 1 %	inhibitorio	Karaioannoglou y col., 1977.
<i>Lactobacillus plantarum</i>	acuoso en medio de cultivo	2 %	germicida	Karaioannoglou y col., 1977.
<i>Lactobacillus plantarum</i>	acuoso en medio de cultivo	5 %	germicida	Karaioannoglou y col., 1977.
<i>Proteus vulgaris</i>	extracto de ajo	2.2 %	inhibitoria	El-khateib y col., 1989.
<i>Proteus vulgaris</i>	extracto de cebolla	2.5 %	inhibitoria	El-khateib y col., 1989.
<i>Pseudomonas pyocaneus</i>	cebolla y ajo deshidratado y reconstituido	-	altamente inhibitorio	Abdou y col., 1972.

Tabla 7 (continuación)

MICROORGANISMO	CARACTERÍSTICAS DEL EXTRACTO	CANTIDAD	EFECTO	REFERENCIAS
<i>Rhodotorula</i>	extracto acuoso	1:1024	inhibidas	Moore y col., 1977
<i>Salmonella typhi</i>	jugo crudo y extractos con solventes de ajo y cebolla	-	altamente inhibitorio	Abdou y col., 1972
<i>Salmonella typhimurium</i>	alicina (ajo)	0.5mM	inhibitorio	Feldberg y col., 1988.
<i>Salmonella typhimurium</i>	extracto de ajo	3 %	inhibitorio	El-khateib y col., 1989.
<i>Sarcinia lutea</i>	extracto de ajo	5 %	inhibitorio	El-khateib y col., 1989.
<i>Sarcinia lutea</i>	extracto de cebolla	más de 20 %	inhibitorio	El-khateib y col., 1989.
<i>Staphylococci sp.</i>	aceite esencial	1:125000	inhibitorio	Cavallito y col., 1945.
<i>Staphylococcus aureus</i>	extracto de ajo	2.2 %	inhibitorio	El-khateib y col., 1989.
<i>Staphylococcus aureus</i>	extracto de cebolla	más de 20 %	inhibitorio	El-khateib y col., 1989.
<i>Staphylococcus aureus</i>	acuoso en medio de cultivo	5 %	germicida	Mantis y col., 1978.
<i>Staphylococcus aureus</i>	acuoso en medio de cultivo	2 %	inhibitorio	Mantis y col., 1978.
<i>Staphylococcus aureus</i>	acuoso en medio de cultivo	1 %	no inhibitorio	Mantis y col., 1978.
<i>Staphylococcus aureus</i>	extracto de ajo	1:256	antimicrobiano potente	Tynecka y Gos., 1973
<i>Staphylococcus aureus</i>	extracto de ajo	1 %	inhibe	Dababneb y Al-Delaime, 1984.
<i>Streptococcus sp</i>	aceite esencial	1:125000	inhibitorio	Cavallito y col., 1946.
<i>Streptococci sp.</i>	aceite esencial	1:125000	inhibitorio	Cavallito y col., 1946.
<i>Staphylococcus typhimurium</i>	cebolla y ajo deshidratado y reconstituido	1 %	actividad bactericida	Johnson y Paiza, 1989.
<i>Torulopsis</i>	extracto acuoso	1:1024	inhibidas	Moore y col., 1977.
<i>Trichosporum</i>	extracto acuoso	1:1024	inhibidas	Moore y col., 1977.
<i>Vibrio cholerae</i>	aceite esencial de ajo	1:125000	inhibidas	Cavallito y col., 1945.
<i>Trichosporon</i>	extracto acuoso	1:1024	inhibidas	Moore y col., 1977.

### II.3. Antecedentes históricos y medicina folklórica

Cebollas y ajos han sido parte de la alimentación desde hace más de 3200 años a. C. y han sido citados como un importante alimento básico en la Biblia y el Corán, así como en murales egipcios que datan de la época de construcción de las pirámides. Los griegos y romanos escribieron sobre estos vegetales 400-300 años antes de nuestra era, en el norte de Europa al inicio de la Edad Media fueron populares (Foto 12) (Hale, 1998).

El ajo es una semilla antigua con origen en Asia central. Fue crecida y cultivada en Egipto 2700-2100 años a. C. durante la construcción de las pirámides (Schawrtz y Mohan, 1995). Excavaciones arqueológicas en tumbas egipcias, han demostrado que ajos y cebollas se utilizaban con la convicción de sazonar alimentos en otras vidas (Block, 1985).

Las propiedades medicinales fueron revisadas en un tratado médico de la India por Charaka-Samhita alrededor de 2000 años atrás. El Códice Ebers, un papiro egipcio, atribuido a un médico del mismo nombre, que data de 1550 años a. C. proporciona más de 800 fórmulas terapéuticas, de las cuales 22 mencionan al ajo como un remedio efectivo para una variedad de enfermedades que incluyen problemas cardiacos, dolor de cabeza, picaduras, lombrices y tumores. Los griegos, como Aristóteles, Hipócrates y Aristófanes recomendaron el ajo por su efecto medicinal contra enfermedades respiratorias, del corazón, picaduras

de insectos, etc. Plinio, naturalista romano, citó numerosos usos terapéuticos para las cebollas y ajos. Dioscórides, jefe físico de la armada romana en el primer siglo d. C. prescribió al ajo como un vermífugo o un expeledor de lombrices. En la India, el ajo se ha usado como una loción antiséptica en el lavado de heridas y úlceras. En China, el té de cebolla ha sido ampliamente utilizado para controlar o bajar la fiebre, dolor de cabeza, cólera y disentería. Luis Pasteur en 1858, reportó que el ajo poseía propiedades antimicrobianas. A finales del siglo XIX, Albert Schweitzer usó ajo para el tratamiento de disentería amébrica en Africa (Carson, 1987; Block, 1985).



Foto 12. Ilustración del siglo XIV da muestras de la profusión del uso de ajo con fines medicinales, cuando no como bulbo comestible, en aquella época (Hale, 1998).

### II.3.1. Antecedentes medicinales sistemáticos de ajos y cebollas

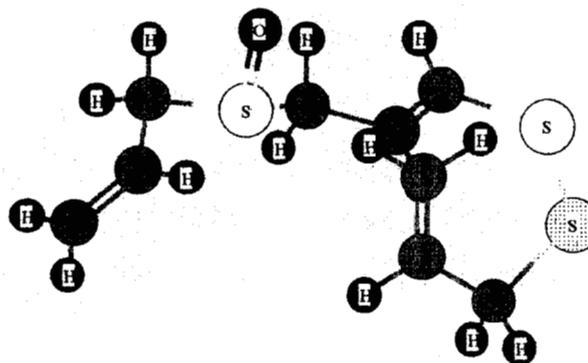
Los primeros estudios científicos sobre la composición y mecanismo de acción metabólica de las especies *Allium* o de ajo y cebolla datan de mediados del siglo XX. Muller y Virtanen en 1965 experimentaron con el producto de síntesis de la tiamina y el ajo (alil L-tiamina) y con la tiamina y cebolla (tiamina propil disulfuro), y encontraron que son más fácilmente absorbidos en el intestino que la tiamina por sí misma. En el mismo estudio se encontró que los compuestos analizados fueron efectivos, según la dosis, contra el envenenamiento de HCN. También se observó que la tiamina propil disulfuro en combinación con la vitamina B<sub>6</sub> promovió la acción de la rodanasa del hígado y contribuyó a la respiración normal del mismo órgano. Otras investigaciones se enfocaron al estudio del efecto de cebolla o extractos de cebollas en los niveles de azúcar en sangre, investigaron el efecto hipoglucémico de extractos de cebolla sobre ratas, conejos y humanos (Mathew y Augusti, 1975; Augusti, 1975; Augusti y Benaim, 1975). Augusti y Mathew (1975), encontraron que el suministro de aceite de cebolla en 6 voluntarios normales, después de 6 horas, causó una disminución significativa en los niveles de glucosa sanguínea y elevó los niveles de insulina sérica durante las 4 horas subsecuentes. Por lo que concluyeron que puede ser efectivo en el tratamiento de la diabetes.

A mediados de la década de los 70's Sharma y col. (1975), Sharma (1974), Augusti (1977) comprobaron que el jugo de cebolla al ser probado sobre conejos alimentados durante 24 semanas con dietas altas en colesterol, revierte los niveles elevados del lípido sérico y plasma fibrinógeno e incrementan la actividad fibrinolítica, lo cual disminuye la agregación plaquetaria que se vincula con enfermedades coronarias. Vatsala y Singh (1980) y Vatsala y col.(1980) estudiaron el efecto de dietas altas en colesterol sobre los eritrocitos de conejos y observaron que los eritrocitos fueron deformados de manera dentada y hubo una consecuente agregación. La adición del extracto de cebolla en la dieta, suprimió completamente el cambio de las pronunciadas deformaciones, los conejos alimentados con dietas altas en colesterol incrementaron los

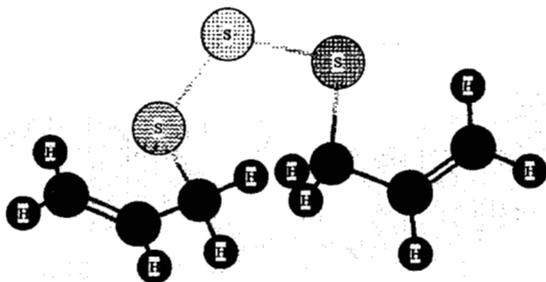
niveles de glutamato fosfatasa, oxalo acetato transaminasa y glutamato piruvato transaminasa. También, Weisenberger y col. (1972) reportaron la inhibición de plaquetas mediante cebolla. Bailey y col., (1979) así como Makheja y col., (1979) además de estudiar el efecto de la agregación de plaquetas, añadieron la síntesis de tromboxanos; y encontraron que al ser incubadas en presencia de cebolla y ácido araquidónico, como inhibidores, hubo un cambio notable en el patrón de los metabolitos de ácido araquidónico y la síntesis de tromboxanos B<sub>2</sub> fue completamente suprimida (Block y Zhao, 1992). Vatsala y Singh (1980) demostraron que al incubar eritrocitos en medio enriquecido con colesterol y extracto de cebolla, disminuyeron los niveles de colesterol de la membrana celular. Otros reportes indican la reducción de colesterol de hígado de ratas y perros cuando fueron alimentados con dietas que contenían ajo y cebolla (Kritchevsky, 1991; Bobboi y col., 1984; Chi, 1982; Chi y col. 1982).

Leung y Foster (1996) reportan otros efectos fármaco-biológicos de los aceites esenciales de ajo y cebolla, en los que se mencionan efectos hipoglucémicos en conejos y humanos disminución del colesterol sérico, disminución de triglicéridos y del colesterol lipoprotéico total de baja densidad, así como propiedades hipotensivas en humanos y animales. En estudios piloto en 10 pacientes con SIDA los mismos autores reportan que el extracto de ajo ayudó a mejorar las condiciones de salud al disminuir el número de células infectadas, con el consecuente mejoramiento en los cuadros clínicos.

Block y col. (1984) estudiaron el efecto de dos compuestos obtenidos a partir de la alicina del aceite esencial de ajo en la agregación de plaquetas y reportaron que el ajoeno (Figura 6) y el dialil-trisulfuro (Figura 7) fueron potentes agentes antitrombóticos, y también encontraron que inhiben la agregación de plaquetas humanas. Estos estudios fueron confirmados



**Figura 6.** Ajoeno, estructura química, 2-vinil-4H1,3-ditiina. No CAS [92285-01-3] 2-Propenil 3-(2-propenilsulfinil)-1-propenildisulfuro 4,5,9-tritio-1,6,11 dodecatieno 9-óxido [92284-99-6, 92285-00-2] Reportado por Block y col. en 1984 a partir de alicina calentando en acetona-agua.



**Figura 7.** Diallyl trisulfuro. Estructura química  $H_2CCHCH_2SSSCH_2CHCH_2$

tratamiento de arteroesclerosis, trombosis coronaria e infarto (Pszczola, 1998; Leung y Foster, 1996).

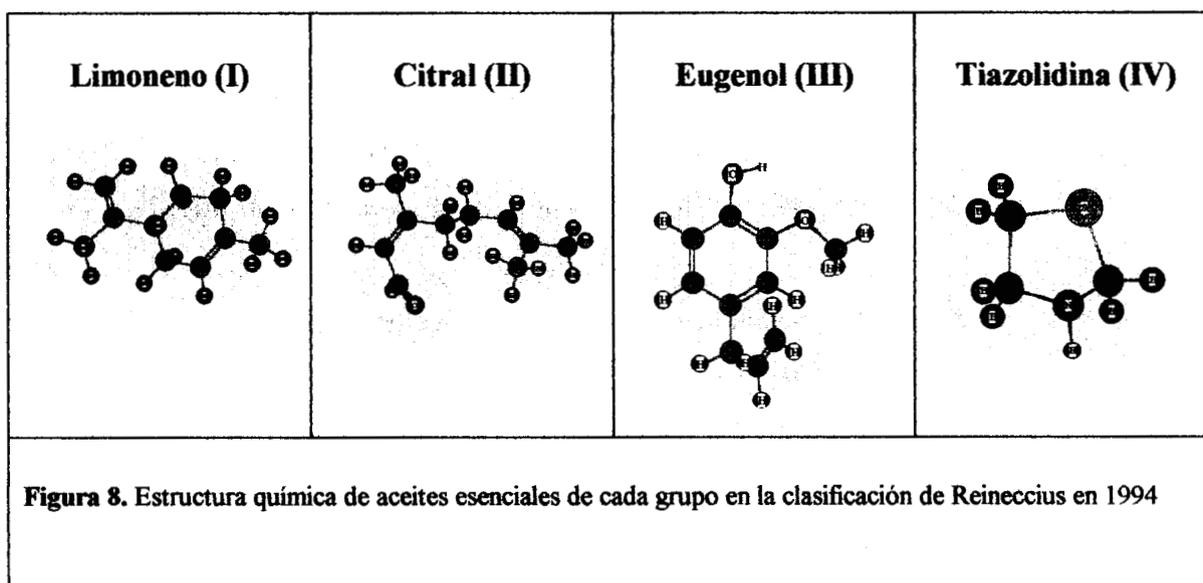
Pan (1985) examinó el efecto citotóxico de ajo fresco, dialil trisulfuro, 5-fluoro uracilo, en dos líneas de células cancerígenas gástricas, todas mostraban efectos tumorocidales. El orden de actividad de las tres sustancias fue dialil trisulfuro mayor que 5-fluoro uracilo y mucho mayor que ajo fresco. Recientemente, se conocen otros trabajos realizados en cáncer por Block y col. (1994), Ruiz y col. (1994) e Ip (1992), todos estos estudios mostraron resultados positivos en cuanto a la inhibición en el desarrollo de la enfermedad. Por otra parte, Koch y col. (1989) mencionaron aplicaciones terapéuticas para el ajo.

También se sabe que el ajo y la cebolla es larvicida e insecticida, presenta actividades amebicidas, antihepatotóxico en ratas, antimicótico, es espectorante, es diaforético y tiene propiedades diuréticas y actúa como relajante del músculo intestinal, (Gurusubramanian y Krishna, 1996; Leung y Foster, 1996).

independientemente por Sharma y Nirmala (1985). Del mismo estudio, los conejos alimentados diariamente con 20 mg de (Cis y Trans)-ajoeno/kg de peso, mostraron un 100% de inhibición de la agregación de plaquetas por un periodo de 24 horas, en otros términos, encontraron que disminuye la viscosidad de la sangre y se mejora la microcirculación, y también, encontraron que lo convierte en sustancia potencial para el

#### II.4. Generalidades químicas de los aceites esenciales

Químicamente, los volátiles presentes en aceites esenciales son mezclas de lípidos de bajo peso molecular y se agrupan en: terpenos o hidratos de carbono de fórmula general  $(C_5H_8)_n$  como el limoneno (I), derivados oxigenados de estos hidrocarburos como el citral (II), compuestos aromáticos que tienen una estructura benzóica tal como el eugenol (III) y compuestos que contienen nitrógeno y/o azufre como la tiazolidina (IV) (Figura 8) (Reineccius, 1994).



En los vegetales del género *Allium*, como la cebolla (*Allium cepa*) y el ajo (*Allium sativum*), los principales compuestos encontrados en sus aceites esenciales son de naturaleza azufrada (Albrand y col., 1980; Boelens y col., 1971; Brodnitz y col., 1969; Cavallito y Bailey, 1944). Los aromas y sabores frescos de ajos y cebollas y otros miembros del género son producidos por descomposición enzimática de S-alquil y S-propenil tiosulfonato, pequeñas cantidades de derivados correspondientes como el metil y propil están presentes, aunque estos compuestos son convertidos a disulfuros, trisulfuros y compuestos más complejos que contienen azufre (Carson, 1987).

## II.5. El género *Allium*

Este género ha sido clasificado dentro de las *Amarillidaceae*, las *Lilliaceae*, o las distintas familias *Alliaceae* que incluyen a varias especies económicamente importantes: las de bulbo cebolla (*Allium cepa* L.), las estrechamente relacionadas de tallo (*A. cepa* L. var. *ascalonicum* Backer), cebolla de papa (*A. cepa* L. Var. *aggregatum* Don), cebolla en racimos (*A. fistulosum* L.), cebollín (*A. schoenoprasum* L.), cebollín chino (*A. tuberosum*), ajo (*A. sativum* L.) y puerro (*A. ampeloprasum* L. var. *porrum* (L.) [sin. *A. porrum* L.]). Las anteriores son algunas de por lo menos 18 especies que se consumen como vegetales frescos, en vinagre o se usan como saborizantes. Algunas especies de *Allium*, incluida *A. giganteum* Regel, *A. moly* L., y *A. caer* Pali, se usan como plantas de ornato. *A. vineale* L. es utilizado como alimento de pasturas. (Schawrtz y Mohan, 1995).

## II.6. Generación y extracción de los compuestos volátiles en *Allium*

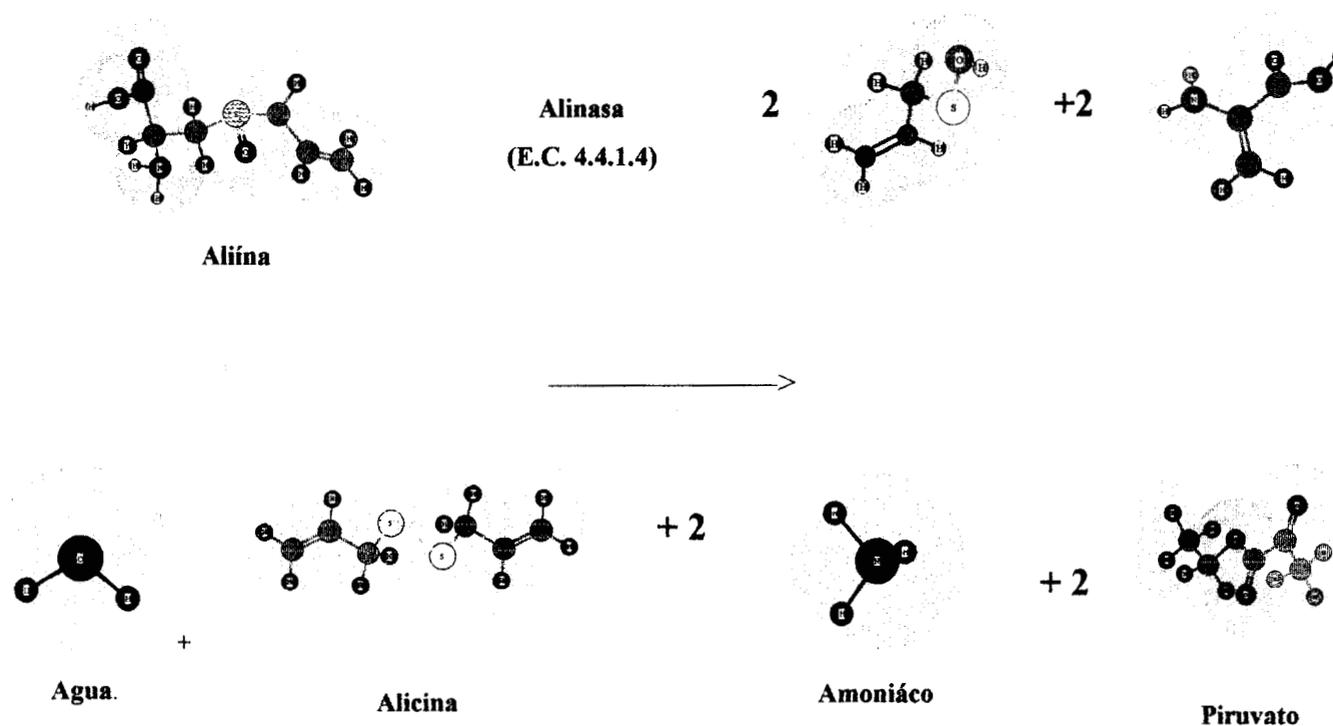
Los compuestos encontrados en los aceites esenciales dependen fundamentalmente del método de extracción (Sass, 1998). Una revisión realizada por Block (1985) incluye la destilación realizada por Theodor Wertheim químico alemán que en 1844 fue el primero en obtener una sustancia de ajo por destilación con arrastre de vapor y encontró que lo característico del olor y sabor del ajo se debía a la presencia de un líquido que contenía azufre al que llamó aceite de ajo y propuso el nombre de alil (de *Allium*) para el grupo de hidrocarburos en el aceite y “scwefelallyl” (alisulfuro en español) se refiere, según él, a grupos de estructura  $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-$ , o en forma más corta  $\text{C}_3\text{H}_5$ . En 1892, otro químico alemán, Semmler, aplicó destilación de vapor a los dientes de ajo, y obtuvo dialil disulfuro  $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{S}_2$   $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{SSCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ , acompañado de menores cantidades de dialil trisulfuro y dialil tetrasulfuro.

El siguiente descubrimiento en la química del ajo y la cebolla fue hecho por Cavallito y col. (1944), empleando un método menos drástico que la destilación. Estos autores utilizaron una extracción con alcohol etílico (4 kg de ajos) a temperatura ambiente y obtuvieron 6 g de un aceite; cuya fórmula fue  $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{SO}$  al que llamaron

alicina y encontraron que era químicamente inestable. La Tabla 8 y la Figura 9 presentan la forma como se genera la alicina a partir de dos moléculas de aliina.

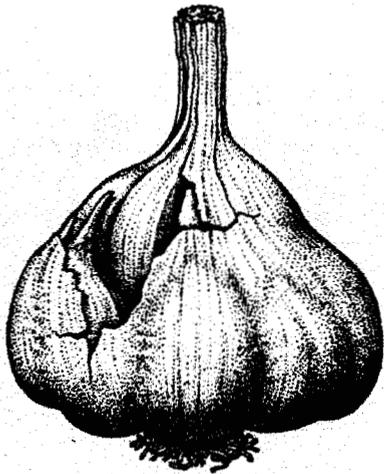
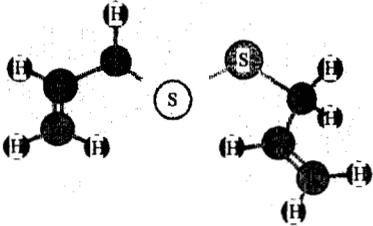
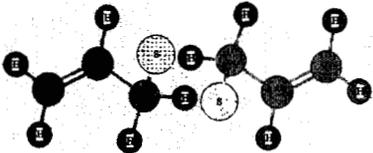
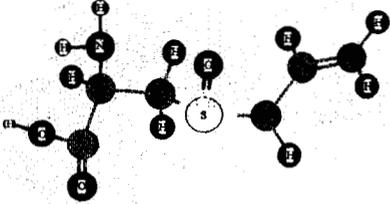
**Tabla 8.** Generación de algunos compuestos volátiles azufrados en ajo (Maarse, 1991; Beuchat y col., 1989; Whitaker, 1975).

PRECURSORES	SUSTRATO	ENZIMA	PRODUCTOS
(+) - S - alil (+) - S - metil (+) - S - propil	L - cistein sulfóxido	alinasa E.C. 4.4.1.4	Trans -(+) - S- (1 propenil - L - cistein sulfóxido (alicina) + ácido pirúvico + amoniaco

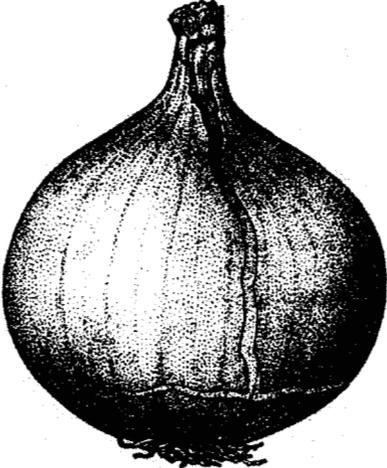
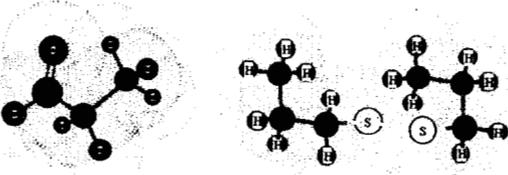
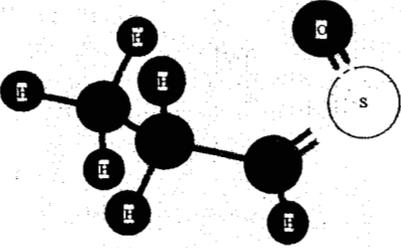
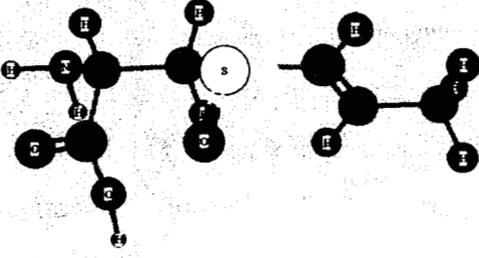


**Figura 9.** Formación de la alicina a partir de aliina por la acción de la alinasa. Reacción estequiométrica (Webb, 1992; Focke y col., 1990; Block, 1985; Freeman, 1975; Cavallito y col., 1945).

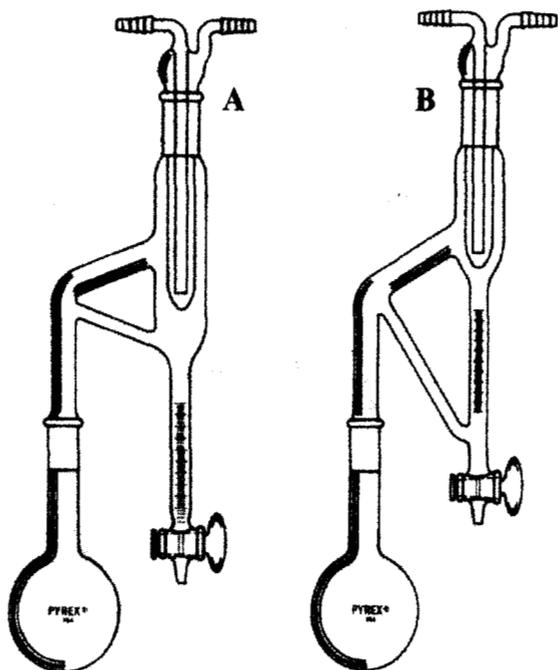
En forma natural, el principal precursor de los compuestos azufrados en ajo y en general en las especies *Allium* es el aminoácido S-(2-propenil)-L-cistein-S-óxido (aliína), el cual por acción de la enzima alinasa (E.C. 4.4.1.4); localizada en diferentes compartimientos de la célula y favorecida por el rompimiento de los precursores glucosídicos no volátiles al contacto con el oxígeno, produce 2-propenil 2-propenetioli sulfonato (alicina), el cual es el principal producto aromático del ajo, y también S-metil y S-propil-L-cistein-S-óxidos, piruvato y amonio (Schawrtz y Mohan, 1995; Whitfield y Last, 1991; Focke y col., 1990; Beuchat y Golden, 1989; Whitaker, 1975; Cavallito y Bailey, 1944). La Figura 10 presenta compuestos extraídos del ajo con diferentes métodos.

	Tratamiento	Resultado
 <p data-bbox="265 1676 690 1800"><b>Figura 10.</b> Compuestos azufrados extraídos de ajo (<i>Allium sativum</i>) por diversos métodos (Djerassi, 1994; Yu y col. 1989; Block, 1985).</p>	<p data-bbox="778 906 872 974"><b>vapor</b> <b>100 ° C</b></p>	 <p data-bbox="1034 1183 1339 1236"><b>DIALIL DISULFURO, ALIL DISULFURO</b></p>
	<p data-bbox="720 1251 931 1357"><b>alcohol etílico y</b> <b>agua</b> <b>25 ° C</b></p>	 <p data-bbox="1133 1530 1240 1555"><b>ALICINA</b></p>
	<p data-bbox="733 1634 918 1740"><b>alcohol etílico</b> <b>por abajo de</b> <b>0 ° C</b></p>	 <p data-bbox="1141 1859 1232 1885"><b>ALIÍNA</b></p>

Los precursores de la cebolla son (+) S-metil, (+) S-propil y (+) S-propil y S-(1-propenil) l-cistein-S-óxido en el que el aminoácido cisteína es predominante. La descomposición enzimática de los derivados del propenil produce la sustancia lacrimógena transitoria, el tiopropanal S-óxido. Aunque los tiosulfatos se descomponen para producir una mezcla de disulfuros y trisulfuros que contienen grupos metil, propil y 1-propenil y pequeñas cantidades de derivados de tiofenos y otros grupos cíclicos (Carson, 1987). La Figura 11 presenta los diferentes constituyentes obtenidos a partir de cebolla y tres métodos diferentes de extracción.

	Tratamiento	Resultado
	<p>vapor 100 °C</p>	 <p>PROPIONALDEHÍDO + DIPROPIL DISULFURO</p>  <p>(TIOPROPANAL-S-ÓXIDO) FACTOR LACRIMÓGENO</p>
<p>Figura 11. Compuestos azufrados extraídos de la cebolla, el factor lacrimógeno es un isómero estructural de la aliína (Block, 1985; Becker y Schuphan, 1975).</p>	<p>freón y agua a 0° C</p>	 <p>PRECURSOR LACRIMÓGENO</p>
	<p>alcohol etílico por debajo de 0 °C</p>	

### II.6.1. Principios del proceso de extracción por arrastre de vapor en condiciones de vacío estándar



**Figura 12.** Representación esquemática de los destiladores de aceites esenciales por arrastre de vapor en condiciones de vacío estándar. Consta de tres partes, dedo refrigerante en la parte superior, cuerpo del destilador y matraz para contener la muestra (Catálogo de Corning Glassware, 1995).

La destilación, termodinámicamente, involucra cambios de estado en la muestra (de líquido a vapor y de vapor a líquido) de sustancias no miscibles con diferentes puntos de ebullición (agua y aceite) así como un cambio en la presión al generarse vacío en condiciones estándares de presión atmosférica (en la Ciudad de México 560 mm de Hg). Una vez que inicia el ascenso de la temperatura de la muestra y el destilador se eleva la presión en el interior del sistema generando salida de gases, que no son condensados por el dedo refrigerante, principalmente aire, a través de la junta de unión con el cuerpo del destilador.

Cuando inicia la ebullición, los vapores que se condensan caen por el tubo comunicante del cuerpo del destilador mismo

que se llena de aceite y agua, se inicia así el reflujo. Se recomienda dejarlo de 60 a 90 minutos antes de apagar el control de temperatura. La Figura 12 presenta dos destiladores para la extracción de aceites por arrastre de vapor utilizados para extraer aceites esenciales más y menos densos que el agua respectivamente. Termodinámicamente ambos tienen el mismo funcionamiento, su diferencia radica en la posición e inclinación del tubo comunicante que conecta al tubo en el que se aloja el aceite esencial colectado. Para el caso de los aceites más densos que el agua (A) este se llena desde la parte inferior (escala graduada hacia arriba) y el caso contrario (B) para los menos densos (escala graduada hacia abajo).

## II.7. Análisis de compuestos presentes en aceites esenciales de ajo y cebolla

### II.7.1. Fundamento y determinación por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

La cromatografía de gases es una técnica instrumental con alto poder para resolver la separación de mezclas complejas de compuestos que pueden ser volatilizadas. Los compuestos se separan según la afinidad que tengan por una fase estacionaria cuando son transportados por un gas conocido como fase móvil. Al acoplar un espectrómetro de masas al cromatógrafo, se genera una huella digital conocida como

espectro de masas de cada una de las sustancias separadas en el cromatógrafo. La Figura 13 resume el principio general de funcionamiento del espectrómetro de masas. El espectro de masas contiene información sobre los iones generados durante la fragmentación de los compuestos, estos iones permiten caracterizar la molécula de cada uno de los componentes de la muestra. El ion molecular conocido proporciona el peso molecular de un compuesto, y otros iones generados sirven para completar la estructura del componente separado. Es pues, la espectrometría de masas, una técnica analítica versátil que se usa para identificar compuestos desconocidos. Tiene alta especificidad y sensibilidad que ofrece la ventaja de ser rápido y con rango de aplicabilidad alto en otras técnicas analíticas como cromatografía de HPLC, resonancia magnética nuclear, infrarrojo, etc (Esteban, 1993).



Figura 13. Principio general de un espectrómetro de masas (Esteban, 1993).

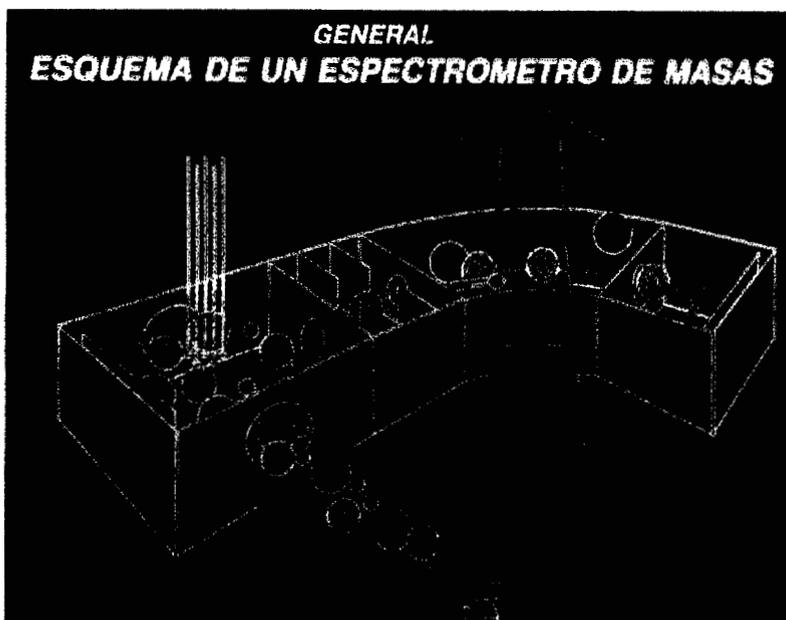


Figura 14. Esquematación del fundamento y principios de operación de un espectrómetro de masas. (Esteban, 1993)

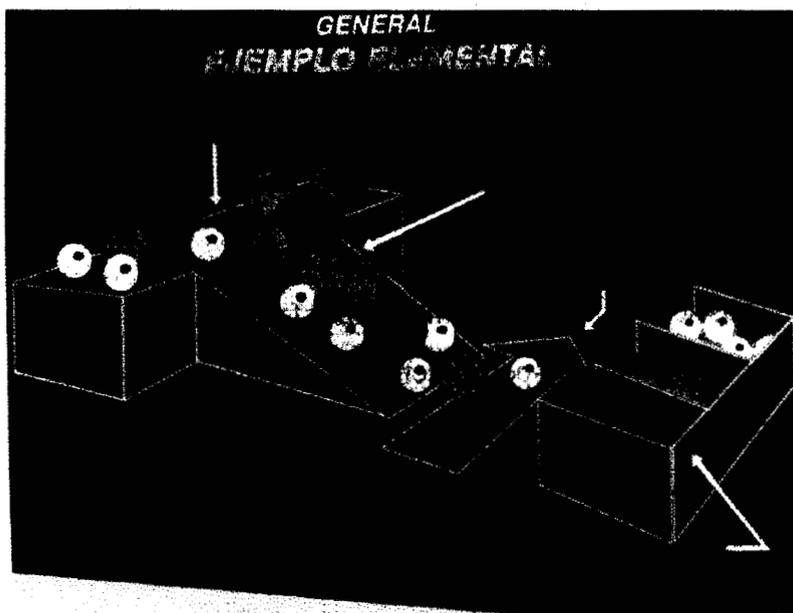


Figura 15. Representación de un espectrómetro de masas en donde en la primera etapa de activación; las moléculas, iones o átomos son activados al aumentar su nivel energético (energía potencial, parte superior de la rampa). Posteriormente se aceleran al descender y la energía potencial adquirida anteriormente se transforma en energía cinética y es igual para todas. Luego, y en el campo separador se agrupan por pesos iguales, las moléculas más pesadas se desvían poco de su trayectoria, y las más ligeras sufrirán una desviación mayor. Finalmente la colección y detección se hace en receptáculos de masas iguales que pueden tener fuerzas fijas o variables para recoger todos los fragmentos de manera sucesiva (Esteban, 1993).

Una vez que las moléculas han sido separadas en la columna cromatográfica, ingresan a un área de baja presión, normalmente inferior a  $10^{-6}$  mbar, en la que son vaporizadas en caso de que no sean gaseosas. De ahí son bombardeadas por una fuente de electrones conocida como cámara de ionización, el más utilizado es el de impacto electrónico o "EI". Esta corriente de electrones (100,000 veces mayor a la corriente que circula a nivel casero) generada por una emisión térmica con un filamento de tungsteno o renio -similar a un foco eléctrico- (Figura 14). Un voltaje de 70 eV bombardea las moléculas en estado gaseoso ionizando al provocar la emisión estimulada de un electrón de la misma, generando positivamente hasta 0.01 del total de las moléculas que ingresan. No solamente se generan moléculas ionizadas o iones moleculares ( $M^+$ ), también se forman iones fragmento debido a la descomposición de los iones moleculares con exceso de energía. Se debe considerar que el patrón de fragmentación o forma como se rompe la molécula, presentan proporciones

relativas a cada uno de éstos iones y es característico de la molécula analizada y de las condiciones del proceso de ionización. Después de que se han generado los iones en los espectrómetros de masa magnéticos, éstos, son atraídos hasta un campo magnético con el propósito de alinearlos y proporcionar la misma energía cinética y repeler los electrones generados. Posterior a la alineación, los iones son dirigidos a través del campo hasta un filtro; en el que las moléculas que no fueron ionizadas se bombean a lo largo del sistema de vacío (Figura 15) (Esteban, 1993).

Finalmente, los iones o fragmentos que llegan al analizador o al ordenador generan un espectro de masa/carga ( $m/z$ ) el cual es proporcional a la cantidad de fragmentos o iones ordenados una vez que pasaron por el filtro. La información generada se recopila en un espectro de masa/carga el cual es característico de cada sustancia analizada (Figura 16). Se representa en el eje X al radio del ion molecular o cociente masa/carga ( $m/z$ ) contra su abundancia en el eje Y. Al analizar los datos obtenidos con las herramientas de la espectrometría se detectan fragmentos con diferentes abundancias a lo largo del eje masa/carga que proporcionan la información suficiente para conocer la fórmula estructural del compuesto detectado (Figura 17).

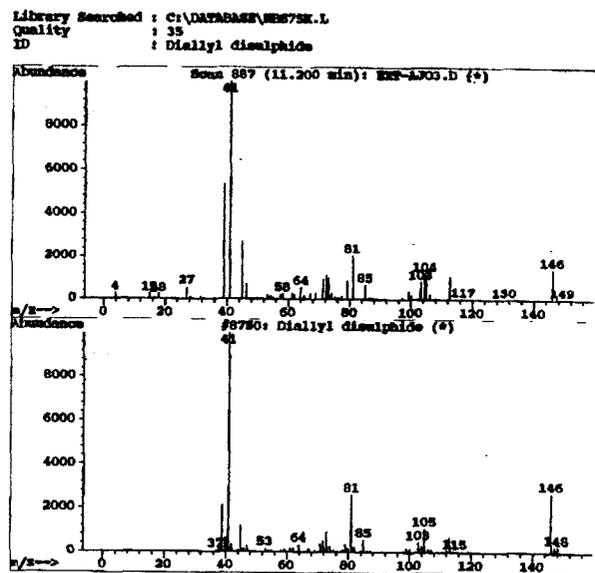


Figura 16. Espectro de masas, patrón del dialil disulfuro comparado con el patrón de la biblioteca biblioteca NIST/EPA/NIH 75K (National Institute Standard Test/ Enviromental Protection Agency/ National Institute Health), parte inferior. Se puede apreciar que el fragmento más abundante tiene 41 unidades de masa atómica.

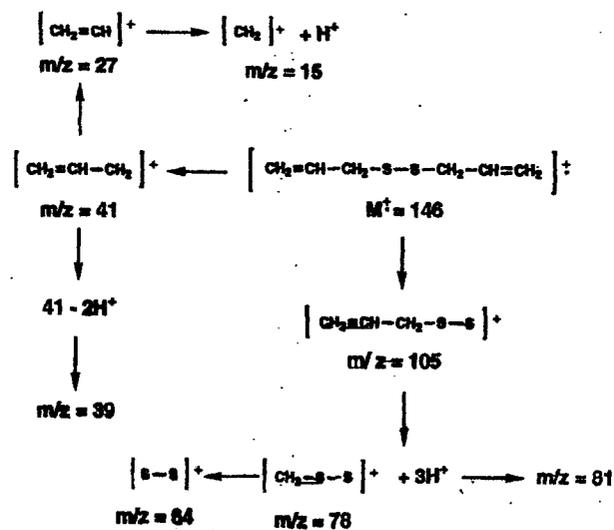
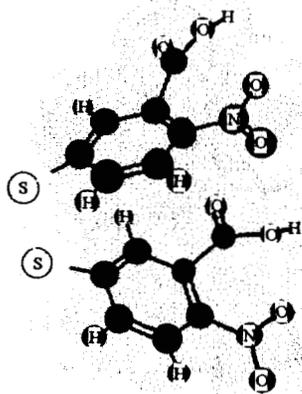


Figura 17. Patrón de fragmentación del dialil disulfuro.

## II.7.2.

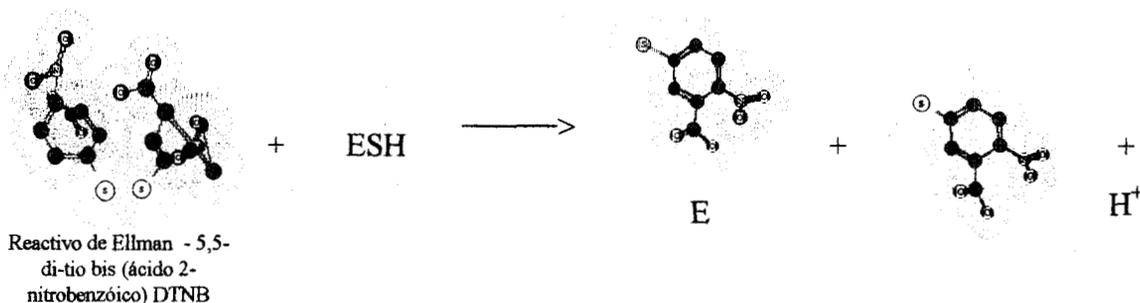
**Fundamento y determinación química de los grupos sulfhidrilo con el reactivo de Ellman**

**Figura 18.** Reactivo de Ellman 5,5-di-tio bis (ácido 2-nitro benzóico) DTNB-  $C_{14}H_8N_2O_8S_2$

El 5,5-di-tio bis (ácido 2-nitro benzóico) DTNB o reactivo de Ellman (Ellman, 1959), reacciona con los grupos tiol de un compuesto para generar sustancias coloridas detectadas fotométricamente a 420 nm del espectro visible. Esta técnica instrumental es usada en la determinación y cuantificación de radicales sulfhidrilo de proteínas y también en otros compuestos que los contengan. El grupo cromóforo generado es el resultado de la oxidación del compuesto que contiene al radical tiol y la reducción del DTNB (Figura 18). La concentración de grupos detectados se expresa como mmoles (SH)/l de dilución, y se calcula con la siguiente ecuación:

$$Co \text{ (mmoles SH/ml)} = (\text{Abs a } 420 \text{ nm} / \text{Coeficiente de extinción } 13600 / \text{M /cm}) * \text{factor de dilución}$$

La reacción general del reactivo de Ellman se presenta en la Figura 19.



**Figura 19.** Reacción del reactivo de Ellman en la formación del compuesto colorido

## II.8. Fundamento y determinación del crecimiento bacteriano mediante turbidimetría

En el caso de las bacterias quimio-heterotróficas, las cuales usan sustratos orgánicos como fuentes únicas de carbono y energía, el crecimiento obtenido puede ser medido en términos del sustrato consumido y la biomasa resultante. Son varios los

métodos para cuantificar el crecimiento celular en los que se consideran los gravimétricos tales como el peso celular seco, la concentración de los constituyentes celulares individuales (como DNA, RNA, proteínas, peptidoglucano); medición del número total de células tales como cuenta total (por conteo con el microscopio o conteo de partículas electrónicas) y conteo viable; también existen métodos indirectos del conteo del material celular tal como la turbidimetría o nefelometría que utiliza al espectrofotómetro (Hui y Khachatourians; 1995).

### II.8.1. El Crecimiento bacteriano

En el patrón de crecimiento bacteriano mostrado en la Figura 20 se pueden diferenciar cuatro fases. La primera conocida como fase lag o periodo de adaptación a las condiciones del medio, en esta fase no se incrementa el número de células de forma evidente y es extremadamente variable en la duración. Esta fase es seguida por una línea recta característica del crecimiento exponencial o fase logarítmica; en la cual el crecimiento puede llegar a duplicarse cada 20 minutos. La transición entre la fase exponencial y la fase estacionaria involucra un período de desbalance durante el cual los diferentes compuestos celulares no son sintetizados a la misma velocidad. En un recipiente cerrado el crecimiento de los microorganismos está limitado, normalmente, por el agotamiento de los nutrientes disponibles o por la acumulación de productos tóxicos como resultado del metabolismo celular. Como consecuencia, la velocidad de crecimiento declina y el crecimiento se detiene en este punto, sin embargo, la cantidad de células ha alcanzado el máximo número en esta fase llamada estacionaria. Finalmente, las células bacterianas mantienen un estado donde no hay crecimiento, fase de decaimiento o muerte. Esta fase es el resultado de un número de factores, tales como el agotamiento de las reservas de energía. La velocidad de muerte es muy variable y depende del medio ambiente así como de las especies particulares, la edad y la cantidad del inóculo transferido (Hui y Khachatourians, 1995).

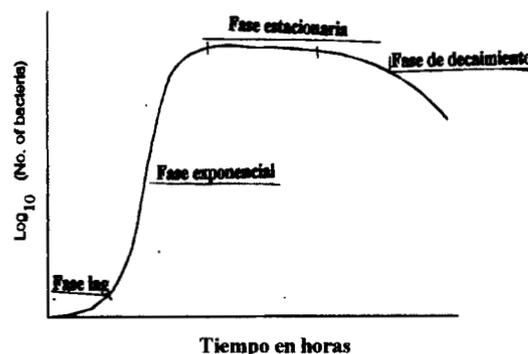


Figura 20. Curva de crecimiento típica de células bacterianas en cultivo por lote.

## II.9. Evaluación sensorial

El análisis sensorial permite, en forma científica y objetiva, evaluar caracteres relacionados con el olor, sabor y textura. Dicho de otro modo este método mide los atributos sensoriales de un alimento. La aceptación que tenga el alimento se debe a la respuesta del consumidor, ya que es quien lo califica. La comercialización de un producto alimenticio debe de considerar el valor nutritivo y calórico del mismo y además complementarse con los resultados de una evaluación sensorial.

Actualmente la evaluación sensorial de los alimentos constituye un pilar fundamental para el desarrollo y diseño de nuevos productos alimenticios. La medición del grado de satisfacción que brindará un determinado producto, nos permite anticipar la posible aceptabilidad que éste tendrá. Es también, la evaluación sensorial, un elemento necesario para desarrollar una estrategia de mercadeo ya que el placer o satisfacción sensorial hedónica es una determinante importante en el consumo de alimentos. Los paneles de degustadores, denominados jueces, son el mecanismo de evaluación, hacen uso de sus sentidos basados en la fisiología y psicología de la percepción como la herramienta que proporciona la información (Wittig, 1990; O'Mahony, 1979).

Los jueces se seleccionan y entrenan con el fin de lograr la máxima veracidad, sensibilidad y reproducibilidad en los juicios que emitan ya que de ello depende en gran medida el éxito y confiabilidad de los resultados. Los aspectos más relevantes en una evaluación sensorial son: el laboratorio de pruebas, las muestras, el panel de degustadores, el método de evaluación y el análisis estadístico de los datos obtenidos.

La metodología de la evaluación sensorial de forma general presenta pruebas de respuesta subjetiva así como pruebas objetivas y analizables estadísticamente entre los que se encuentran las pruebas de valoración, los métodos analíticos y los métodos para detectar diferencias. Los métodos para detectar diferencias miden precisamente las diferencias existentes entre las muestras y son el acercamiento más próximo al análisis de los alimentos. Básicamente estas pruebas indican si dos muestras son iguales o diferentes, pero no necesariamente señalan la diferencia o la causa de ella. Su limitación está en que requiere que las muestras sean homogéneas y que las diferencias entre ellas sean pequeñas, ocupan demasiado tiempo y son de mucha precisión. El panel que requiere está constituido

sean pequeñas, ocupan demasiado tiempo y son de mucha precisión. El panel que requiere está constituido por pocos jueces entrenados que hacen varias repeticiones de la degustación (O'Mahony, 1979).

El planteamiento de la “hipótesis nula” ( $H_0$ ) indica que las muestras no difieren entre sí y la “Hipótesis alternativa” ( $H_1$ ) plantea que sí hay diferencias. Las diferencias que se encuentran se expresan en términos de nivel de significación o nivel de probabilidad, que indican el grado en que las diferencias observadas entre dos estímulos son verdaderas y no debidas al azar. Los niveles más frecuentes son 5 y 1 %, aunque también se usa el 0.1 %.

Las pruebas utilizadas para detectar diferencias son: prueba de estímulo único, prueba pareada, prueba de dúo-trío, prueba triangular y prueba de comparación múltiple.

### **II.9.1 Prueba de estímulo único.**

También llamada “A no A”. Se usa para entrenar expertos en degustación. Consiste en entregar al juez una muestra estándar o control, sea A, varias veces, para que se familiarice con ella sensorialmente. En seguida, se le entrega la muestra “no-A”, que es la que va a calificar y se le pregunta si ella corresponde o no a la que degustó inicialmente.

### **II.9.2. Prueba pareada.**

Permite detectar pequeñas diferencias entre dos muestras. Elimina el efecto de la memoria, fundamental en la prueba de estímulo único. Se puede usar para medir: a) diferencias de calidad y b) diferencias de una característica de calidad o prueba direccional. La primera pregunta que se hace a los jueces es si hay diferencias entre las dos muestras presentadas que conforman cada par. Se usa cuando una muestra la queremos confrontar a un estándar y se pregunta si las muestras son diferentes o no. También permite saber si al modificar procesos o parte de ellos la calidad del producto resulta modificada. En el segundo caso las muestras se presentan en los siguientes pares:

AA-AB-BA-BB. Se sortea el orden de presentación para que la distribución de los pares sea al azar. La evaluación se hace confeccionando una tabla de frecuencias para las respuestas correctas y falsas de cada juez, la validez de la evaluación se calcula por chi cuadrado ( $X^2$ ) (O'Mahony, 1979).

### II.9.3. Prueba Dúo-Trío.

Se entregan al juez tres muestras: primero se sirve un estándar conocido y enseguida se presentan al mismo tiempo dos muestras desconocidas, y se pregunta cual de las dos muestras es igual al estándar que se entregó primero. Esta prueba requiere de un panel de mayor número de degustadores que el triangular. Los resultados del panel pueden también ser evaluados por cálculo de chi cuadrado o por tablas que señalan el número de juicios correctos mínimo para cada tamaño de panel, según el nivel de significancia (Wittig, 1990).

### II.9.4. Prueba triangular.

Es tal vez el método más usado por paneles de degustadores, permite seleccionar jueces y también medir propiedades sensoriales de los alimentos, diferencias en la materia prima y en general es muy útil par determinar diferencias pequeñas.

Al degustador o juez se le presentan tres muestras simultáneamente: dos de ellas son iguales y una diferente. Se le pide señalar la diferente. En algunas ocasiones se pide además comentar acerca de la naturaleza de la diferencia. Las posibilidades de combinación son:

$$n! = 1 \times 2 \times 3 = 6 \quad \text{AAB ABA BAA BBA BAB ABB}$$

la posibilidad de acertar por azar es de 1/3. y se evalúa con la ecuación siguiente:

$$X^2 = ([4 * \text{número de aciertos} - 2 \text{número de errores}] - 3)^2 / (8 * \text{número de jueces})$$

También hay tablas que señalan el mínimo de juicios correctos para un tamaño de panel dado en cada nivel de significación (Wittig, 1990; O'Mahony, 1979).

**La diversidad de los fenómenos de la naturaleza es tan grande y los tesoros que encierran los cielos tan ricos, precisamente para que la mente del hombre nunca se encuentre carente de su alimento básico.**

**JOHANNES KEPLER, *Mysterium Cosmographicum***

### **III. OBJETIVOS**

#### **A) General**

1) Determinar el posible efecto inhibitorio del aceite esencial de ajo y cebolla en *Pseudomonas fragi* y *Lactobacillus pentosus*.

#### **B) Particulares**

1) Establecer la metodología de extracción de aceites esenciales en ajo (*Allium sativum*) y cebolla (*Allium cepa*).

2) Identificar los compuestos presentes en los aceites esenciales de forma analítica mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y cuantificar la concentración de radicales sulfhidrilo mediante la prueba de Ellman.

3) Conocer las actividades bacteriostáticas, de aceites esenciales de ajo y cebolla probando diferentes concentraciones y combinaciones de estos aceites en medios de cultivo sintéticos inoculados con cepas puras.

4) Evaluar sensorialmente un producto cárnico (chorizo tipo español) al cual se le añadió la concentración inhibitoria de aceites de ajo y cebolla.

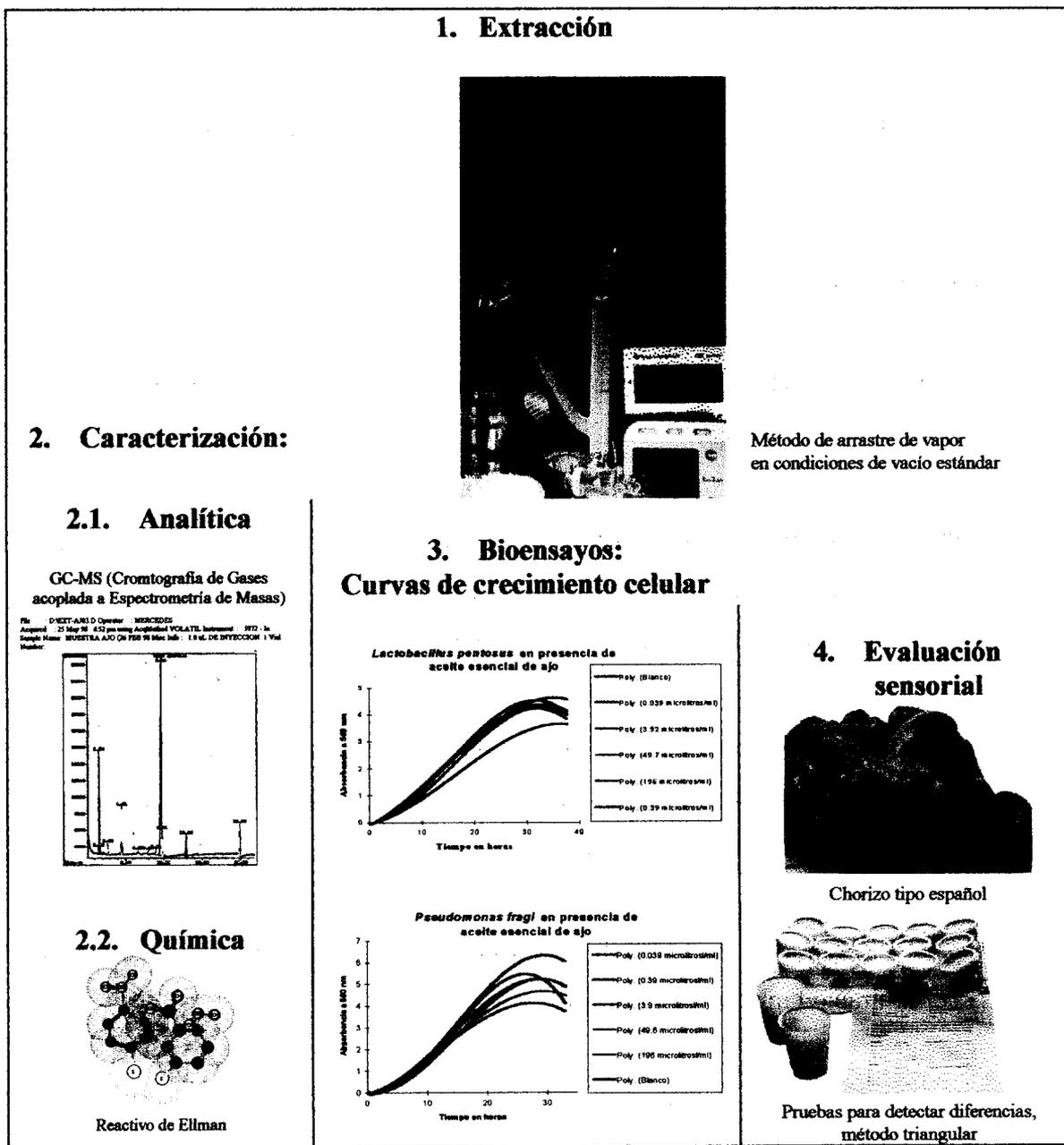
*"In rerum natura"*

En la naturaleza de las cosas

*Toda hipótesis que no es comprobada carece de valor*

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### IV.1. Diagrama general de la metodología experimental



#### IV.1.1. Extracción de aceites esenciales

Se realizó siguiendo la metodología propuesta en el diagrama de flujo de la Figura 21.



Foto 13. Ajos después de la operación de limpieza.

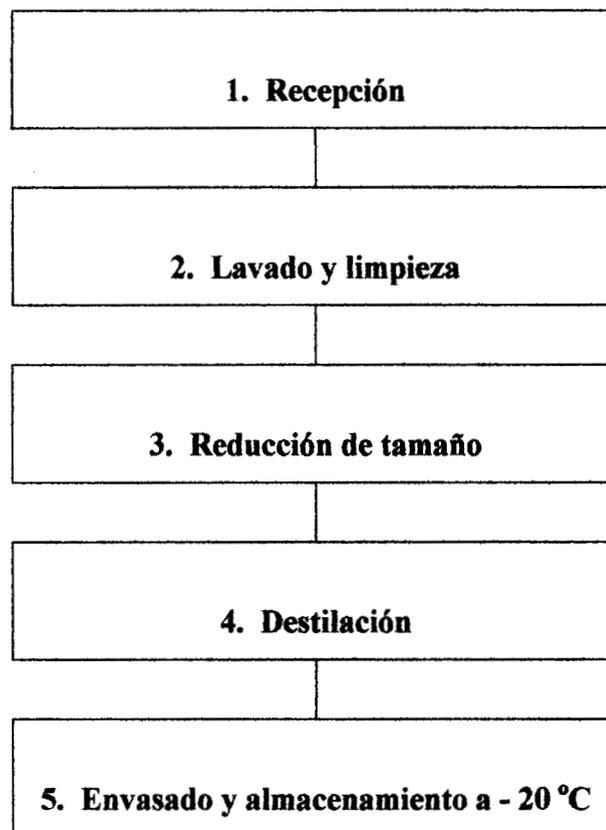
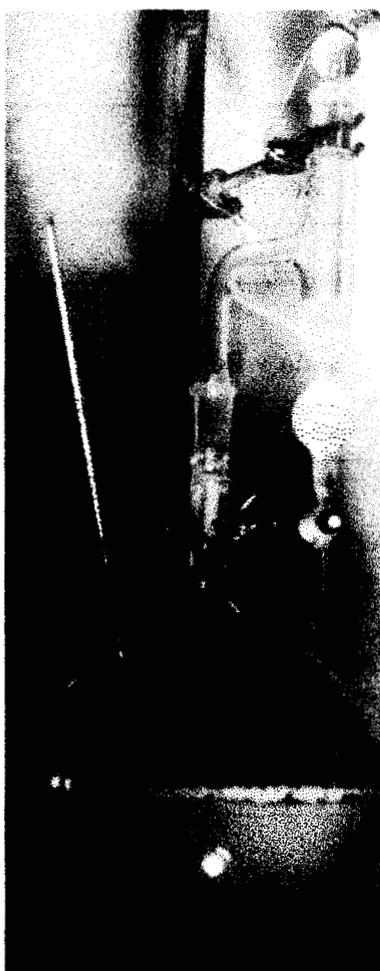


Figura 21. Diagrama de flujo general de la extracción de los aceites.

##### IV.1.1.1. Materiales y equipo

Los ajos y las cebollas se adquirieron en un mercado local de la ciudad de México. La cebolla se seleccionó por color y tamaño y el ajo por tamaño y densidad desechando los menos densos. Posteriormente se pelaron manualmente, después del remojo por 8 horas (Foto 13). Una vez que la cutícula se había reblandecido, se cortó el pedúnculo y se procedió a la reducción de tamaño homogeneizando con agua destilada en proporción 1 a 1 en una licuadora.

222254



Dedo refrigerante

Cuerpo del destilador

Termopozo para termómetro

Matraz de 6 litros de capacidad

**Foto 14.** Equipo de destilación de aceites esenciales más densos que el agua, con modificación para termopozo y mayor volumen de recuperación de volátiles.

#### IV.1.1.2. Extracción de volátiles

La destilación se llevó a cabo de acuerdo con la técnica 19.128 del AOAC (1990) en un equipo marca Pyrex # 3410 con el fin de recuperar mayor volumen de aceite y poder tomar lecturas de temperatura mediante la adaptación de un termopozo para acondicionar un termómetro de mercurio (Fotos 14 y 15). Todo el equipo estuvo construido en vidrio y tenía tres partes: un matraz de 6 litros, el cuerpo del destilador (parte central) y el dedo refrigerante (parte superior). La destilación se realizó a un 50 - 65 % de la capacidad del matraz.



**Foto 15.** Acumulación del aceite esencial de ajo durante el proceso.

Se utilizó una parrilla de calentamiento con agitación marca Thermoline modelo SP-A1025 B para calentar la muestra a una velocidad de ascenso constante hasta llegar a 93 °C en ambos casos de las destilaciones, de cebolla y ajo, manteniéndose a ebullición por hora y media hasta que no se observó condensación aceitosa evidente y la temperatura había descendido sin dejar de ebullición. La condensación de los vapores de agua y aceite esencial se originó al recircular agua a 4 °C con una bomba de inmersión a través del intercambiador de calor o refrigerante. La recolección y almacenamiento de los aceites se hizo en matraces aforados de 1 ml de capacidad. El almacenamiento se llevó a cabo a -20 °C. El rendimiento de los aceites se determinó por peso constante al considerar la cantidad de muestra al inicio y el peso del aceite obtenido al final de las extracciones.

### IV.1.1.3. Pruebas físicas

Para los aceites esenciales de ajo y cebolla la carta de especificación comercial incluye los parámetros recopilados en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Carta comercial de especificaciones fisicoquímicas de los aceites esenciales de ajo (*Allium sativum*) y cebolla (*Allium cepa*). Reineccius, (1994); Extract Mex, (1998).

PARÁMETRO	ACEITE ESENCIAL DE AJO	ACEITE ESENCIAL DE CEBOLLA
<b>Descripción</b>	Aceite volátil con fuerte sabor y aroma característico del ajo fresco	Aceite volátil con fuerte sabor y aroma característico de la cebolla fresca
<b>Apariencia</b>	Líquido aceitoso y cristalino libre de material extraño	Líquido aceitoso y cristalino libre de material extraño
<b>Color</b>	Es un líquido amarillo claro a naranja rojizo	Es un líquido amarillo-ámbar claro hasta naranja ámbar rojizo
<b>Olor</b>	Fuertemente pungente, característico de ajo	Fuertemente pungente, característico de cebolla
<b>Sabor y aroma</b>	Fuerte, claro característico de ajo	Fuerte, claro característico de cebolla
<b>Solubilidad</b>	Es soluble en la mayoría de aceites fijos y en aceite mineral. Parcialmente soluble en alcohol. Insoluble en glicerina y en propilen glicol	Es soluble en la mayoría de aceites fijos y en aceite mineral. Parcialmente soluble en alcohol. Insoluble en glicerina y en propilen glicol
<b>Gravedad específica a 25 °C</b>	(1.040 - 1.090) g/cm <sup>3</sup>	(1.040 - 1.090) g/cm <sup>3</sup>
<b>Índice refractivo a 20 °C</b>	1.559 - 1.579	1.5490 - 1.5700
<b>Cromatografía de gases</b>	Presenta picos normales	Presenta picos normales
<b>Pureza</b>	30 - 40 % como dialil disulfuro	30 - 40 % como dipropil disulfuro
<b>Envasado</b>	En contenedores de aluminio de 5 ó 10 kg/ Contenedores de acero inoxidable de 20 ó 50 kg	En contenedores de aluminio de 5 ó 10 kg/ Contenedores de acero inoxidable de 20 ó 50 kg

## IV.2. Análisis de compuestos volátiles en los aceites esenciales

Una vez colectado y almacenado el aceite, se analizó por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS) y por su contenido de grupos sulfhidrilo libres a través de la prueba de Ellman (1959). A continuación se describe el equipo y las condiciones de operación para cada procedimiento de análisis (Figura 22).

### IV.2.1. Diagrama de flujo general de la caracterización por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

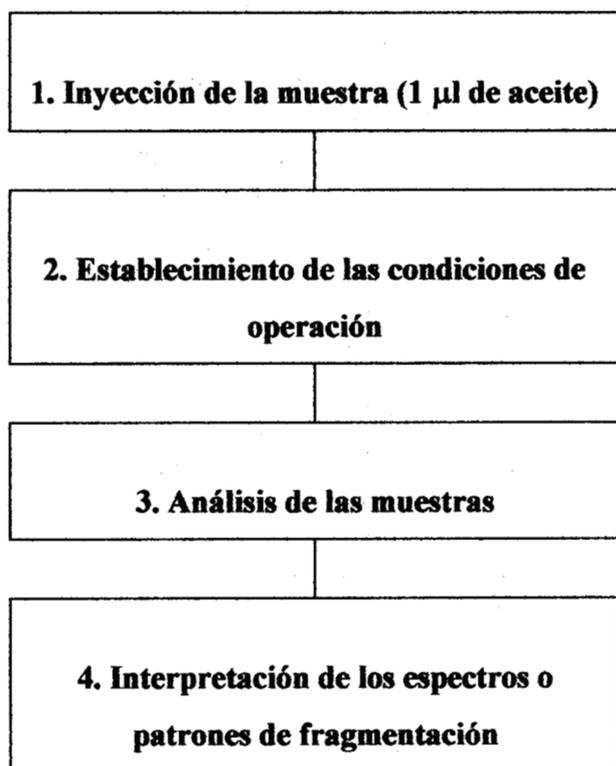


Figura 22. Diagrama de flujo general de la caracterización mediante espectrometría de masas.

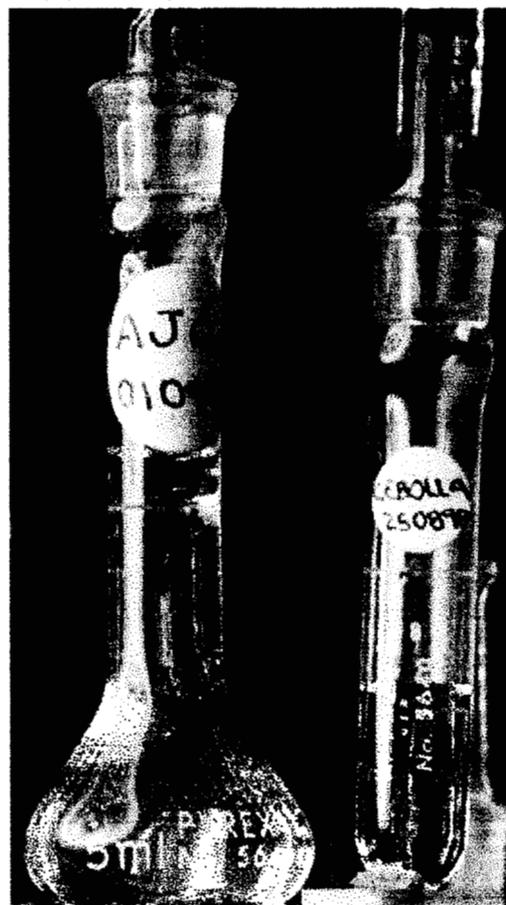


Foto 16. Aceites esenciales de ajo y cebolla contenidos en recipientes de vidrio.

#### **IV.2.2. Equipo y condiciones de operación**

Para la caracterización e identificación de los compuestos volátiles presentes en los aceites esenciales se usó un instrumento analítico acoplado que consta de un cromatógrafo de gases marca Hewlett Packard HP (Palo Alto, California, E.U.) serie II número 5890 y un espectrómetro de masas de flujo de electrones modelo 5972 de la misma marca (GC-MS por sus siglas en inglés). Los aceites esenciales de ajo y cebolla se caracterizaron al inyectar 1 microlitro ( $\mu\text{l}$ ) de cada uno. La identificación de los compuestos se hizo en base a la información de los espectros de los compuestos según sus tiempos de retención en la columna cromatográfica y la comparación de los espectros de masas con los patrones de fragmentación disponibles en la biblioteca NIST/EPA/NIH 75K (National Institute Standard Test/ Environmental Protection Agency/ National Institute Health)

La técnica se estableció después de hacer 8 análisis preliminares y determinar las condiciones de operación del GC-MS para una separación adecuada. Se utilizó una columna capilar HP- FFAP (Free Fatty Acids Phase) # 19091F-112 de 25 m de longitud y espesor de película de  $0.52 \mu\text{m}$ , polar y con intervalo de temperatura de  $60\text{-}240^\circ\text{C}$ , el radio de fase de la columna fue de  $150:0.32 \text{ mm}$ . Las condiciones de operación fueron las siguientes: temperatura del inyector  $120^\circ\text{C}$ , temperatura del detector  $200^\circ\text{C}$  y  $70 \text{ eV}$  de potencial eléctrico, una presión en el inyector de  $8 \text{ psi}$ , la rampa de temperatura del horno  $60^\circ\text{C}$  por  $3 \text{ min}$  y luego ascendió  $5^\circ\text{C}$  cada minuto hasta  $120^\circ\text{C}$ , el split o división de flujo fue de  $2:1$  el gas acarreador fue helio ultra alta pureza.

#### **IV.2.3. Análisis de radicales sulfhidrilo**

El fundamento se presenta en la sección III.7.3. Esta determinación tiene como objetivo conocer la cantidad de grupos sulfhidrilo que se encuentran en los aceites esenciales de ajo y cebolla y sus combinaciones, con el propósito de conocer la existencia de alguna relación entre los grupos tiol y la inhibición del crecimiento celular debida a estos grupos químicos. Para ello se planteó la siguiente metodología:

Se utilizó ácido 5,5-di-tio bis 2-nitro benzóico (DTNB) de marca Sigma (St Louis, Missouri, E.U.) en proporción de 39.6 mg/10 ml del buffer de fosfato de potasio dibásico anhidro 0.1 N. Para analizar el contenido de radicales sulfhidrilo (SH) los aceites se diluyeron en 50 ml a una concentración de  $2.0 \times 10^{-4}$  ml de aceite/ml de agua. Posteriormente se hicieron diluciones, con amortiguador 0.1 N de fosfato dibásico de potasio anhidro que contenía al reactivo de Ellman, de esta concentración inicial para alcanzar las concentraciones de los tratamientos con aceites que se muestra en la Tabla 10. Se hicieron mezclas de aceite de ajo y de cebolla en proporción 1:1, 1:2 y 2:1 (ajo: cebolla). La absorbancia de las diluciones se leyó a 420 nm en el espectrofotómetro (Shimadzu, modelo UV - 650) y la concentración de grupos sulfhidrilo se expresa como mmoles (SH)/l

**Tabla 10.** Concentración de aceites esenciales añadidos a medios de cultivo

TRATAMIENTO	Concentración de aceites esenciales ( $\mu$ l de aceite / ml)				
<b>ajo</b>	196	49.7	3.99	0.399	0.039
<b>ajo:cebolla 2:1</b>	ajo: 130.6	16.56	1.3	0.132	0.013
	cebolla: 65.3	33.13	2.61	0.264	0.026
<b>ajo:cebolla 1:1</b>	ajo: 98	24.85	1.96	0.198	0.0195
	Cebolla: 98	24.85	1.96	0.198	0.0195
<b>ajo:cebolla 1:2</b>	ajo: 65.3	33.13	2.61	0.264	0.026
	cebolla: 130.6	16.56	1.3	0.132	0.013
<b>cebolla</b>	196	49.7	3.99	0.396	0.039

#### IV.3. Crecimiento de microorganismos en medios sintéticos

Tomando en cuenta el efecto de los aceites esenciales del género *Allium* sobre microorganismos en general (Sección II.2.1.) se estudió el crecimiento de cepas de *Pseudomonas fragi* y *Lactobacillus pentosus*. Se eligieron estos dos microorganismos debido a que el primero está asociado con la descomposición de carne, mientras que *L. pentosus*. es una cepa bioprotectora, empleada en productos cárnicos fermentados. Los valores de las concentraciones se determinaron mediante 4 pruebas microbiológicas preliminares.

### IV.3.1. Diagrama de flujo general de los bioensayos

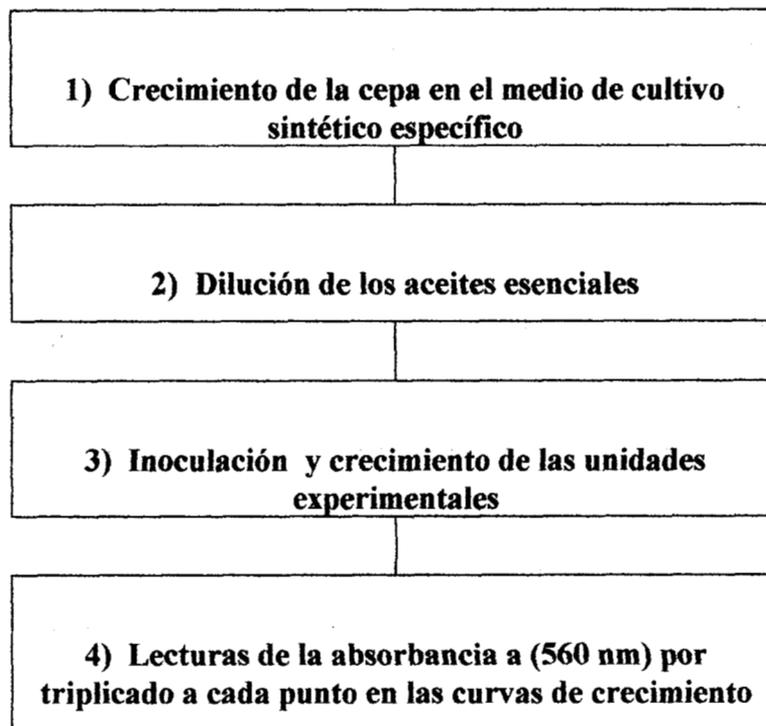


Figura 23. Diagrama de flujo general de los bioensayos

#### IV.3.1.1. Metodología experimental

Se prepararon diluciones de los aceites de ajo y cebolla para obtener las concentraciones y cantidades probadas en los medios de cultivo sintéticos. Posteriormente, en tubos de ensayo adicionados con las concentraciones de aceites de ajo y cebolla y sus combinaciones según lo indica la Tabla 10, además de un testigo sin aceites, se inocularon concentraciones conocidas de los microorganismos que se indican a continuación.

#### IV.3.1.1.1. Crecimiento de *Pseudomonas fragi*

Se utilizó la cepa ATCC 4973 que se obtuvo en forma liofilizada del cepario del Centro de Investigación de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), México D.F.

Se inocularon 25 ml de medio TSB (Trypticase Soy Broth) con el cultivo reactivado previamente. Los matraces de inocularon a 19 °C por 36 horas. Para conocer si había contaminación de la cepa, se realizó tinción de Gram y observación al microscopio.

Posteriormente, en tubos de ensayo se adicionó con las concentraciones de aceites de ajo y cebolla y sus combinaciones, además de un testigo (sin aceites), se inoculó al 1 % del cultivo con una densidad optica = 1. Los tubos se incubaron a 19 °C por un total de 2 días, midiéndose la densidad optica cada 4 horas durante 2 días.

Estas pruebas se realizaron por triplicado en dos repeticiones.

#### IV.3.1.1.2. *Lactobacillus pentosus* (31035)

La cepa de *L. pentosus* (31035) fue amablemente proporcionada en su forma pura por la Doctora Lore Andersen, de Christian Hansen, Dinamarca. El cultivo liofilizado se reactivó en caldo MRS, (Oxoid, Basingstoke, GB), incubado a 30 °C por 24 horas. Posteriormente se incubaron matraces con 25 ml de medio MRS con 1 % del cultivo con densidad optica igual a 1 y se incubó por a 30 °C 24 horas.

Se prepararon tubos de ensaye con las concentraciones de aceites de ajo y cebolla indicados en la Tabla 10 y a estos se inocularon al 1 % del cultivo con densidad óptica = 1. Los tubos se incubaron a 30 °C por un total de 2 días, midiendo cada 4 horas durante 2 días la densidad optica.

Este experimento se realizó por triplicado y se repitió 2 veces.

#### **IV.4. Análisis sensorial**

Se estudiaron las diferencias en aceptación general de chorizo español por el método triangular con la prueba discriminativa triangular (Wittig, 1990), en 10 formulaciones adicionadas con aceite esencial de ajo y cebolla en las concentraciones máximas (196 y 49.6  $\mu\text{l}$  de aceite/g de pasta) comparadas con un testigo. Dado que los aceites de ajo y de cebolla tienen el doble papel de inhibidores del crecimiento de microorganismos y de sazoadores, se desconocía si los niveles efectivos de inhibición microbiana de estos aceites no eran rechazados por los consumidores cuando se añadían a un producto procesado.

En particular en este estudio se deseaba conocer cómo se distribuyen las diferencias de aceptación de los cinco tratamientos y dos niveles de los aceites esenciales de ajo y cebolla probados en *Pseudomonas fragi* y *Lactobacillus pentosus*. Los aceites se probaron como sazoadores de chorizo. Para ello, se prepararon 15 kg de pasta con el método reportado por Guerrero y Arteaga (1990) en un diseño factorial de 2 niveles de concentración (196 y 49.7  $\mu\text{l}$  de aceite(s) / g de pasta) y cinco tratamientos, inciso IV.4.2.

La evaluación la llevó a cabo un panel con 6 jueces entrenados (Wittig, 1990).

##### **IV.4.1. Formulación del producto**

A 10 porciones de pasta, de 1 kg cada una, se aplicaron cinco tratamientos representados por la adición de las concentraciones de aceites de ajo y/o cebolla que se describen en la Tabla 11, una porción de 5 kg se utilizó como blanco.

**Tabla 11.** Tratamientos y niveles de aceites esenciales de ajo y cebolla en la formulación de chorizo español

TRATAMIENTO	NIVEL (PROPORCIÓN AJO/CEBOLLA)	CONCENTRACIÓN µl aceite(s)/g
1	1:0	196 : 0
2	1:1	98 : 98
3	1:2	65.3 : 130.6
4	2:1	130.6 : 65.3
5	0:1	0 : 196
6	1:0	49.6 : 0
7	1:1	24.9 : 24.9
8	1:2	16.63 : 16.63
9	2:1	32.26 : 16.63
10	0:1	0 : 49.9

#### IV.4.2. Muestras para el análisis sensorial



Foto 17. Chorizo tipo español

#### IV.4.2.1. Ingredientes utilizados

Carne de pierna de cerdo	10 kg
Lardo	5 kg
Pimentón	0.6 kg
Vinagre blanco -comercial-	466 ml
Cloruro de sodio	0.333 kg
Fosfato de sodio*	0.05 kg
Glutamato monosódico**	0.01kg
Nitrito de sodio***	0.005 kg

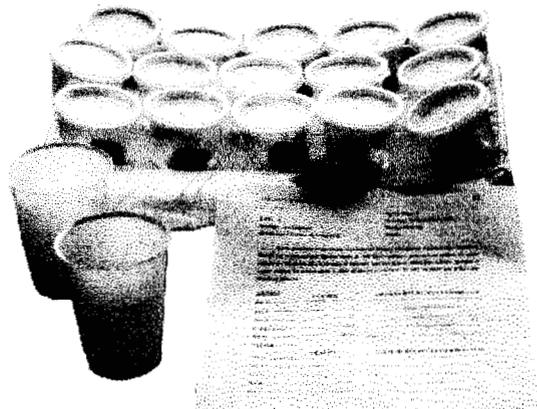
\* Regulador de la acidez, secuestrante, emulsionante, texturizador, estabilizador, agente de retención del agua No 339 Codex Alimentarius (C.A.) (Smith, 1992)

\*\* Acentuador del sabor No 621 C.A.

\*\*\* Conservante fijador del color No 251 C.A.

Las muestras degustadas, que equivalen a los tratamientos, se presentaron en recipientes de plástico con tapa y etiquetados con un código y aleatorizadas acompañadas de agua y galletas de sabor neutro como líquido o sólido de neutralización (Foto 18).

Los jueces fueron informados que las muestras podían o no ser deglutidas después de 15 masticadas uniformizando así la aparición de los aceites en el sabor, y la forma de degustación antes de contestar en el formato proporcionado. Los análisis sensoriales se realizaron en oficinas individuales aislados de estímulos externos y con iluminación roja para evitar la influencia del color y la textura de las muestras.



**Foto 18.** Las muestras con tratamientos se presentaron individualmente en grupos de 3, dos de las muestras son iguales y una es el blanco. En cada sesión, los 6 jueces degustaron 15 porciones de producto

#### **IV.4.3. Procedimiento en la elaboración de la pasta**

La carne y el lardo se picaron, en un molino para carne marca Momat, usando un cedazo mediano (1/8) para ser mezclados con los aditivos durante dos minutos a baja velocidad en una mezcladora de la misma marca. Posteriormente, se almacenó la pasta a 4 °C durante 24 horas. Pasado este tiempo, se embutió en la tripa de cerdo eliminando el aire atrapado en su interior. Los tramos de chorizo se ataron de 10 a 12 cm de distancia para finalmente iniciar la maduración secándose a temperatura ambiente.

222254

#### IV.4.3.1. Preparación y presentación de las muestras

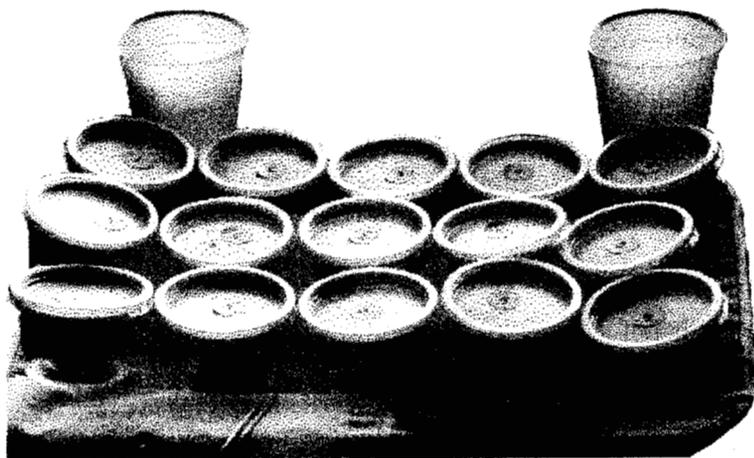


Foto 19. Prueba triangular para detectar diferencias

Se frieron los chorizos durante 10 minutos a 130 °C en un sartén con 100 ml de aceite de maíz cambiándolo en cada tratamiento térmico (Fotos 19 y 20).

Para realizar la degustación se controló:

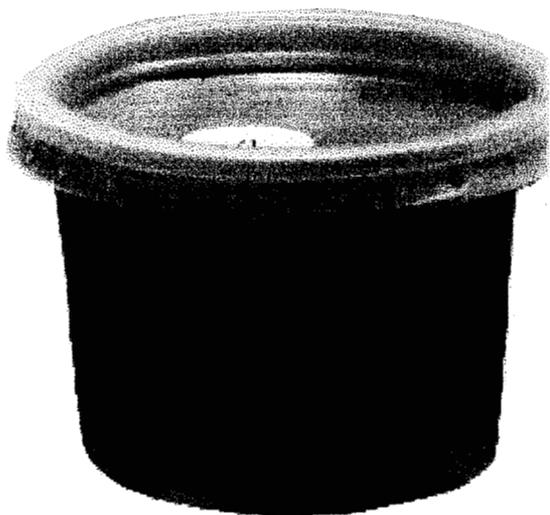


Foto 20. Una muestra chorizo tipo español

- a) apariencia (igual forma, consistencia)
- b) igual tamaño
- c) temperatura ambiente
- d) codificación de las muestras
- e) orden de presentación (por sorteo y quedó inscrito en el formato y la planilla de control
- f) hora de degustación
- h) frecuencia de las degustaciones
- i) duración de la degustación

Se emplearon 15 muestras en cada degustación.

#### IV.4.3.2. Panel de jueces

El panel de jueces fue seleccionado entre el personal de la Universidad Iberoamericana en base a su capacidad discriminativa, este panel trabajó con niveles de confianza de 95% y con límites D 0.70 y 0.45 para análisis secuencial, de acuerdo con la Norma # ASTM (American Society Testing and Materials), organismo encargado de regular las pruebas de evaluación sensorial. Los jueces empleados tienen más de dos años de entrenamiento de realizar evaluaciones sensoriales.

Las condiciones del análisis fueron las siguientes:

**Tamaño del panel:** 6 jueces

**Pruebas usadas:** para observar diferencias

**Método:** triangular

**Condiciones de trabajo:**

- a) factores ambientales (temperatura ambiente)
- b) hora del día (de 14 a 18 horas en promedio)
- c) intervalo de tiempo entre degustaciones (25-30 minutos por evaluación)

#### IV.4.3.3. Diseño experimental y análisis estadístico

Las muestras para análisis sensorial se asignaron en forma totalmente al azar a 10 tratamientos (Daniel, 1995). Los resultados se analizaron utilizando un programa SAS para computadora personal (SAS Institute, 1989). Con el propósito de obtener la mayor cantidad de información sobre el sabor y aroma en los 10 tratamientos, su análisis estadístico se efectuó por el método de la  $\phi_1$  cuadrada en la que se considera el número de jueces, número de aciertos, número de errores y el número mínimo de aciertos necesarios para el intervalo de confianza seleccionado.

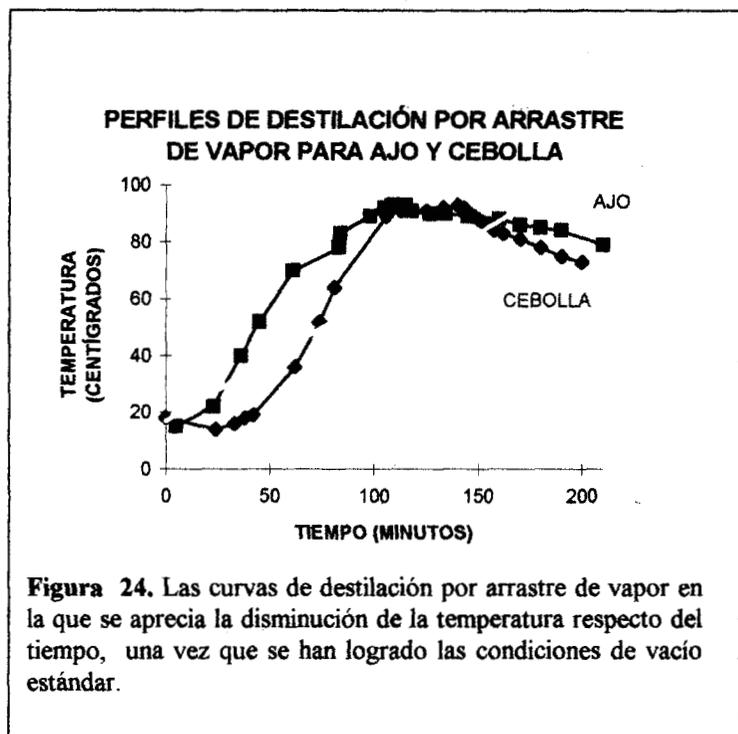
Las curvas de crecimiento de *P. fragi* y *L. pentosus* así como la concentración de radicales sulfhidrilo, se sujetaron a ecuaciones de regresión (Daniel, 1995)

Preferiría comprender una sólo causa que ser Rey de Persia.

DEMÓCRITO DE ABDERA

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### V.1. Extracción de aceites



Se determinaron puntos de ebullición finales de 76 °C para ajo y 73 °C para cebolla después de hora y media de iniciado el descenso de la temperatura a partir de 93 °C, en ambos casos (Figura 24). Las condiciones de vacío estándar se inician con el descenso, por la condensación de los vapores de agua y aceite y por la expulsión del aire disuelto en la muestra así como el aire que está en el volumen interno no ocupado (Foto 14).

La ecuación de los gases ideales  $PV = nRT$  describe a la presión  $P$  como una función de la temperatura  $P(T)$ . El volumen ( $V$ ) del recipiente permanece constante, el número de moles ( $n$ ) (aire principalmente y algunas moléculas del aceite) disminuye durante el inicio y hasta el final del proceso (Atkins, 1991). La disminución se debe al aumento de la presión como efecto del aumento de la temperatura de la muestra, los gases disueltos en la muestra ( $N_2$ ,  $CO_2$  y  $O_2$ ) y el aire del volumen no ocupado del sistema de destilación son desalojados entre la unión del cuerpo del destilador y el dedo refrigerante a medida que aumenta la presión lo suficiente como para desplazar al dedo refrigerante. Al ser liberados los gases disminuye el número de moles totales y hace que descienda el punto final de ebullición en cada material biológico destilado.

Los perfiles son diferentes para cada sustancia, aunque su comportamiento tiene la misma tendencia durante todo el proceso de ebullición. Se debe considerar que antes de la ebullición y por la naturaleza química de cada vegetal y su fisiología hay gases y aire disueltos en la muestra. Los procesos metabólicos de los vegetales, aunque hayan sido cosechados, presentan reacciones en las que hay intercambios de gases (Bósquez, 1992). Una vez reducido el tamaño de la muestra, los gases se encuentran disueltos en la porción líquida y el espacio no ocupado del destilador, por consiguiente modifican la presión al interior del sistema una vez que aumenta la temperatura, confiriendo a cada producto biológico un perfil característico. La anterior es una explicación de los posibles comportamientos diferentes para los materiales estudiados.

El rendimiento para la cebolla fué 0.046 g de aceite/kg ya que en los 28 kg destilados se obtuvieron 1.275 g de aceite lo que es 42% superior al reportado bibliográficamente. En ajos, de los 5.1 kg previa la reducción de tamaño y sin cutícula se obtuvieron 18.65 g de aceite equivalentes a 3.65 g/kg, 35% arriba del reportado. Con los datos obtenidos se puede suponer que las operaciones posteriores a la cosecha, la variedad genética y la metodología de extracción son factores a considerar en el aumento de los valores del rendimiento (Reineccius 1994; Mazza y col. 1992; Badui 1988).

## **V.2. Análisis de compuestos volátiles en los aceites esenciales de ajo y cebolla**

Los cromatogramas característicos de aceites esenciales de ajo (*Allium sativum*) y cebolla (*Allium cepa*) obtenidos por arrastre de vapor en condiciones de vacío estándar se presentan a continuación. Se reportan también las estructuras y la abundancia relativa, espectros de fragmentación de las sustancias identificadas en cada uno, el orden de separación y la abundancia relativa.

### V.2.1. Ajo (*Allium sativum*)

El número total de compuestos en ajos fue 20, totalmente caracterizados 10 y 2 parcialmente. La Tabla 12 presenta los compuestos identificados y caracterizados en el aceite esencial de ajo. Se identificaron 10 compuestos (Figura 25), todos contienen por lo menos un átomo de azufre, son alifáticos y el más abundante es dialil disulfuro o alicina 35.59 % (tiempo de retención  $t_r$  11.35 min), seguido por di-2-propenil trisulfuro ( $t_r$  18.45 min), con 18.39 %. Se debe señalar que este compuesto presenta un isómero, con la misma composición química pero

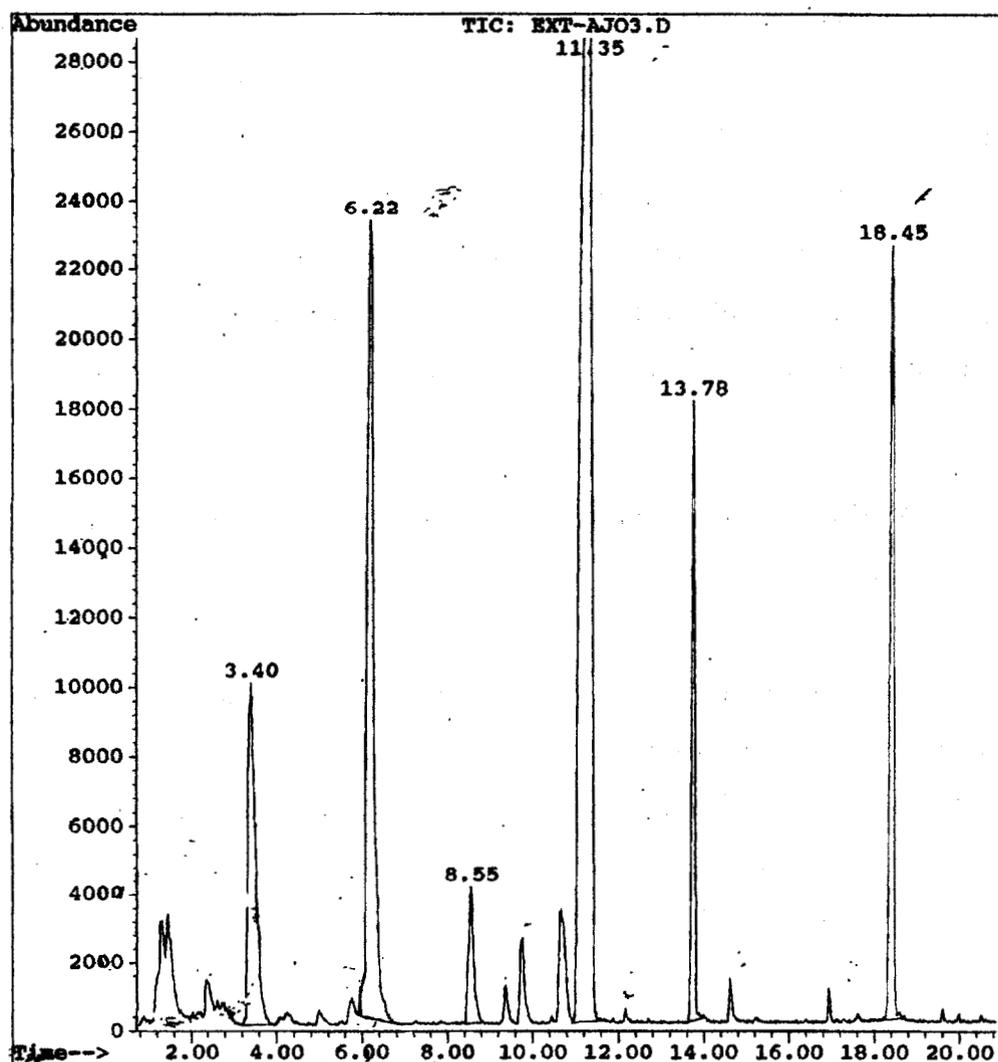


Figura 25. Cromatograma de aceite esencial de ajo (*Allium sativum*) obtenido por arrastre de vapor en condiciones de vacío estándar.

diferente estructura. Con tiempo de retención de 13.78 minutos el metil, 2-propenil trisulfuro tiene una abundancia relativa de 16.36 % le sigue con 6.22 min de tiempo de retención

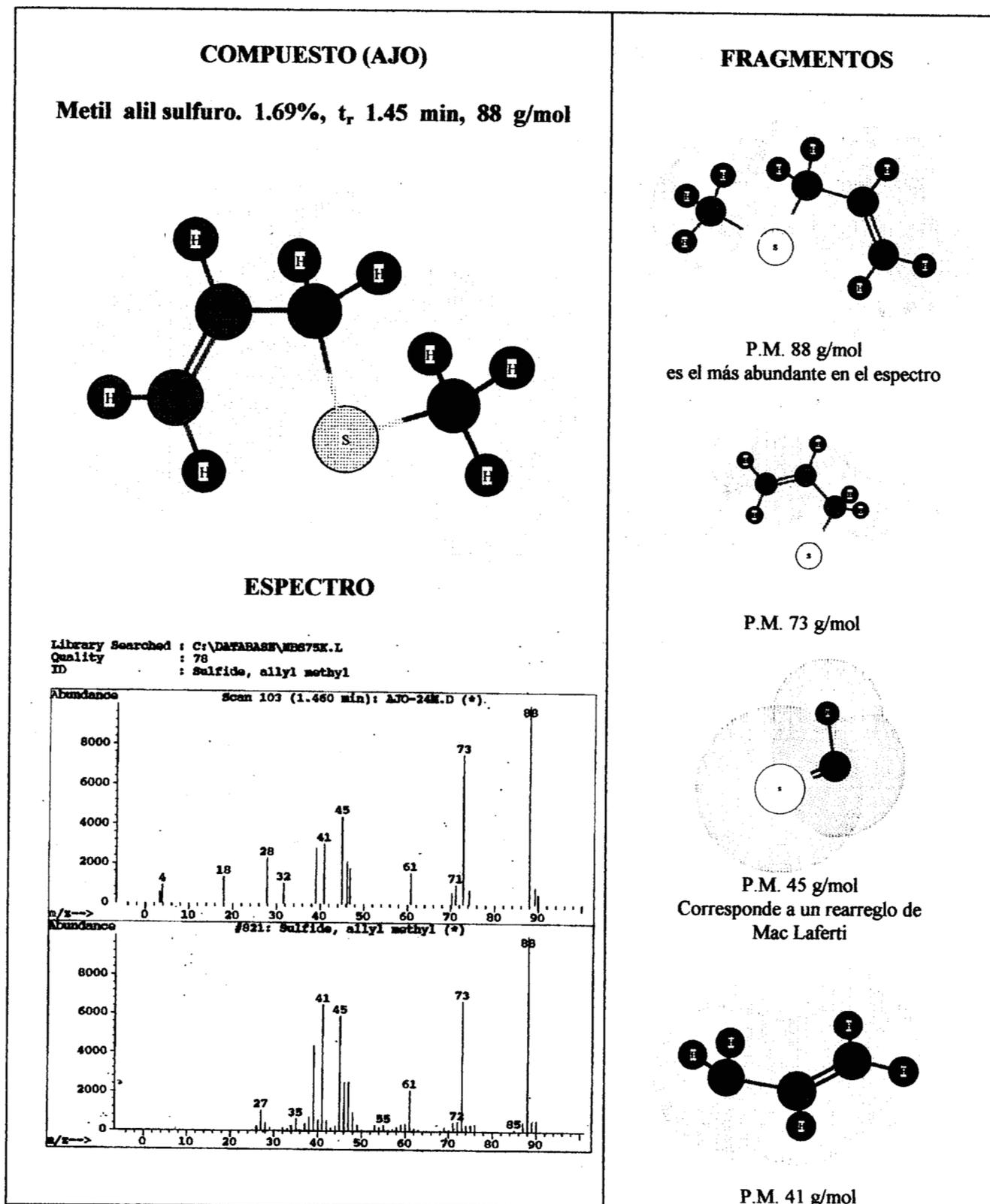
aproximado el 2-propenil metil disulfuro con 11.35 %. En quinto lugar por abundancia relativa de 4.8 % y tiempo de retención 3.40 min se encuentra al 3-3'tio bis, 1-propeno. Con 4.6 % de abundancia y tiempo de retención de 8.55 min el dimetil-trisulfuro. Finalmente y con abundancias por abajo de 1.7 % se identificaron otros cuatro compuestos y corresponden a los picos de 1.45, 2.37, 9.7 y 10.64 min de tiempo de retención y son: metil alil sulfuro, dimetil disulfuro, 2-propenil propil disulfuro y el 3 (alil-tio) ácido propiónico respectivamente.

**Tabla 12.** Compuestos identificados en el aceite esencial de ajo (*Allium sativum*)

TIEMPO DE RETENCIÓN (minutos)	ABUNDANCIA RELATIVA (%- ÁREA)	PESO MOLECULAR g/mol	NOMBRE
1.45	1.69	88	Metil alil sulfuro
2.37	1.11	94	Dimetil disulfuro
3.40	4.8	114	3-3'-tio bis, 1-propeno
6.22	11.35	120	2 Propenil metil disulfuro
8.55	4.6	126	dimetil - trisulfuro
9.7	0.24	148	2-propenil propil disulfuro
10.64	0.86	146	3-(alil tio), ácido propiónico
11.35	35.59	146	dialil disulfuro
13.78	16.36	152	metil, 2-propenil trisulfuro
18.45	18.39	178	di-2-propenil trisulfuro

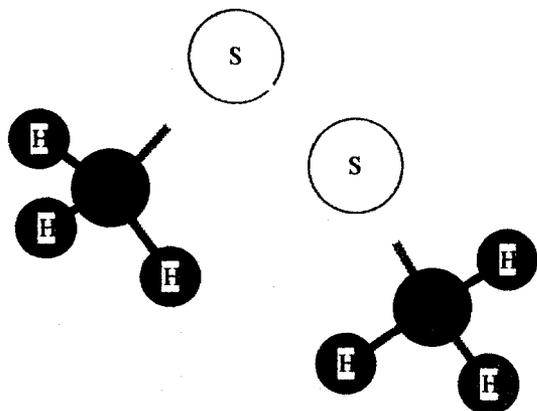
La Tabla 13 presenta los patrones de fragmentación de cada uno de los compuestos identificados en el aceite esencial de ajo.

**Tabla 13.** Patrones de fragmentación de 10 compuestos identificados en el aceite esencial de ajo obtenido por el método de arrastre de vapor.

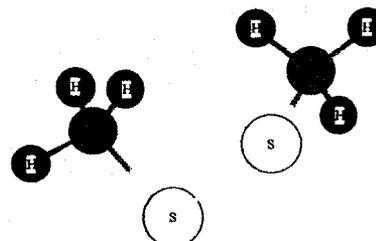


**COMPUESTO (AJO)**

**Dimetil disulfuro. 1.11%, R<sub>f</sub> 2.37 min, 94 g/mol**



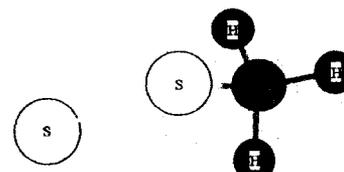
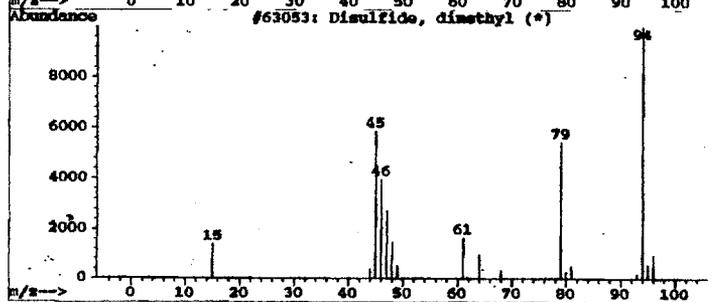
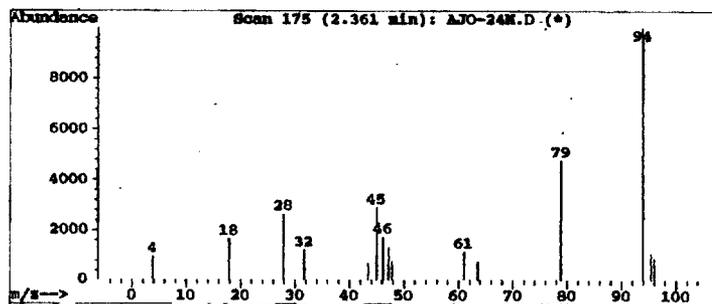
**FRAGMENTOS**



P.M. 94 g/mol  
es el más abundante en el espectro

**ESPECTRO**

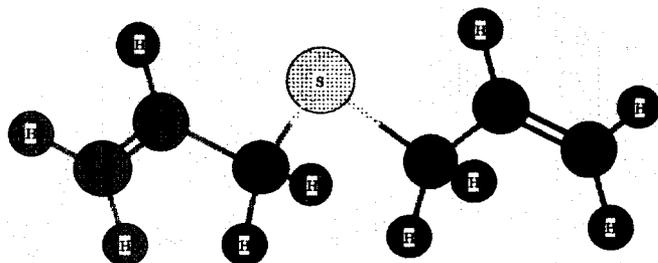
Library Searched : C:\DATABASE\MS75K.L  
Quality : 91  
ID : Disulfide, dimethyl



P.M. 79 g/mol

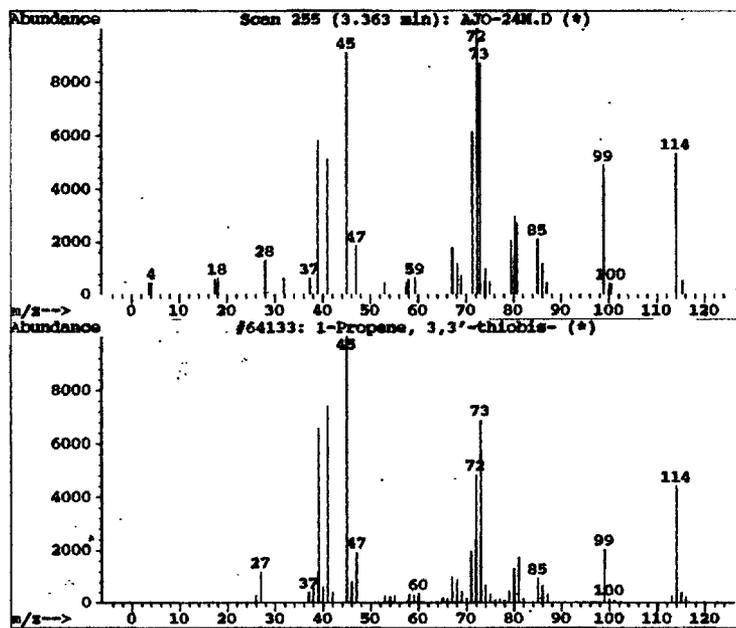
### COMPUESTO (AJO)

3-3'-tio bis, 1-propeno. 4.8%,  $R_f$  3.40 min, 114 g/mol

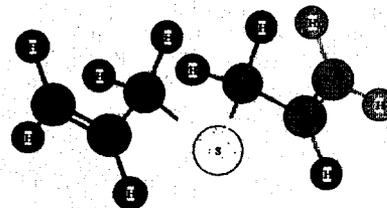


### ESPECTRO

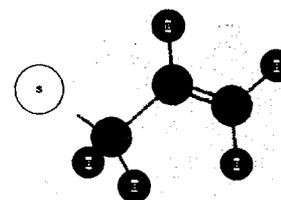
Library Searched : C:\DATABASE\MS75K.L  
Quality : 90  
ID : 1-Propene, 3,3'-thiobis-



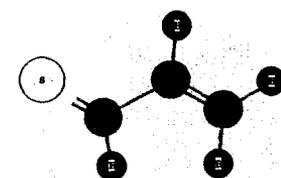
### FRAGMENTOS



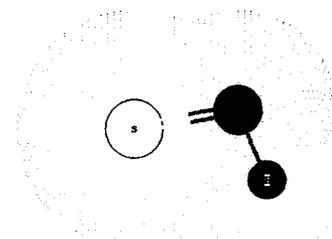
P.M. 114 g/mol



P.M. 73 g/mol



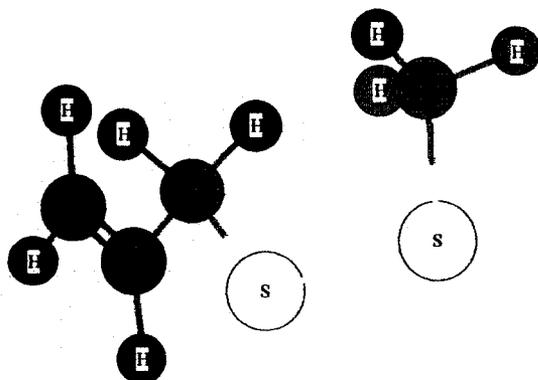
P.M. 72 g/mol  
es el más abundante en el espectro



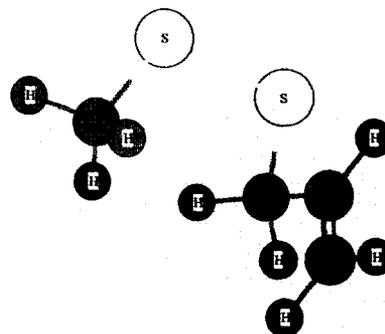
P.M. 45 g/mol  
Corresponde a un rearrreglo de  
Mac Laferti

**COMPUESTO (AJO)**

**2 Propenil metil disulfuro. 11.35%,  
R<sub>f</sub> 6.22 min, 120 g/mol**



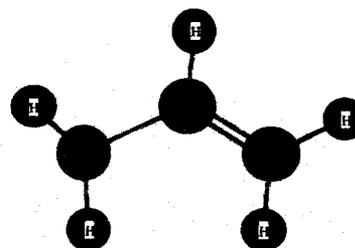
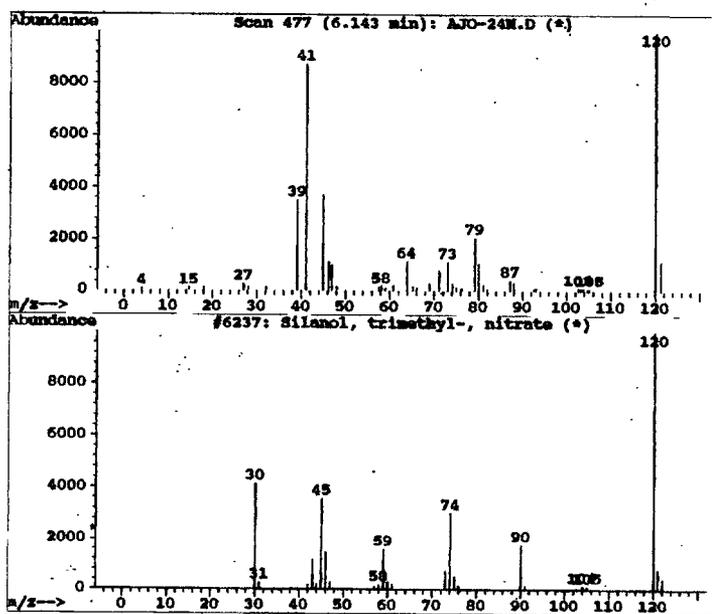
**FRAGMENTOS**



P.M. 120 g/mol  
es el más abundante en el espectro

**ESPECTRO**

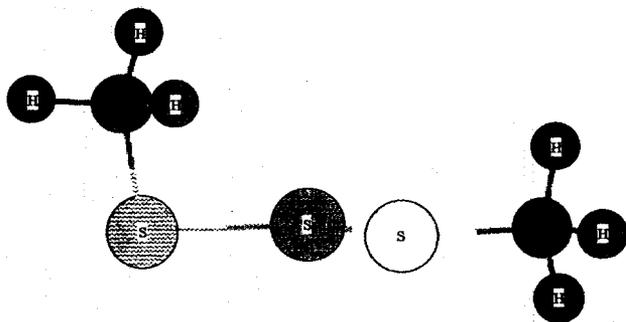
Library Searched : C:\DATABASE\MSB75K.L  
Quality : 42  
ID : *2-propenyl methyl disulfide*  
: silanol, trimethyl-, nitrate



P.M. 41 g/mol

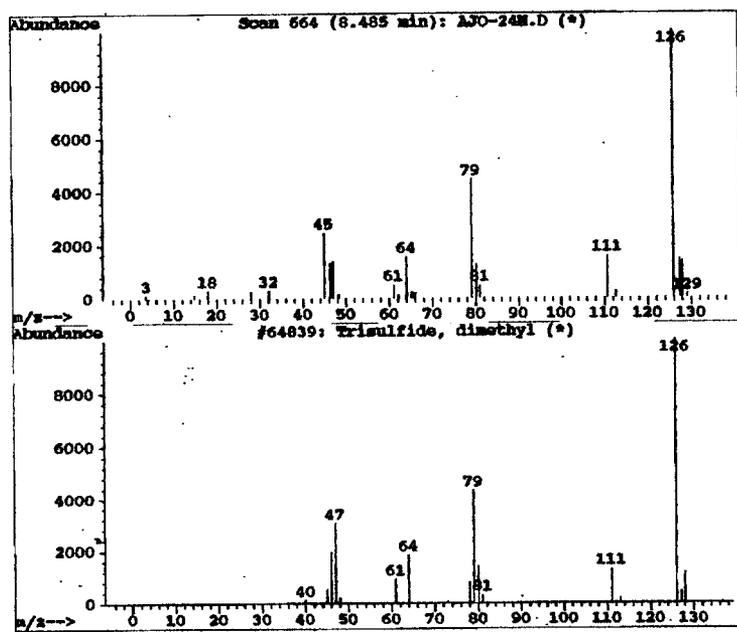
### COMPUESTO (AJO)

Dimetil trisulfuro. 4.6%,  $R_f$  8.55 min, 126 g/mol

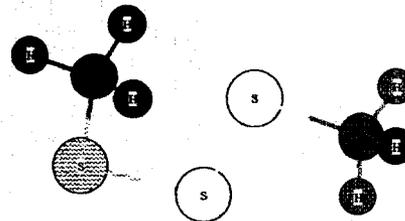


### ESPECTRO

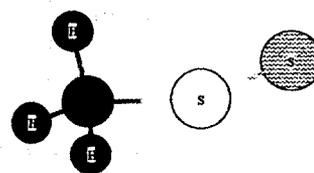
Library Searched : C:\DATABASE\NBS75K.L  
Quality : 91  
ID : Trisulfide, dimethyl



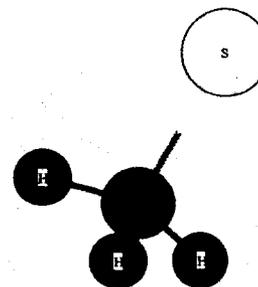
### FRAGMENTOS



P.M. 126 g/mol  
es el más abundante en el espectro



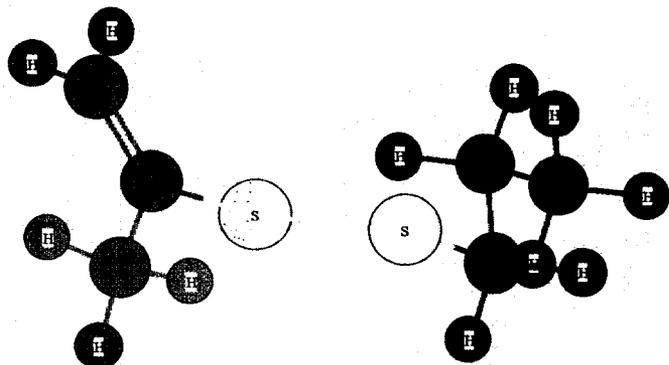
P.M. 79 g/mol



P.M. 45 g/mol

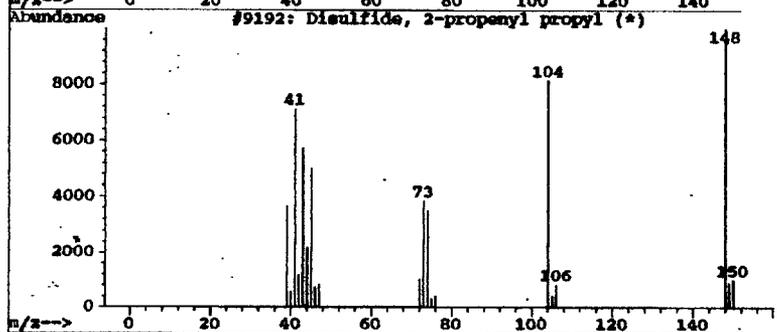
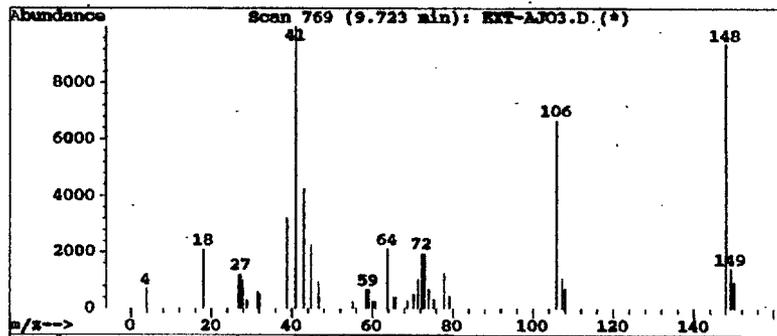
**COMPUESTO (AJO)**

**2-Propenil propil disulfuro. 0.24%, R<sub>f</sub> 9.7 min, 148 g/mol**

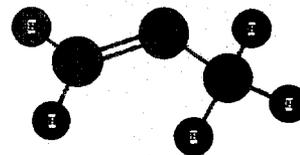


**ESPECTRO**

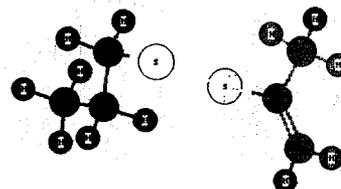
Library Searched : C:\DATABASE\NBS75K.L  
 Quality : 46  
 ID : Disulfide, 2-propenyl propyl



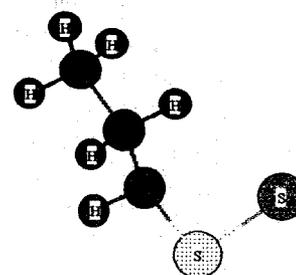
**FRAGMENTOS**



P.M. 41 g/mol  
 es el más abundante en el espectro



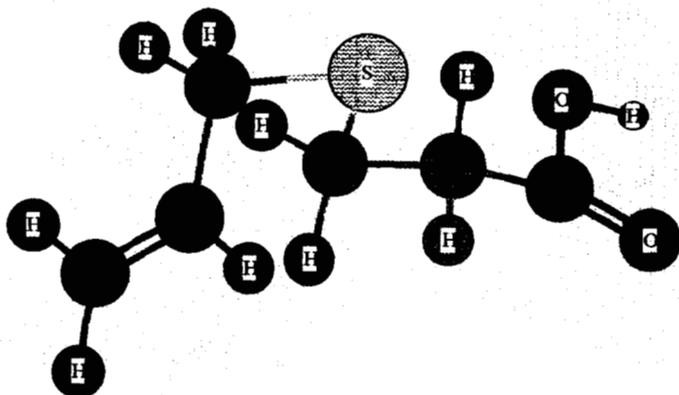
P.M. 148 g/mol



P.M. 106 g/mol

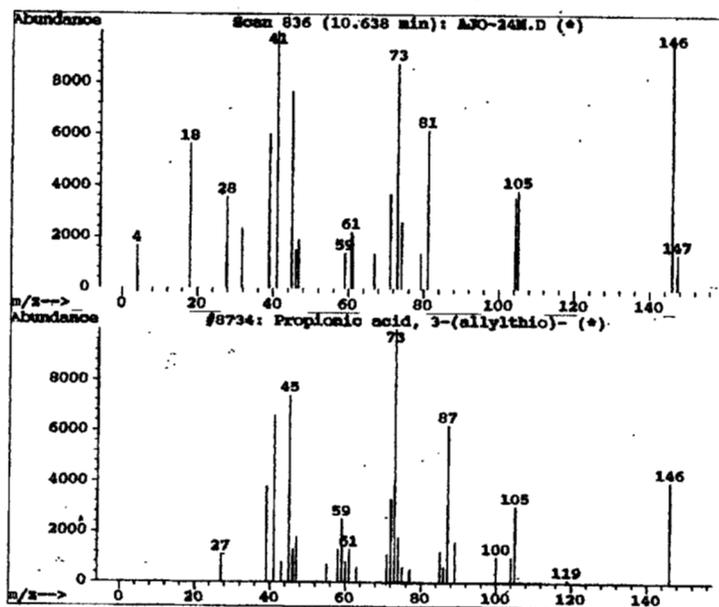
## COMPUESTO (AJO)

3-(alil tio), ácido propiónico. 0.86%,  
 R<sub>f</sub> 10.64 min, 146 g/mol

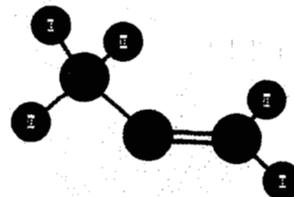


## ESPECTRO

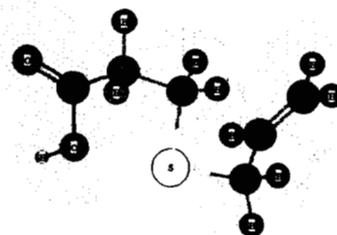
Library Searched : C:\DATABASE\MBS75K.L  
 Quality : 50  
 ID : Propionic acid, 3-(allylthio)-



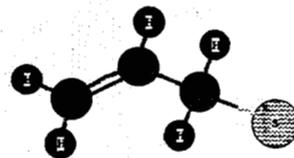
## FRAGMENTOS



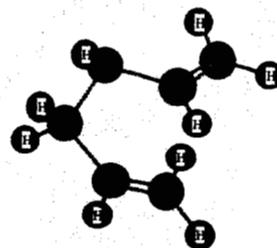
P.M. 41 g/mol  
 es el más abundante en el espectro



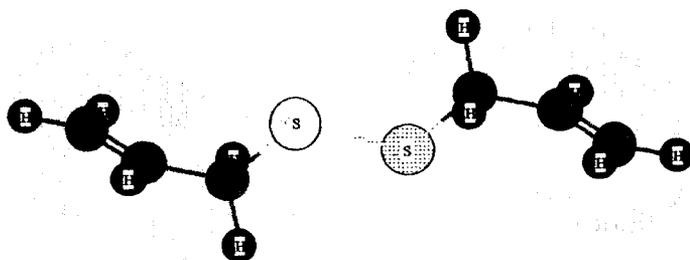
P.M. 146 g/mol



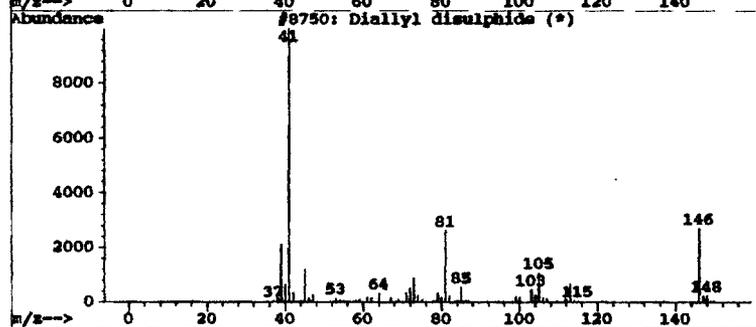
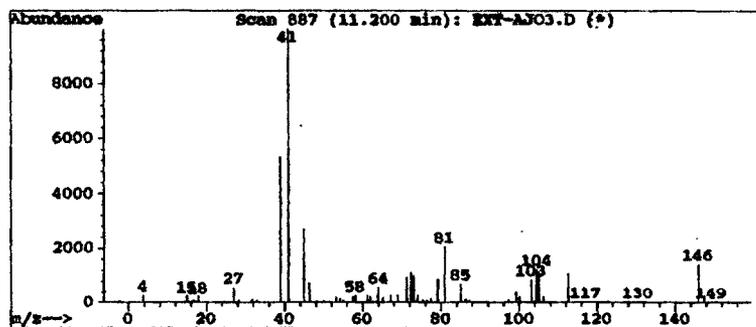
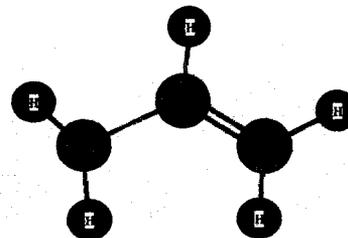
P.M. 73 g/mol



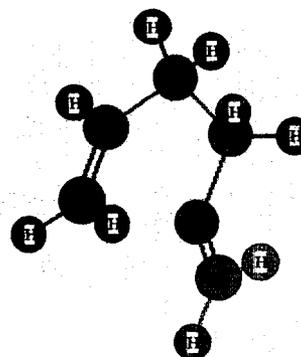
P.M. 81 g/mol  
 Corresponde a un rearrreglo de  
 Mac Laferti

**COMPUESTO (AJO)****Dialil disulfuro. 35.59 %, R<sub>t</sub> 11.35 min, 146 g/mol****ESPECTRO**

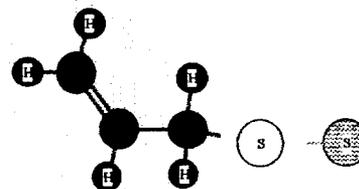
Library Searched : C:\DATABASE\MS75K.L  
 Quality : 35  
 ID : Diallyl disulphide

**FRAGMENTOS**

P.M. 41 g/mol  
 es el más abundante en el espectro



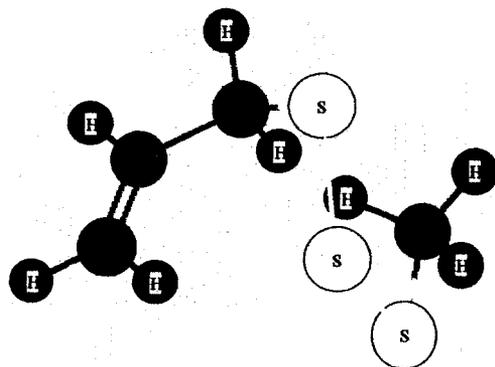
P.M. 81 g/mol  
 es un rearrreglo de Mac Laferti



P.M. 105 g/mol

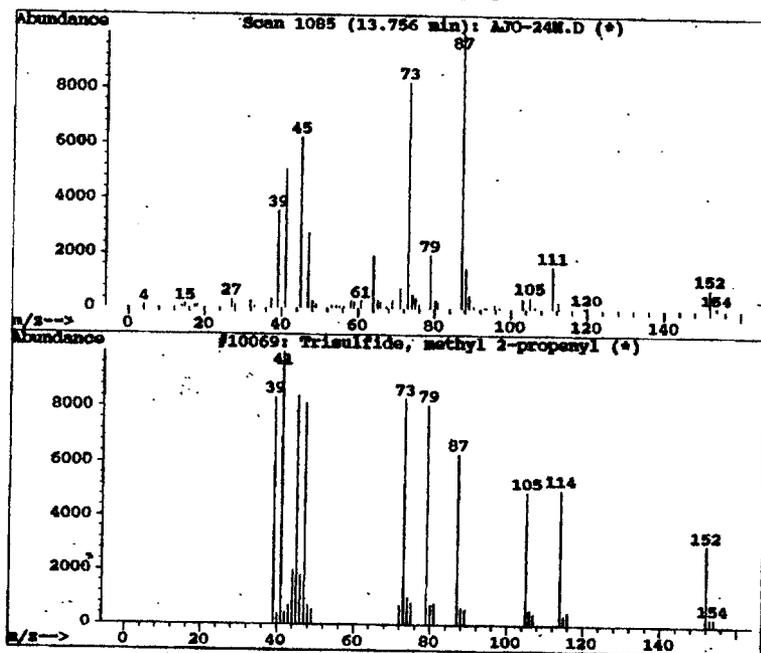
### COMPUESTO (AJO)

Metil, 2-propenil trisulfuro. 16.36%,  
R<sub>f</sub> 13.78 min, 152 g/mol

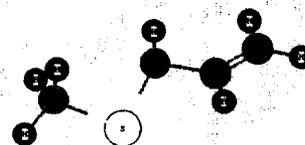


### ESPECTRO

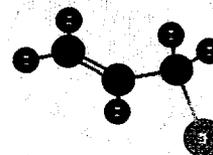
Library Searched : C:\DATABASE\MBS75K.L  
Quality : 12  
ID : Trisulfide, methyl 2-propenyl



### FRAGMENTOS



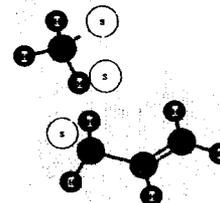
P.M. 87 g/mol  
rearrreglo de Mac Laferti  
es el más abundante en el espectro



P.M. 73 g/mol



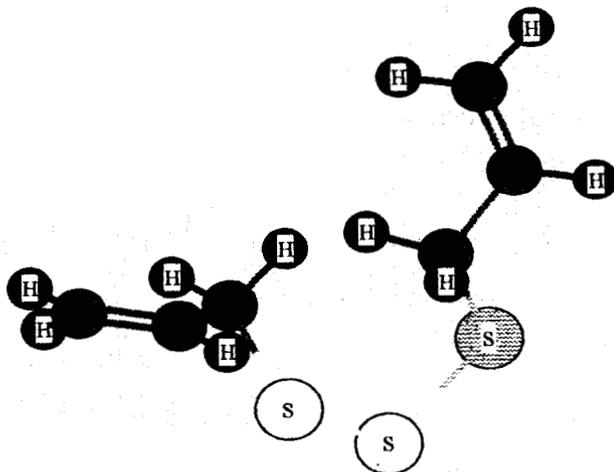
P.M. 45 g/mol



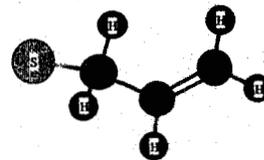
P.M. 152 g/mol

**COMPUESTO (AJO)**

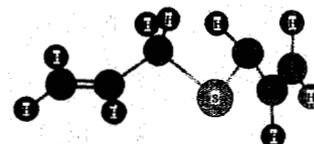
**di-2-propenil trisulfuro. 18.39%, R<sub>f</sub> 18.45 min, 178 g/mol**



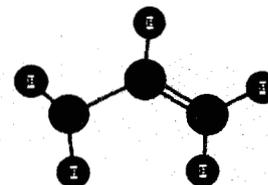
**FRAGMENTOS**



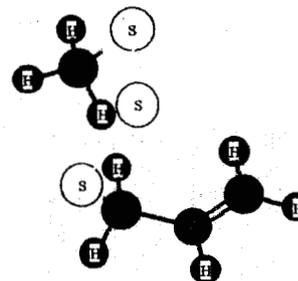
P.M. 81 g/mol  
es el más abundante en el espectro



P.M. 113 g/mol  
Corresponde a un rearrreglo de  
Mac Laferti



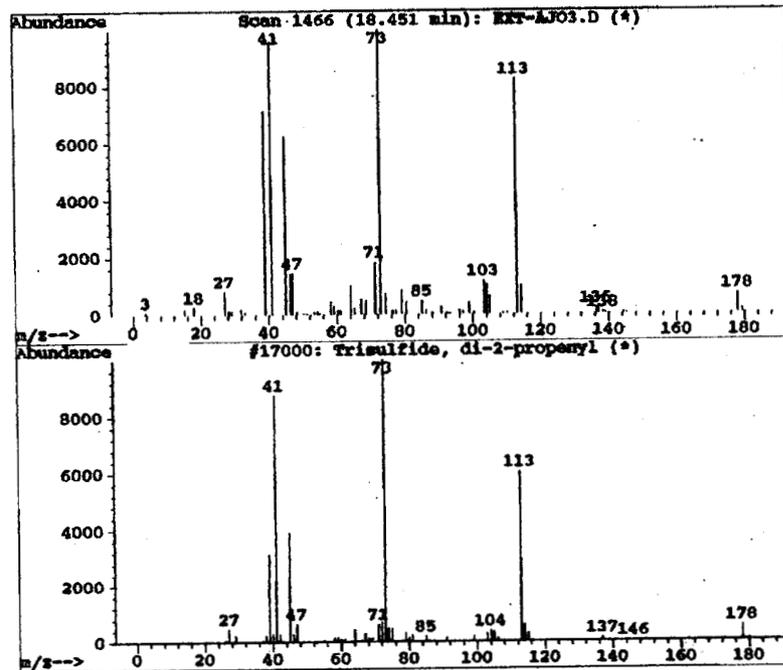
P.M. 41 g/mol



P.M. 178 g/mol

**ESPECTRO**

Library Searched : C:\DATABASE\NBS75K.L  
Quality : 62  
ID : Trisulfide, di-2-propenyl



Se ha reportado que el producto primario de la reacción enzimática en *Allium* es el ácido sulfénico el cual se transforma inmediatamente a tiosulfonatos; éstos se descomponen en disulfuros, tiosulfonatos, trisulfuros que contienen metil, propil y 1-propenil, sulfuros, di, tri y tetrasulfuros que aparecen en el aceite esencial de cebolla y ajo obtenido por destilación (Block y Zhao, 1992; Whitaker, 1975).

El potencial de los sabores y aromas en cebollas y ajos está determinado genéticamente. Chieko y col. (1993) estudiaron los compuestos volátiles formados en un híbrido entre ajo y cebolla, éstos aunque tienen la misma naturaleza azufrada, presentan diferentes constituyentes de las plantas que los originaron. Xiao-Jia y col. (1994) identifican la abundancia natural de los volátiles que contienen selenio en especies *Allium* como son: ajo, ajo variedad elefante, cebolla y ajo moruno o cebollin en donde queda de manifiesto la diversidad de constituyentes de compuestos químicos a pesar de ser de la misma especie. Whitaker (1975) reportó que en el desarrollo del sabor, olor y pungencia en cebolla y ajo y en general la composición química de los lípidos aromáticos en estos vegetales durante su síntesis están influenciados por el contenido de azufre del suelo y del balance nutricional del entorno en que crece la planta. También, influyen en la composición química de los aceites las condiciones ambientales y el tratamiento térmico. Las proporciones de los constituyentes dependen de la edad de la planta (Block y col. 1994). Mazza y col. (1992) estudiaron la composición del aceite de ajo según la maduración y el grado de madurez y encontraron que la abundancia y composición cambia en los diferentes estadios de una misma especie, aunque otros autores (Lawson, 1993; Randle y col. 1994; Lawson y col., 1992; Lawson y col. 1991; Koch y col, 1989; Whitaker, 1975; Brodnitz y col. 1971; Brodnitz y col., 1969) concluyen que en promedio la composición general de los constituyentes es constante para las mismas variedades, mismos métodos de extracción y las mismas prácticas culturales en el cultivo. Reineccius (1994) informó que entre los factores que modifican la composición de los compuestos obtenidos en los aceites esenciales el más importante a considerar es el método de extracción. Por ejemplo, durante la destilación el calor induce reacciones de oxidación que modifica los constituyentes. La diferencia en los métodos de extracción da origen a los diferentes compuestos y calidades de éstos (Chieko y col., 1993; Carson, 1987).

### V.2.2. Cebolla (*Allium cepa*)

El número total de compuestos separados en cebollas fueron 38, totalmente caracterizados 20 y parcialmente 4. La Figura 26 presenta el cromatograma del aceite esencial de cebolla, obtenido por arrastre de vapor.

De los 20 compuestos caracterizados totalmente, los dos más abundantes no contienen azufre y son aldehídos, el propanal con 27 % de abundancia relativa y tiempo de retención de 0.95 min y el 2-pentenal, 2-metil (2-etil-t-butanal) a 3.63 min con 13.82 % de abundancia relativa el cual se puede formar por condensación aldólica y una subsecuente deshidratación de dos moléculas de propanal. Estos compuestos son de los contribuyentes del sabor y aroma más importantes en cebollas frescas. El precursor más importante, el S-propenil cistein-S-óxido, forma el factor lacrimógeno inestable tiopropanal-S-óxido (Block y col., 1994; Block y Zhao, 1992; Block y col., 1992; Carson, 1987; Boelens y col., 1971; Brodnitz y Pascale, 1971). La tiazolidina, con tiempo de retención de 8.13 minutos y abundancia de 8.4 % de abundancia relativa es cíclico y contiene dos átomos de azufre y uno de nitrógeno. Los demás compuestos tienen abundancias por abajo del 6 % y de ellos 8 son cíclicos y contienen azufre, los restantes son alifáticos y de la misma forma, también, contienen azufre. Se debe notar que en promedio el 40 % de los dos constituyentes más abundantes no contienen al azufre y el restante 60 % lo integran alrededor de 28 compuestos que si lo contienen. La Tabla 14 presenta los compuestos identificados y caracterizados en el aceite esencial de cebolla, la Tabla 15 presenta la caracterización mediante espectrometría de masas de 20 compuestos.

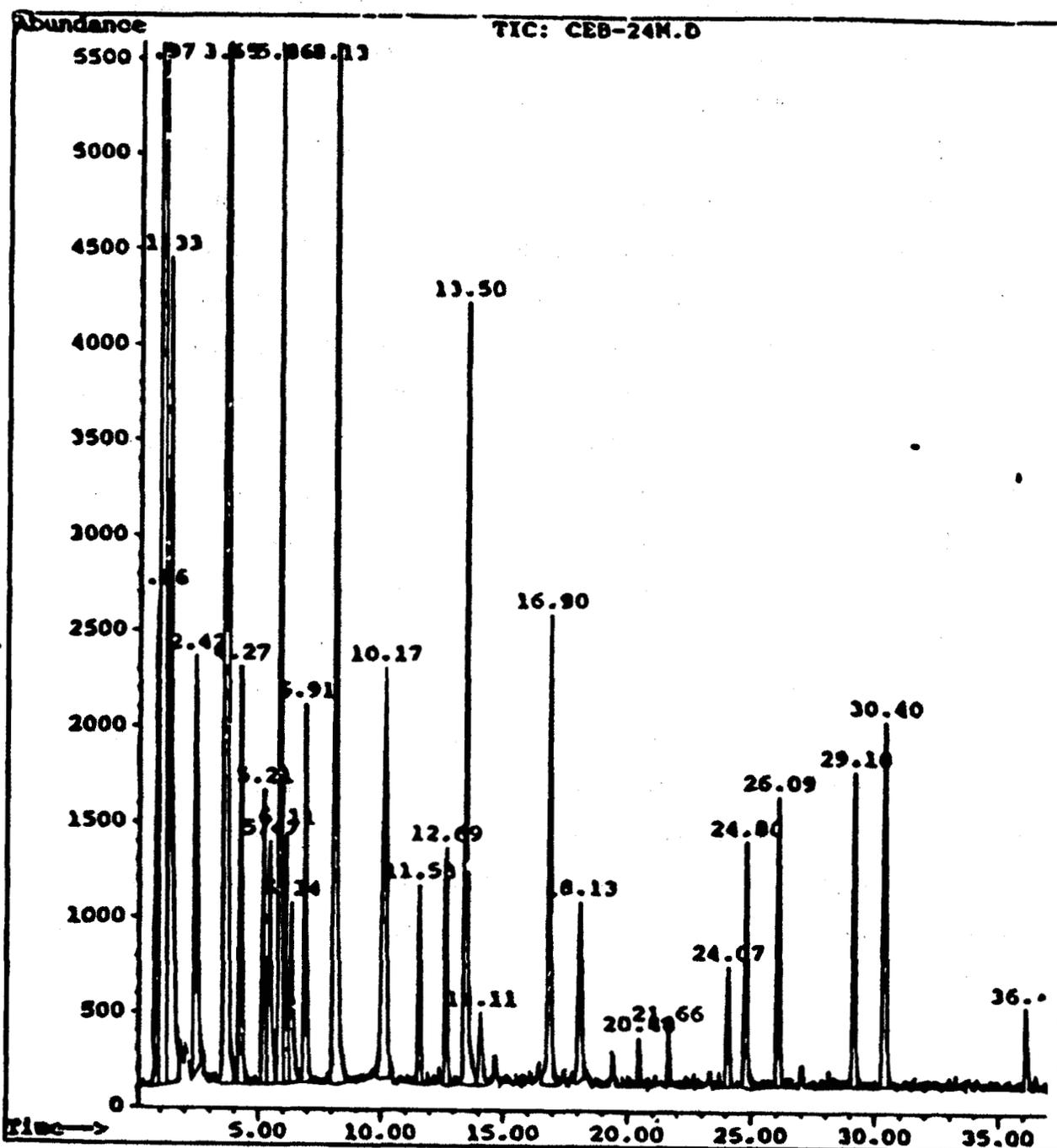
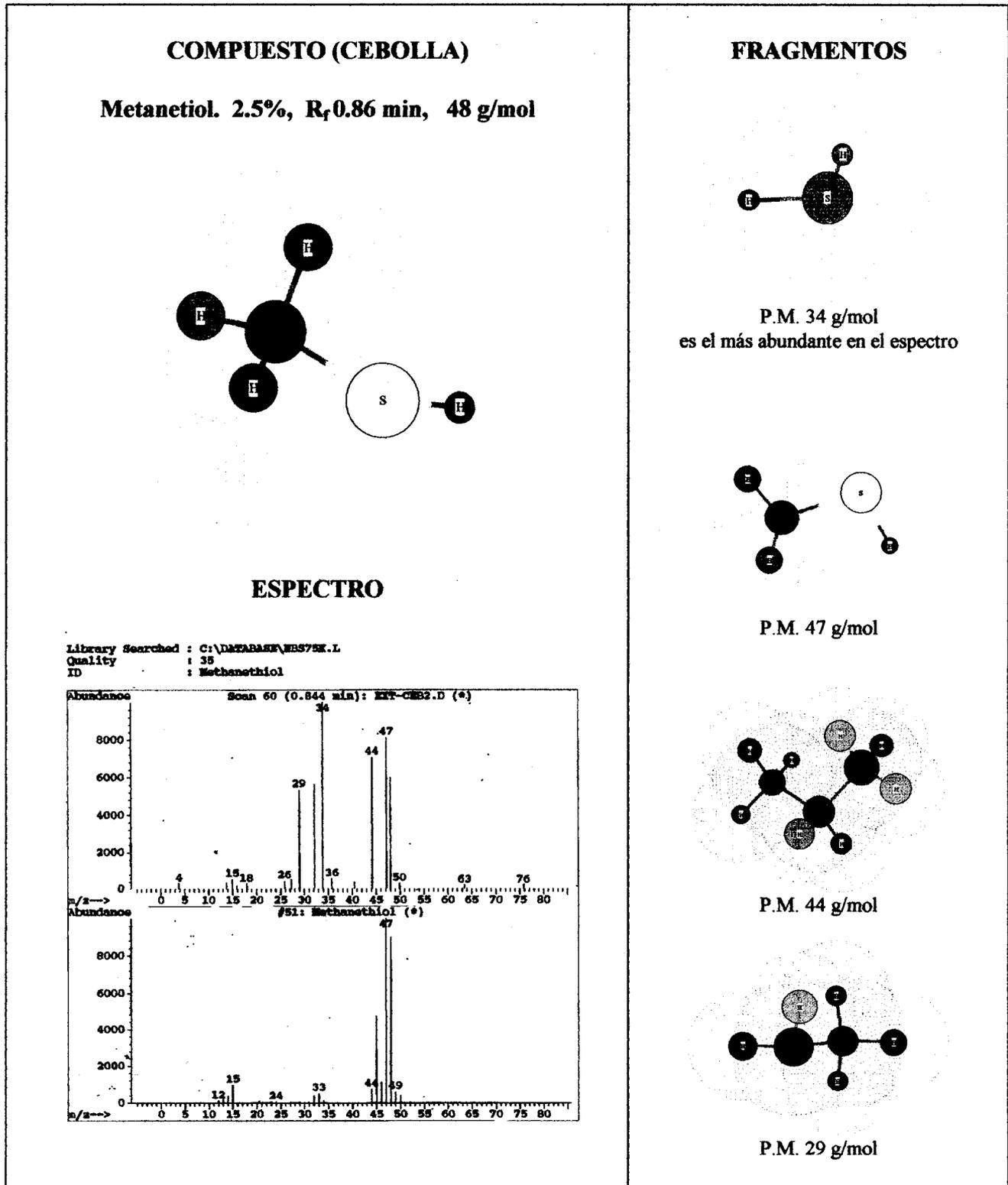


Figura 26. Cromatograma de aceite esencial de cebolla (*Allium cepa*) obtenido por arrastre de vapor en condiciones de vacío estándar

**Tabla 14.** Compuestos identificados en el aceite esencial de cebolla (*Allium cepa*)

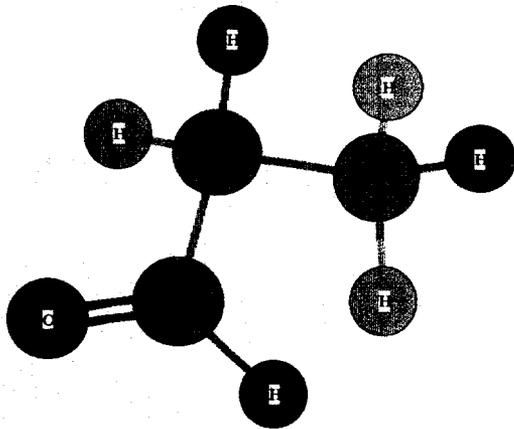
TIEMPO DE RETENCIÓN (minutos)	ABUNDANCIA RELATIVA (%- ÁREA)	PESO MOLECULAR g/mol	NOMBRE
0.86	2.5	48	Metanetiol
0.95	27	58	Propanal
2.40	2.8	94	Dimetil disulfuro
3.63	13.82	98	2-pentenal, 2-metil (2- etil-t-butanal)
5.2	1.52	122	Metil propil disulfuro
5.46	1.6	108	Metil etil disulfuro
5.80	5.7	112	2,5-dimetil-tiofeno
6.10	1.1	120	1,3-ditiano
6.34	1.1	108	1,3-propan ditiol
6.91	1.8	120	1,4-ditiano
8.13	8.4	122	Tiazolidina
10.17	3.5	126	Dimetil trisulfuro
11.53	0.90	148	2-propenil propil disulfuro
12.69	1.12	106	1,3-Ditiolano
16.30	2.6	154	3,3-tienil- 2- ácido propenoico
18.13	1.2	74	Metil tirano
24.07	0.64	182	Dipropil trisulfuro
29.10	1.65	180	1,2,4-tritiolano, 3,5-dietil
30.40	2.09	180	trans-3,5-Dietil-1,2,4-tritiolano
36.13	0.43	113	2,5-dimetil-tiazolio

**Tabla 15.** Caracterización mediante espectrometría de masas de 20 compuestos volátiles encontrados en cebolla (*Allium cepa*)



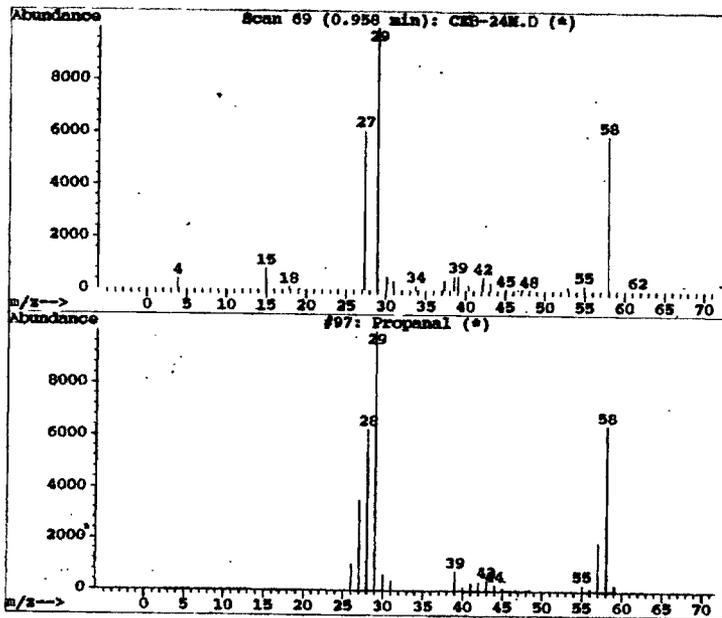
**COMPUESTO (CEBOLLA)**

**Propanal. 27%, R<sub>f</sub> 0.95 min, 58 g/mol**

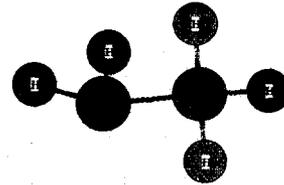


**ESPECTRO**

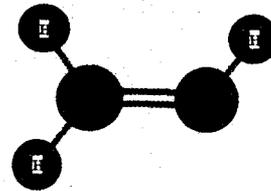
Library Searched : C:\DATABASE\MS75K.L  
 Quality : 80  
 ID : Propanal



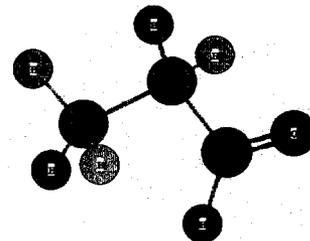
**FRAGMENTOS**



P.M. g/mol.M. 29 g/mol  
 el más abundante en el espectro



P.M. 27 g/mol  
 Corresponde a un rearrreglo de  
 Mac Laferti

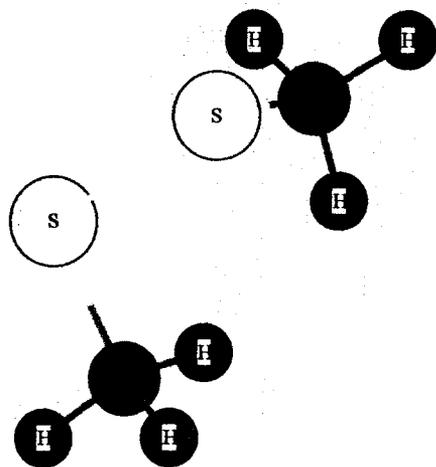


P.M. 58 g/mol  
 Corresponde al ión padre

222254

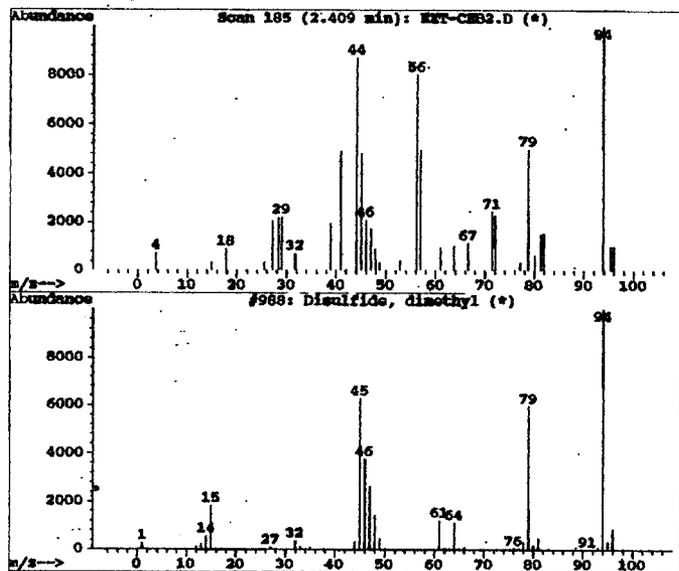
**COMPUESTO (CEBOLLA)**

**Dimetil disulfuro. 2.8%, R<sub>f</sub> 2.40 min, 94 g/mol**

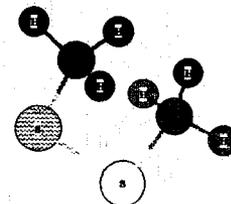


**ESPECTRO**

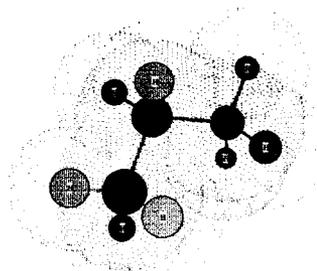
Library Searched : C:\DATABASE\MSB75K.L  
Quality : 50  
ID : Disulfido, dimethyl



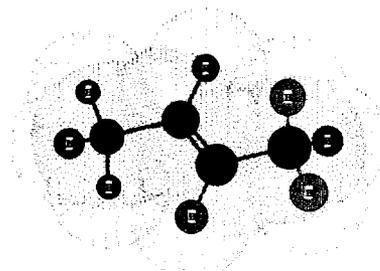
**FRAGMENTOS**



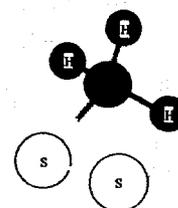
P.M. 94 g/mol  
es el más abundante en el espectro



P.M. 44 g/mol  
rearrreglo de Mac Laferti



P.M. 56 g/mol  
rearrreglo de Mac Laferti

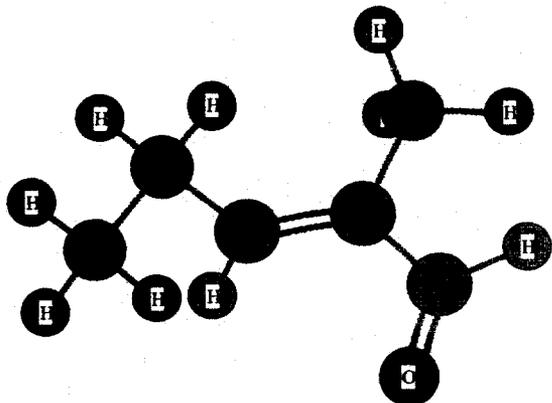


P.M. 79 g/mol

**COMPUESTO (CEBOLLA)**

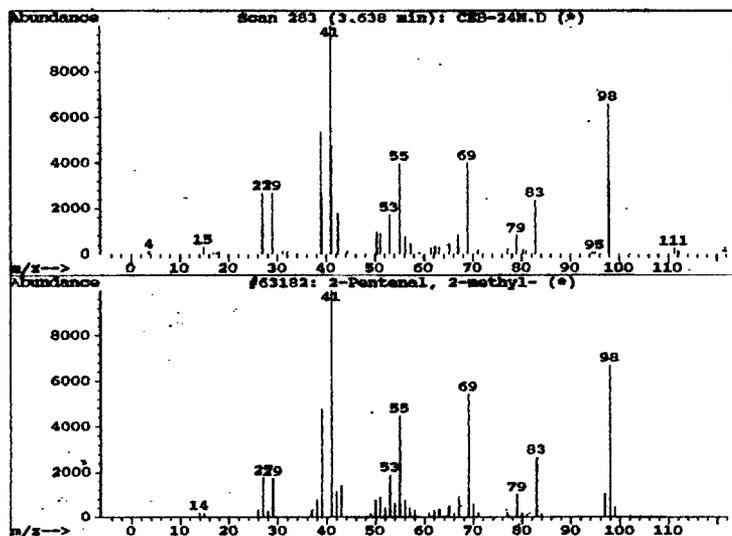
**2-pentenal, 2-metil(2-etil-t-butanal). 13.82%,**

**R<sub>f</sub> 3.63 min, 98 g/mol**

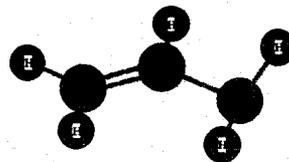


**ESPECTRO**

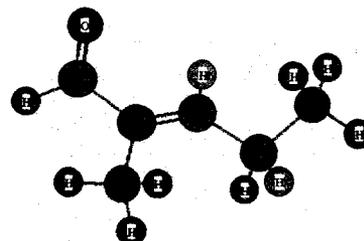
Library Searched : C:\DATABASE\MS75K.L  
Quality : 91  
ID : 2-Pentenal, 2-methyl-



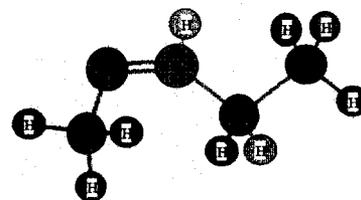
**FRAGMENTOS**



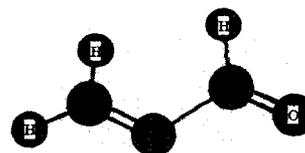
P.M. 41 g/mol  
es el más abundante en el espectro



P.M. 98 g/mol  
ion padre



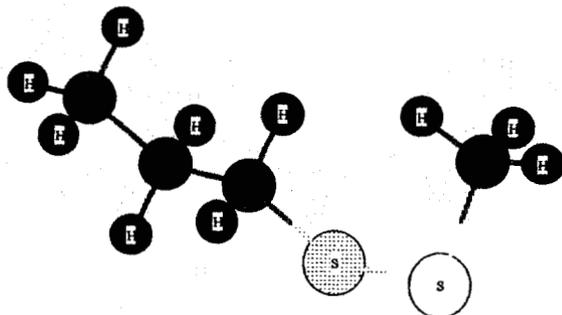
P.M. 69 g/mol



P.M. 55 g/mol  
Corresponde a un rearrreglo de  
Mac Laferti

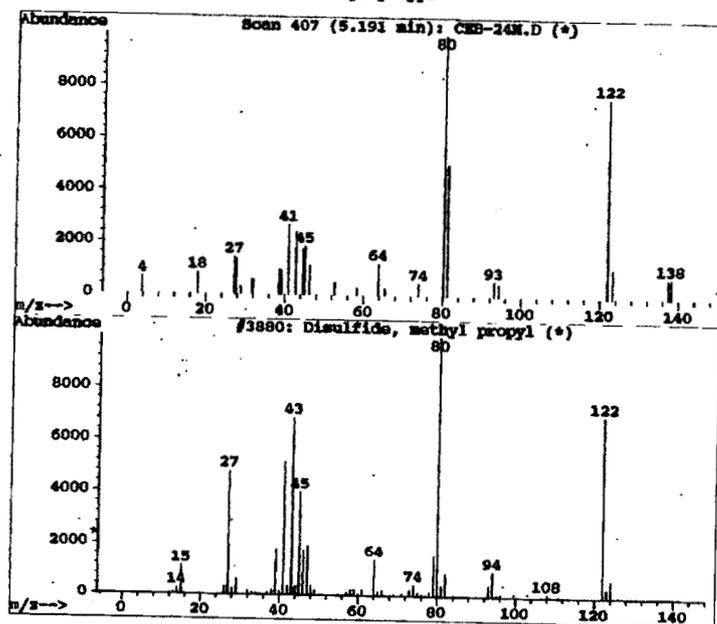
### COMPUESTO (CEBOLLA)

Metil propil disulfuro. 1.52%,  $R_f$  5.2 min, 122 g/mol

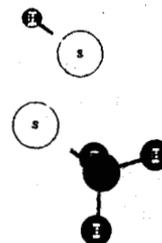


### ESPECTRO

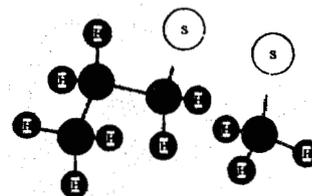
Library Searched : C:\DATABASE\MRS75K.L  
Quality : 78  
ID : Disulfido, methyl propyl



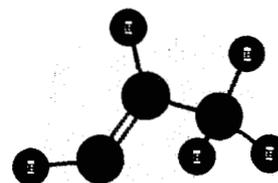
### FRAGMENTOS



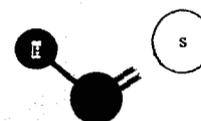
P.M. 80 g/mol  
el más abundante en el espectro



P.M. 122 g/mol



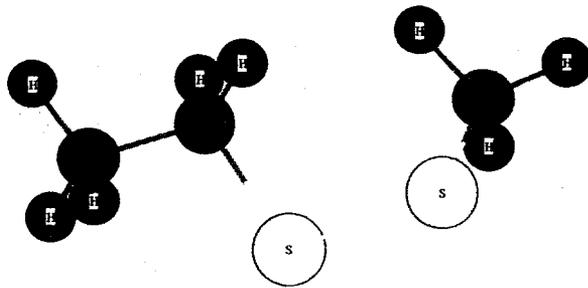
P.M. 41 g/mol



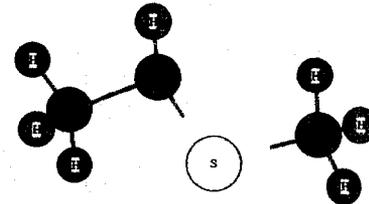
P.M. 45 g/mol

**COMPUESTO (CEBOLLA)**

**Metil etil disulfuro. 1.6%, R<sub>f</sub> 5.46 min, 108 g/mol**



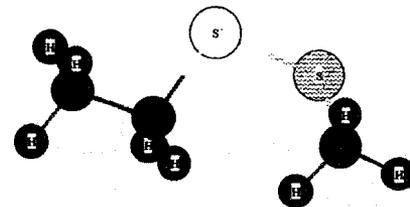
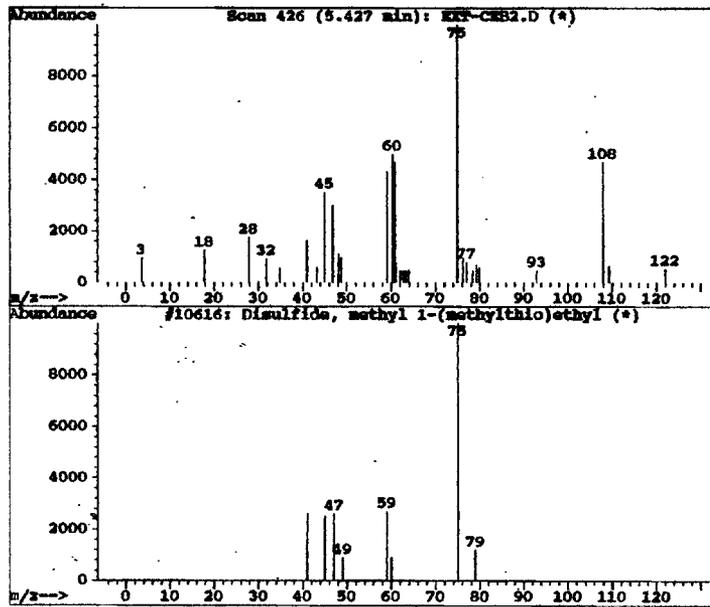
**FRAGMENTOS**



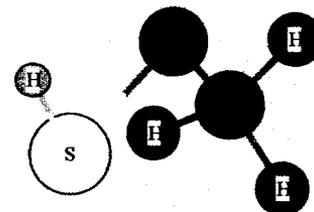
P.M. 75 g/mol  
más abundante en el espectro

**ESPECTRO**

Library Searched : C:\DATABASE\MBS75K.L  
Quality : 43  
ID : Disulfide, methyl 1-(methylthio)ethyl



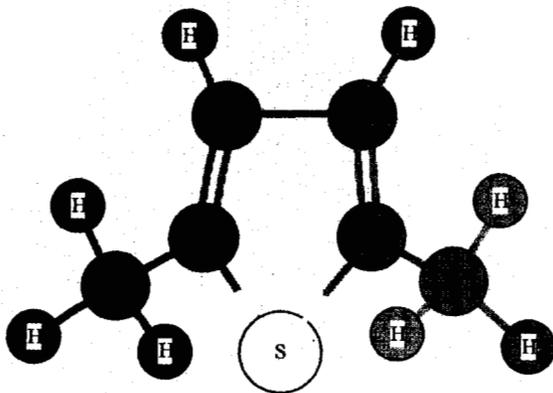
P.M. 108 g/mol



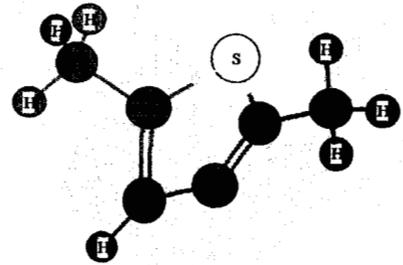
P.M. 60 g/mol

**COMPUESTO (CEBOLLA)**

**2,5-dimetil-tiofeno. 5.7%, R<sub>f</sub> 5.805 min, 112 g/mol**



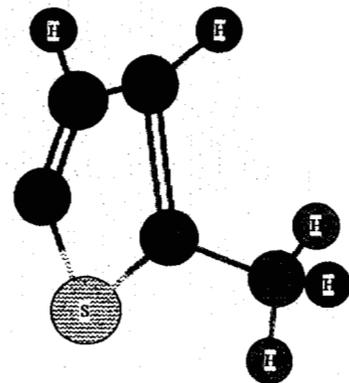
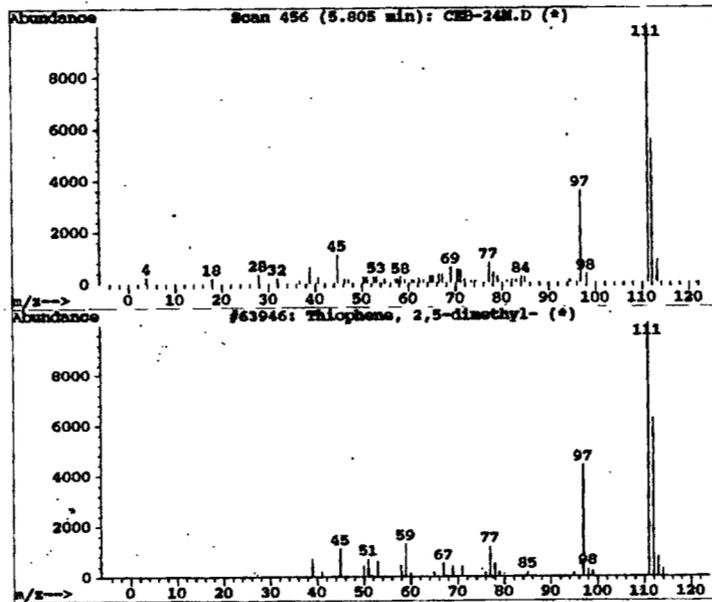
**FRAGMENTOS**



P.M. 111 g/mol  
es el más abundante en el espectro y  
corresponde al ión molecular

**ESPECTRO**

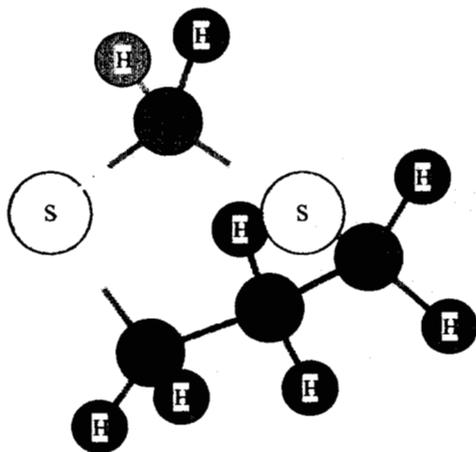
Library Searched : C:\DATABASE\MSB75K.L  
Quality : 91  
ID : Thiophene, 2,5-dimethyl-



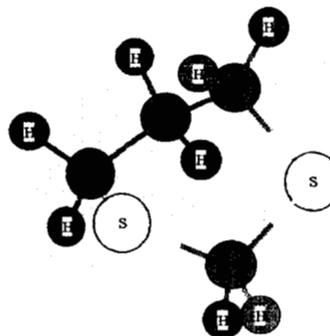
P.M. 97 g/mol

**COMPUESTO (CEBOLLA)**

1,3-ditiano. 1.1%,  $R_f$  6.10 min, 120 g/mol



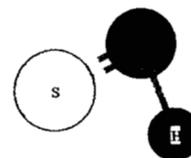
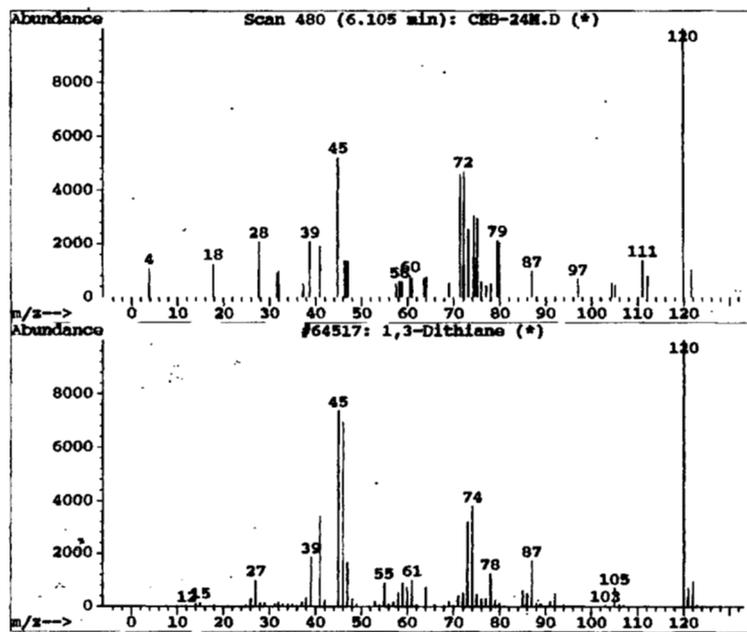
**FRAGMENTOS**



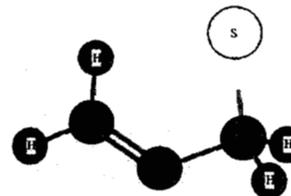
P.M. 120 g/mol  
es el más abundante en el espectro y  
corresponde al ión molecular

**ESPECTRO**

Library Searched : C:\DATABASE\NBS75K.L  
Quality : 38  
ID : 1,3-Dithiane



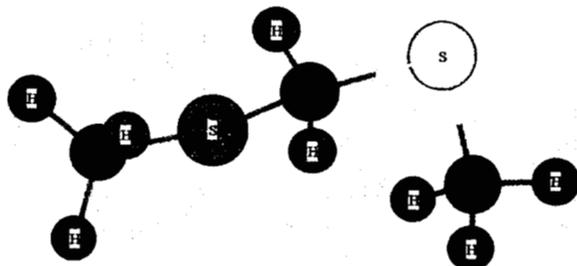
P.M. 45 g/mol



P.M. 72 g/mol

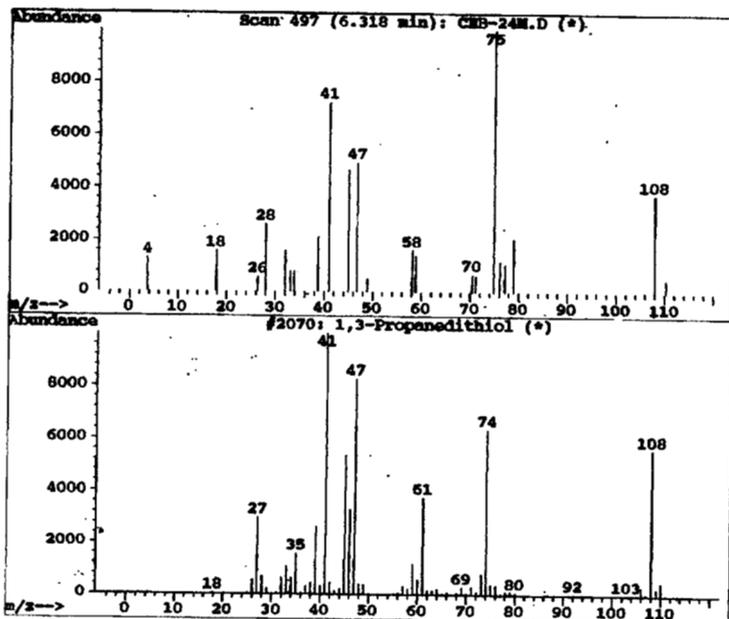
### COMPUESTO (CEBOLLA)

1,3-propan ditiol. 1.1%,  $R_f$  6.34 min, 108 g/mol

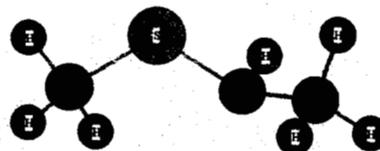


### ESPECTRO

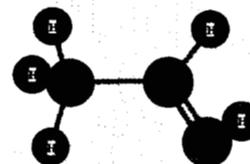
Library Searched : C:\DATABASE\MSB75K.L  
Quality : 50  
ID : 1,3-Propanedithiol



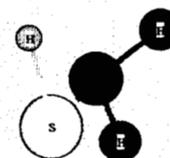
### FRAGMENTOS



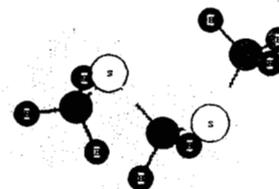
P.M. 75 g/mol  
es el más abundante en el espectro y  
corresponde al ión molecular



P.M. 41 g/mol  
Corresponde a un rearrreglo de  
Mac Laferti



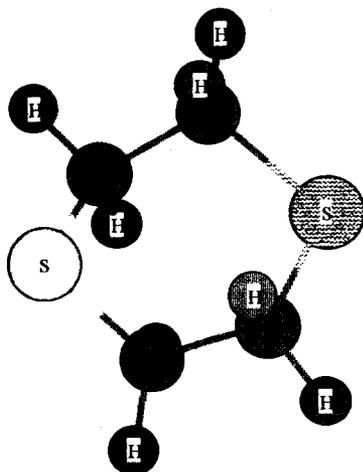
P.M. 47 g/mol



P.M. 108 g/mol

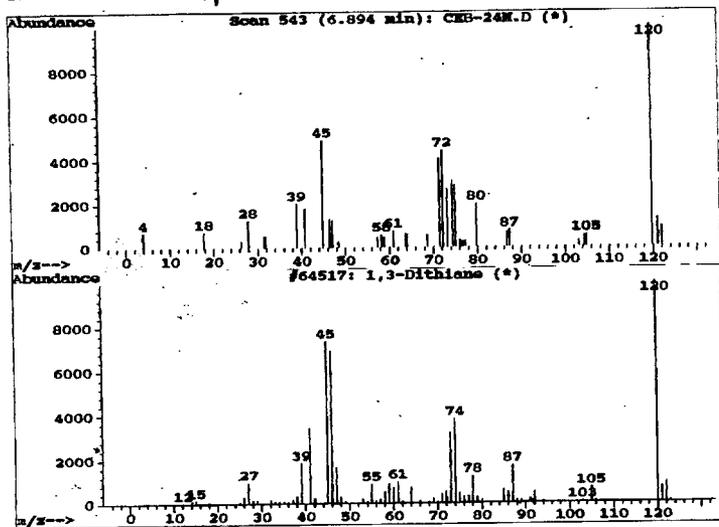
**COMPUESTO (CEBOLLA)**

1,4-ditiano. 1.8%,  $R_f$  6.91 min, 120 g/mol

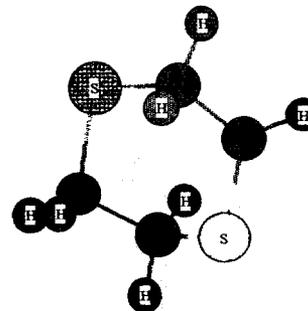


**ESPECTRO**

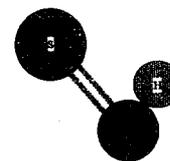
Library Searched : C:\DATABASE\MS75K.L  
 Quality : 53  
 ID : 1,4-Dithiane



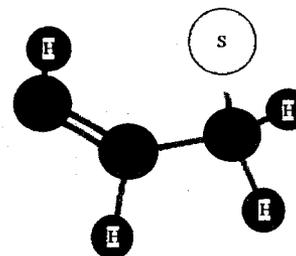
**FRAGMENTOS**



P.M. 120 g/mol  
 es el más abundante en el espectro y  
 corresponde al ión molecular



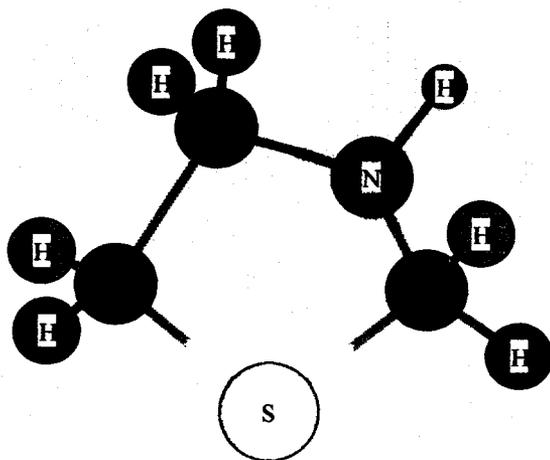
P.M. 45 g/mol



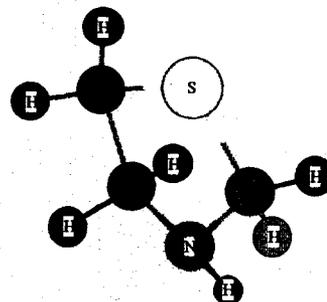
P.M. 72 g/mol

**COMPUESTO (CEBOLLA)**

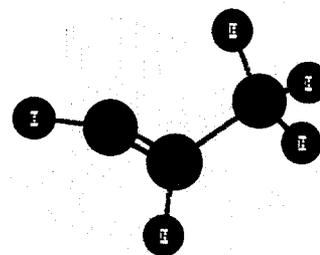
**Tiazolidina. 8.4%, R<sub>f</sub> 8.13 min, 122 g/mol**



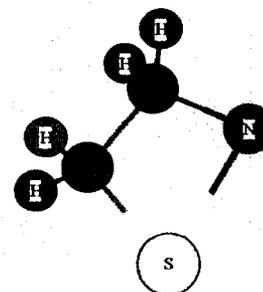
**FRAGMENTOS**



P.M. 89 g/mol  
ion padre



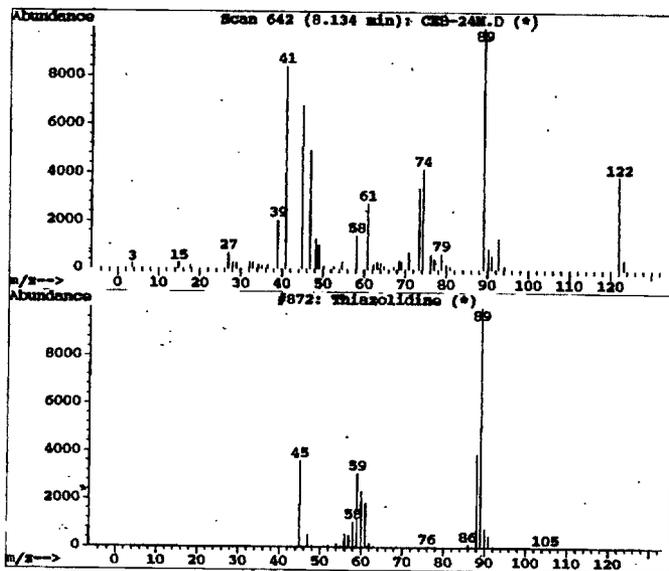
P.M. 41 g/mol  
Corresponde a un rearrreglo de  
Mac Laferti



P.M. 74 g/mol

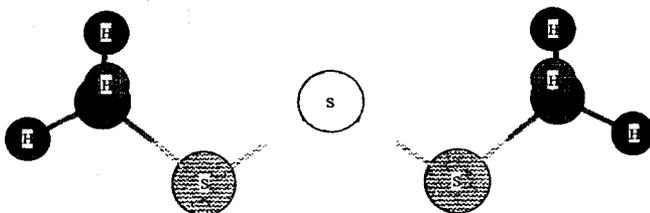
**ESPECTRO**

Library Searched : C:\DATABASE\MS75K.L  
Quality : 50  
ID : Tiazolidine



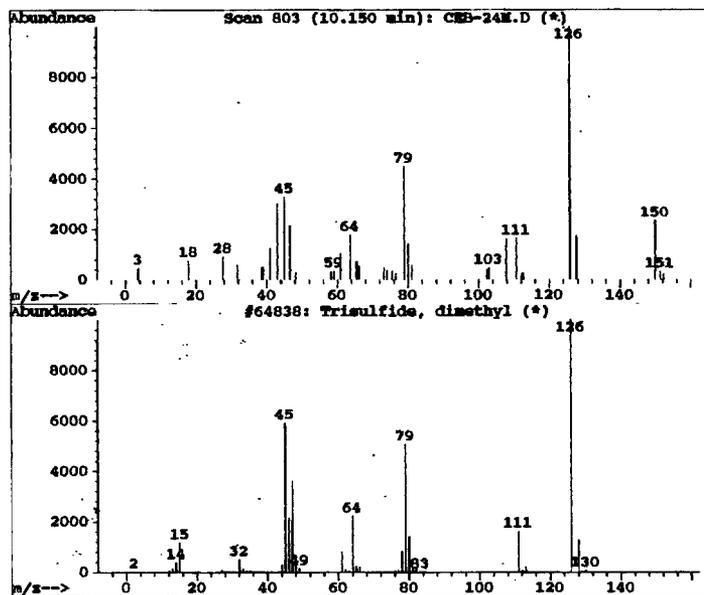
**COMPUESTO (CEBOLLA)**

Dimetil trisulfuro. 3.5%,  $R_f$  10.17 min, 126 g/mol

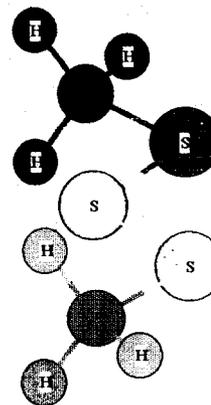


**ESPECTRO**

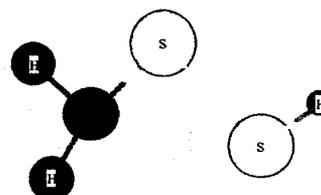
Library Searched : C:\DATABASE\MBS75K.L  
 Quality : 87  
 ID : Trisulfide, dimethyl



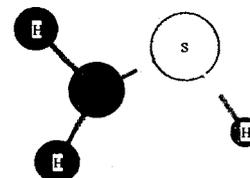
**FRAGMENTOS**



P.M. 126 g/mol  
 es el más abundante en el espectro y  
 es el ion padre



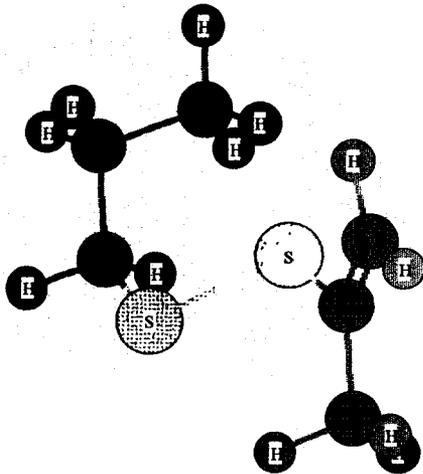
P.M. 79 g/mol



P.M. 45 g/mol

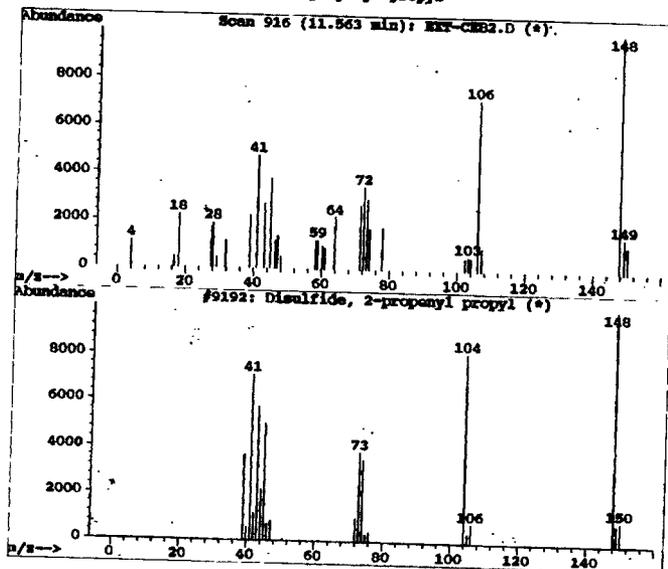
### COMPUESTO (CEBOLLA)

2-propenil propil disulfuro. 0.90%,  
R<sub>f</sub> 11.53 min, 148 g/mol

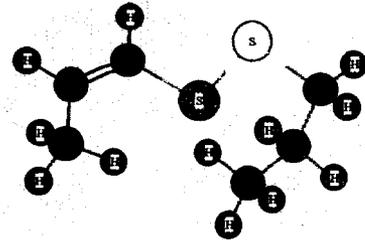


### ESPECTRO

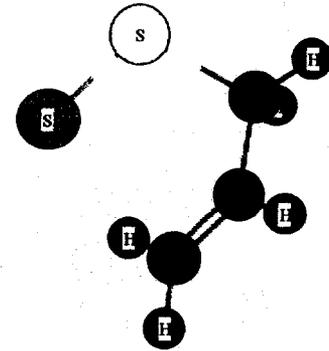
Library Searched : C:\DATABASE\MS75K.L  
Quality : 50  
ID : Disulfide, 2-propenyl propyl



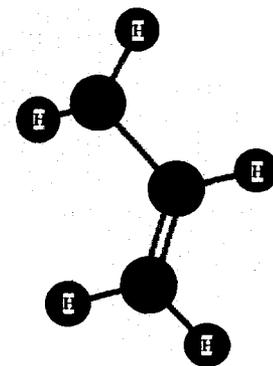
### FRAGMENTOS



P.M. 148 g/mol (es un isómero)



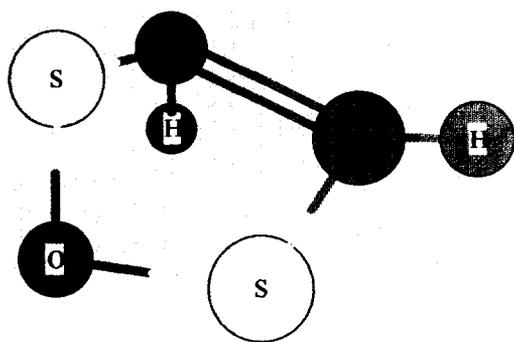
P.M. 106 g/mol



P.M. 41 g/mol

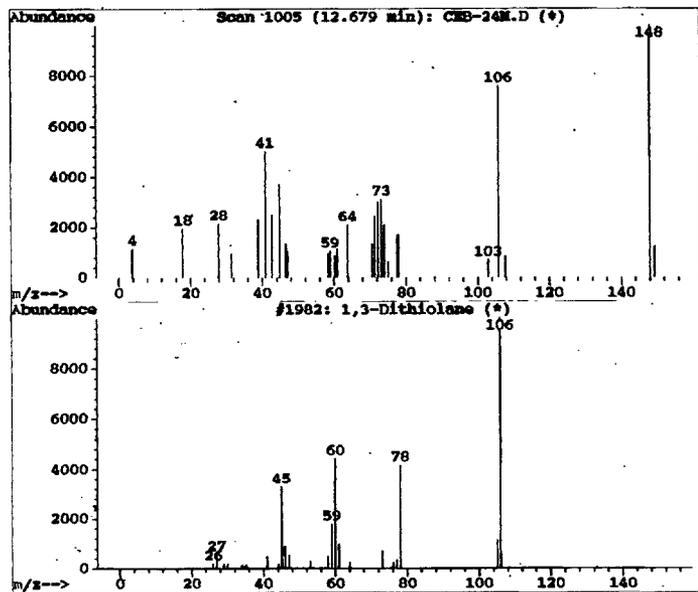
**COMPUESTO (CEBOLLA)**

**1,3-Ditiolano. 1.12%, R<sub>f</sub> 12.69 min, 106 g/mol**

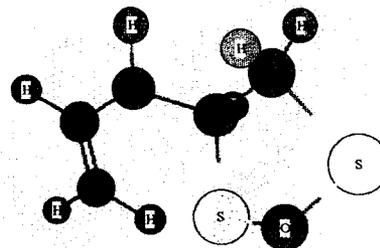


**ESPECTRO**

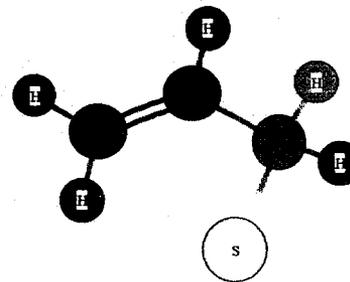
Library Searched : C:\DATABASE\MBS75K.L  
 Quality : 22  
 ID : 1,3-Dithiolane



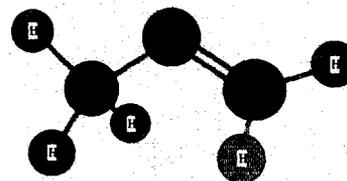
**FRAGMENTOS**



P.M. 148 g/mol  
 rearrreglo de Mac Laferti



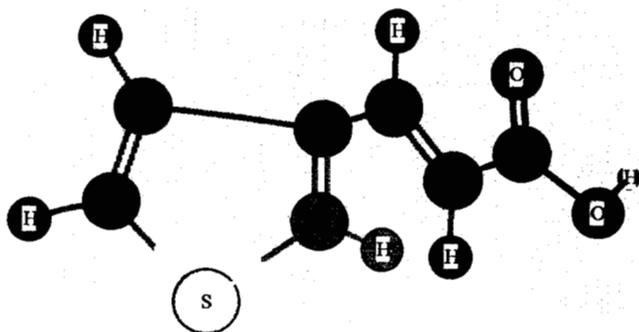
P.M. 73 g/mol



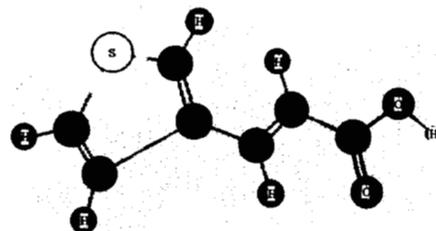
P.M. 41 g/mol

### COMPUESTO (CEBOLLA)

3,3-tienil- 2- ácido propenóico. 2.6%,  
R<sub>f</sub> 16.30 min, 154 g/mol



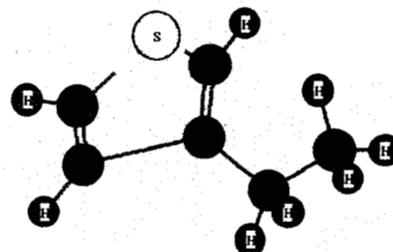
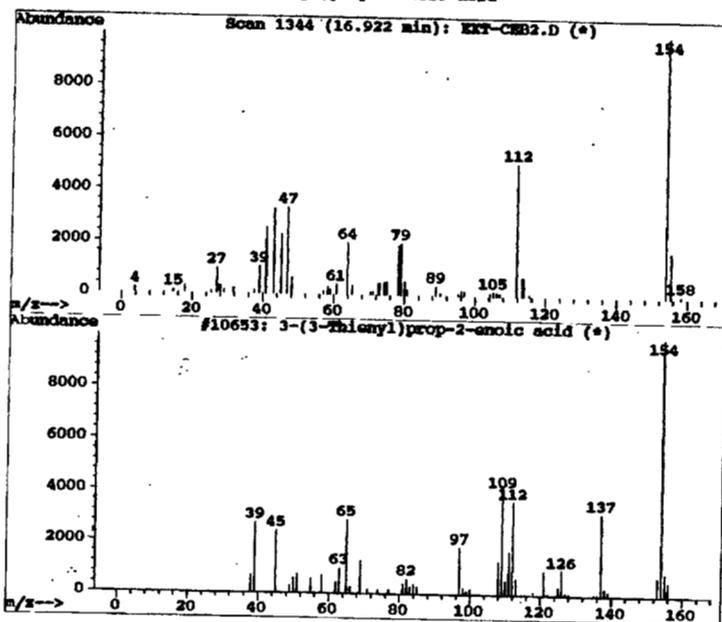
### FRAGMENTOS



P.M. 154 g/mol  
es el más abundante en el espectro y  
es el ion padre

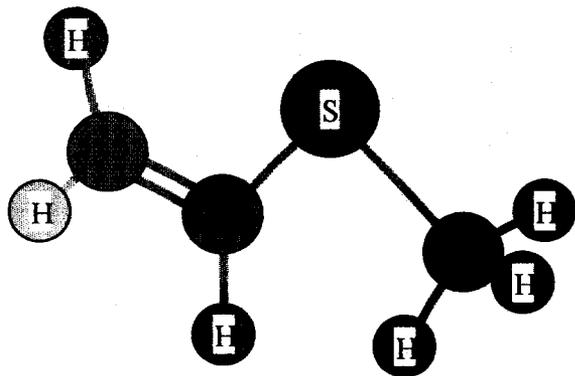
### ESPECTRO

Library Searched : C:\DATABASE\MBS75K.L  
Quality : 43  
ID : 3-(3-Thienyl)prop-2-enoic acid



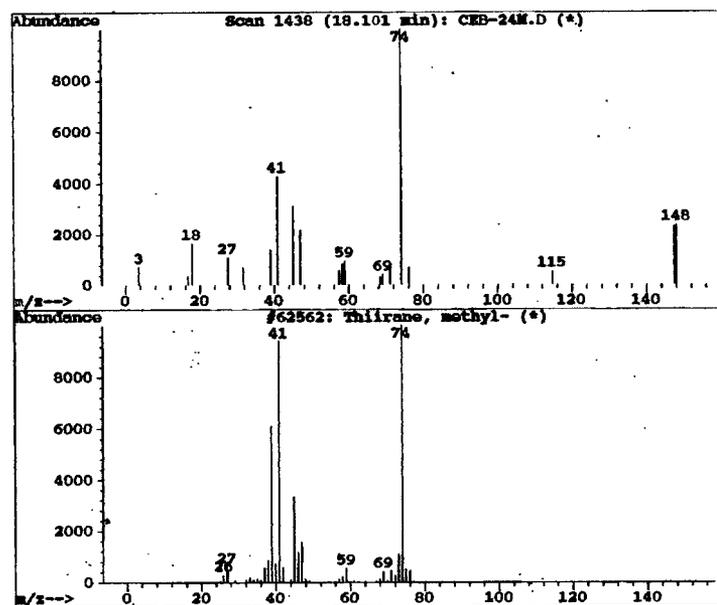
P.M. 112 g/mol

## COMPUESTO (CEBOLLA)

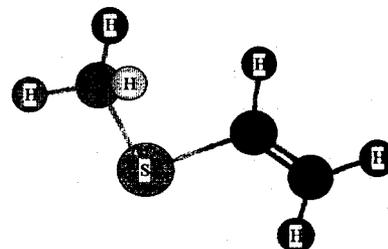
Metil tirano. 1.2%,  $R_f$  18.13 min, 74 g/mol

## ESPECTRO

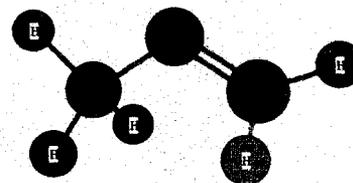
Library Searched : C:\DATABASE\MBS75K.L  
 Quality : 53  
 ID : Thirane, methyl-



## FRAGMENTOS



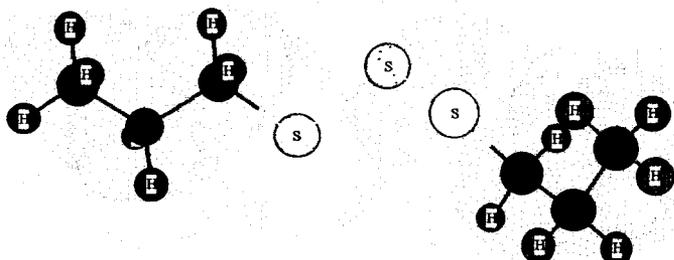
P.M. 74 g/mol



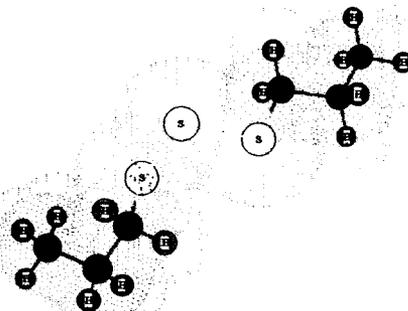
P.M. 41 g/mol

### COMPUESTO (CEBOLLA)

Dipropil trisulfuro. 0.64%,  $R_f$  24.07 min, 182 g/mol



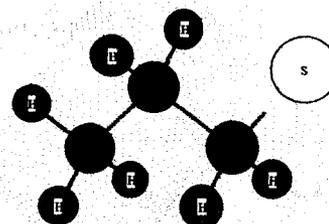
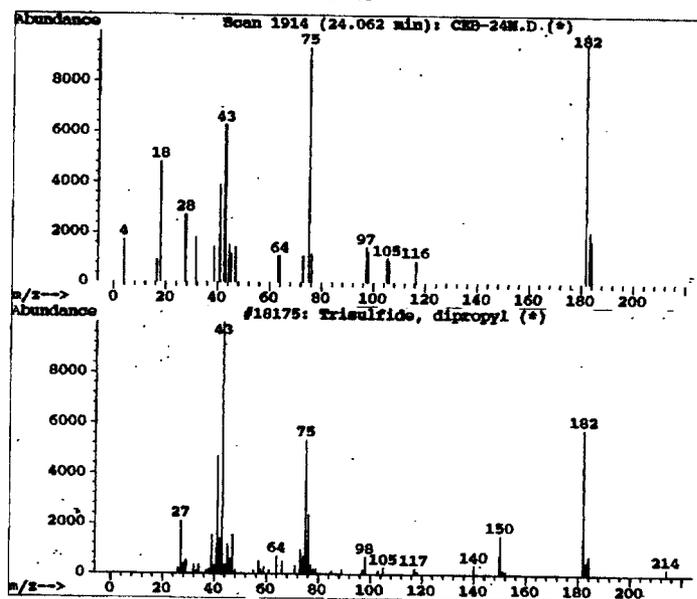
### FRAGMENTOS



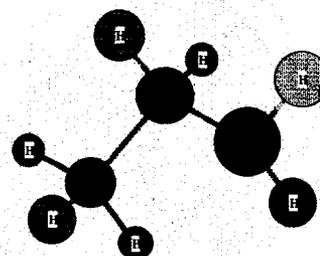
P.M. 182 g/mol

### ESPECTRO

Library Searched : C:\DATABASE\MES75K.L  
Quality : 38  
ID : Trisulfide, dipropyl



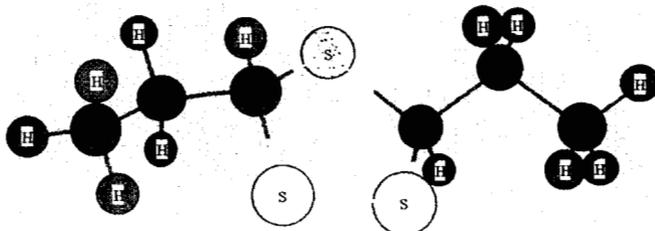
P.M. 75 g/mol



P.M. 43 g/mol

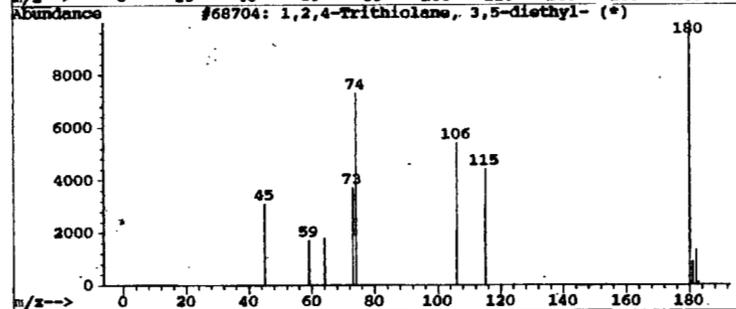
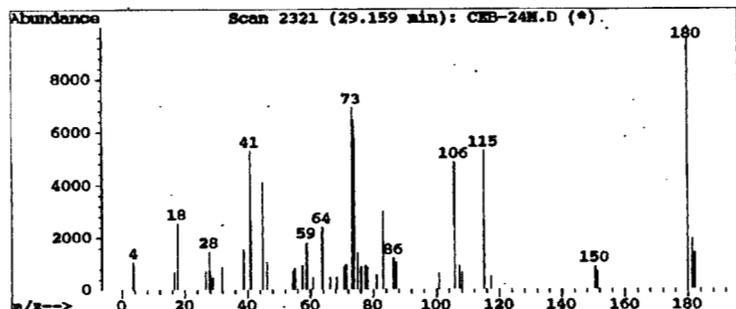
**COMPUESTO (CEBOLLA)**

1,2,4-tritriolano, 3,5-dietil. 1.65%,  
R<sub>f</sub> 29.10 min, 180 g/mol

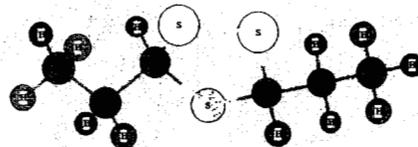


**ESPECTRO**

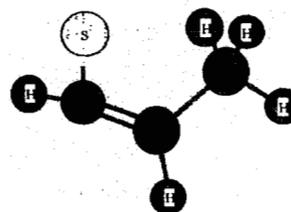
Library Searched : C:\DATABASE\NBS75K.L  
Quality : 83  
ID : 1,2,4-Trithiolane, 3,5-diethyl-



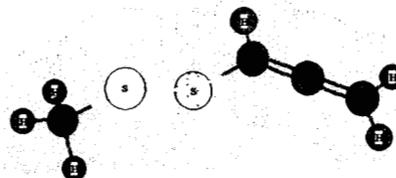
**FRAGMENTOS**



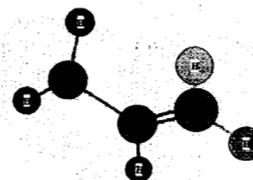
P.M. 180 g/mol  
corresponde al ion padre



P.M. 73 g/mol



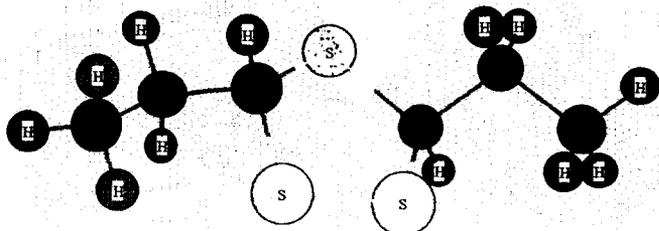
P.M. 115 g/mol



P.M. 41 g/mol

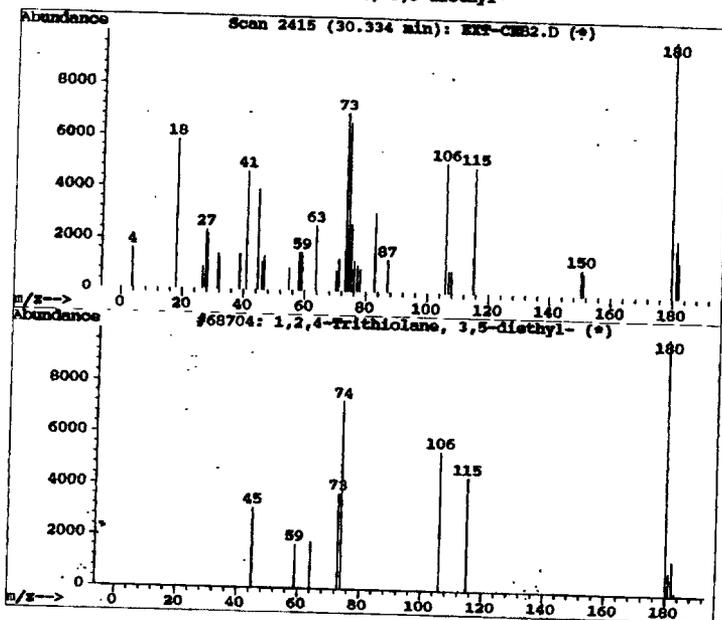
### COMPUESTO (CEBOLLA)

**trans-3,5-Dietil-1,2,4-tritriolano. 2.09%,  
R<sub>f</sub> 30.40 min, 180 g/mol**

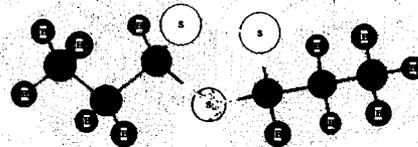


### ESPECTRO

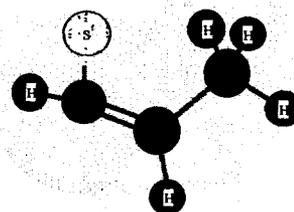
Library Searched : C:\DATABASE\MS75K.L  
Quality : 83  
ID : 1,2,4-Trithiolane, 3,5-diethyl-



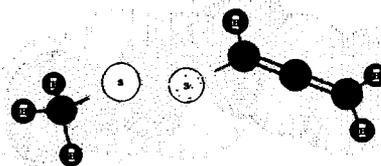
### FRAGMENTOS



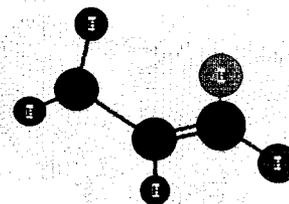
P.M. 180 g/mol  
corresponde al ion padre



P.M. 73 g/mol



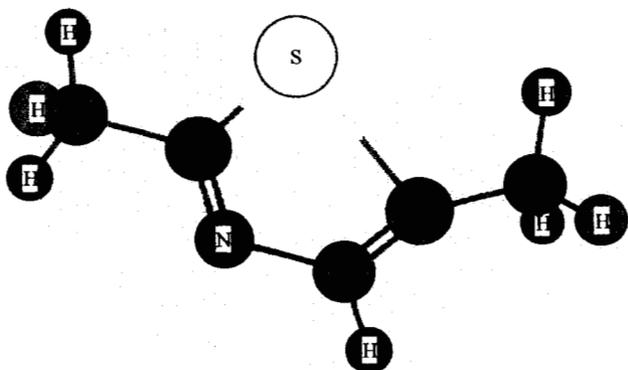
P.M. 115 g/mol



P.M. 41 g/mol

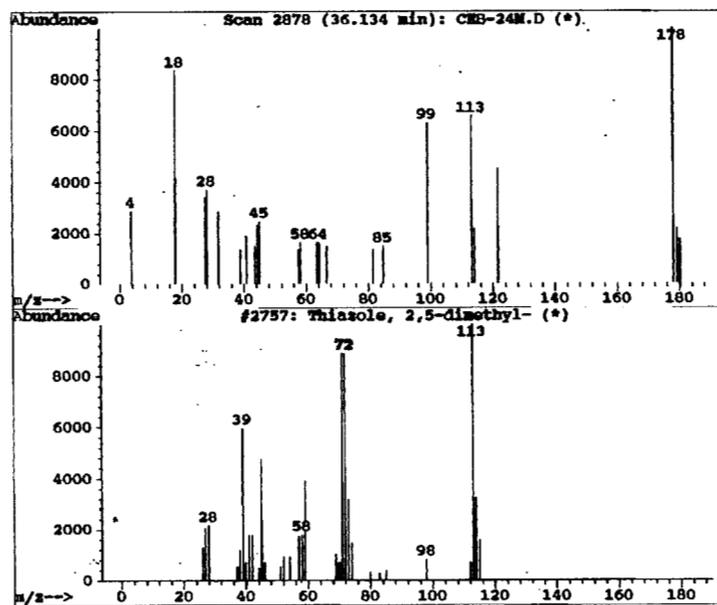
**COMPUESTO (CEBOLLA)**

**2,5-dimetil-tiazolio. 0.43%,  
R<sub>f</sub> 36.13 min, 113 g/mol**

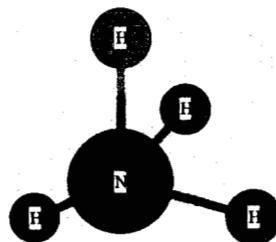


**ESPECTRO**

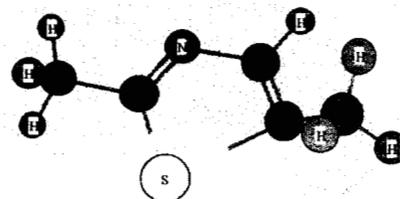
Library Searched : C:\DATABASE\MES75K.L  
Quality : 9  
ID : Thiazole, 2,5-dimethyl-



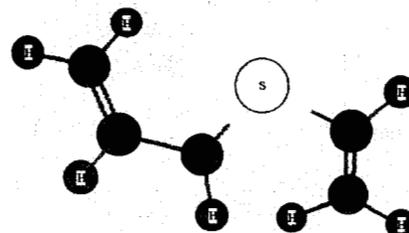
**FRAGMENTOS**



P.M. 18 g/mol



P.M. 113g/mol  
ion padre



P.M. 99 g/mol

La Tabla 16 resume a los compuestos identificados en los aceites esenciales de ajo y cebolla extraídos por arrastre de vapor en condiciones de vacío estándar, así como su abundancia relativa, tiempo de retención y peso molecular.

**Tabla 16.** Compuestos azufrados encontrados en los aceites esenciales de ajo y cebolla.

Familia de compuestos	Ajo	Cebolla	Abundancia relativa %	tiempo de retención (min)	peso molecular (g/mol)
<b>Monoazufrados</b>	Metil alil sulfuro		1.69	1.45	88
	3-3'-tio bis, 1-propeno		4.8	3.40	114
	3-alil tio ácido propiónico		0.86	10.64	146
		Metanetiol	2.5	0.86	48
		2,5-dimetil-tiofeno °	5.70	5.80	112
		Tiazolidina °	8.4	8.13	122
		3,3-tienil-2-ácido propenónico °	2.6	16.3	154
		Metil tirano	1.2	18.13	74
<b>Disulfuros</b>		2,5-dimetil-tiazolio °	0.43	36.13	113
		<b>Dimetil disulfuro *</b>	<b>1.11</b>	<b>2.37</b>	<b>94</b>
		2 Propenil metil disulfuro	11.35	6.22	120
		<b>2-propenil propil disulfuro *</b>	<b>0.24</b>	<b>9.7</b>	<b>148</b>
		Dialil disulfuro	35.59	11.35	146
		<b>Dimetil disulfuro *</b>	<b>2.8</b>	<b>2.4</b>	<b>94</b>
		Metil propil disulfuro	1.52	5.2	122
		Metil etil disulfuro	1.6	5.46	108
		1,3-ditiano °	1.1	6.10	120
		1,3-propan ditiol	1.1	6.34	108
		1,4-ditiano °	1.8	6.91	120
		<b>2-propenil propil disulfuro *</b>	<b>0.90</b>	<b>11.53</b>	<b>148</b>
		1,3-Ditiolano °	1.12	12.69	106
	<b>Trisulfuros</b>		<b>Dimetil trisulfuro *</b>	<b>4.6</b>	<b>8.55</b>
		2-propenil metil trisulfuro	16.36	13.78	152
		di-2-propenil trisulfuro	18.39	18.45	178
		<b>Dimetil trisulfuro *</b>	<b>3.5</b>	<b>10.17</b>	<b>126</b>
		Dipropil trisulfuro	0.64	24.07	182
		1,2,4-tritriolano-3,5-Dietil °	1.65	29.10	180
		trans-3,5-Dietil-1,2,4-tritriolano °	2.09	30.40	180
<b>Sin azufre</b>		Propanal	27	0.95	58
		2-pentenal, 2 metil(2-etil-t-butanal)	13.82	3.63	98

° **Compuestos cíclicos**

\* **Compuestos comunes en los dos vegetales**

### V.2.3. Concentración de grupos sulfhidrilo SH

Con la ecuación general  $C_o(\mu\text{mol SH/ml}) = (A / 13\ 600 * D)$ , reportada por Ellman (1959), se obtienen las curvas para cada tratamiento (Figura 27). Con ellas se puede calcular la concentración de grupos tiol a cada valor de concentración de aceites esenciales (Tabla 17). De las ecuaciones, A es el valor de la absorbancia leída en la solución problema a 420 nanómetros (nm), 13 600 es el coeficiente de extinción, D es el factor de dilución y se calcula:  $[(\text{Volumen total}/\text{Volumen de la muestra}) * (\text{Volumen de la solución de fosfato} + \text{Volumen del reactivo de Ellman}) / \text{Volumen de la muestra}]$ .

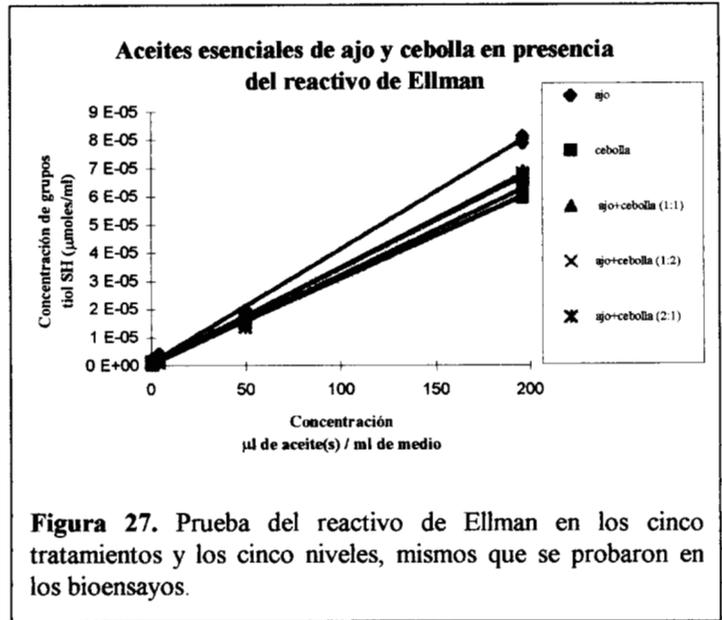


Figura 27. Prueba del reactivo de Ellman en los cinco tratamientos y los cinco niveles, mismos que se probaron en los bioensayos.

Tabla 17. Ecuaciones que describen la concentración de los grupos sulfhidrilo (µmoles/ml) en los 5 tratamientos probados en los bioensayos.

TRATAMIENTO	ECUACIÓN DEL TRATAMIENTO	R <sup>2</sup>
Ajo	[SH (µmoles/ml)] = 4E-07*(µl de aceite) + 1E-06	0.9987
Ajo+cebolla (2:1)	[SH (µmoles/ml)] = 3E-07*(µl de aceites) + 7E-07	0.9993
Ajo+cebolla (1:1)	[SH (µmoles/ml)] = 3E-07*(µl de aceites) + 6E-07	0.9989
Ajo+cebolla (1:2)	[SH (µmoles/ml)] = 3E-07*(µl de aceites)+ 3E-07	0.9993
Cebolla	[SH (µmoles/ml)] = 3E-07*(µl de aceites) + 8E-07	0.9994

Los coeficientes de correlación de cada una de las ecuaciones obtenidas con los datos experimentales está por arriba del 0.99 en los cinco tratamientos probados. Se tiene que considerar que el orden de magnitud entre el nivel más pequeño y el más elevado de concentración de los aceites es de (5025) veces mayor por lo que los tres primeros puntos se encuentran cercanos entre sí comparados con los dos últimos, (0.039, 0.39, 3.99, 49.6, 196) µl aceite(s)/ml.

Los resultados de la Tabla 18 indican una disminución gradual de la concentración de grupos tiol a medida que aumenta el contenido del aceite esencial de cebolla. Con las ecuaciones obtenidas la concentración de los grupos tiol en ajo y cebolla, al comparar los resultados, en un mismo nivel de concentración se puede notar que en ajos es 25 % mayor respecto de la cebolla. De la misma forma, también se aprecia que entre las combinaciones de los aceites no hay diferencia en las concentraciones del grupo funcional. Los dos constituyentes más abundantes en la cebolla no contienen átomos de azufre y son aldehídos que no generan el pigmento detectado con el reactivo, mientras que en ajos todos sus constituyentes si lo contienen. Aunque no se puede conocer cual o cuales de los constituyentes en cada aceite reaccionan, se debe señalar que el ajo se encuentra 25% por arriba en la concentración de los grupos tiol detectados respecto de la cebolla y entre las mezclas no hay diferencia.

**Tabla 18.** Concentración de grupos tiol (SH) en  $\mu\text{moles/ml}$

Concentración $\mu\text{l}$ aceite(s) / ml	$\mu\text{moles/ml}$ de grupos tiol en cada tratamiento ( $1 \times 10^{-5}$ )				
	ajo	ajo+cebolla (2:1)	ajo+cebolla (1:1)	ajo+cebolla (1:2)	cebolla
196	7.94	5.95	5.94	5.91	5.96
49.6	2.08	1.55	1.548	1.518	1.55
3.99	0.259	0.186	0.178	0.1497	0.186
0.39	0.115	0.0817	0.0717	0.0419	0.0817
0.039	0.101	0.0711	0.0611	0.039	0.0711

El número de compuestos azufrados en cebollas que tienen estructuras cíclicas son 9 y suman 18.99 % de abundancia relativa (2,5-dimetil-tiofeno, tiazolidina, 3,3-tienil-2-ácido propenóico, 2,5-dimetil tiazolio, 1,3-ditiano, 1,3-ditiolano, 1,2,4-tritriolano-3,5-dietil y el trans-3,5-dietil-1,2,4-tritriolano), los demás compuestos alifáticos caracterizados que contienen al azufre suman 15.76 % (metanetiol, metil propil disulfuro, metil tirano, dimetil disulfuro, metil etil disulfuro, 1,3-propan ditiol, 2-propenil propil disulfuro, dimetil trisulfuro, dipropil trisulfuro); el restante 18.53 % corresponde a otros compuestos que no fueron identificados y que de forma individual cada uno de ellos tienen abundancias por

abajo de 1 % según las áreas del cromatograma. Considerando que un compuesto cíclico como los que se encuentran en cebollas adquieren mayor estabilidad al presentar un fenómeno conocido como resonancia, que no es otra cosa que el movimiento continuo de los electrones al interior de la molécula, que proporciona mayor estabilidad al compuesto y por consiguiente menor actividad en la formación del pigmento detectado en la prueba si se compara con los compuestos alifáticos del aceite esencial de ajo.

### V.3. Crecimiento de microorganismos en medios sintéticos

El análisis de resultados de las curvas de crecimiento en los bioensayos, se realizó a través de las ecuaciones de cada tratamiento y cada nivel obtenidas a partir de las lecturas de la absorbancia. Las funciones polinómicas ( $y(x)$ ) de tercer orden, en estos bioensayos, describen al crecimiento celular considerando los factores enlistados en la Tabla 1. La variable independiente  $x$  representa al tiempo en horas, entre el inicio del crecimiento y la culminación de la fase exponencial, 30 horas para *Lactobacillus pentosus* y 24 horas para *Pseudomonas fragi*. El intervalo de interés se justifica en conocer como responde el crecimiento a lo largo del tiempo  $y(x)$  con cada uno de los tratamientos y niveles probados entre la inoculación y el inicio de la fase estacionaria (Figura 20). El polinomio o ecuación que simula el crecimiento está influenciado por la variable de tiempo ( $x^3$ ,  $x^2$ ,  $x$ ).

Las ecuaciones lineales, enlistadas en las Tablas 20 y 22 tienen la misma tendencia, se localiza un punto máximo en el mismo intervalo seleccionado, coeficientes de correlación similares por lo que pueden ser comparadas en un rango de la variable independiente tiempo para conocer el comportamiento del crecimiento equivalente al área, calculada por el valor de la integral definida. El porcentaje de inhibición se obtuvo al comparar los valores de cada una de las áreas bajo la curva respecto de la que presentó la menor área y por consiguiente el menor crecimiento.

### V.3.1. *Lactobacillus pentosus*

Sugieren los resultados que como era de esperarse, la máxima inhibición se alcanza a 196  $\mu\text{l/ml}$  del aceite esencial ajo, tratamiento y nivel de referencia, respecto de las demás curvas. El porcentaje de inhibición se calculó en base a las ecuaciones obtenidas con las regresiones y con el aceite esencial de ajo a 196  $\mu\text{l/ml}$  como referencia de la máxima inhibición. Seguido por la combinación de ajo y cebolla (2:1), ajo y cebolla (1:1) y finalmente la mezcla de mayor proporción de ajo y cebolla (1:2) en el máximo nivel probado. La variación de los resultados de las áreas cuando se combinan los aceites indican que no hay efecto sinérgico. Para el nivel de concentración de 49.6  $\mu\text{l/ml}$ , la inhibición está entre 27.98 % en la mezcla de ajo y cebolla (2:1) y 15.61% ajo y cebolla (1:2) comparado con la referencia sugiere un posible efecto sinérgico en la combinación 2:1 de ajo + cebolla (Tabla 19 y Figura 28). De igual forma para el nivel de 3.9  $\mu\text{l/ml}$  no se aprecia diferencia del porcentaje de inhibición al compararlo con el nivel de 49.6  $\mu\text{l/ml}$ . En el nivel de 0.39  $\mu\text{l/ml}$  el efecto que presentan los aceites y sus combinaciones no son de inhibidores y por el contrario, es evidente el incremento en los valores de las áreas asociadas al crecimiento de *L. pentosus*, según los datos los constituyentes de los aceites favorecen el desarrollo metabólico cuando se probaron por abajo de 0.39 $\mu\text{l/ml}$ . La Figura 28 recopila las curvas de crecimiento en *L. pentosus*, la comparación de las curvas de los resultados de las áreas se encuentran en la Tabla 20.

**Tabla 19.** Comparación de las áreas y porcentajes de inhibición a 30 horas en *Lactobacillus pentosus*.

TRATAMIENTO	% de inhibición a cada nivel de concentración de los tratamientos					
	196	49.6	3.9	0.39	0.039	Blanco
Conc.aceite esencial $\mu\text{l/ml}$						
Ajo	0	19.2	18.19	29.88	11.87	33.19
Ajo+Cebolla (2:1)	3	27.98	24.15	6.86	27.59	20.54
Ajo+Cebolla (1:1)	8.14	21.27	20.55	19.82	17.59	8.75
Ajo+Cebolla (1:2)	8.9	15.61	21.09	31.62	13.50	31
Cebolla	4.6	16.26	19.84	8.89	11.32	12

Figura 28. Curvas ajustadas de crecimiento de *Lactobacillus pentosus*

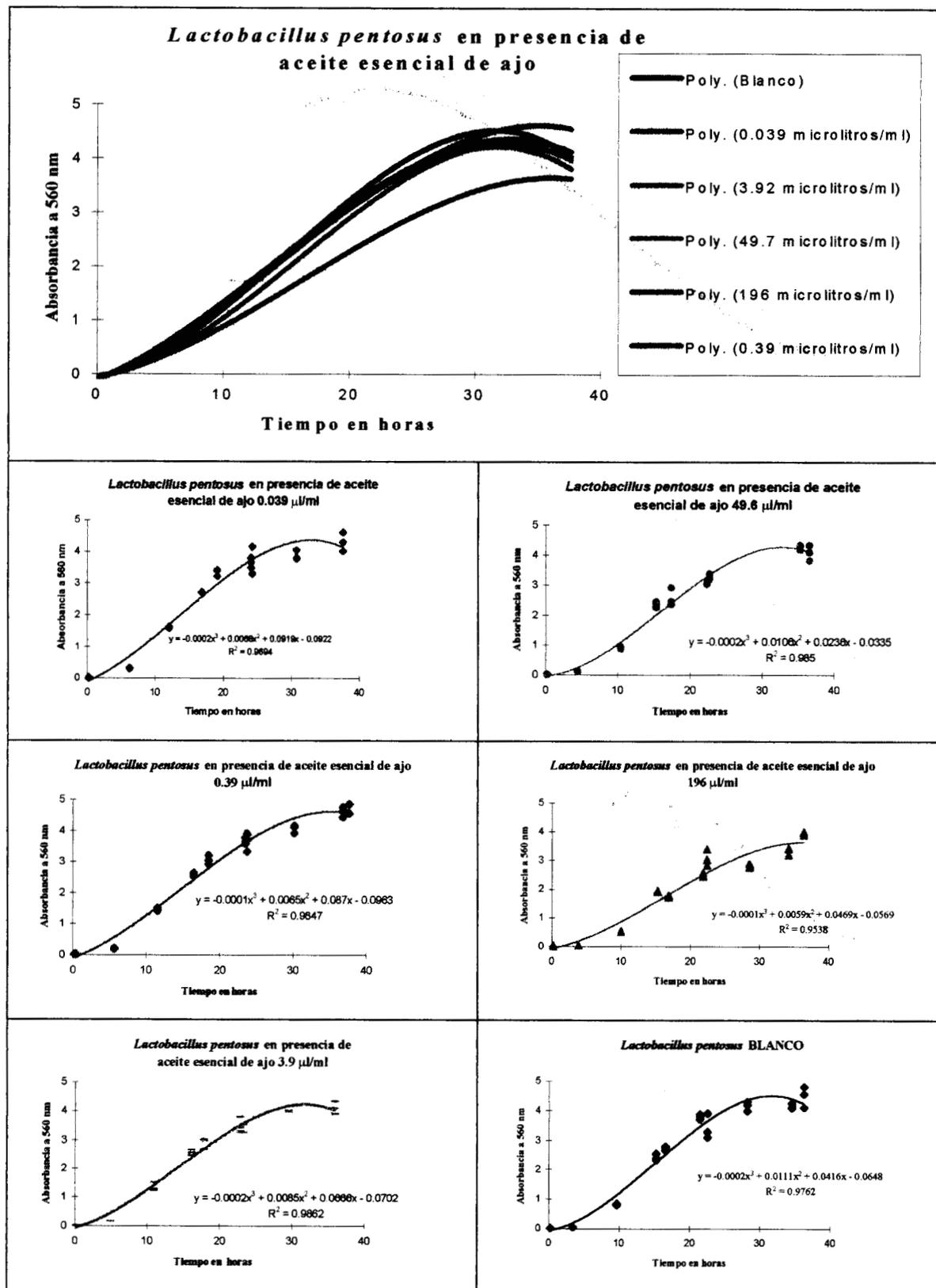


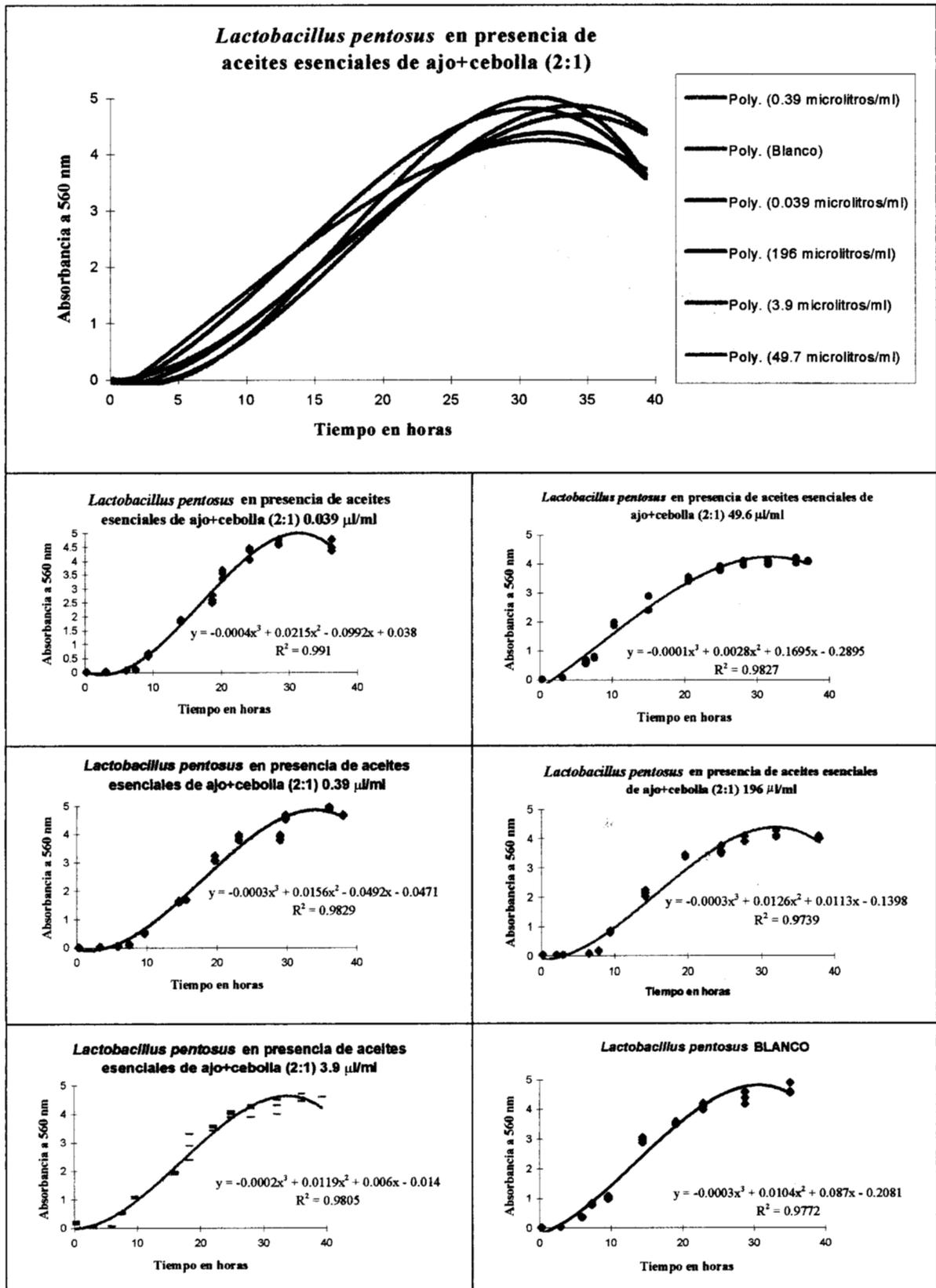
Figura 28. Curvas ajustadas de crecimiento de *Lactobacillus pentosus* (continuación)

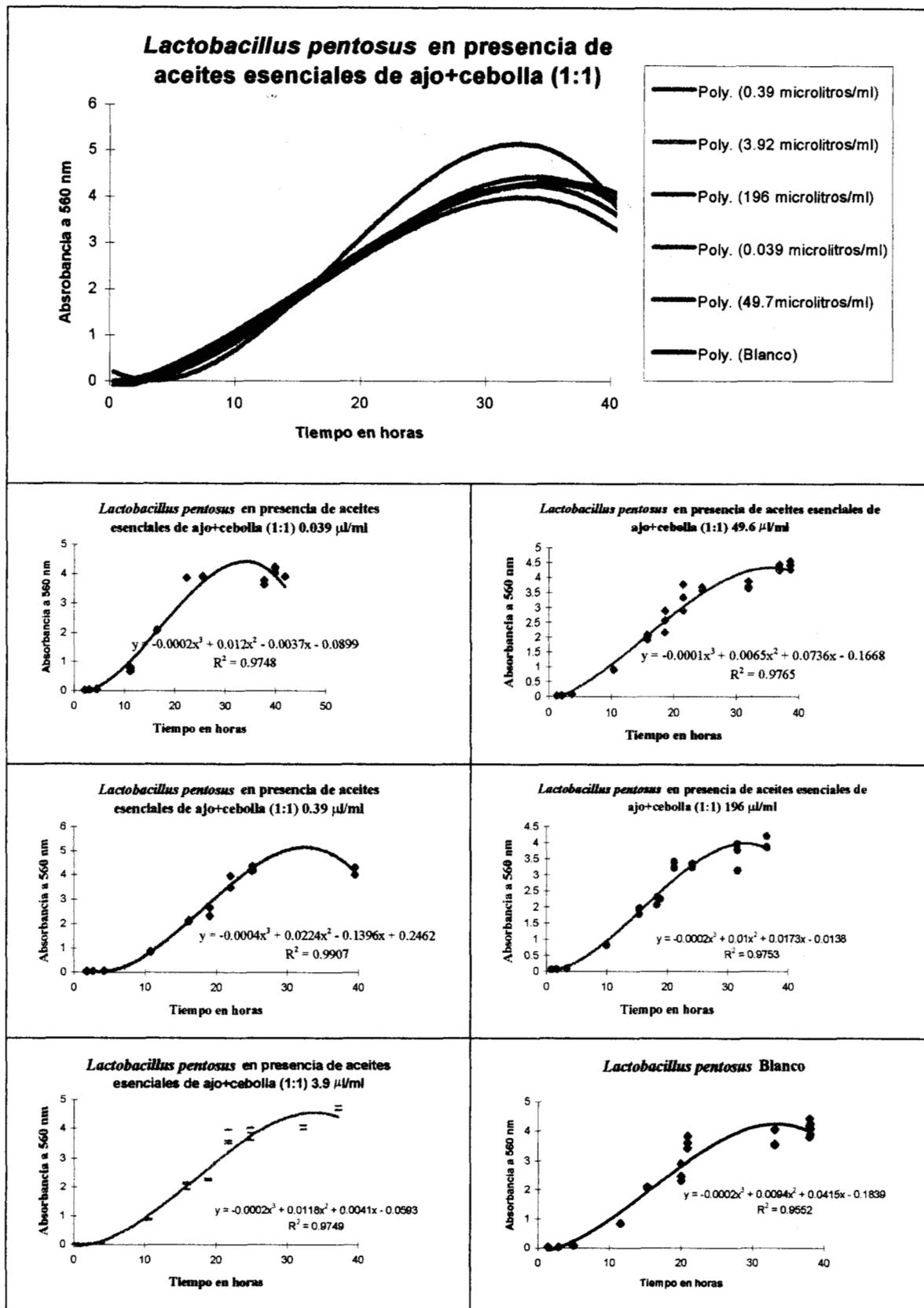
Figura 28. Curvas ajustadas de crecimiento de *Lactobacillus pentosus* (continuación)

Figura 28. Curvas ajustadas de crecimiento de *Lactobacillus pentosus* (continuación)

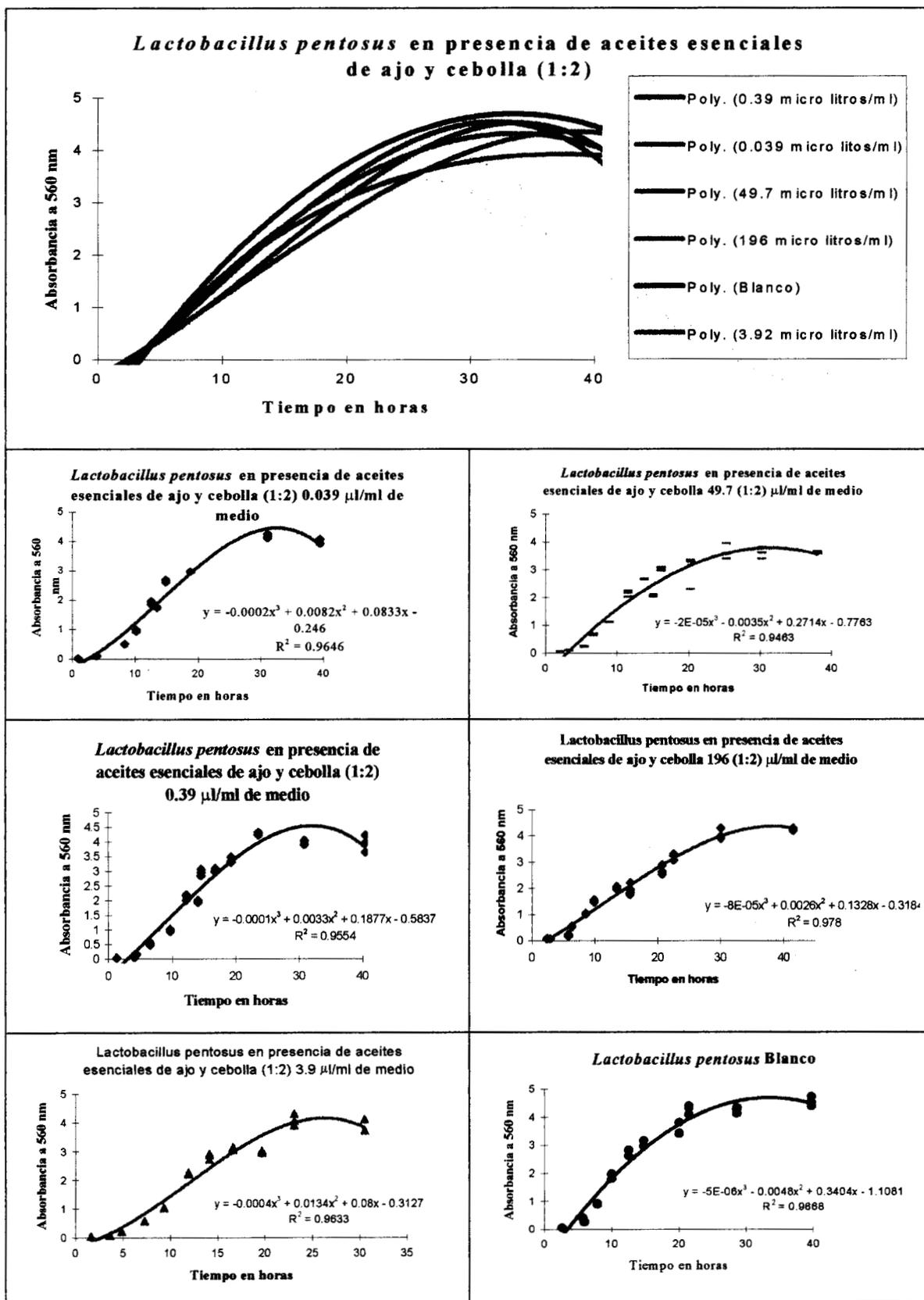
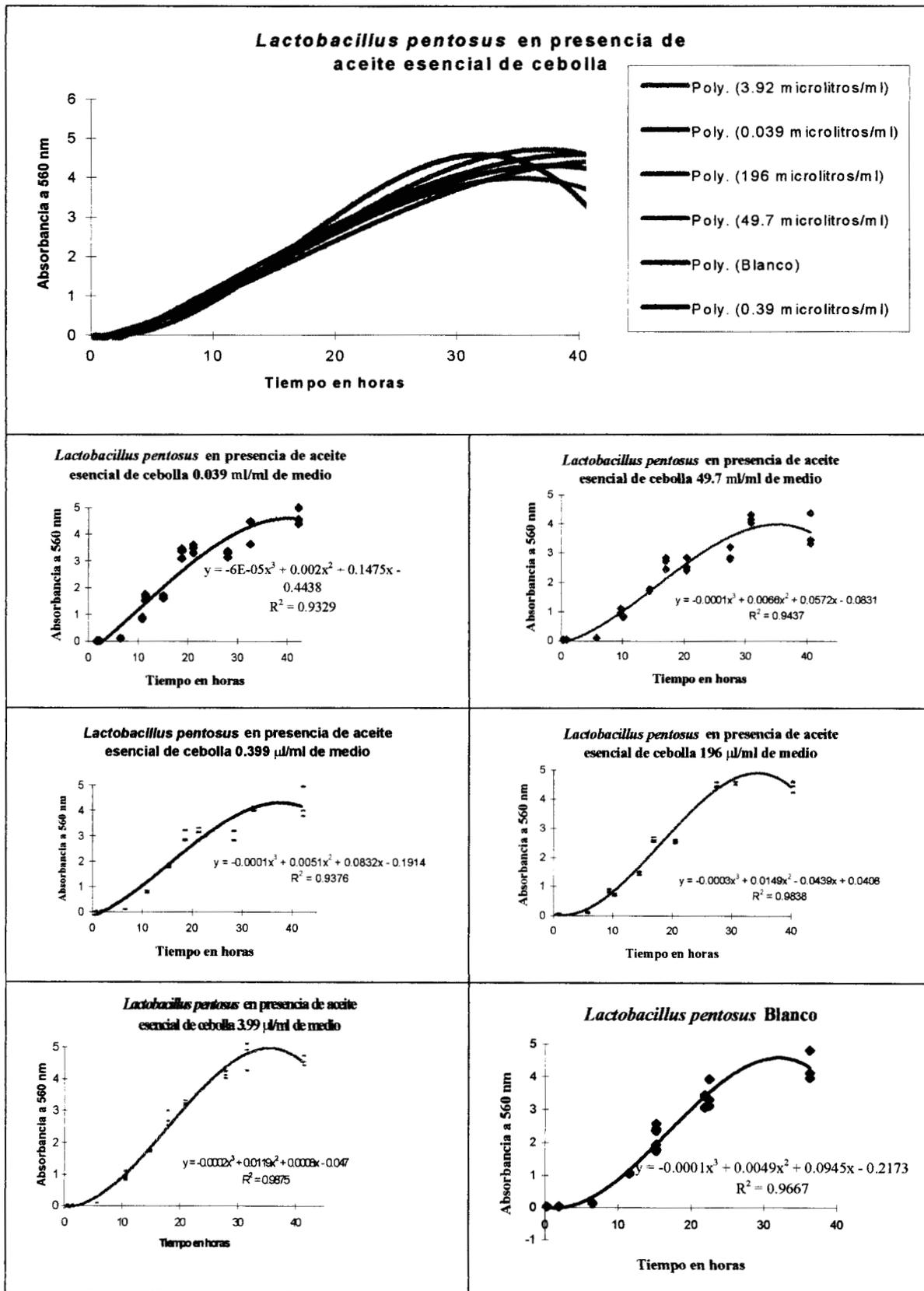


Figura 28. Curvas ajustadas de crecimiento de *Lactobacillus pentosus* (continuación)



**Tabla 20.** Ecuaciones de crecimiento de *Lactobacillus pentosus*, punto teórico máximo, área bajo la curva a 30 horas y porcentaje de inhibición tomando como referencia la menor área (ajo a 196 µl/ml).

NIVEL	ECUACIÓN (coeficiente de correlación)	MÁXIMO Y VALOR TEÓRICO DE ABSORBANCIA (TIEMPO, ABSORBANCIA)	ÁREA A 30 HORAS	% relativo de diferencia entre áreas
<b>AJO</b>				
0.039	$y = -0.0002x^3 + 0.0068x^2 + 0.0919x - 0.0922$ ; $R^2 = 0.9694$	(28.11, 3.421)	59.28	11.87
0.39	$y = -0.0001x^3 + 0.0065x^2 + 0.087x - 0.0963$ ; $R^2 = 0.9847$	(49.22, 8.008)	74.51	29.88
3.96	$y = -0.0002x^3 + 0.0085x^2 + 0.0666x - 0.0702$ ; $R^2 = 0.9862$	(31.82, 4.21)	63.86	18.19
49.6	$y = -0.0002x^3 + 0.0106x^2 + 0.0236x - 0.0335$ ; $R^2 = 0.985$	(35.33, 4.37)	64.51	19.02
196	$y = -0.0001x^3 + 0.0059x^2 + 0.0469x - 0.0569$ ; $R^2 = 0.9538$	(39.33, 3.03)	52.24	0
BLANCO	$y = -0.0002x^3 + 0.0111x^2 + 0.0416x - 0.0648$ ; $R^2 = 0.9762$	(38.97, 6.752)	78.20	33.19
<b>AJO + CEBOLLA (2:1)</b>				
0.039	$y = -0.0004x^3 + 0.0215x^2 - 0.0992x + 0.038$ ; $R^2 = 0.991$	(33.35, 5.80)	72.15	27.59
0.39	$y = -0.0003x^3 + 0.0156x^2 - 0.0492x - 0.0471$ ; $R^2 = 0.9829$	(33.01, 4.53)	56.09	6.86
3.96	$y = -0.0002x^3 + 0.0119x^2 + 0.006x - 0.014$ ; $R^2 = 0.9805$	(39.91, 6.46)	68.88	24.15
49.6	$y = -0.0001x^3 + 0.0028x^2 + 0.1695x - 0.2895$ ; $R^2 = 0.9827$	(34.86, 4.78)	72.54	27.98
196	$y = -0.0003x^3 + 0.0126x^2 + 0.0113x - 0.1398$ ; $R^2 = 0.9739$	(28.44, 3.47)	53.54	2.42
BLANCO	$y = -0.0003x^3 + 0.0104x^2 + 0.087x - 0.2081$ ; $R^2 = 0.9772$	(26.72, 3.81)	65.75	20.54
<b>AJO + CEBOLLA (1:1)</b>				
0.039	$y = -0.0002x^3 + 0.012x^2 - 0.0037x - 0.0899$ ; $R^2 = 0.9748$	(39.84, 6.16)	63.13	17.25
0.39	$y = -0.0004x^3 + 0.0224x^2 - 0.1396x + 0.2462$ ; $R^2 = 0.9907$	(33.90, 5.67)	65.16	19.82
3.96	$y = -0.0002x^3 + 0.0118x^2 + 0.0041x - 0.0593$ ; $R^2 = 0.9749$	(39.50, 6.18)	65.76	20.55
49.6	$y = -0.0001x^3 + 0.0065x^2 + 0.0736x - 0.1668$ ; $R^2 = 0.9765$	(48.40, 7.28)	66.36	21.27
196	$y = -0.0002x^3 + 0.01x^2 + 0.0173x - 0.0138$ ; $R^2 = 0.9753$	(34.17, 4.27)	56.87	8.14
BLANCO	$y = -0.0002x^3 + 0.0094x^2 + 0.0415x - 0.1839$ ; $R^2 = 0.9552$	(33.40, 4.23)	57.25	8.75
<b>AJO + CEBOLLA (1:2)</b>				
0.039	$y = -0.0002x^3 + 0.0082x^2 + 0.0833x - 0.246$ ; $R^2 = 0.9646$	(31.71, 4.26)	60.40	13.50
0.39	$y = -0.0001x^3 + 0.0033x^2 + 0.1877x - 0.5837$ ; $R^2 = 0.9554$	(38.22, 5.82)	76.40	31.62
3.96	$y = -0.0004x^3 + 0.0134x^2 + 0.08x - 0.3127$ ; $R^2 = 0.9633$	(24.99, 3.81)	66.21	21.09
49.6	$y = -0.0002x^3 + 0.004x^2 + 0.1839x - 0.5446$ ; $R^2 = 0.9439$	(25.4, 3.42)	61.91	15.61
196	$y = -8E-05x^3 + 0.0026x^2 + 0.1328x - 0.3184$ ; $R^2 = 0.978$	(36.73, 4.102)	57.40	8.98
BLANCO	$y = -5E-06x^3 - 0.0048x^2 + 0.3404x - 1.1081$ ; $R^2 = 0.9668$	(33.68, 4.72)	75.72	31.00
<b>CEBOLLA</b>				
0.039	$y = -6E-05x^3 + 0.002x^2 + 0.1475x - 0.4438$ ; $R^2 = 0.9329$	(41.81, 4.83)	58.91	11.32
0.39	$y = -0.0001x^3 + 0.0051x^2 + 0.0832x - 0.1914$ ; $R^2 = 0.9376$	(40.79, 4.90)	57.34	8.89
3.96	$y = -0.0002x^3 + 0.0119x^2 + 0.0008x - 0.047$ ; $R^2 = 0.9875$	(39.7, 6.22)	65.55	19.84
49.6	$y = -0.0001x^3 + 0.0066x^2 + 0.0572x - 0.0831$ ; $R^2 = 0.9437$	(47.97, 6.80)	62.39	16.26
196	$y = -0.0003x^3 + 0.0149x^2 - 0.0439x + 0.0408$ ; $R^2 = 0.9838$	(31.56, 4.06)	54.81	4.68
BLANCO	$y = -0.0001x^3 + 0.0049x^2 + 0.0945x - 0.2173$ ; $R^2 = 0.9667$	(40.45, 5.00)	59.85	12.71

### V.3.2. *Pseudomonas fragi*

También para las *Pseudomonas fragi* la máxima inhibición se alcanza con el mayor nivel probado de 196  $\mu\text{l/ml}$ . Calculado a partir de las ecuaciones obtenidas con las regresiones y con el aceite esencial de ajo al máximo nivel probado como referencia de la máxima inhibición. El intervalo seleccionado fue de 24 horas ya que a diferencia de *L. pentosus*, *P. fragi* tiene crecimiento óptimo en la temperatura de 19 °C por lo que llega más rápidamente al punto máximo y por consiguiente a la fase estacionaria en un intervalo más corto de tiempo. Para el nivel máximo probado, el resultado indica que con cebolla se logra mayor área, o lo que es igual, es menos inhibidora del crecimiento celular comparándola con el área respecto de ajo. Aunque se debe señalar que cuando se combinan los aceites en proporción 1:1 surge el efecto sinérgico en la inhibición en éste nivel de concentración. En el nivel de 49.6 y 3.9  $\mu\text{l/ml}$  no hay diferencias considerables en cuanto a las áreas nuevamente es el ajo el que tiene el mayor porcentaje de inhibición con lo que se puede suponer que no hay diferencia usar el nivel de 3.9 a respecto de 49.6  $\mu\text{l/ml}$ . Finalmente, en el caso de las concentraciones menores de 0.39 y 0.039  $\mu\text{l/ml}$  el fenómeno contrario a la inhibición se presenta con lo que se favorece el desarrollo celular y es posible que ello se deba a la utilización de los compuestos presentes en los aceites durante los procesos metabólicos, al comparar los aceites durante este fenómeno, la cebolla induce aún más el crecimiento que el ajo (Tablas 21 y 22, Figura 29).

**Tabla 21.** Comparación de áreas y porcentajes de inhibición a 24 horas en *Pseudomonas fragi*.

TRATAMIENTO	% de inhibición a cada nivel de concentración de los tratamientos					
	196	49.6	3.9	0.39	0.039	Blanco
Conc.aceite esencial $\mu\text{l/ml}$						
Ajo	0	5.36	5.28	27.20	29.03	17.76
Ajo+Cebolla (2:1)	11.66	14.37	14.93	20.09	23.68	24.35
Ajo+Cebolla (1:1)	0.13	14.22	18.92	28.76	24.34	17.50
Ajo+Cebolla (1:2)	6.80	10.18	16.82	28.76	23.74	28.35
Cebolla	13.90	18.57	22.63	27.35	33.01	23.89

Figura 29. Curvas ajustadas de crecimiento de *Pseudomonas fragi*

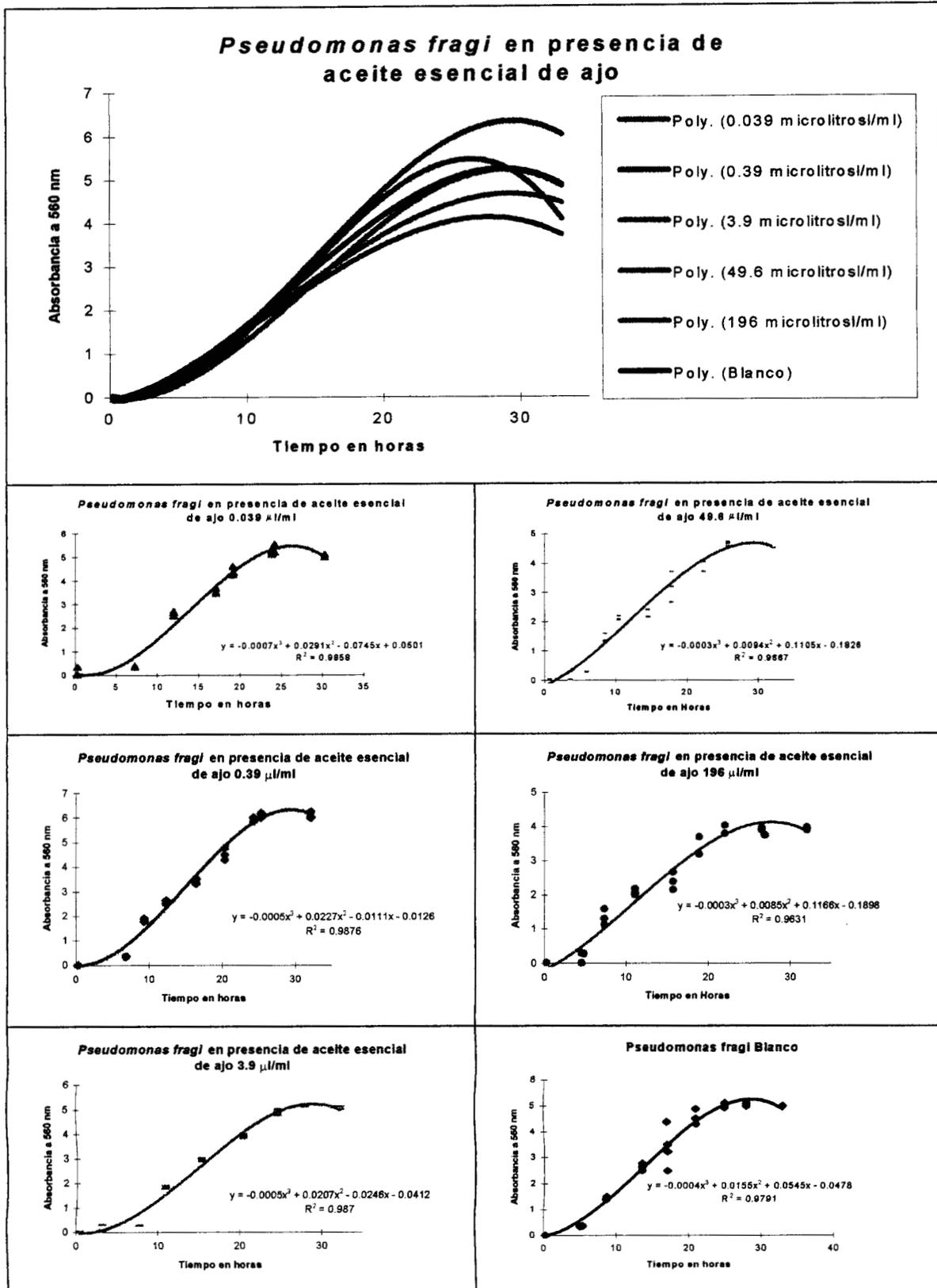


Figura 29. Curvas ajustadas de crecimiento de *Pseudomonas fragi* (continuación)

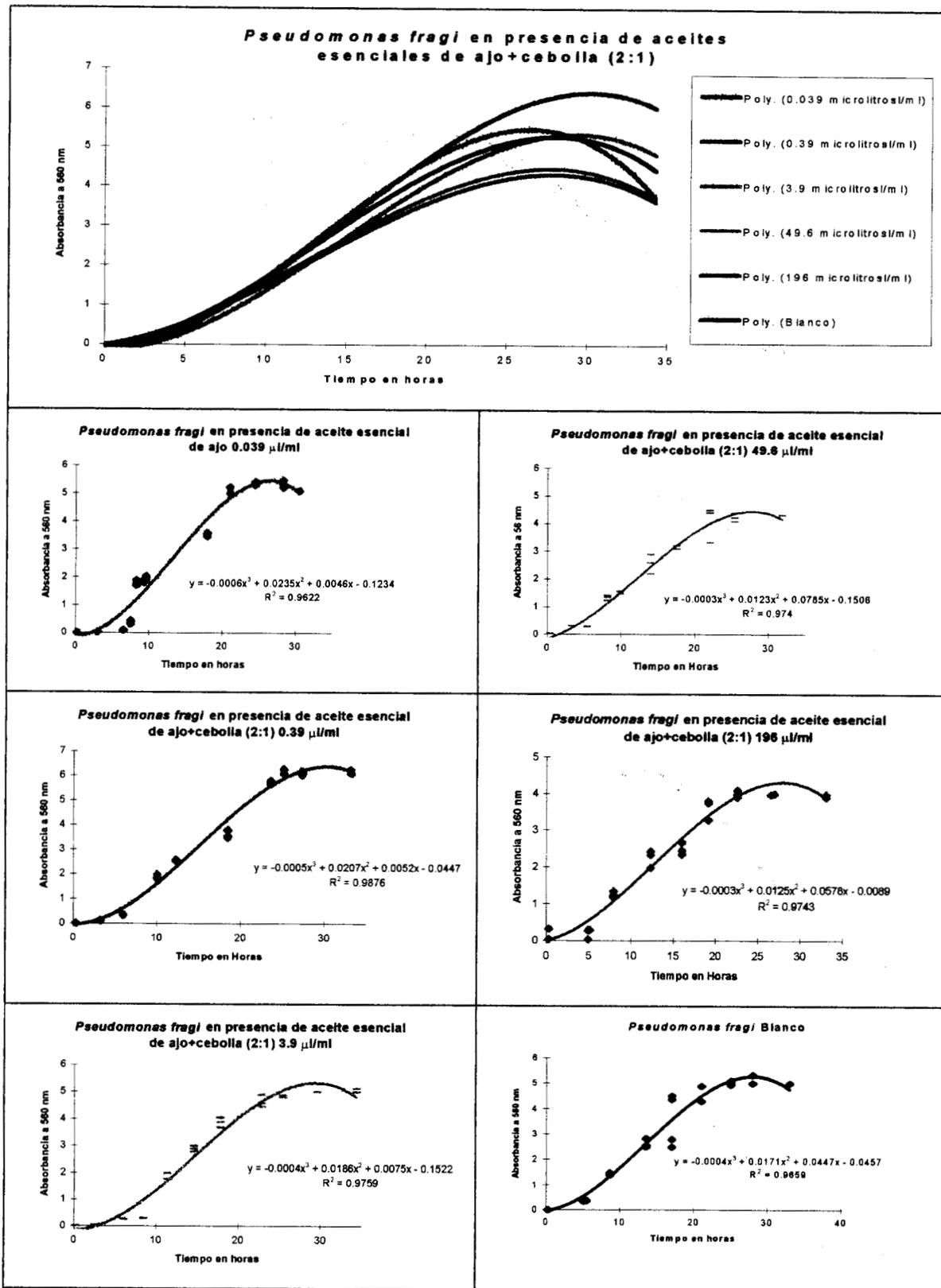


Figura 29. Curvas ajustadas de crecimiento de *Pseudomonas fragi* (continuación)

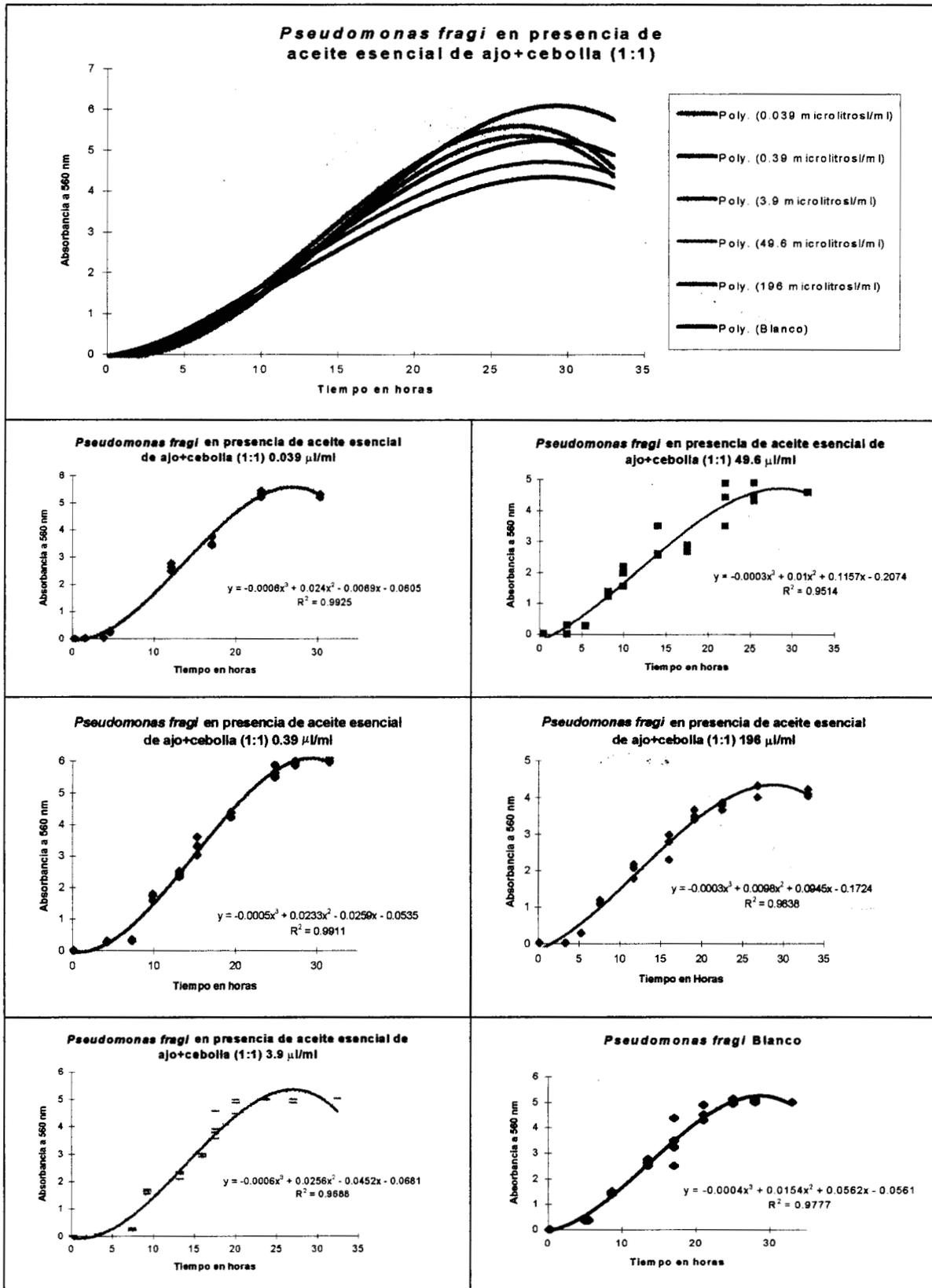


Figura 29. Curvas de crecimiento de *Pseudomonas fragi* (continuación)

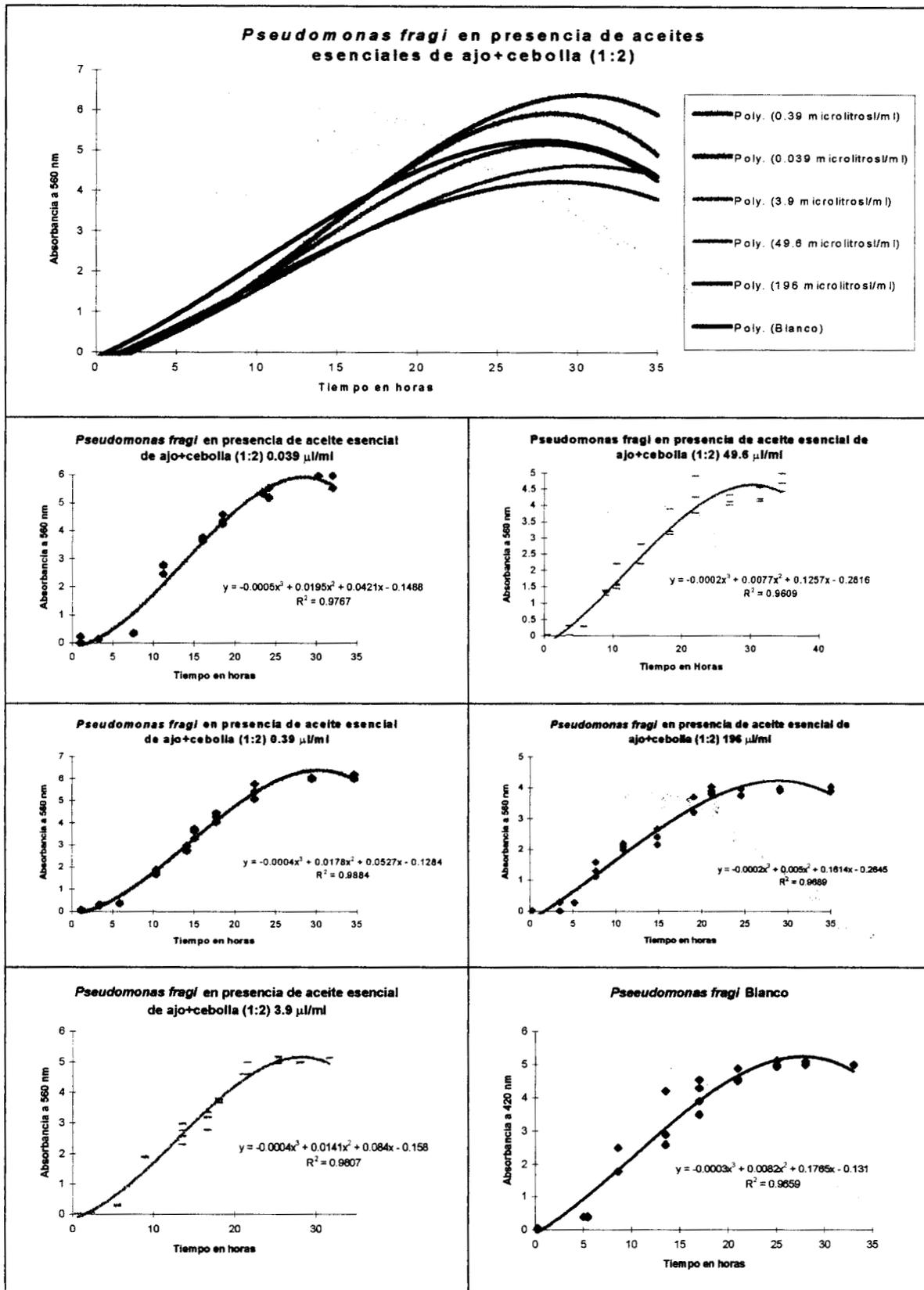
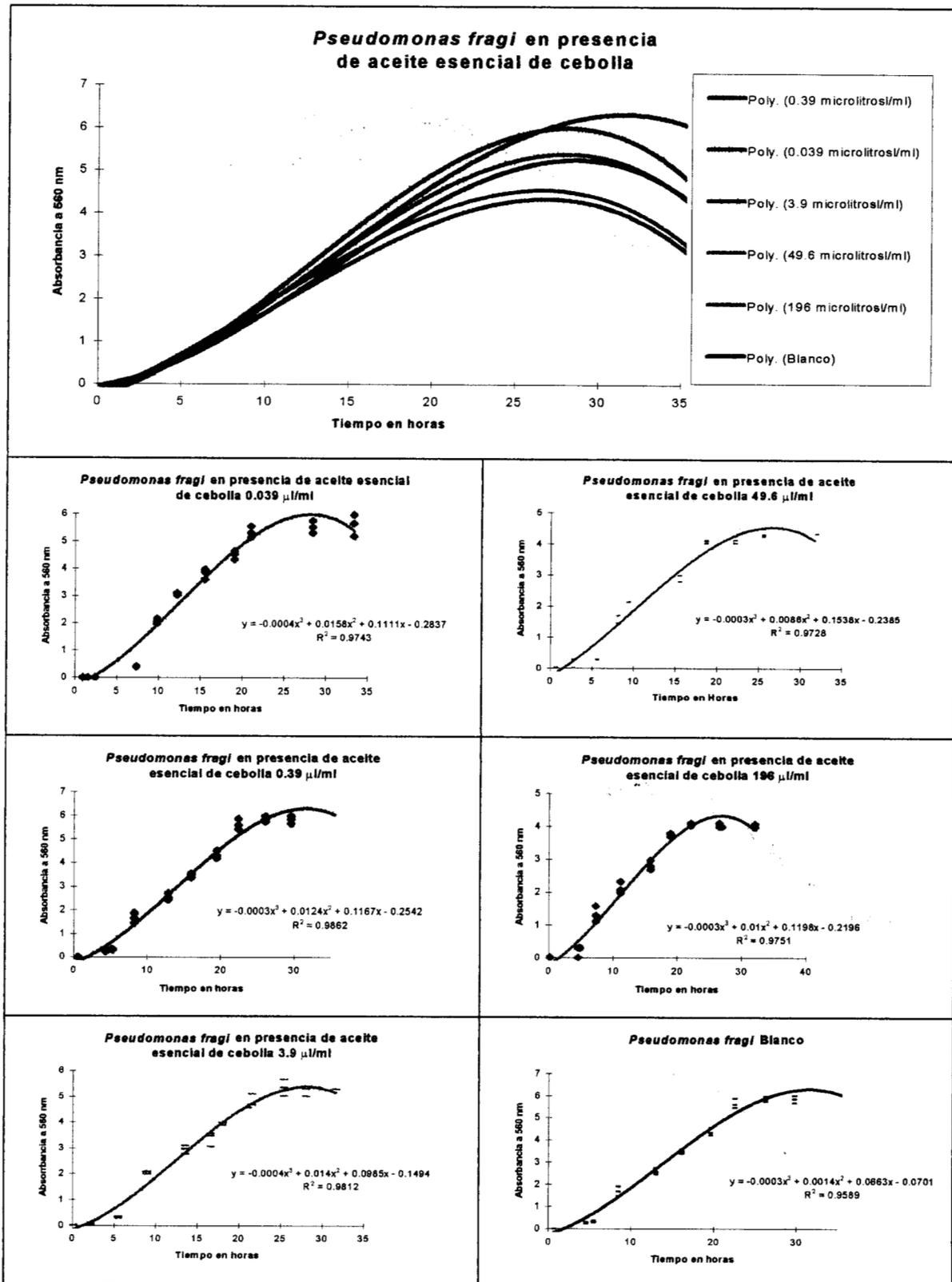


Figura 29. Curvas ajustadas de crecimiento de *Pseudomonas fragi* (continuación)

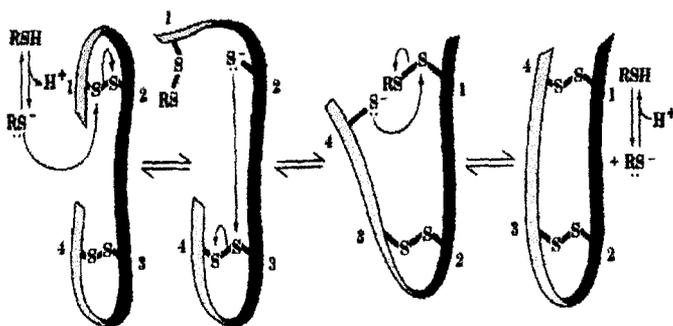


**Tabla 22.** Ecuaciones de cada curva de crecimiento de *Pseudomonas fragi*, punto teórico máximo, área bajo la curva a 24 horas y porcentaje de inhibición tomando como referencia el número menor (ajo a 196 µl/ml).

NIVEL	ECUACIÓN (coeficiente de correlación)	MÁXIMO Y VALOR TEÓRICO DE ABSORBANCIA (TIEMPO, ABSORBANCIA)	ÁREA A 24 HORAS	% de inhibición
<b>AJO</b>				
0.039	$y = -0.0007x^3 + 0.0291x^2 - 0.0745x + 0.0501$ ; $R^2 = 0.9858$	(26.36, 5.48)	61.17	29.03
0.39	$y = -0.0005x^3 + 0.0227x^2 - 0.0111x - 0.0126$ ; $R^2 = 0.9876$	(30.02, 6.58)	59.63	27.20
3.96	$y = -0.0005x^3 + 0.0207x^2 - 0.0246x - 0.0412$ ; $R^2 = 0.987$	(26.99, 4.54)	45.8	5.28
49.6	$y = -0.0003x^3 + 0.0094x^2 + 0.1105x - 0.1826$ ; $R^2 = 0.9667$	(25.67, 3.77)	45.87	5.36
196	$y = -0.0003x^3 + 0.0085x^2 + 0.1166x - 0.1898$ ; $R^2 = 0.9631$	(24.23, 3.35)	43.31	0
BLANCO	$y = -0.0004x^3 + 0.0155x^2 + 0.0545x - 0.0478$ ; $R^2 = 0.9791$	(27.48, 4.85)	52.79	17.76
<b>AJO + CEBOLLA (2:1)</b>				
0.039	$y = -0.0006x^3 + 0.0235x^2 + 0.0046x - 0.1234$ ; $R^2 = 0.9622$	(26.01, 5.09)	56.88	23.68
0.39	$y = -0.0005x^3 + 0.0207x^2 + 0.0052x - 0.0447$ ; $R^2 = 0.9876$	(27.47, 5.06)	54.33	20.09
3.96	$y = -0.0004x^3 + 0.0186x^2 + 0.0075x - 0.1522$ ; $R^2 = 0.9759$	(31.20, 6.03)	51.03	14.93
49.6	$y = -0.0003x^3 + 0.0123x^2 + 0.0785x - 0.1506$ ; $R^2 = 0.974$	(30.21, 5.17)	50.7	14.37
196	$y = -0.0003x^3 + 0.0125x^2 + 0.0578x - 0.0089$ ; $R^2 = 0.9743$	(29.92, 4.87)	49.14	11.66
BLANCO	$y = -0.0004x^3 + 0.0171x^2 + 0.0447x - 0.0457$ ; $R^2 = 0.9659$	(29.75, 5.88)	57.39	24.35
<b>AJO + CEBOLLA (1:1)</b>				
0.039	$y = -0.0006x^3 + 0.024x^2 - 0.0069x - 0.0605$ ; $R^2 = 0.9925$	(26.52, 5.44)	57.38	24.34
0.39	$y = -0.0004x^3 + 0.0178x^2 + 0.0527x - 0.1284$ ; $R^2 = 0.9884$	(28.10, 3.57)	60.94	28.76
3.96	$y = -0.0006x^3 + 0.0256x^2 - 0.0452x - 0.0681$ ; $R^2 = 0.9688$	(27.53, 5.57)	53.54	18.92
49.6	$y = -0.0004x^3 + 0.0181x^2 + 0.0249x - 0.0743$ ; $R^2 = 0.9882$	(25.32, 4.89)	50.61	14.22
196	$y = -0.0003x^3 + 0.0098x^2 + 0.0945x - 0.1724$ ; $R^2 = 0.9838$	(25.84, 3.63)	43.35	0.13
BLANCO	$y = -0.0004x^3 + 0.0154x^2 + 0.0562x - 0.0561$ ; $R^2 = 0.9777$	(27.37, 4.31)	52.62	17.50
<b>AJO + CEBOLLA (1:2)</b>				
0.039	$y = -0.0005x^3 + 0.0195x^2 + 0.0421x - 0.1488$ ; $R^2 = 0.9767$	(27.03, 5.36)	56.93	23.74
0.39	$y = -0.0004x^3 + 0.0178x^2 + 0.0527x - 0.1284$ ; $R^2 = 0.9884$	(31.07, 6.69)	60.94	28.76
3.96	$y = -0.0004x^3 + 0.0141x^2 + 0.084x - 0.158$ ; $R^2 = 0.9807$	(24.61, 4.16)	52.19	16.82
49.6	$y = -0.0002x^3 + 0.0077x^2 + 0.1257x - 0.2816$ ; $R^2 = 0.9609$	(32.17, 5.07)	48.33	10.18
196	$y = -0.0002x^3 + 0.005x^2 + 0.1614x - 0.2645$ ; $R^2 = 0.9689$	(26.73, 3.80)	46.58	6.80
BLANCO	$y = -0.0003x^3 + 0.0082x^2 + 0.1765x - 0.131$ ; $R^2 = 0.9659$	(25.81, 4.723)	60.59	28.35
<b>CEBOLLA</b>				
0.039	$y = -0.0004x^3 + 0.0158x^2 + 0.1111x - 0.2837$ ; $R^2 = 0.9743$	(29.47, 6.47)	64.81	33.01
0.39	$y = -0.0003x^3 + 0.0124x^2 + 0.1167x - 0.2542$ ; $R^2 = 0.9862$	(31.65, 6.34)	59.76	27.35
3.96	$y = -0.0004x^3 + 0.014x^2 + 0.0985x - 0.1494$ ; $R^2 = 0.9812$	(26.43, 4.84)	56.11	22.63
49.6	$y = -0.0003x^3 + 0.0086x^2 + 0.1538x - 0.2385$ ; $R^2 = 0.9728$	(25.74, 4.39)	53.31	18.57
196	$y = -0.0003x^3 + 0.01x^2 + 0.1198x - 0.2196$ ; $R^2 = 0.9751$	(27.12, 4.40)	50.42	13.90
BLANCO	$y = -0.0003x^3 + 0.014x^2 + 0.0663x - 0.0701$ ; $R^2 = 0.95.89$	(33.32, 6.58)	57.04	23.89

Köningsberg (1992) indicó que un inhibidor es una molécula que interviene directamente sobre alguna parte de la cadena oxidativa mitocondrial en dos mecanismos, el primero; puede ser uniéndose a alguna subunidad específica o algún grupo prostético, el segundo puede ser compitiendo con los donadores y aceptores naturales por los sitios específicos de oxido-reducción. Para el caso específico de las sustancias encontradas en los aceites esenciales es imposible determinar cual o cuales son las que tienen el mayor efecto en los mecanismos propuestos, aunque se atribuye a la alicina su máximo efecto (Feldberg y col. 1988), pero si es un hecho que los resultados indican que con el aceite esencial de ajo se logra mayor inhibición del crecimiento celular y como consecuencia una disminución en los sistemas metabólicos celulares y enzimáticos recopilados en la Tabla 6 de la presente tesis, aunque hay bacterias resistentes según un reporte de Kyung y col. (1996). Hay varios mecanismos de acción de los compuestos azufrados de ajos y cebollas que incluyen entre otros, la alteración de los puentes disulfuro en proteínas, la modificación del potencial redox en la cadena del flujo de electrones, alteración de la permeabilidad celular, acción sobre la acetil Co-A, alteración del potencial de oxidación de la glutatión reductasa.

### V.3.3. Alteración del puente disulfuro -S-S- (-SH)

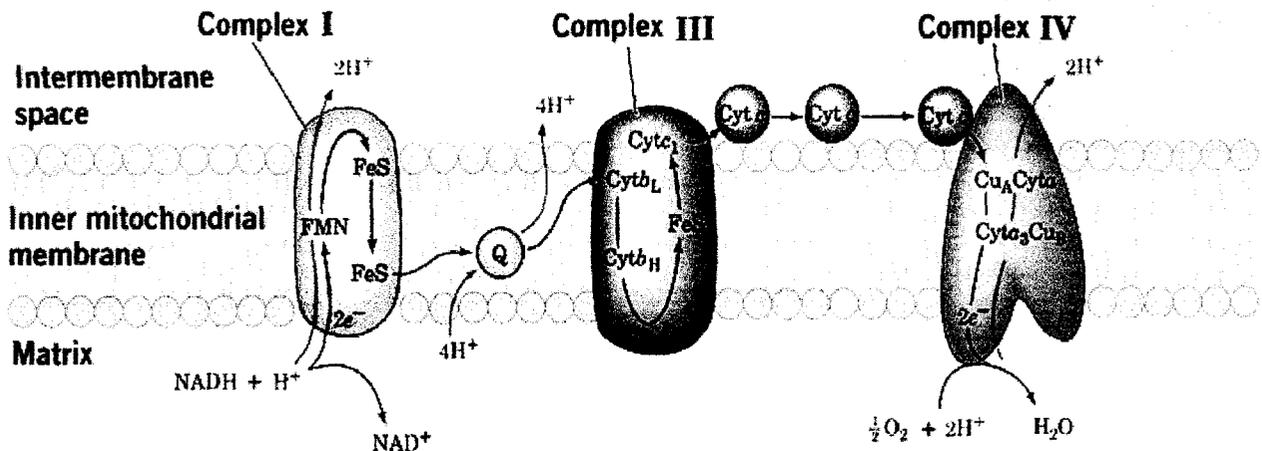


**Figura 30.** Un posible mecanismo de intercambio de grupos tiol- o intercambio de disulfuro es el catalizado por la glutatión reductasa. La cinta púrpura representa el esqueleto polipeptídico de una proteína. El ataque del grupo tiol o mercapto puede ser ionizado en forma de tiolato.

La inhibición enzimática puede ser el resultado de la reacción de los grupos sulfhidrilo de las estructuras terciarias (Figura 30), también los compuestos azufrados de los aceites esenciales pueden causar efectos estéricos o desnaturalización de proteínas incluidas las enzimas, según el mecanismo de acción recopilado por Maarse (1991).

### V.3.4. Modificación del potencial redox en la cadena del flujo de electrones

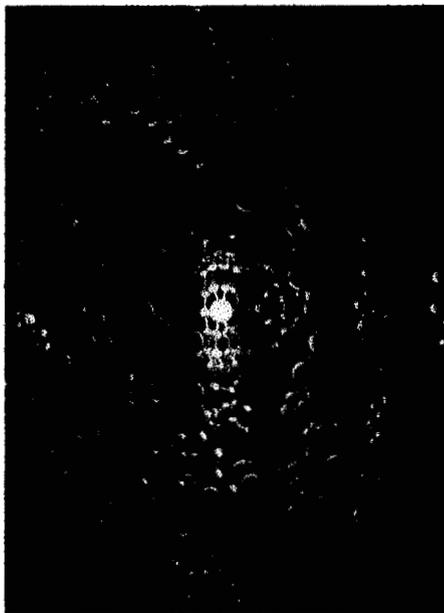
Se conoce que los electrones libres de los compuestos azufrados presentes en los aceites esenciales pueden modificar el balance de óxido reducción en la cadena del transporte de electrones, que es el mecanismo más eficiente de producción de ATP a nivel celular (Figura 31).



**Figura 31.** Diagrama de la cadena del transporte de electrones mitocondriales, indicando la ruta de la transferencia (*negro*) y la bomba de protones (*rojo*). Los electrones son transferidos entre los Complejos I y III por la coenzima Q, soluble en la membrana; y el Complejo III y IV por el citocromo C entre la membrana y la proteína periférica. El complejo II (no se muestra) transfiere los electrones del succinato hasta CoQ. Muchas de las proteínas contenidas en el interior de la membrana mitocondrial están organizadas en cuatro complejos respiratorios de la cadena de transporte de electrones. Cada complejo consta de varios componentes protéicos que están asociados con una variedad de grupos prostéticos, los cuales incrementan gradualmente los potenciales de reducción. Los complejos son móviles entre el interior de la membrana mitocondrial no aparecen como estructuras rígidas o estables (Voet y Voet, 1995; Köningsberg, 1992).

El lugar donde se genera la mayor cantidad de energía a nivel celular es en la membrana mitocondrial en las células eucarióticas y en el mitocondrion en las células procarióticas; este proceso es la transferencia de energía libre en forma de electrones desde el NADH y FADH<sub>2</sub> hasta O<sub>2</sub> vía los centros redox ligados a las proteínas acopladas en la síntesis de ATP y son los complejos FeS.

La inhibición del metabolismo en este nivel, tiene como fundamento propuesto, la modificación del agrupamiento Fe-S de la cadena del transporte de electrones en donde



**Figura 32.** Citocromo C. Participa en el transporte de electrones del proceso de obtención de energía desde el alimento hasta el oxígeno. El interior de cada proteína es un grupo prostético llamado grupo hemo, de color naranja en la ilustración. Alterna entre los estados oxidados y reducidos de hierro y azufre, en contra de la pérdida de electrones que pasan a lo largo de la cadena del transporte de electrones.

son transferidos los electrones de la coenzima Q al citocromo C. Puede actuar posiblemente el inhibidor alterando la estructura de las cisteínas con el hierro. Se conocen tres grupos prostéticos como complejos hierro-azufre en las proteínas (no incluye al grupo hemo). Los dos tipos más comunes son los designados agrupamientos [2Fe-2S] y [4Fe-4S] en donde están coordinados los átomos de hierro a cuatro grupos sulfhidrido de residuos del amino ácido cisteína (Cys).

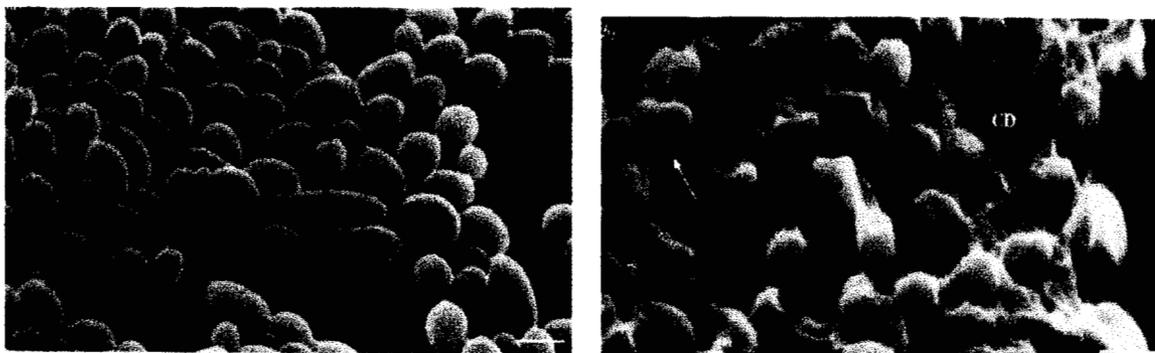
En las bacterias se encuentra el complejo del tipo [Fe-S], de forma general los estados oxidados y reducidos de todos los complejos hierro-azufre difieren por una carga formal sin considerar el número de átomos de hierro. Esto porque los átomos en cada agrupación, forman un sistema conjugado y pueden tener valores de los estados de oxidación característicos de sus iones ferroso +2 y férrico +3.

### V.3.5. Alteración de la permeabilidad celular, acción sobre la acetil Co-A

Focke y col. (1990), reportaron la inhibición de la acetil-Co A sintetasa en plantas, levaduras y mamíferos, así como el sistema formador de acetil-CoA bacteriano, acetato-cinasa y fosfotransacetilasa mediante el uso de principios azufrados a partir de ajo. Dos años antes, Mahmoud y Ghannoum (1988) reportaron que el enlace de la alicina a las enzimas es no covalente y es reversible. Estos autores y también Adetumbi (1986), encontraron que se alteran algunas enzimas vinculadas con la síntesis de ácidos grasos. Ellos estudiaron el mecanismo de acción del extracto acuoso de ajo sobre *Candida albicans* (Fotografía 21), (Ghannoum, 1988; Prashad y Sharma, 1980; Barone, 1977).

El tratamiento con el extracto afectó la estructura y la integridad de la superficie exterior de las células a nivel de membrana. En los reportes, Adetumbi (1986), indica también, que la presencia del extracto acuoso de ajo afecta los lípidos

polares y no polares así como los ácidos grasos, al disminuir el contenido total, debido a la inactivación de algunas enzimas involucradas en las reacciones de síntesis.



**Foto 21.** Microscopía de barrido electrónico de *C. albicans* KCCC 14172 crecida en medio de cultivo con agitación a 37 °C. (a) en ausencia de extracto acuoso de ajo (EAA); son células elongadas o esféricas, (b) en presencia de (EAA) se tienen células deformadas y distorsionadas y en algunos casos colapsadas; como lo indica la flecha; CD señala los restos citoplásmicos y la barra (parte inferior de a) es de 4  $\mu$  m. (Mahmoud y Ghannoum, 1988)

Las levaduras que crecieron en presencia de ajo presentaron mayores niveles de fosfatidil serinas y disminuyeron los niveles de fosfatidil colinas; en adición a los esteroides libres y esteroles ésteres. *Candida albicans* acumuló esteroides glicósidos esterificados; la concentración de ácido palmítico (16:0) y ácido oleico (18:1) se incrementó; sin embargo las concentraciones de ácido linoléico (18:2) y ácido linolénico (18:3) disminuyeron en la principal ruta biosintética para las fosfatidilcolinas; que comienza con la formación de fosfatidilserinas de CDP-diacilglicerol y serina en la  $\beta$ -oxidación de los lípidos, utilizados en los constituyentes de las membranas celulares (Voet y Voet, 1995; Weete, 1980). La acumulación de fosfatidil serinas sugiere que los compuestos azufrados del ajo interfieren con las enzimas que catalizan la ruta. Células de *C. albicans* crecidas en medio que contiene extracto acuoso de ajo (EAA), acumularon proporciones bajas de ácido palmítico y de ácido linoléico y apenas detectables en menos de 1 ppb de ácido oleico; con lo que se puede suponer que el efecto del bloqueo de los extractos de ajo sobre la biosíntesis de lípidos involucra la génesis de ácidos grasos insaturados.

A nivel de la acetil Co-A, que es el producto común de la oxidación de ácidos grasos, aminoácidos y carbohidratos en el ciclo de Krebs en procariotes y eucariotes. El grupo acetil de la acetil Co-A está enlazado a un tioéster para aportar la porción azufrada del grupo  $\beta$ -mercaptoetil-amina. La Co-A, por lo tanto, funciona como un acarreador de acetil y otros grupos acil. La acetil Co-A se forma en cinco pasos en el cual el complejo multienzimático piruvato deshidrogenasa los cataliza con una reacción estequiométrica general de:

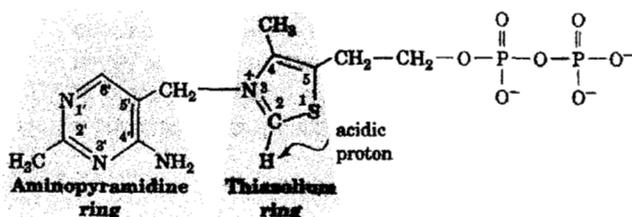
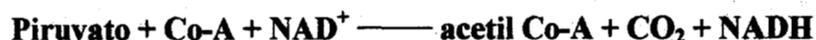


Figura 33 . Pirofosfato de tiamina

La coenzima Co-A y los grupos prostéticos requeridos para esta reacción son pirofosfato de tiamina (Figura 33), FAD,  $\text{NAD}^+$  y lipoamida. El anillo de tiazolidina se identificó y caracterizó en el aceite esencial de cebolla con tiempo de retención de 8.13 min.

La síntesis de ácidos grasos se genera a partir de la acetil Co-A y si ésta no se encuentra disponible, no hay reacciones de síntesis de otros lípidos como el colesterol que a nivel de membrana celular es un constituyente y a nivel de hormonas es un precursor (Bryan y col. 1978; Augusti y Mathew, 1975; Augusti y Mathew, 1974).

### V.3.6. Alteración del potencial de oxidación de la glutatión reductasa

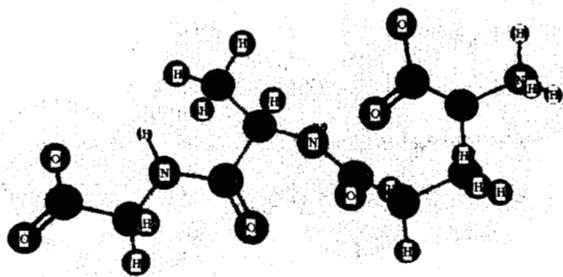
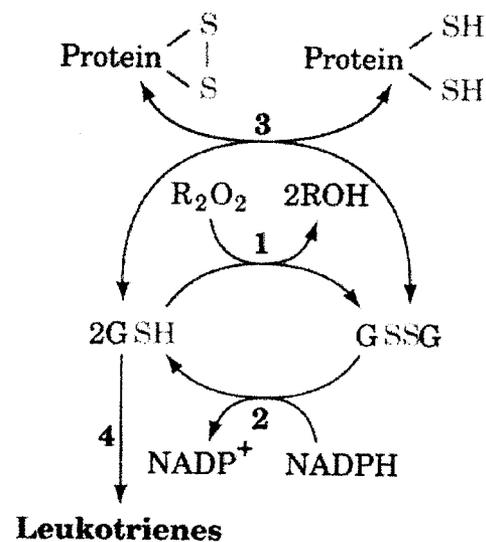


Figura 34. GSH;  $\gamma$ -glutamyl-cisteinil-glicina, glutatión

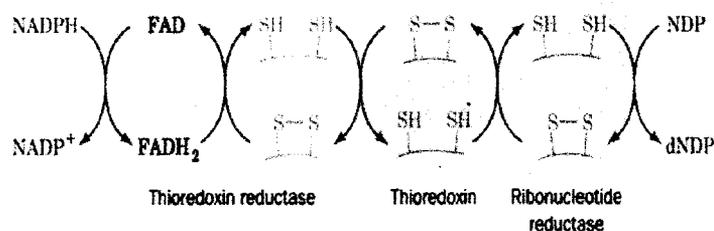
El glutatión GSH (Figura 34), es un tripeptido con un enlace  $\gamma$ -amida, participa en una variedad de procesos de detoxificación, transporte y metabólicos como se ilustra de manera general en la Figura 35. (Voet y Voet, 1995; Davison, 1993; Zollner, 1993).



**Figura 35.** Algunas reacciones que involucran a la glutatión: (1) detoxificación con la glutatión peroxidasa (2) regeneración de GSH a partir de GSSG por la glutatión reductasa, (3) modulación de la tiorredoxina; encargada del balance disulfuro de las proteínas y (4) biosíntesis de leucotrienes mediante la glutatión -S-transferasa.

### V.3.7. Alteración de la transferencia de electrones durante la síntesis del material genético para la división celular

Trabajos publicados han encontrado que los compuestos azufrados bloquean la síntesis de constituyentes celulares a nivel de DNA, RNA o ribosomas al actuar en la biosíntesis de las enzimas o inhibiendo directamente la enzima a nivel de su sitio activo. Indican los reportes que también se afecta la síntesis de RNA. De igual forma, hay estudios que vinculan a los compuestos azufrados de las especies de *Allium* con la inhibición de la síntesis de selenio-proteínas vinculadas en la expansión del código genético y enfermedades relacionadas con la deficiencia de selenio y su bioquímica ya que es un oligo elemento básico que participa en la actividad enzimática, Figura 36 (Ip y col., 1992; Böck. y col., 1993; Stadtman, 1990; Felberg y col. 1988).



**Figura 36.** Ruta de la transferencia de electrones para la reducción del NDP (Nucleósido de di fosfato) que participa en la formación de desoxiribonucleótidos. El NADPH proporciona equivalentes reductores en el proceso entre los intermediarios de la tiorredoxina reductasa, tiorredoxina, y reductasa ribonucleótido.

#### V.4. Análisis sensorial

Los resultados obtenidos por sesión se anotaron en la hoja maestra (Figura 37) y después fueron vaciados a la planilla de control en donde se registró toda la información que se comparó con las tablas estadísticas para las pruebas triangulares de acuerdo a lo reportado por Wittig (1990). Indican los datos, según lo describen los jueces en sus comentarios que la formulación que más gustó en la evaluación fue la que contiene las proporciones de ajo y cebolla (1:2) a un nivel de concentración de 196  $\mu\text{l}$  (de aceites)/gramo de pasta (Tabla 23). Por el número de aciertos en los los dos parámetros evaluados, como fueron el aroma y el sabor, se mejoran estos atributos sensoriales cuando se adicionaron los aceites esenciales como sazonadores. Otra observación fue que a concentraciones de 196  $\mu\text{l}$ /gramo de pasta no se puede diferenciar entre los otros tratamientos cual o cuales combinaciones son predominantes y en algunas evaluaciones estas son confundidas entre si. La combinación de ajo+cebolla en proporción de 2:1 fue la que menos aciertos presentó, aunque en general todos los tratamientos en el nivel de mayor concentración fueron diferenciados respecto del blanco. Aunque en el caso de los chorizos sazonados solamente con cebolla fueron desagradables.

**Tabla 23.** Evaluación sensorial y la comparación de tratamientos de acuerdo con las pruebas de significancia por el método triangular para cada tratamiento

<b>SIGNIFICANCIA PARA LA PRUEBA TRIANGULAR (P = 1/3)</b>								
<b>JUICIOS PARA CADA MUESTRA (GRUPO*JUECES) 2*6</b>			<b>MÍNIMO DE JUICIOS CORRECTOS PARA ESTABLECER DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS</b>					
<b>12</b>	<b>CORRECTOS</b>		<b>P = 0.05 (8)</b>		<b>P = 0.01 (9)</b>		<b>P = 0.001 (10)</b>	
	<b>OLOR</b>	<b>SABOR</b>	<b>OLOR</b>	<b>SABOR</b>	<b>OLOR</b>	<b>SABOR</b>	<b>OLOR</b>	<b>SABOR</b>
<b>AJO+CEB (1:1) *</b>	9	11	X	X	X	X	-	X
<b>AJO *</b>	10	10	X	X	X	X	X	X
<b>AJO+CEB (2:1) *</b>	8	9	X	X	-	X	-	-
<b>AJO+CEB (1:2) *</b>	12	12	X	X	X	X	X	X
<b>CEB *</b>	11	10	X	X	X	X	X	X
<b>AJO **</b>	10	10	X	X	X	X	X	X
<b>AJO+CEB (1:1) **</b>	10	10	X	X	X	X	X	X
<b>AJO+CEB (1:2) **</b>	10	8	X	X	X	-	X	-
<b>CEB**</b>	9	9	X	X	X	X	-	-
<b>AJO+CEB (2:1) **</b>	9	9	X	X	X	X	-	-
<b>TOTAL</b>	<b>98</b>	<b>96</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>
Intervalo seleccionado	100		43		46		49	
	200		80		84		89	

\* 196 µl de aceite(s)/gramo de pasta

\*\* 49,6 µl de aceite(s)/gramo de pasta

X Los aciertos son suficientes para satisfacer el intervalo de confianza

SET: 2

Método: Triangular

Producto: Chorizo tipo español

No de Juez: 4

Nombre: Mayela de la Peña

Fecha: 060798

Hora: 17:00

De la presente evaluación sensorial de aroma y sabor en chorizo tipo español, dos de las muestras son iguales entre si. Por favor juzgue, primero, el aroma de cada muestra y encierre en un círculo el número que considere diferente. Luego, juzgue el sabor dando 15 masticadas a cada muestra y encierre la que aprecie sea diferente. Muchas gracias

AROMA			
		CLAVES	ANOTE EN QUE RESIDE LA DIFERENCIA
6 ✓	Set 1: I903	W032 Q350	huele menos a cebolla
8 ✓	Set 2: E592	Z025 Y396	menos aromático
defig ✓	Set 3: S043	R203 T160	las 3 presentaban notas muy bajas
6 ✓	Set 4: C401	J209 V750	dif. en el olor a ajo (menor cone)
2 ✓	Set 5: L460	Z025 I907	las 3 presentaban notas muy parecidas a cebolla
SABOR			
		CLAVES	ANOTE EN QUE RESIDE LA DIFERENCIA
6 ✓	Set 1: I903	W032 Q350	aunque el sabor es muy parecido
6 <	Set 2: E592	Z025 Y396	nota un poco más ácida y salada
3 +	Set 3: S043	R203 T160	mayor sabor
6 ✓	Set 4: C401	J209 V750	dif. en el contenido de grasa
2 ✓	Set 5: L460	Z025 I903	le falta más sabor

Figura 37. Hoja maestra de evaluación para cada juez en la que se anotaron los comentarios realizados en los grupos de muestras evaluadas

Tabla 24. Planilla de control

EVALUACIONES FECHAS: - (03,06,07,08,09) - 07 98

<b>JUEZ</b>							
	1	2	3	4	5	6	
<b>CONCENTRACIÓN</b> * 196 µl/gramo de pasta							
<b>AJO+CEB (1:1)*</b>  <b>10</b>	<p>060798 /14:00</p> <p>2 El aroma es más suave</p> <p>1 El sabor es menos salado y menos grasoso</p> <p>2 El sabor tiene otra forma de salado diferente</p> <p>080798 /14:07</p> <p>2 El aroma es más suave</p> <p>2 El sabor es menos salado</p>	<p>030798 /14:15</p> <p>2 El aroma no posee aroma a condimento ajo, ó es muy tenue</p> <p>1 El sabor tiene otra forma de salado diferente</p> <p>2 El aroma cierto olor a carne cocida sin condimento</p> <p>2 El sabor sola sin condimento, menor grado de palatabilidad (poca grasa)</p>	<p>030798 /15:08</p> <p>4 El aroma no huele</p> <p>1 El sabor insipido, se desmorona, es fibroso</p> <p>2 El aroma <u>huele a condimento</u></p> <p>2 El sabor insipido, se desmorona, es fibroso</p>	<p>030798 /13:46</p> <p>2 El aroma olor ligero</p> <p>1 El sabor diferente</p> <p>2 El aroma menor olor</p> <p>2 El sabor <u>mayor</u></p>	<p>060798 /17:00</p> <p>2 El aroma menor a ajo</p> <p>1 El sabor consistencia más blanda</p> <p>080798 /16:35</p> <p>2 El aroma intenso a ajo</p> <p>2 El sabor menor consistencia, grasa y condimentos</p>	<p>070798 /14:080</p> <p>4 El aroma olor a cebolla y ajo un poco fuerte, el diferente no</p> <p>1 El sabor mediano a ajo, ligeramente ácidas. La consistencia sabor condimentado</p> <p>2 El aroma olor a cebolla y ajo ligero, agradable. la diferente no muy agradable</p> <p>2 El sabor sabor a cebolla, ajo regular más ajo, la diferente condimentada sabrosa</p>	<p>24</p> <p><b>10</b></p> <p>aciertos olor 9 - 3</p> <p>aciertos sabor 11 - 1</p>
<b>AJO*</b>  <b>9</b>	<p>070798 /15:35</p> <p>2 El aroma aroma más suave</p> <p>1 El sabor menos salado y más grasoso</p> <p>080798 /14:07</p> <p>2 El aroma aroma más suave</p> <p>2 El sabor menos salado y menos grasoso</p>	<p>030798 /14:15</p> <p>2 El aroma no detecto olor a condimento</p> <p>1 El sabor media desabrida aunque posee sal y poco de sabor a carne</p> <p>060798 /14:04</p> <p>2 El aroma menos condimentada que las otras y menos a olor a grasa</p> <p>2 El sabor salada pero algo insipida a carne</p>	<p>080798 /15:40</p> <p>4 El aroma huele a harna</p> <p>1 El sabor <u>más condimentada</u></p> <p>2 El aroma huele menos a condimento (ajo)</p> <p>2 El sabor es más condimentado</p>	<p>080798 /15:40</p> <p>4 El aroma nivel de notas muy bajas, predomina la grasa</p> <p>1 El sabor igual a la anterior</p> <p>2 El aroma notas de <u>grasa las otras a cebolla a cebolla</u></p> <p>2 El sabor no tiene sabor a cebolla</p>	<p>060798 /17:00</p> <p>2 El aroma menos intenso a ajo</p> <p>1 El sabor consistencia más blanda</p> <p>070798 /16:35</p> <p>2 El aroma intenso a ajo</p> <p>2 El sabor menos intenso sabor a condimentos</p>	<p>060798 /17:00</p> <p>4 El aroma olor a cebolla y ajo fuerte, no en el diferente</p> <p>1 El sabor muy fuerte a ajo en los iguales, en el blanco; menos condimentada.</p> <p>2 El aroma olor a ajo fuerte no en la diferente</p> <p>2 El sabor sabor muy fuerte a ajo en las dos iguales, la otra condimentada bien</p>	<p>24</p> <p><b>9</b></p> <p>aciertos olor 10 - 2</p> <p>aciertos sabor 10 - 2</p>

<b>JUEZ</b>							
	1	2	3	4	5	6	
<b>CONCENTRACIÓN</b> * 196 µl/gramo de pasta							
<b>AJO+CEB (2:1)*</b> <b>8</b>	<p>030798 / 14:10</p> <p>1 El aroma es más suave. 1 El sabor es menos salado</p> <p>2</p> <p>070798 / 15:35</p> <p>2 El aroma aroma más suave 2 El sabor más grasoso, más salado</p>	<p>060798 / 14:04</p> <p>1 El aroma cierto olor a pan molido, menos condimentada</p> <p>1 El sabor un salado menor que las otras condimento y grasa</p> <p>2</p> <p>080798 / 14:06</p> <p>2 El aroma pan y caldo de pollo y las otras a carne y condimento</p> <p>2 El sabor no es tan apetecible, sabe algo a carne y grasa</p>	<p>060798 / 15:35</p> <p>1 El aroma <u>huele más a condimento</u></p> <p>2 El <u>sabor es más salado a condimento</u></p> <p>2 El <u>sabor más condimentado</u></p>	<p>030798 / 13:46</p> <p>1 El aroma no tiene olor a cebolla</p> <p>1 El sabor a cebolla</p> <p>2</p> <p>060798 / 17:00</p> <p>2 El <u>aroma</u> menos aromático</p> <p>2 El <u>sabor</u> nota un poco más ácida y salada</p>	<p>080798 / 16:35</p> <p>1 El <u>aroma ausencia de aroma de condimentos</u></p> <p>1 El <u>sabor menor consistencia y sabor a aroma a ajo</u></p> <p>2 El <u>aroma intenso</u></p> <p>2 El <u>sabor menor</u> sabor a condimentos</p>	<p>030798 / 18:00</p> <p>1 El aroma olor a cebolla y la diferente no</p> <p>1 El <u>sabor</u> sabor a cebolla fuerte pero agradable, la diferente sabe bien pero solo a condimento</p> <p>2 El <u>aroma</u> olor a ajo y cebolla, leve y en la diferente no</p> <p>2 El <u>sabor</u> sabor a cebolla fuerte agradable, la diferente solo a condimento</p>	<p>24</p> <p><b>8</b></p> <p>aciertos olor 8 - 4 aciertos sabor 9 - 3</p>
<b>AJO+CEB (1:2)*</b> <b>7</b>	<p>060798 / 14:00</p> <p>1 El aroma es más suave 1 El sabor es más grasoso y menos salado</p> <p>2</p> <p>070798 / 15:35</p> <p>2 El <u>aroma</u> aroma más suave 2 El <u>sabor</u> menos salado menos grasoso</p>	<p>030798 / 14:15</p> <p>1 El aroma no posee olor a especias</p> <p>1 El <u>sabor</u> media desahbrida aunque poseé sal y poco de sabor a carne</p> <p>2</p> <p>080798 / 14:06</p> <p>2 El <u>aroma</u> cierto aroma a rancidez de grasa, sin condimento</p> <p>2 El <u>sabor</u> no se define sabor, no se encuentra insípida y se detecta algo de grasa</p>	<p>060798 / 15:08</p> <p>1 El <u>aroma</u> no huele a salado</p> <p>1 El <u>sabor</u> fibroso y salado</p> <p>2</p> <p>060798 / 15:35</p> <p>2 El <u>aroma</u> no tiene olor a cebolla</p> <p>2 El <u>sabor</u> diferente poco desagradable</p>	<p>070798 / 17:00</p> <p>1 El <u>aroma</u> no presenta un olor fuerte a cebolla</p> <p>1 El <u>sabor</u> no sabe a cebolla</p> <p>2</p> <p>080798 / 15:35</p> <p>2 El <u>aroma</u> no presenta un olor fuerte a cebolla</p> <p>2 El <u>sabor</u> no sabe a cebolla</p>	<p>090798 / 14:05</p> <p>1 El <u>aroma</u> aroma menos intenso a ajo</p> <p>1 El <u>sabor</u> menos intenso</p> <p>2 El <u>aroma</u> aroma menos intenso</p> <p>2 El <u>sabor</u> menos intenso</p>	<p>080798 / 15:35</p> <p>1 El <u>aroma</u> huele ácido, a cebolla fuerte; la diferente no, solo a condimento</p> <p>1 El <u>sabor</u> saben ácida y ajo regulada diferente ácida condimentada</p> <p>2 El <u>aroma</u> huelen regular a ajo y cebolla, la diferente no</p> <p>2 El <u>sabor</u> saben fuerte a ajo, un poco ácidas; las diferentes no. Queda mucho residuo a ajo en la boca</p>	<p>24</p> <p><b>7</b></p> <p>aciertos olor 12 - 0 aciertos sabor 12 - 0</p>
<b>CEB*</b> <b>6</b>	<p>030798 / 14:10</p> <p>1 El aroma es más suave. 1 El sabor es más grasoso 2 El aroma es más suave. 2 El sabor es más salado</p>	<p>070798 / 13:45</p> <p>1 El <u>aroma</u> más carne cocida y ligero aroma a pan y no se detecta condimentos</p> <p>1 El <u>sabor</u> carne seca ligeramente salada, sin condimento</p> <p>2 El <u>aroma</u> las muestras a analizar tienen cierto aroma a salmón enlatado; el control tiene cierto aroma a pan molido</p> <p>2 El <u>sabor</u> estructura resistente no fibrosa ni seca, algo salado sin condimento, no encuentro un sabor que me confirme que lo que estoy comiendo es carne</p>	<p>030798 / 15:08</p> <p>1 El <u>aroma</u> <u>olor fuerte</u></p> <p>1 El <u>sabor</u> se desmorona, salado, parece que masticas papel</p> <p>2</p> <p>080798 / 15:08</p> <p>2 El <u>aroma</u> huele a menos condimento</p> <p>2 El <u>sabor</u> es más picante al final</p>	<p>060798 / 17:00</p> <p>1 El <u>aroma</u> huele menos a cebolla</p> <p>1 El <u>sabor</u> aunque el sabor es muy parecido</p> <p>2 El <u>aroma</u> diferente en el olor a ajo (menor conc.)</p> <p>2 El <u>sabor</u> diferente en el contenido de grasa</p>	<p>060798 / 17:00</p> <p>1 El <u>aroma</u> menor a ajo (el menos intenso)</p> <p>1 El <u>sabor</u> menor consistencia</p> <p>2</p> <p>080798 / 16:35</p> <p>2 El <u>aroma</u> intenso aroma a ajo</p> <p>2 El <u>sabor</u> <u>solo diferencias mínimas en sabor y de algo de consistencia</u></p>	<p>030798 / 18:00</p> <p>1 El <u>aroma</u> olor a cebolla fuerte, la diferente no</p> <p>1 El <u>sabor</u> sabor demasiado fuerte, un poco desagradable, la diferente solo a condimento</p> <p>2</p> <p>080798 / 15:35</p> <p>2 El <u>aroma</u> olor a cebolla fuerte, ácidas la diferente muy condimentada y ácida</p> <p>2 El <u>sabor</u> <u>sabor demasiado fuerte, un poco desagradable, la diferente solo a condimento</u></p>	<p>24</p> <p><b>6</b></p> <p>aciertos olor 11 - 1 aciertos sabor 10 - 2</p>

<b>JUEZ</b>							
1	2	3	4	5	6	24	
<b>CONCENTRACIÓN</b> <b>** 49.6 µl/gramo de pasta</b>							
<b>AJO **</b> <b>5</b>	<p>030798 / 14:10 1 El aroma es más suave 1 El sabor es menos grasoso</p> <p>2 080798 / 14:07 2 El aroma <u>más fuerte</u> 2 El sabor <u>más salado</u> menos grasoso</p>	<p>030798 / 14:15 1 El aroma no posee aroma a condimento ajo o es muy tenue 1 El sabor insipida en cuanto a sabor a chonzo, pero salado</p> <p>2 060798 / 14:04 2 El aroma sin condimento, sin olor a grasa 2 El sabor carne seca, salada pero sin condimento</p>	<p>090798 / 16:30 1 El aroma huele a pan 1 El sabor salado 2 El aroma <u>huele a condimento</u> 2 El sabor <u>condimentado</u></p>	<p>060798 / 15:35 1 El aroma huele diferente 1 El sabor no sabe a cebolla 2 El aroma huele diferente 2 El sabor no sabe a cebolla</p>	<p>060798 / 17:00 1 El aroma menos intenso (ajo) 1 El sabor <u>más salado</u></p> <p>2 070798 / 17:00 2 El aroma mayor olor en sabor, un poco más</p>	<p>060798 / 17:00 1 El aroma olor diferente no muy claro 1 El sabor <u>Igual de condimentador los tres subrosos</u></p> <p>2 080798 / 15:35 2 El aroma huelen ligeramente a ajo, un poco rancia 2 El sabor muy poca diferencia, muy agradables, saben ácidas, muy condimentadas; la diferente menos, pero también ácida</p>	<b>5</b> <b>actertos olor</b> <b>10 - 2</b> <b>actertos sabor</b> <b>10 - 2</b>
<b>AJO+CEB (1:1) **</b> <b>4</b>	<p>060798 / 14:00 1 El aroma es más suave 1 El sabor es menos salado y menos grasoso</p> <p>2 080798 / 14:07 2 El aroma <u>más fuerte</u> 2 El sabor <u>más grasoso, más salado</u></p>	<p>080798 / 14:06 1 El aroma aroma a grasa, sin condimento 1 El sabor grasa con sal, cierto rasgo fibrosos</p> <p>2 090798 / 16:30 2 El aroma carne cocida y grasa 2 El sabor <u>condimentado</u></p>	<p>080798 / 15:40 1 El aroma huele feo condimentada 1 El sabor <u>perdura más</u></p> <p>2 090798 / 16:30 2 El aroma no huele a nada 2 El sabor <u>condimentado</u></p>	<p>030798 / 13:45 1 El aroma olor ligeramente diferente 1 El sabor el contenido de grasa</p> <p>2 070798 / 17:00 2 El aroma de olor bajo (menor) 2 El sabor diferente sabor</p>	<p>030798 / 18:00 1 El aroma olor a cebolla más leve que el set 1, la diferente no 1 El sabor <u>las tres saben igual</u></p> <p>2 060798 / 17:00 2 El aroma olor a cebolla y tal vez ajo, no en la diferente 2 El sabor <u>sabor agradable a ajo y cebolla sabrosa, en la otra no, solo condimentado</u></p>	<p>030798 / 18:00 1 El aroma olor a cebolla más leve que el set 1, la diferente no 1 El sabor <u>las tres saben igual</u></p> <p>2 060798 / 17:00 2 El aroma olor a cebolla y tal vez ajo, no en la diferente 2 El sabor <u>sabor agradable a ajo y cebolla sabrosa, en la otra no, solo condimentado</u></p>	<b>4</b> <b>actertos olor</b> <b>10 - 2</b> <b>actertos sabor</b> <b>10 - 2</b>
<b>AJO+CEB (1:2) **</b> <b>3</b>	<p>030798 / 14:10 1 El aroma es más suave. 1 El sabor es más grasoso</p> <p>2 080798 / 14:07 2 El aroma más suave 2 El sabor <u>menos salado más grasoso</u></p>	<p>030798 / 14:15 1 El aroma posee un olor más a pan que a cebolla-ajo 1 El sabor salado y no tiene sabor cebolla-ajo desagradable</p> <p>2 080798 / 14:06 2 El aroma cierto aroma pan-grasa 2 El sabor se detecta cierto grado de acidez, grasa, sin condimento, aunque las otras dos muestras <u>tienen</u> condimentos, y el sabor aunque algo ácido y salado. La textura la siento seca</p>	<p>080798 / 15:40 1 El aroma <u>huele a harina no condimentada</u> 1 El sabor <u>menos condimentado</u></p> <p>2 090798 / 16:30 2 El aroma huele a pan 2 El sabor <u>más condimentado</u></p>	<p>030798 / 13:45 1 El aroma olor menos intenso 1 El sabor <u>textura diferente, sabor a chile</u></p> <p>2 060798 / 17:00 2 El aroma los tres presentan notas muy bajas 2 El sabor mayor sabor</p>	<p>030798 / 15:00 1 El aroma <u>Intenso a ajo</u> 1 El sabor <u>poca consistencia</u> 2 El aroma menos intenso a ajo 2 El sabor <u>menos salado y más consistencia</u></p>	<p>070798 / 14:08 1 El aroma olor muy ligero a ajo agradable, la diferente no 1 El sabor un poco ácida, muy leve a ajo las dos iguales, muy agradable, la diferente no 2 El aroma <u>olor muy ligero a ajo agradable, la diferente no</u> 2 El sabor <u>ligero a ajo y cebolla muy agradable, la diferente menos condimentada</u></p>	<b>3</b> <b>actertos olor</b> <b>10 - 2</b> <b>actertos sabor</b> <b>8 - 4</b>

<b>JUEZ</b>						
1	2	3	4	5	6	
<b>CONCENTRACIÓN</b> ** 49.6 µl/gramo de pasta						
<b>CEB **</b>  <b>2</b>	<p>060798 / 14:00</p> <p>1 El aroma es más fuerte</p> <p>1 El sabor es más grasoso y menos salado</p> <p>2</p> <p>070798 / 15:35</p> <p>2 El aroma es más suave</p> <p>2 El sabor menos salado menos grasoso</p>	<p>060798 / 15:08</p> <p>1 El aroma condimentado</p> <p>1 El sabor salado, consistencia fácil de masticar</p> <p>2</p> <p>070798 / 13:45</p> <p>2 El aroma huele a pan</p> <p>2 El sabor es más condimentado</p>	<p>060798 / 17:00</p> <p>1 El aroma los tres presentan notas muy parecidas a cebolla</p> <p>1 El sabor le falta más sabor</p> <p>2</p> <p>070798 / 17:00</p> <p>2 El aroma nivel de condimento bajo</p> <p>2 El sabor mejor sabor a cebolla</p>	<p>030798 / 15:00</p> <p>1 El aroma menor aroma -intensidad- a ajo</p> <p>1 El sabor poca consistencia menos grasoso</p> <p>2 El aroma menos intenso a ajo</p> <p>2 El sabor mejor consistencia menos sal</p>	<p>030798 / 15:35</p> <p>1 El aroma huele a ácido y ligeramente a ajo, la diferencia no igual un poco a ramito</p> <p>1 El sabor saben a menzaca ácida pero un poco más condimentada que la diferencia, sabor a guardado semi-rancio en la diferencia</p> <p>2</p> <p>070798 / 14:30</p> <p>2 El aroma olor muy ligero a ajo muy agradable, la diferencia no leve a ajo en las iguales, la diferencia menos condimentada</p>	<p>24</p> <p><b>2</b></p> <p>aciertos olor 9 - 3</p> <p>aciertos sabor 9 - 3</p>
<b>AJO + CEB (2:1)</b>  <b>1</b>	<p>060798 / 14:00</p> <p>1 El aroma es más suave</p> <p>1 El sabor es menos salado y menos grasoso</p> <p>2</p> <p>070798 / 15:35</p> <p>2 El aroma aroma más fuerte</p> <p>2 El sabor más salado y más grasoso</p>	<p>060798 / 15:35</p> <p>1 El aroma es de menor intensidad, huele a pan</p> <p>1 El sabor menos condimento</p> <p>2</p> <p>070798 / 15:35</p> <p>2 El aroma huele a pan</p> <p>2 El sabor es ácido</p>	<p>030798 / 13:45</p> <p>1 El aroma no presenta olor a cebolla</p> <p>1 El sabor la textura es diferente, contenido de grasa</p> <p>2</p> <p>060798 / 15:35</p> <p>2 El aroma igual al anterior</p> <p>2 El sabor no tiene sabor a cebolla</p>	<p>060798 / 17:00</p> <p>1 El aroma mejor aroma a ajo</p> <p>1 El sabor menos salado</p> <p>2</p> <p>090798 / 14:05</p> <p>2 El aroma menos intenso (ajo) y consistencia (ajo) y consistencia</p>	<p>030798 / 18:00</p> <p>1 El aroma olor a ajo y cebolla leve, la diferencia no</p> <p>1 El sabor sabor muy agradable a condimento en las iguales, la diferencia un poco menos condimentada</p> <p>2</p> <p>060798 / 17:00</p> <p>1 El aroma olor a ajo fuerte, no en el diferente</p> <p>1 El sabor sabor agradable a ajo en las iguales, en la otra menos condimento</p>	<p>24</p> <p><b>1</b></p> <p>aciertos olor 9 - 3</p> <p>aciertos sabor 9 - 3</p>
<b>BLANCO</b>	5	5	5	5	5	
aciertos olor	16 - 4	12 - 8	19 - 1	12 - 8	19 - 1	
aciertos sabor	16 - 4	14 - 6	17 - 3	13 - 7	16 - 4	
comentarios adicionales	En general están sabrosos	El que es diferente se desmorona en la boca pero al masticarlo parece fibra o papel. Además solo se percibe sal	La muestra diferente se desintegra fácilmente en la boca	Buen sabor en general, las muestras de mayor consistencia con partes grasosas y algunas muy saladas	070798 / 14:08	En general la muestra con ajo y/o cebolla se siente menos la grasa y se ven más complicadas y con textura más hacia salchicha, muy firme
						30
						98 - 22
						96 - 24

**La sociedad nunca avanza. Retrocede en un sitio con la misma rapidez con la que se adelanta en otro. Sufre cambios continuos; es bárbara, civilizada, cristiana, rica, científica; pero... por cualquier cosa que se recibe, algo se paga.**

**RALPH WALDO EMERSON,**

**“Self-Reliance”, en *Essays: First Series*, 1841**

## **VI. CONCLUSIONES**

### **VI.1. Extracción**

- 1) Con el método de extracción de aceites esenciales por arrastre de vapor en condiciones de vacío estándar se obtuvieron sustancias puras. Las temperaturas de ebullición finales para ajo y cebolla fueron de 76 °C y 73 °C respectivamente y 4 horas de proceso total de destilación en promedio
- 2) Se aumentó el rendimiento en 42 % y 35 % para cebolla y ajo respecto del reportado bibliográficamente.

### **VI.2. Caracterización**

- 3) Se identificaron 10 compuestos azufrados en ajos, en cebollas 20 y los dos más abundantes son aldehídos.

#### **VI.2.1. Análisis cromatográficos**

- 4) Los compuestos caracterizados en ajo en su totalidad son alifáticos.
- 5) La alicina o dialil disulfuro es el compuesto más abundante en ajo.

- 6) La abundancia relativa de los compuestos con un átomo de azufre, en ajos, suman alrededor de 2.8 %, los disulfuros suman alrededor del 48.29 % y los trisulfuros 39.35 %.
- 7) En cebolla, los aldehídos tienen abundancia relativa de 27 % para el propanal y el 2-pentenal, 2-metil(2-etil-t-butanal) 13.8%.
- 8) Los compuestos monoazufrados en cebollas suman 20.33 % de abundancia relativa, los disulfuros tienen 10.82 %, los trisulfuros 47.23 %.
- 9) Nueve compuestos de las cebollas son cíclicos y dos presentan nitrógeno y azufre.
- 10) Ajos y cebollas tienen tres compuestos comunes, el dimetil disulfuro, 2-propenil propil disulfuro y el dimetil trisulfuro.

#### **VI.2.2. Química con el reactivo de Ellman**

- 11) La determinación de grupos sulfhidrilos indica que el aceite esencial de ajo tiene 25 % más que los detectados en cebolla.
- 12) La detección de grupos sulfhidrilo disminuyó en la manera que aumentó el contenido de aceite esencial de cebolla.

#### **VI.3. Bioensayos.**

- 13) Los aceites esenciales de ajo y cebollas son inhibidores del crecimiento de *Lactobacillus pentosus* y *Pseudomonas fragi*, según la concentración. Ya que los compuestos azufrados a mayor concentración modifican el potencial de óxido-reducción y posiblemente modifiquen las estructuras terciarias de las proteínas.
- 14) En niveles por abajo de 0.39  $\mu\text{l/ml}$  de los aceites, se favorece el desarrollo celular. Posiblemente porque los compuestos son incorporados al metabolismo celular y favorecen su desarrollo.

- 15) El aceite esencial de ajo presenta el mayor efecto inhibitorio que la cebolla y que sus combinaciones, tal vez se deba a que la totalidad de los compuestos volátiles de ajos son azufrados, en cebollas el 40 % son aldehídos que no contienen azufre.
- 16) Posiblemente son los compuestos azufrados y no los aldehídos los que presentan la actividad antimicrobiana.
- 17) Con la metodología realizada, no es posible saber cual o cuales de los compuestos presentan la actividad antimicrobiana.
- 18) La mezcla de los aceites no supera la inhibición del aceite esencial de ajo.

#### **VI.4. Evaluación sensorial**

- 19) Se mejoran los atributos sensoriales del producto cárnico cuando se utilizan aceites esenciales de ajo y cebolla en 196 µl/ml como sazonadores en proporción de (1:2).
- 20) La formulación de aceite esencial de cebolla por si sola es desagradable.

Hace falta valor para temer.

MONTAIGNE , *Essays* ,III, (1588)

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abdou, I. A., Abdou, Z., A.A.; El-Sherbeeney, M.R. y Abdou- El-Gheat, Z.H. 1972. Antimicrobial activity of *Allium sativum*, *Allium cepa*, *Raphanus sativum*, *Capsicum frutescens*, *Eurica sativa*, *Allium curra* on bacteria. *Qualitas Plantarum Material Vegetable*. 22:29-31.
- Adetumbi, M., Javor, G.T. y Lau, B.H. 1986. *Allium sativum* (garlic) inhibits lipid synthesis by *Candida albicans* Antimicrobials Agents Chemother. 30, 499-501.
- Albrand, M., Dubois, P., Etievant P., Gelín R. y Tokarska B. 1980. Identification of a new volatile compound in onion (*Allium cepa*) and leek (*Allium porum*): 3,4-Dimethyl-2,5-dioxo-2,5-dihydrothiophene. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 28: 1037-1038
- AOAC. 1990. *Official Methods of Analysis*. Decimoquinta ed. pp 344..Association of Official Analytical Chemists. Washington D.C. E.U.
- Atkins, P. W. 1991. *Fisicoquímica*. 3a ed. pp 201-213. Adison-Wesley Iberoamericana. México.
- Augusti, K. T. 1977. Hypocholesterolemic effect of garlic, *Allium sativum* Linn. *Indian Journal Experientia Biology* .15(6):489-490.
- Augusti, K.T. 1975. Studies on the effect of allicin (diallyl disulfide-oxide) on alloxan diabetes. *Experientia* 31(11): 1263-1265.
- Augusti, K. T. y Benaim, M. E. 1975. Effect of essential oil of onion (allyl propyl disulfide) on blood glucose, free fatty acid and insulin levels of normal subjects. *Clinical Chimia Acta*. 2; 60(1):121-123.
- Augusti, K.T. y Mathew, P.T. 1975. Effect of allicin on certain enzymes of liver after a short term feeding to normal rats. *Experientia* 31(2): 148-149.
- Augusti, K.T. y Mathew, P.T. 1974. Lipid lowering effect of allicin (diallyl disulphide-oxide) on long term feeding to normal rats. *Experientia* 30(5): 468-470.

- Azzouz M.A. y Bullerman LL. B. 1982. Comparative antimicrobial effects of selected herbs, spices, plant components and commercial antifungal agents. *Journal Food Protection*. 14: 1298-1301.
- Badui S. 1988. Diccionario de tecnología de alimentos. Ed. Alhambra Mexicana S.A. de C.V. México.
- Bailey, J. M., Makheja, A. N., Butler, J. y Salata, K. 1979. Anti-inflammatory drugs in experimental atherosclerosis. Part 4. Inhibition of atherosclerosis in vivo and thromboxane synthesis and platelet aggregation in vitro. *Atherosclerosis*. 32(2):195-203.
- Banu Y. y Majumder M.S.I. 1981. Antimicrobial activity of *Allium ampeloprasum* the single bulb garlic. *Bangladesh Journal Biological Sciences*. 10(1-2):39-45.
- Barone, F.E. y Tansey, M.R. 1977. Isolation, purification, synthesis, and kinetics of activity of the anticandidal component of *Allium sativum* and a hypothesis for its mode of action. *Mycologia* 69:793-797.
- Becker A. y Schuphan, W. 1975. Biogenesis and biochemistry of onion essential oils (*Allium cepa* L.) with antimicrobial effects. *Qualitas Plantarum Plant Foods for Human Nutrition* 25 (2):107-169.
- Beuchat L.R. y Golden D.A. 1989. Antimicrobials and their use in foods. Overview. Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technology*. 43(1):101-116.
- Block, E. 1994. Flavorants from Garlic, Onion and Other *Allium* and their Cancer-Preventive Properties. En *Food Phytochemicals for Cancer Prevention* pp 84-96. Huang, M.-T., (Eds).; ACS Symposium Series 546; ACS: Washington, DC. E.U.
- Block E., Littlejohn H., Putman D. y Bussard M. L. 1994. Onion (*Allium cepa* L.) thiosulfates respond to increasing sulfur fertility. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 42, 2085-2088.
- Block, E., Putman, D. y Zhao, S-H. 1992. *Allium* Chemistry: GC-MS Analysis of thiosulfates from onion, leek, scallion, shallot, chive and chinese chive. *Journal Agricultural Food Chemistry* 40:2431-2438.
- Block, E. y Zhao, S. 1992. *Allium* Chemistry: Simple synthesis of antithrombotic capaenes from onion and deoxycepaenes from oil of shallot by reaction of 1-Propenethiolate with Sulfonyl Halides. *Journal Organic Chemistry*. 57: 5815-5817.
- Block, E. 1985. The Chemistry of garlic and onions. *Scientific American*. 252 (3): 94-99.

- Block, E., Ahmad S., Jain M.K., Mahendra K., Crecey R., Apitz- Castro y Cruz M.R. 1984. E,Z-Ajoene: A potent antithrombotic agent from garlic. *Journal American Chemical Society*, 106: 8295-8296.
- Bobboi, A., Augusti, K. T. y Joseph, P. K., 1984. Hypolipidemic effects of onion oil and garlic oil in ethanol-fed rats. *Indian Journal Biochemistry Biophysics*. 21(3):211-213.
- Böck, A., Forchhammer, K., Heider, J. y Baron, C. 1993. Selenoprotein synthesis: an expansion of the genetic code. *Trends Biochemistry Sciences*. 16: 463-467.
- Boelens, M., de Valois, P.J., Wobben, H.J. y Van der Gen A. 1971. Volatile flavor compounds from onion. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 19(5): 984-991.
- Bósquez, M. E. 1992. Manual de Prácticas de Laboratorio de Fisiología de Frutas y Hortalizas. Libros de Texto y Manuales de Práctica. Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa. México.
- Bourgeois, C.M. y Leveau, J. Y. 1995. Microbiological control for foods and agricultural products. pp.421-430. VCH Publishers, Inc. Verlagsgesellschaft mbH. Weinheim, Alemania.
- Brodnitz M.H. y Pascale J.V. 1971. Thiopropanal S-oxide: A lachrimatory factor in onion. *Journal Agriculture Food Chemistry*. 17(4):760-763.
- Brodnitz M.H., Pascale J.V. y Van derslice L. 1971. Flavor components of garlic extract. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 19(2): 273-275.
- Brodnitz, M.H., Pollock, y Vallon P.P. 1969. Flavor components of garlic extract. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 19:1808-1810.
- Bryan, R. W., Feinmark, S. J., Makheja, A. N. y Bailey, J.M. 1978. Lipid metabolism in cultured cells. Synthesis of vasoactive thromboxane A<sub>2</sub> from C<sub>14</sub> arachidonic acid culture lung fibroblasts. *Journal Biology Chemistry*. 253(22):8134-8142.
- Campbell, N. A. 1993. Biology. 3a. ed. Benjamin Cummings Publishing Company, Inc. Reedwood City, California. E. U.
- Carson, J.F. 1987. Chemistry and biological properties of onions and garlic. *Food Reviews International* 3:71-103.
- Castelló, Y.T., Zabé, M. y Piña, L. I. 1987. Presencia de la comida prehispánica. pp. 102. Fondo Cultural Banamex, A.C. México.

- Cavallito, C.J., Bailey J. H. 1944. Allicin, the antibacterial principal of *Allium sativum*. I Isolation, physical properties and antibacterial action. *Journal American Chemical Society* 66: 103.
- Cavallito, C.J., Bailey J. H. y Buck J.S. 1945. The antibacterial principle of *Allium sativum*. III its precursor and "essential oil of garlic" *Journal American Chemical Society*. 67: 1032.
- Chi, M. S. 1982. Effects of garlic products on lipid metabolism in cholesterol-fed rats. *Proctection Society Experientia Biological Medical*. 171(2):174-178.
- Chi, M. S., Koh, E. T. y Steward, T. J. 1982. Effects of garlic on lipid metabolism in rats fed cholesterol or lard. *Journal Nutrition*. 112(2):241-248.
- Chieko, O., Takahisa, H., Kikue, K. y Akio, K. 1993. Volatile flavor compounds formed in an interespecific hybrid between onion and garlic. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 41:1808-1810.
- Colby, D. S. 1987. *Bioquímica. Editorial Manual Moderno. México D.F.*
- Collins M.A. y Charles H.P. 1987. Antimicrobial activity of carnosol and ursolic acid: two anti-oxidant constituents of *Rosmarinus officinalis* L. *Food Microbiology*. 4:311-315.
- Conner D.E. 1993. Naturally occurring compounds. Antimicrobials in foods. pp 441-468. 2 a ed. Davison M.P. y Branen A.L. (Ed.), Marcel Dekker, Inc., Nueva York.
- Corning glassware catálogo. 1995. Pyrex. Aparatos de destilación. pp 80. Nueva York. E.U.
- Dababneb, B.F.A. y Al-Delaimi. K.S: 1984. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by garlic extrac. *Lebensm Wiss Technology*. 17:29-31.
- Dainty, R.H. y MacKay, B.M. 1992. Ecosystems microbes: foods. pp.103-114., Blackwel scientific publications. Inglaterra.
- Daniel, W. W. 1995. *Bioestadística. 5a ed. Uteha-Noriega (Eds.) México.*
- Danker J.; Tromp F.J.T.; Vries H. y Klasen H.J. 1979. Antimicrobial activity of crude juices of *Allium ascalonicum*, *Allium cepa* and *Allium sativum*. *Zentralblatt fur Bakteriologie, -Parasitenkunde, - Infektionskrankheiten und Hygiene, IA*. 245 (1/2):229-239.
- Davison, P.M. y Branen, A.L. 1993. Antimicrobials in foods. 2a ed.Marcel Dekker. pp 448-450. Nueva York. E.U.

- De witt J.C., Notermans S., Gorin N. y Kampelmacher E.H. 1979. Effect of garlic oil or onion oil on toxin production by *Clostridium botulinum* in meat slurry. *Journal Food Protection*. 42(3):222-224.
- Djerassi, C., 1994. Dictionary of natural products, type of compound index-species index. Chapman and Hall. Cambridge, Gran Bretaña.
- El-Khateib T., Ahmed S.H. y Makboul M.A. 1989. Trials for increasing keeping quality of Egyptian minced meat kofta and kapab by spices extracts. En proceedings. pp. 20-25. *35 th International Congress of Meat Science and Technology*. Copenhagen, Roskilde Dinamarca, Danish Meat Research Institute.
- El-Khateib T.; Schmidt U. y Leistner L. 1987. Mikrobiologische stabilitaet Von turkischer pastirma. *Fleischwirtschaft*. 67(1):101-105.
- Ellman L. G. 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Archives Biochemistry Biophysics* 82:70-77.
- El-Shourbagy M.S., Abdou Bark, Hassan MA, Tawfik M.S. y Ahmed Y.M. 1993. Breeding potential of locally cultivated garlic (*Allium sativum* L.).v. phytotherapeutic value of improved selections. *Journal Herbs and Medicinal Plants*; 1(3):27-45.
- Esteban, L. 1993. La espectrometría de masas en imágenes. pp. 3-69. ACK. Editores. Universidad Complutense, Madrid.
- Extract Mex, (1998). Boletín técnico publicitario.
- Farag R.S., Daw Z.Y., Hewedi F.M. y El-Baroty G.S.A. 1989. Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. *Journal Food Protection*, 52(9):665-667.
- Feldberg, R. S., Chang, S.C., Kotik, A.N., Nadler, M., Neuwirth, Z. y Sundstrom, D. C. 1988. In vitro mechanism of inhibition of bacterial cell growth by allicin. *Antimicrobial Agents Chemother*. 32(12):1763-1768.
- Fenwick G.R. y Hanley A.B. 1985. The genus *Allium*. Part 3. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*; 23(1):1-73.
- Fennema O.R. 1984. Food chemistry. pp 601. 2a ed. Marcel Dekker. Nueva York. E.U.
- Focke M., Feld A. y Lichtenthaler K. 1990. Allicin, a naturally occurring antibiotic from garlic, specifically inhibits acetyl Co-A synthetase. *FEBS Letters* 261(1):106-108.

- Freeman, F. y Koder Y. 1995. Garlic chemistry: stability of S-(2-propenil) 2-propene-1-sulfinothioate (allicin) in blood, solvents, and simulated physiological fluids. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 43(9):2332-2338.
- Freeman, G., Whenham, R.J. 1975. A survey of volatile components of some *Allium* species in terms of S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides present as flavour precursors. *Journal Sciences Food agriculture* 26(12):1869-1886.
- Guerrero, L. M. I. y Arteaga, M. M.R. 1990. Tecnología de carnes. Elaboración y Preservación de Productos Cárnicos. pp 87-94. Editorial Trillas. México D.F.
- Ghannoum, M.A. 1988. Studies on the anticandidal mode of action of *Allium sativum* (garlic). *Journal Genetic Microbiology*, 134(11):2917-2924.
- Gould, G.W. 1992. Ecosystem Approaches to food preservation. *Journal Applied Bacteriology*. Symposium Supplement. 73:58-68.
- Graham, H.D. y Graham, E.J.F. 1987. Inhibition of *Aspergillus parasiticus* growth and toxin production by garlic. *Journal Food Safety* 8:101.
- Gurusubramanian G.y Krishna S.S. 1996. The effects of exposing eggs of four cotton insect pests to volatiles of *Allium sativum* (Liliaceae). *Bulletin of Entomological Research*. 86(1):29-31.
- Hale, S. 1998. El gran libro del ajo. pp 6-11. Quinted Publishing Limited. Londres, Inglaterra.
- Hargreaves L.L., Jarvis B., Rawlinson A.P. y Wood J.M. 1975. The antimicrobial effect of spices, herbs and extracts from these and other food plants. *Scientific and Technical Surveys*, Leatherhead Food, 48-56.
- Hitokoto, H., Morozumi, S., Wauke, T., Sakai, S. y Kurata, H. 1980 Inhibitory effects of spices on growth and toxin production of toxigenic fungi. *Applied and Enviromental Microbiology*. 39:818-822.
- Holt, G. J., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T. y Williams, S. T. 1993. Bergey's Manual of determinative bacteriology. Novena Edición. Williams y Willkins. Baltimore, Maryland, E.U.
- Hui, H. Y. y Khachatourians, G.G. 1995. Food biotechnology, microorganisms. VCH. Verlagsgesellschaft mbH. Weinheim, Alemania.
- Ip, C., Lisk, D.J., Stoewsand, G.S. 1992. Mamary cancer prevention by regular garlic and selenium-enriched garlic. *Nutrition Cancer*. 17:279-286.

- Jeanfils, J., Burlion N. y Andrien, F. 1991. Antimicrobial effects of essential oil from different spices. *Revue de l'Agriculture*, 44(5):1013-1019.
- Johnson, E.A. y Paisa, M.W. 1989. Microbiological principles for the safety of foods. Middlekauff y Shubik. (Eds), International food regulation handbook pp135-174. Marcel Dekker, Inc. Nueva York. E.U.
- Kabelik J. 1970. Antimicrobial properties of garlic. Antimikrobielle Eigenschaften des Knoblauchs. *Pharmazie*. 25(4):266-70.
- Kammerer, S. y Praznik, W. 1993. Garlic the therapeutical effects of the compounds and the analysis. *Ernaehrung*, 17 (10) 541-545.
- Karaioannoglou, P.G., Mantis, A.J. y Panetsos A.G. 1977. The effect of garlic extract on lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum* in culture. *Lebensm. Wiss. U. Technology*. 10:148-150.
- Kim, J.M., Marshall, J.A., Preston II, J.F. y Wei, C.I. 1995. Antibacterial activity of carvacol, citral, and geraniol against *Salmonella typhimurium* in culture medium on fish cubes. *Journal Food Science*, 60(6):1364-1368,1374.
- Koch, J., Berger, L. y Vieregee-Reiter, C. 1989. Allicin in garlic *Allium sativum* L. and garlic preparations: determination using headspace gas chromatography. *Planta Medica* 55(3):327-331.
- Königsberg, M. 1992. Bioenergética de la cadena respiratoria mitocondrial. Libros de Texto y Manuales de Práctica. Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa.. México.
- Kritchevsky, D. 1991. The effect of dietary garlic on the development of cardiovascular disease. *Trends in Food Science and Technology*, 2(6):141-144.
- Kyung K.H., Park K.S. y Kim, Y.S. 1996. Isolation and characterization of bacteria resistant to the antimicrobial activity of garlic. *Journal Food Science*, 61(1):226-229.
- Lawson, L.D. 1993. Bioactive organosulfur compounds of garlic and garlic products. En *Human Medicinal Agents from Plants*. pp 306-330. Kinghorn, A. D., Balandrin, M. F., (Eds), American chemical society, Symposium Series 534; Washington, DC.
- Lawson, L.D., Wang, Z.Y.J. y Hughes, B.G. 1992. Identification and HPLC quantitation of the sulfides and dialk(en)yl thiosulfinates in commercial garlic products. *Planta Medica*, 57(3):263-270.

- Lawson, L.D., Wood, S.G. y Hughes, B.G. 1991. HPLC analysis of allicin and other thiosulfinates in garlic clove homogenates. *Planta Medica*, 57(4):363-370.
- Leistner, L. y Gorris, G.M.L. 1995. Food preservation by hurdle technology. *Trends in Food Science and Technology*, 6:41-47.
- Leung, Y. A. y Foster, S. 1996. Encyclopedia of common natural ingredients used in foods, drugs and cosmetic. pp 261-263. 390-392. 2a ed. John Wiley and Sons Inc.
- Maarse, H. 1991. Introduction. C.1. Volatile compounds in foods and beverages. Maarse H. (Ed.), pp 1-39. Marcel Dekker Inc., Nueva York.
- Maarse, H. y Visscher, C.A. 1989. Volatile Compounds in Food: Qualitative and Quantitative Data. TNO-CVO Analytical Food Institute: Zeist, Holanda.
- Maarse, H. y Visscher, C.A. 1989. Volatile Compounds in Food Volumes I,II y III. Grafische, Holanda.
- Mahmoud, A. G.y Ghannoum, A. 1988. Studies on the anticandidal mode of action of *Allium sativum* (Garlic). *Journal General Microbiology*, 134: 2917-2924.
- Makheja, A. N., Vanderhoek, Y. J., y Bailey, M. J., 1979. Effects of onion *Allium cepa* extract on platelet aggregation and tromboxane synthesis. *Prostaglandins Medical*. 2(6): 413-424.
- Mantis A.J., Karaioannoglu, P.G. y Panetsos, A.G. 1978. The effect of garlic extraction food poisoning bacteria in culture media I. *Staphylococcus aureus*. *Lebensm. Wiss. u.-Technology*, 33(4):299-301.
- Mathew, P.T. y Augusti, K. T. 1975. Hypoglycemic effects of onion, *Allium cepa* Linn. on diabetes mellitus - a preliminary report. *Indian Journal physiology pharmacology*. 19(4):213-217.
- Mazza, G., Ciaravolo, S., Chiricosta, G. y Celli S. 1992. Volatile flavour components from ripening and mature garlic bulbs. *Journal Flavour and fragrance*. (7): 111-116.
- Middlekauff, R. D. y Shubik, P. 1989. International regulation handbook. Marcel Dekker. Nueva York.
- Moore, G.S. y Atkins, R.D. 1977. The fungicidal and fungi-static effects of and aqueous garlic extract on medically important yeast-like fungi. *Mycologia* 69:341.
- Muller, A. L. y Virtanen, A. I. 1965. On the biosynthesis of cycloalliinl. *Acta chemical Scandinavian*, 19(9):2257-2258.

- Multon, J.L. 1996. Quality control for foods and agricultural products. VCH. Verlagsgesellschaft mbH. Weinheim, Alemania.
- O'Mahony, M. 1979. Short-cut signal detection measures for sensory analysis. *Journal of Food Science*. 44,302-303.
- Pafumi, J. 1986. Assesment of the microbiological quality of spices and herbs. *Journal of Food Protection*. 49(12):958-963.
- Pan, X. Y. 1985. Comparison of the cytotoxic effect of fresh garlic, diallyl trisulfide, 5-fluorouracil (5-FU), mitomycin C (MMC), and Cis-DDP on two lines of gastric cancer cells. *Chung-Hua-Chung-Liu-Tsa-Chih*. 7(2):103-105.
- Pierce, J. B. 1986. Química de la materia. Novena reimpresión. pp 134-161. Publicaciones cultural S.A. de C.V. México D.F.
- Prashad, G., y Sharma, V.D. 1980. Efficacy of garlic (*Allium sativum*) treatment against experimental candidiasis in chicks. *British Veterinary Journal*, 136:448-451.
- Pszczola, D.E. 1998. The ABCs of Nutraceutical Ingredients. *Food Technology*. 52 (3):30-37.
- Randle, M. W., Block, E., Littlejohn, H., Putman, D. y Bussard, M.L. 1994. Onion (*Allium cepa* L.) thiosulfates respond to increasing sulfur fertility. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 42:2085-2088.
- Ray, B. 1996. Fundamental food microbiology. CRC. Press. Boca Ratón. E.U. pp 7-15, 20, 87-90.
- Rees, L.P., Minney, S.F., Plummer, N.T.; Slater J.K. 1989. Skyrme, D.A. A quantitative assessment of the antimicrobial activity of garlic (*Allium sativum*). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 9(3):303-307.
- Reineccius, G. 1994. Source book of food flavors. pp 24-106. 2a ed. Chapman and Hall. Nueva York. E.U.
- Ruiz, R., Hartman, T.G., Karmas, K., Lech, J. y Rosen, R. 1994. Breath analysis of garlic- borne phytochemicals in human subjects. En *Food Phytochemicals for Cancer Prevention*. pp 102-119.; Huang, M.-T. (Eds); American chemical society Symposium series 546. Washington, DC.
- Saleem, Z.M., y Al-Delaimy, K.S. 1982. Inhibition of *Bacillus cereus* by garlic extracts. *Journal Food Protection*, 45(11):1007-1009.

- Sánchez, S. E., Rodríguez, A. J., Saucedo, V. C. y Colinas, L. M. T. 1997. El extracto de ajo como estimulador de la brotación en ciruelo japonés (*Prunus salicina* Lindl.). *Agrociencia*, 31(1):105-111.
- Sass-Kiss, A., Simandi B., Gao, Y., Boross, F., Vamos-Falucci, Z., 1998. Study on the pilot-scale extraction of onion oleoresin using supercritical CO<sub>2</sub>. *Journal Sciences Food Agriculture*. 76:320-326.
- Schwartz, H. F. y Mohan S. K., 1995. Compendium of onion and garlic diseases. pp 1-6. APS Press. The American Phytopathological Society. 2a impresión. Nueva York. E.U.
- Sharma, C. P. y Nirmala, N. V. 1985. Effects of garlic extract and of three pure components isolated from it on human platelet aggregation, arachidonate metabolism, release reaction and platelet ultrastructure-comments. *Thrombosis Research*. 37(3):489-490.
- Sharma, A., Tewari A.M., Shrikhande Padwal-Desai, y Bandyopadhyay C. 1979. Inhibition of aflatoxin-producing fungi by onion extracts. *Journal Food Sciences*. 44:1545-1547.
- Sharma, K.K., Chowdhury, N. K. y Sharma, A.L. 1975. Long term effect of onion on experimentally-induced hypercholesterolemia and consequently decreased fibrinolytic activity in rabbits. *Indian Journal medical research*. 63(11):1629-1634.
- Sharma, K.K. 1974. Onion and blood fibrinolytic activity. *Indian Journal medical science*. 28(12): 573-574
- Shashikant, K.N., Basappa, S.C., y Srinivasa-Murthy V. 1988. Studies on the antimicrobial and stimulatory factors of garlic (*Allium sativum* Linn). *Journal Food Science and Technology - India*. 18(2):44-47.
- Shelef L. A., Naglik O.A. y Bogen D.W. 1980. Sensitivity of some common food-borne bacteria to the spices sage, rosemary, and allspice. *Journal Food Science and Technology*, 45:1042-1044.
- Shelef, L.A., Jyothi, E.K. y Bulgarelli, M.A. 1984. Growth of enteropathogenic and spoilage bacteria in sage-containing broth and foods. *Journal Food Science and Technology*, 49:737-740,809.
- Singh, V.K. y Singh, D.K. 1995. Characterization of allicin as a molluscicidal agent in *Allium sativum* (garlic). *Biological Agriculture and Horticulture*. 12 (2):119-131.

- Sklan, D. Berner, Y.N. y Rabinowitch, H.D. 1992. The effect of dietary onion and garlic on hepatic lipid concentrations and activity of antioxidative enzymes in chicks. *Journal Nutritional Biochemistry*, 3(7):322-325.
- Smith, B.L., 1992. Codex alimentarius, texto abreviado. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación, Organización mundial de la salud. Roma.
- Stadman, T. C. 1990. Selenium Biochemistry. *Annual Review Biochemistry*, 59:111-127.
- Stevenson, E. K. y Bernard, D.T. 1995. Establecimiento de programas de análisis de riesgos en puntos críticos de control. Un manual de taller. National food processors institute. 2a ed. Washington, D.C.
- Tainter, R.D. y Grenis, T.A. 1993. Spices and seasonings a food technology handbook. pp161. VCH Verlagsgesellschaft mbH. Weinheim, Alemania.
- Talaat El-Khateib, Ahmed, S.H. y Makhoul, M.A. 1989. Trials for increasing keeping quality of egyptian minced meat "Kofta and Kapab" by spices extracts pp. 486-497. En Proceedings 35 th International Congress of Meat Science and Technology. Copenhagen, Roskilde, Dinamarca.
- Toussaint S.M., Renaud, A., Horman, I. 1991. Dos millones de años de industria alimentaria. Nestlé. S.A., Vevey, Suiza.
- Tung-Hsi Yu, Li-Yun Lin y Chi-Tang Ho. 1994. Volatile compounds of blanched, fried blanched, and baked blanched garlic slices. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 42:1342-1347.
- Tynecka, Z. y Gos, Z. 1973. Inhibitory action of garlic (*Allium sativum*) on growth and respiration of some microorganisms. *Acta Microbiological*, 5:51.
- Vatsala, T. M., Singh, M. y Murugesan, R. G. 1980. Effects of onion in induced atherosclerosis in rabbits: I Reduction of arterial lesions and lipids levels. *Artery*. 7(6):519-530
- Vatsala, T. M. y Singh, M. 1980. Changes in shape of erythrocytes in rabbits on atherogenic diet and onion extracts. *Atherosclerosis*.36(1):39-45
- Van der Zant, C. y Splittstoesser, D.F., 1992. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. pp. 821-835. American Public Health Association (APHA). Washington, D.C. E.U.
- Voet, D. y Voet J. 1995. Biochemistry. 2a ed., John Wiley and Sons, Inc. Nueva York. E.U.

- Vries H. y Klasen H.J. 1979. Antimicrobial activity of crude juices of *Allium ascalonicum*, *Allium cepa* and *Allium sativum*. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, -Infektionskrankheiten und -Hygiene*, 245(1/2):229-239.
- Wang Z.Y.J. y Hughes B.G. 1992. Identification and HPLC quantitation of the sulfides and dialk(en)yl thiosulfinates in commercial garlic products. *Planta Medica*: 57(3):263-270.
- Webb, E. C. 1992. ENZYME NOMENCLATURE. Committee of the International Unión of Biochemistry and Molecular Biology on the nomenclature and classification of enzymes. pp 44, 489, 545, 546, 607, 619, 635, 1038. Academic Press. San Diego, California. E.U.
- Weete, J. D. 1980. Lipid biochemistry of fungi and other organisms. 2a ed. Plenum Press. Nueva York, E.U.
- Weisenberger, H. Grube, E., Koenig, E. y Pelzer, H. 1972. Isolation and identification of the platelet aggregation inhibitor present in the onion, *Allium cepa*. *FEEBS Letters*, 26(1),105-108.
- Whitaker, J.R 1975. Development of flavor, odor and pungency in onion and garlic. *Advances Food Research*, (25):73-133.
- Whitaker J.O. 1995. Principles of food enzymology for the food sciences. pp 367-385. 2a ed. Marcel Dekker. Nueva York.
- Whitfield, F. B., Last, J. H. 1991. Vegetables. Maarse H. (Ed). En Volatile compounds in foods and beverages. pp205-210. Marcel Dekker, Inc. Nueva York. E.U.
- Wittig, de P. E. 1990. Evaluación sensorial, una metodología actual para tecnología de alimentos. pp. 57-62. Universidad de Chile.
- Xiao-Jia C., Uden C. P., Block E., Zhang X., Quinby D. y Sullivan J.J. 1994. *Allium* chemistry: identification of natural abundance organo selenium volatiles from garlic, elephant garlic, onion, and chinese chive using headspace gas chromatography with atomic emission detection. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 42: 2081-2084.
- Yu-T.H., Wu, C.M. y Chen, S.Y. 1989. Effects of pH adjustment and heat treatment on the stability and the formation of volatile compounds of garlic. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 37(3):730-734.
- Zaika, L.L. y Kissinger, J.C. 1981. Inhibitory and stimulatory effects of oregan on *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus cerevisiae*. *Journal Food Science*, (46):

1205- 1210.

Zaika, L.L., Kissinger, J.C. y Wasserman, A.E. 1983. Inhibition of lactic acid bacteria by herbs. *Journal of Food Sciences*. (48):1455-1459.

Zollner H. 1993. Handbook of enzyme inhibitors. pp 545-546. 2a ed. Parte B.VCH., Weinheim, Alemania.