



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EFECTO DE LA TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO
DE LOS DIENTES ‘SEMILLA’ EN LA PUNGENCIA Y EL
PERFIL DE TIOSULFINATOS DE AJO (*Allium sativum* L.)
CV. COREANO”**

TESIS INDIVIDUAL

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS**

PRESENTA

BRIANDA DANIELA GONZÁLEZ OROZCO

DIRIGIDA POR

DR. MIGUEL DAVID DUFOO HURTADO

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2016.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EFECTO DE LA TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO
DE LOS DIENTES ‘SEMILLA’ EN LA PUNGENCIA Y EL
PERFIL DE TIOSULFINATOS DE AJO (*Allium sativum* L.)
CV. COREANO”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA

BRIANDA DANIELA GONZÁLEZ OROZCO

DIRIGIDA POR

DR. MIGUEL DAVID DUFOO HURTADO

SINODALES

DR. MIGUEL DAVID DUFOO HURTADO
DIRECTOR

DR. EDMUNDO M. MERCADO SILVA
AESOR INTERNO

DRA. MA. ESTELA VÁZQUEZ BARRIOS
PROPIETARIO

DRA. DULCE MARÍA RIVERA PASTRANA
SUPLENTE

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	1
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Generalidades del ajo	1
1.1.1 Origen y antecedentes históricos	1
1.1.2 Taxonomía y variedades de ajo	1
1.1.3 Morfología de la planta de ajo	2
1.1.4 Composición química de los bulbos de ajo	6
1.1.5 Desarrollo y ciclo de cultivo del ajo	6
1.1.6 Bulbificación del ajo	8
1.1.7 Temperatura de almacenamiento	8
1.2. Producción del ajo	9
1.2.1 Producción mundial	9
1.2.2 Producción nacional	11
1.3. Tiosulfinatos	12
1.3.1 Generalidades de los tiosulfinatos	12
1.3.2 Tiosulfinatos en genero <i>Allium</i>	13
1.3.3 Tiosulfinatos en ajo	14
2. HIPÓTESIS	17
3. OBJETIVOS	17
3.1 General	17
3.2 Específicos	17
4. METODOLOGÍA	18

4.1. Material biológico y estrategia experimental	18
4. 2. Determinación de la pungencia de ajo	18
4.2.1 Preparación de las muestras	19
4.2.3 Determinación de ácido pirúvico de extractos de ajo	19
4. 3. Determinación de alicina y tiosulfinatos totales	20
4.3.1 Preparación de las muestras	20
4.3.2 Determinación de alicina mediante la reacción de cisteína con DNTB	20
4.4. Determinación del perfil de tiosulfinatos	21
4.4.1 Preparación de las muestras	22
4.4.2 Determinación del perfil de tiosulfinatos mediante HPLC	23
5. RESULTADOS	24
5.1. Determinación de pungencia	24
5.2. Alicina y tiosulfinatos totales	25
5.3. Perfil de tiosulfinatos	26
6. DISCUSIÓN	30
6.1 Determinación de pungencia	30
6.1 Alicina y tiosulfinatos totales	33
6.2 Perfil de tiosulfinatos	34
7. CONCLUSIONES	38
8. BIBLIOGRAFÍA	39

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Clasificación taxonómica del ajo.	2
2	Clasificación de cultivares de ajo por color y requerimientos agronómicos.	3
3	Concentración de ácido pirúvico total y endógeno (g AC.PIRÚVICO /g AJO) en extractos de ajo 'coreano' provenientes de dientes "semilla" almacenados a temperatura ambiente y a 5°C.	25
4	Concentración de tiosulfatos totales y de alicina total en extractos de ajo 'coreano' provenientes de dientes "semilla" almacenados a temperatura ambiente (TA) y a 5°C.	25
5	Resultados obtenidos por HPLC-UV/Vis en extractos de ajo provenientes de dientes "semilla" almacenados a temperatura ambiente (TA).	27
6	Resultados obtenidos por HPLC-UV/Vis en extractos de ajo provenientes de dientes "semilla" almacenados a 5°C.	28
7	Áreas relativas (%) obtenidas por HPLC-UV/Vis en extractos de ajo provenientes de dientes "semilla" almacenados a temperatura ambiente (TA) y 5°C.	29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Planta joven de ajo.	4
2	Corte transversal de un bulbo de ajo.	5
3	Diente de ajo.	6
4	Etapas ecofisiológicas de ajos del tipo blanco y violeta.	7
5	Producción mundial de ajo del 2002 al 2012.	10
6	Producción mundial de ajo en 2012.	10
7	Producción nacional de ajo en 2014.	11
8	Síntesis de tiosulfinatos.	12
9	Proceso esquemático de las reacciones llevadas a cabo al cortar ajo y cebolla.	13
10	Esquematización de los precursores y de algunos tiosulfinatos encontrados en 9 especies del genero <i>Allium</i> .	14
11	Mecanismo de la formación de alicina.	15
12	Reacción de alicina con dos moléculas de cisteína para obtener dos moléculas de S-alil-mercaptocisteína.	20
13	Curva estándar de soluciones de ácido pirúvico en un rango de concentraciones de 1 a 6 mM determinada a 515 nm.	24
14	Cromatograma (254 nm) de los tiosulfinatos presentes en extractos de ajo provenientes de diente “semilla” almacenados a temperatura ambiente (TA).	26
15	Cromatograma (254 nm) de los tiosulfinatos presentes en extractos de ajo provenientes de diente “semilla” almacenados a 5°C.	27
16	Cromatograma (254 nm) de los tiosulfinatos presentes en extractos acetónicos de ajo.	37

RESUMEN

El ajo (*Allium sativum*) es conocido por sus propiedades terapéuticas, las cuales son atribuidas a sus compuestos organosulfurados, principalmente a los sulfóxidos de cisteína y los tiosulfatos, estos últimos, no se encuentran presentes en el bulbo entero y se forman por reacciones enzimáticas que se llevan a cabo por el rompimiento de las células del bulbo al cortar el ajo. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto que tiene la temperatura de almacenamiento de los dientes “semilla” en la pungencia y el perfil de tiosulfatos de ajo (*Allium sativum*) cv. ‘coreano’. Para el estudio se utilizaron bulbos de ajo procedentes de dientes “semilla” cv. ‘coreano’ almacenados a 5°C y a temperatura ambiente cosechados en la temporada 2014-2015 (tres réplicas de 7 bulbos cada una), de cada una de estas réplicas se determinó la pungencia, el contenido de tiosulfatos totales y el perfil de los principales tiosulfatos presentes mediante HPLC-UV/VIS. Los datos obtenidos fueron examinados a través de un análisis de varianza y una comparación de medias utilizando la prueba de Tukey ($\alpha > 0.05$) para determinar diferencias estadísticas significativas. Los ajos provenientes de dientes “semilla” almacenados a 5°C presentaron un menor contenido de ácido pirúvico (0.448 g ácido pirúvico / g) que los almacenados a temperatura ambiente (0.337 g ácido pirúvico / g). El contenido de alicina y de tiosulfatos totales fue el mismo para ambas condiciones de almacenamiento, lo cual indica presuntamente que la cantidad de tiosulfatos producidos por acción de la alicina no se ve afectada por el almacenamiento a 5°C. La cromatografía de líquidos de alta resolución de los extractos de ajo proveniente de ambas condiciones respalda en parte los resultados obtenidos por el método para la cuantificación de alicina y tiosulfatos totales, debido a que en los cromatogramas se observó el mismo perfil de tiosulfatos en ambas condiciones de temperatura con tiempos de retención y absorbancias máximas similares, no obstante, se observó un aumento en la cantidad de tiosulfatos presentes en la condición de temperatura ambiente comparado con la condición a 5°C a excepción de la alicina. El método para cuantificar tiosulfatos totales al no tener la sensibilidad de la cromatografía de líquidos pudo no haber detectado eficazmente el cambio en la concentración de tiosulfatos totales en ambas condiciones.

1. ANTECEDENTES

1.1 Generalidades del ajo

1.1.1 Origen y antecedentes históricos

El ajo es una de las hortalizas más cultivadas en el mundo, debido a las propiedades culinarias, medicinales e insecticidas que posee y es tan antiguo en la historia como la civilización misma, se han encontrado referencias a él en las tablillas sumerias encontradas en los antiguos asentamientos de Babilonia y Nippur, las cuales indican que desde entonces era utilizado ampliamente para curar múltiples afecciones además de como ingrediente culinario. El ajo pertenece al género *Allium* del griego “evitar” debido a su olor repelente, y es el segundo en importancia y consumo de las cerca de 750 especies pertenecientes a este género. Se considera uno de los cultivos hortícolas más antiguos, debido a que se hace mención a la cerveza de ajo en las leyes codificadas por Hammurabi en el siglo XVIII a.C; incluso se le hace mención en la biblia como sazonador de alimentos y como remedio medicinal, el cual fue utilizado por griegos, romanos, hindúes y chinos, mientras que para los egipcios era considerada una especie sagrada. Aunque se ha especulado sobre el origen de las especies *Allium*, existe evidencia que indica que el origen del ajo y la cebolla se remonta a su cultivo en las regiones montañosas de Asia central. Por otro lado, se ha hecho mención de que las especies del género *Allium* fueron introducidas a América a finales del siglo XV por los españoles (Heinerman, 1995; Block, 2010).

1.1.2 Taxonomía y variedades de ajo

En 1754, Carl Linnaeus dio el nombre de *Allium sativum* al ajo el cual forma parte de la familia *Alliaceae* y al género *Allium* (Cuadro1). Entre las especies más difundidas del mismo género están la cebolla (*Allium cepa*), el chalote (*Allium ascalonium*) y el puerro (*Allium porrum*) (Izquierdo y Quiones, 2001). Como todas las formas cultivadas de ajo son estériles y han sido propagadas solo vegetativamente, podría esperarse que la variación intraespecífica fuera poca; sin

embargo, en regiones en donde el ajo se ha desarrollado durante mucho tiempo, como en China, existen muchos clones distintos. La caracterización morfológica por tamaño, forma y color del bulbo por varios ciclos de cultivo ha demostrado ser un sistema eficiente de evaluación del material genético del ajo, no obstante, no siempre ha permitido una clara diferenciación ente tipos comerciales, ecotipos, biotipos y genotipos .En el Cuadro 2 se muestra otra clasificación de los cultivares de ajo, ésta se basa en el color del bulbo y en los requerimientos agronómicos de la planta (Hanelt, 1990).

Cuadro1. Clasificación taxonómica del ajo (Hanelt, 1990).

Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Tracheofitae</i>
Subdivisión	<i>Angiospermae</i>
Clase	<i>Monocotyledoneae</i>
Superorden	<i>Lilliflorae</i>
Orden	<i>Asparagales</i>
Familia	<i>Alliaceae</i>
Tribu	<i>Allieae</i>
Género	<i>Allium</i>
Subgénero	<i>Allium</i>
Sección	<i>Allium</i>
Especie	<i>A. Sativum</i>

1.1.3 Morfología de la planta de ajo

El ajo es una planta herbácea erecta de 30 a 60 cm de altura y de raíces adventicias superficiales, los bulbos están compuestos por un tallo discoidal o disco basal, una serie de hojas escamosas secas y delgadas que constituyen la base de las hojas fotosintéticamente funcionales y bulbillos o dientes los cuales contienen las yemas axilares de las hojas funcionales más jóvenes. Las hojas funcionales son aplanadas y sólidas con aproximadamente 2.5 cm de ancho,

plegadas en forma longitudinal, generalmente son menos de 15 y se encargan de llevar a cabo la fotosíntesis de la planta. Algunos clones no producen inflorescencia o escapo floral. Si se llega a producir inflorescencia en ella se producen pequeños bulbillos, las flores varían en número o están ausentes en algunos casos y muy rara vez llegan a producir semillas. En la Figura 1 se muestran las partes principales de una planta de ajo (Purseglove, 1985; Takagi y col., 1990).

Cuadro 2. Clasificación de cultivares de ajo por color y requerimientos agronómicos (Burba, 1994).

Grupo	Características de los bulbos	Letargo (Dormancia)	Ciclo	Requerimientos	
				Frío	Fotoperiodo
I Violetas o asiáticos	Medianos, de pocos dientes, gran tamaño y color violáceo	Muy corto	Corto	Bajo	Escaso
II Rosados	Medianos a grandes, gran número de dientes de color rosado	Corto	Medio	Mediano-Bajo	Moderado
III Blancos	Grandes, dientes irregulares de color blanco	Medio	Medio-largo	Mediano-alto	Largo
IV Colorados, rojos y morados	Medianos, bien formados, dientes rojos	Largo	Largo	Alto	Largo

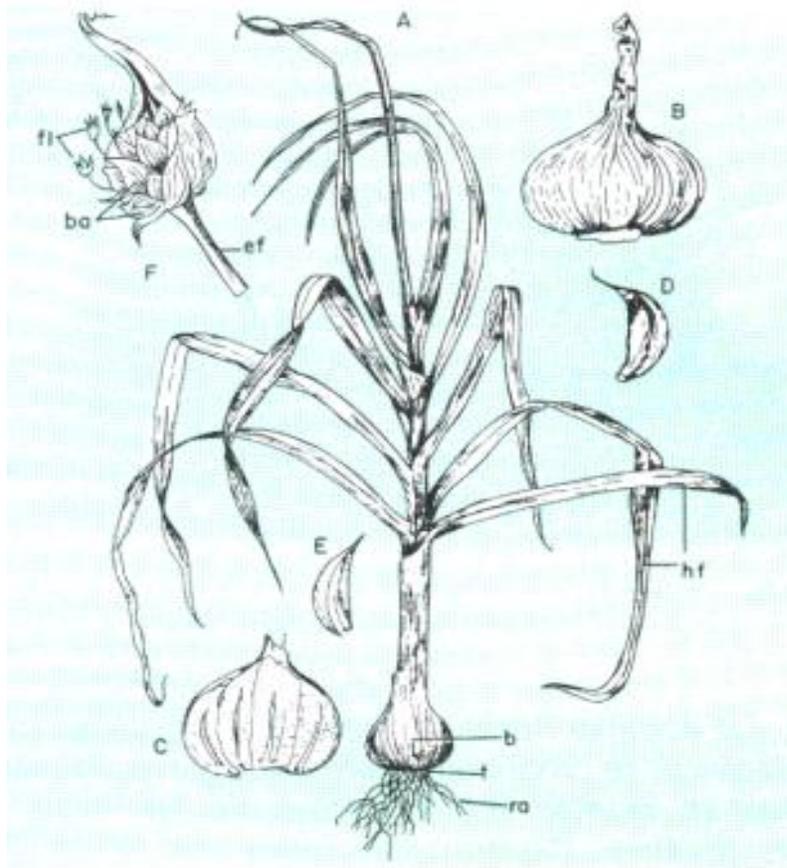


Figura 1. Planta joven de ajo. (A) con raíces adventicias (ra), tallo (t),bulbo (b) y hojas funcionales (hf). Bulbo (B). Sección longitudinal del bulbo (C). Diente (E). Sección longitudinal del diente (F).Inflorescencia (F), escapo floral (ef) bulbillos aéreos (ba) y flores (f)(Purseglove,1985).

El bulbo de ajo consiste de una serie proximal de hojas escamoso-membranosas de protección que cubren a cada uno de los dientes, otra serie de hojas similares cubre a un determinado número de yemas, dientes y también a todo su conjunto. Mas distalmente existe un número de hojas funcionales, mientras que los dientes son producidos en la axila de la hoja, sobre el lado del bulbo, en el cual la hoja diverge (Mann, 1952).

En la Figura 2 se muestra el corte transversal de un bulbo de ajo, en donde las bases envolventes de las hojas que divergen a la derecha se muestran con una

línea continua, los dientes ubicados axilarmente a dichas hojas se marcan con una línea continua oscura, el tipo opuesto de hojas se muestran con líneas discontinuas y los dientes correspondientes a estas se muestran punteados.

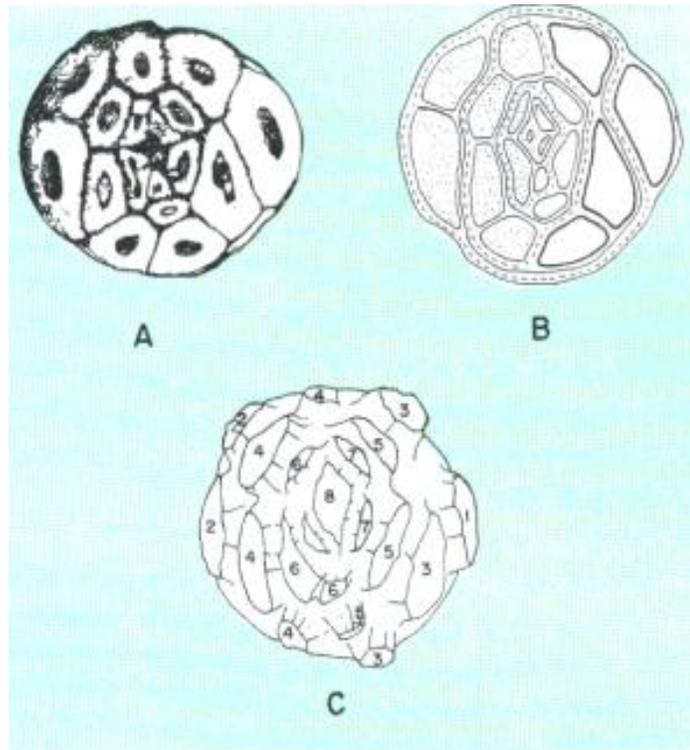


Figura 2. Corte transversal de un bulbo de ajo. Base de las hojas funcionales (B).Dientes del bulbo (A).Proyecciones donde todos los dientes estuvieron unidos (C) (Mann, 1952).

Mann (1952) considera que cada diente consiste de una hoja de protección (pr) (Figura 3) en su parte más externa, con una superficie lignificada y resistente que durante la manipulación protege a la hoja de almacenamiento a la cual rodea. La hoja 2 denominada de almacenamiento (ha) constituye la mayor parte del diente y contiene un gran contenido de sustancias de reserva. La hoja 3 denominada hoja de brotación (hb) es casi totalmente una envoltura o vaina y encierra a los ápices de las hojas funcionales. Las hojas subsecuentes son las funcionales (hf), las cuales darán lugar a los tejidos fotosintéticos.

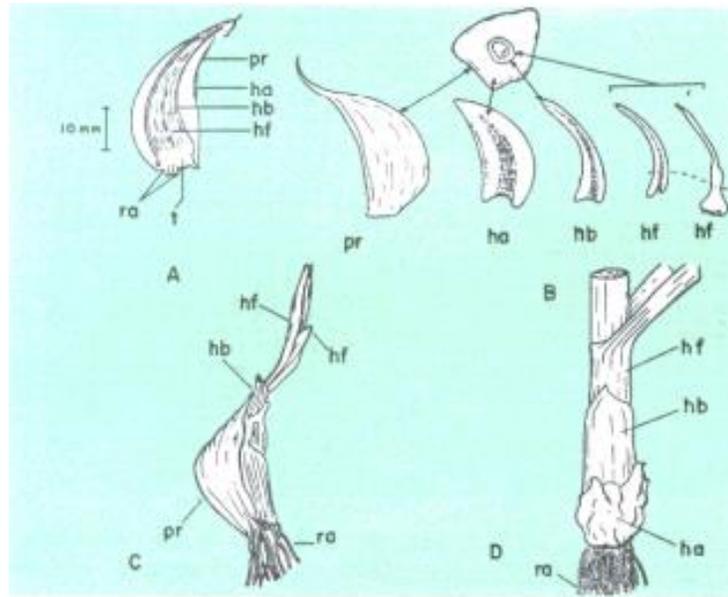


Figura 3. Diente de ajo. Corte longitudinal (A); corte transversal (B); y separación longitudinal de sus partes (C); diente en brotación (D) (Mann, 1952).

1.1.4 Composición química de los bulbos de ajo

El ajo presenta en su composición aproximadamente 62.8% de agua, 29% de carbohidratos, 6.3 % de proteína, 0.1% de grasa, calcio hierro, zinc y pequeñas cantidades de vitaminas como tiamina, riboflavina, niacina y ácido ascórbico. El ajo puede producir de 0.06 a 0.1% de aceite esencial, el cual está compuesto por compuestos denominados tiosulfinatos, principalmente disulfuro de dialilo (DADS), y pequeñas cantidades de disulfuro de alilprofilo.

1.1.5 Desarrollo y ciclo de cultivo del ajo

Según la región y tipo considerado el ajo se cultiva en zonas templadas desde mediados de verano y durante el otoño hasta el final de la primavera (Ledesma y col. 1983). El ciclo de desarrollo de la planta se divide en etapas, la primera, denominada crecimiento vegetativo, en la cual los procesos metabólicos y fisiológicos de la planta están orientados a formar el sistema radicular y las hojas, ésta etapa ocurre normalmente durante el otoño y gran parte del invierno. En ese período no hay desarrollo del bulbo ni del escapo floral. La emisión y alargamiento de las raíces desde la base del diente es una de las primeras manifestaciones del

crecimiento luego de la plantación. Paralelamente se produce el crecimiento de la hoja de brotación y de los primordios de hojas contenidas en la yema axilar ubicada en el interior de la hoja de reserva (Takagi, 1990).

Los factores que afectan el desarrollo y duración el crecimiento del área foliar y de las raíces tendrán una influencia decisiva en el rendimiento final del cultivo, la inducción y el desarrollo del bulbo y el escapo floral requieren del cumplimiento de una etapa de vernalización (bajas temperaturas) seguida de largos fotoperiodos (Rahim y Fordham, 2001).

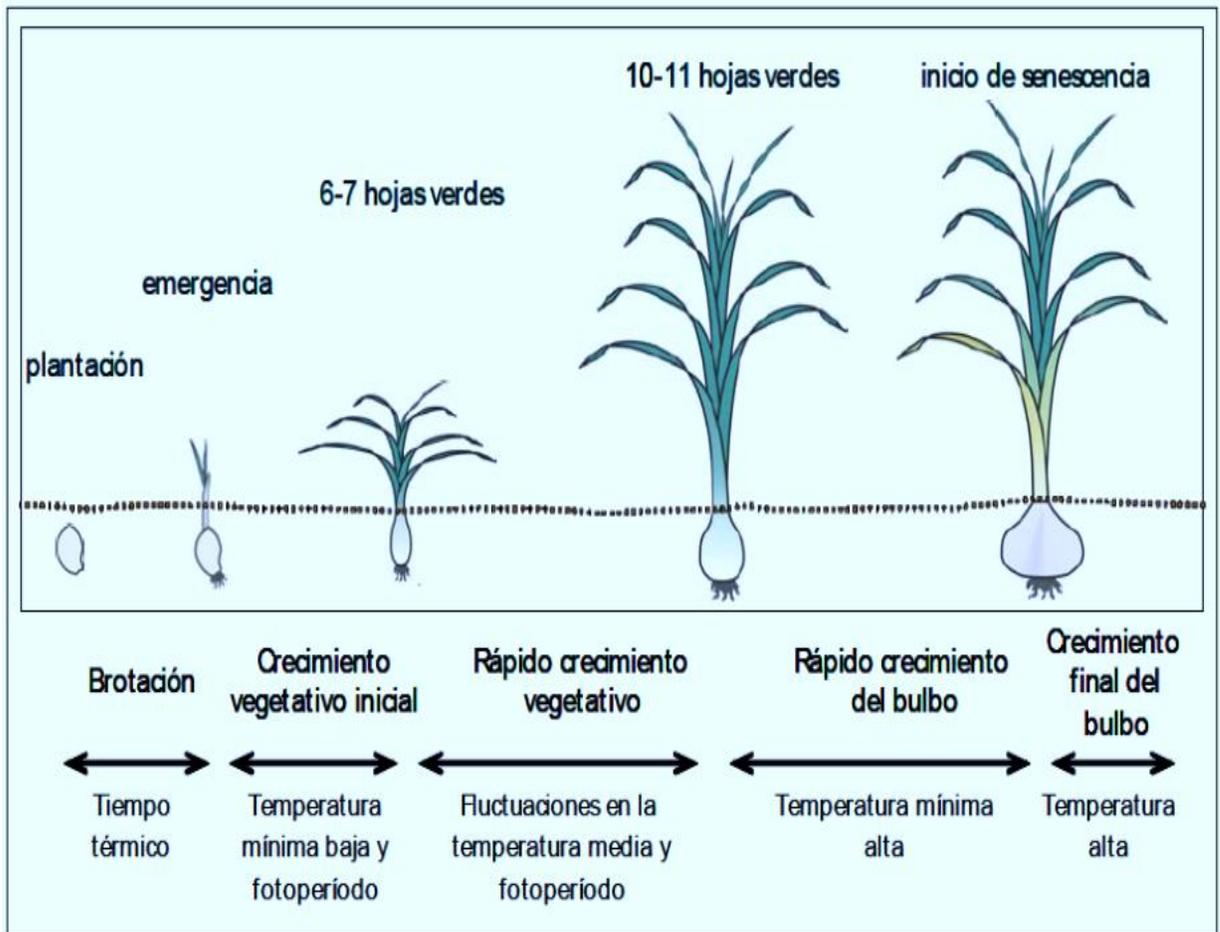


Figura 4. Etapas ecofisiológicas de ajos del tipo blanco y violeta. Al pie se indican las cinco etapas identificadas y los factores ambientales que modulan la velocidad y la duración de cada una de ellas.

1.1.6 Bulbificación del ajo

La formación de los bulbos de ajo resulta de especial importancia para la producción de la planta debido a que los bulbos constituyen el elemento fundamental del producto. Se sabe que la dilatación del bulbo de ajo se produce cuando la temperatura media diaria es mayor del intervalo 18-20°C, y cuando el fotoperiodo supera un umbral que es diferente para cada cultivar o genotipo. Cultivares adaptados a las regiones tropicales tienen un umbral de 11 a 12 horas de luz (Izquierdo y col., 1992). La formación del bulbo inicia por un estímulo termofotoperiódico que se caracteriza a través de dos etapas. La primera denominada “inductiva” en la cual, el frío y los días cortos serían factores imprescindibles. En la segunda etapa, llamada “morfológica” con temperaturas en ascenso y alargamiento de los días, las condiciones termo-fotoperiódicas son sólo capaces de modificar la velocidad del proceso de bulbificación (Portela, 1996).

La bulbificación comienza con el hinchamiento de las bases de las hojas afiladas y luego con el hinchamiento de los primeros dientes formados. Los dientes se desarrollan en las axilas de las hojas internas del follaje conforme avanza el proceso de bulbificación, durante ésta las hojas jóvenes en desarrollo terminan de formar las paredes afiladas pero desarrollan en hojas hinchadas u hojas de bulbo. La bulbificación se puede caracterizar por un incremento en la relación del diámetro máximo del bulbo con respecto al diámetro mínimo del cuello del bulbo, esta relación se denomina “índice de bulbificación” (Brewster, 1994).

1.1.7 Temperatura de almacenamiento

Rahim y Fordham (2001) utilizaron temperaturas de almacenamiento de 5, 10, 15 y 20°C, durante 15 y 30 días antes de la plantación y encontraron que los dientes almacenados a 5 y 10°C mostraron un inicio acelerado y un mejor desarrollo y madurez de los bulbos comparado con aquellos cuyos dientes fueron almacenados a 15 y 20°C. Según Brewster (1994), los dientes de ajo del cultivar ‘California Late’ almacenados por tres o cuatro meses a 5°C maduran a mediados de agosto, mientras que los dientes almacenados a 20°C por 1.5 meses seguido de tres

meses a una temperatura más baja, presentan un retraso en la bulbificación y tienen fallas en su maduración.

López-Hernández (2010) y Zavala-Gutiérrez (2011), almacenaron dientes “semilla” de ajos de la variedad ‘Coreano’ a 5°C y temperatura ambiente durante 6 y 5 semanas respectivamente. En ambos casos existió un adelanto en la cosecha de hasta 6 semanas en aquellos ajos provenientes de dientes “semilla” almacenadas a 5°C, lo que indica una rápida diferenciación de los bulbos, comparado con aquellos obtenidos de dientes “semilla” almacenados a temperatura ambiente.

Los estudios anteriores muestran el efecto que tiene la temperatura de almacenamiento de la “semilla” en el proceso de generación del bulbo, sin embargo, no describen que mecanismos afectan los procesos biológicos o moleculares que disparan dichos cambios.

En el laboratorio de Bioquímica y Fisiología Poscosecha de Frutas y Hortalizas del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos de la Facultad de Química de la UAQ se ha generado información fisiológica y bioquímica y se ha adquirido experiencia para adelantar la cosecha del cultivo hasta en 60 días, y mejorar los factores de calidad y el manejo del ajo de la variedad ‘Coreano’ sometiendo a estrés de frío a los dientes “semilla”.

1.2. Producción del ajo

1.2.1 Producción mundial

El ajo es una hortaliza de elevada demanda mundial cuya producción se ha incrementado en los últimos diez años (Figura 4). La producción mundial de ajo en 2012 fue de 24,836,877 toneladas, lo cual la posiciona en el 12° lugar de las hortalizas más consumidas a nivel mundial. China es el mayor productor con un total de 20,000,000 millones de toneladas correspondiente al 82.52% del total de la producción mundial. En la Figura 5 se muestran los países con mayor producción, destacándose China, India, República de Corea, Egipto y Rusia (FAOSTAT, 2013).

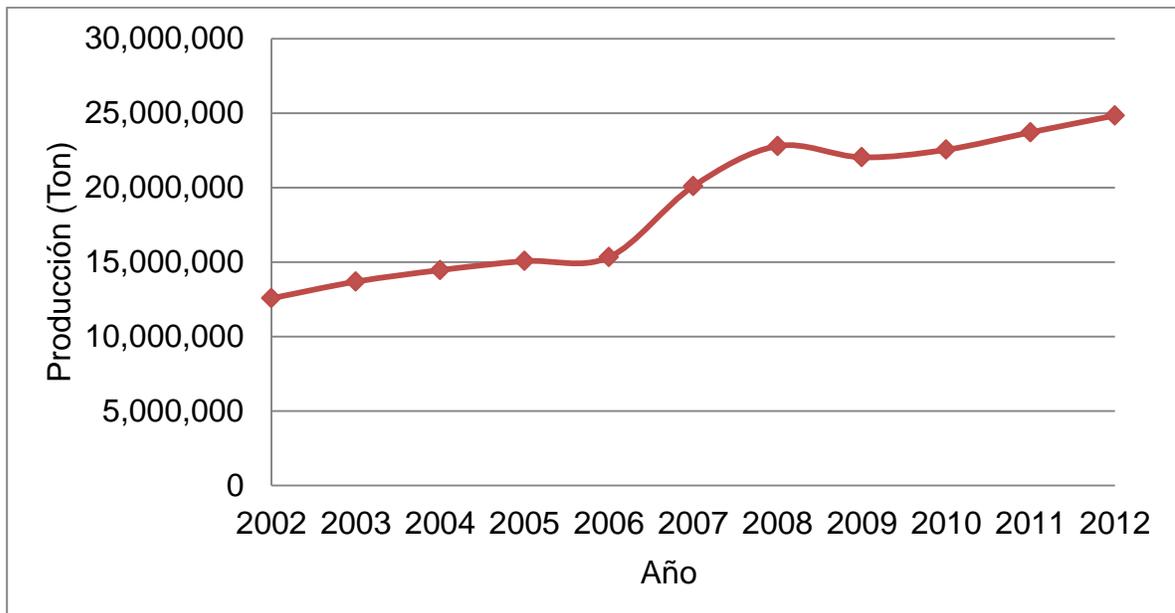


Figura 5. Producción mundial de ajo del 2002 al 2012 (FAOSTAT, 2013).

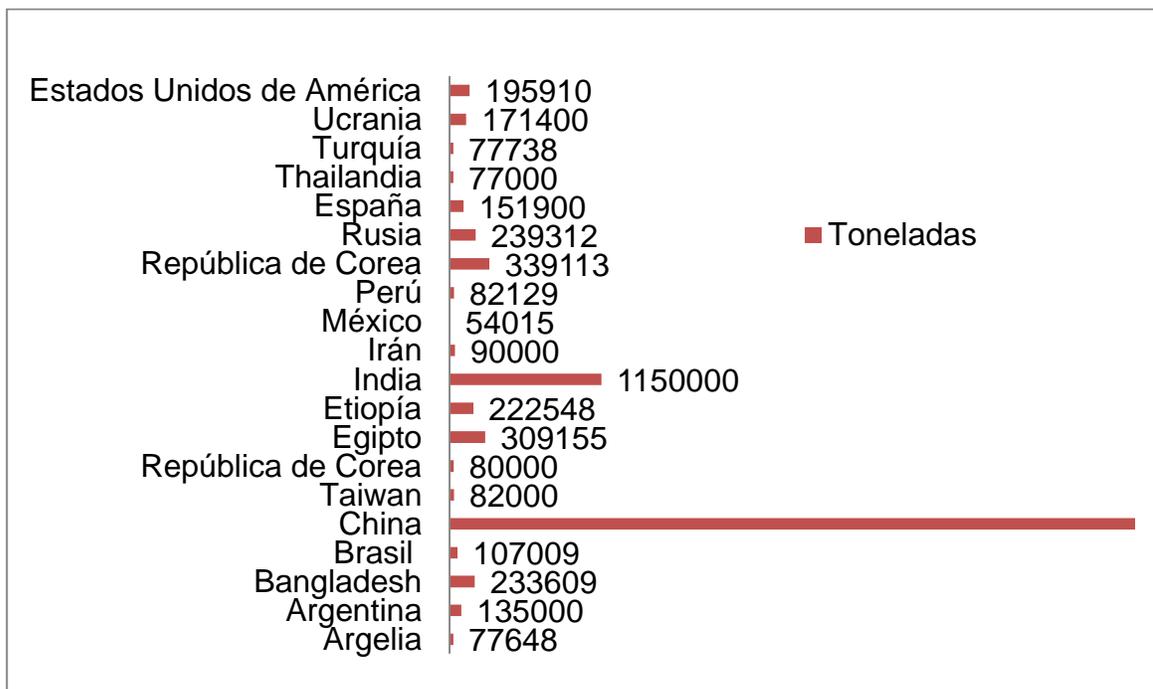


Figura 6. Producción mundial de ajo en 2012 (FAOSTAT, 2013).

1.2.2 Producción nacional

En 2012 México ocupó el 20º lugar en la producción mundial de ajo con un total de 54,015 toneladas (FAOSTAT, 2013). Se estima que el 50% de la producción nacional se destina a exportación, mientras que el 50% restante se mantiene para el consumo nacional (Pérez-Moreno, 2003). En la Figura 6 se muestran los estados de la república con mayor producción de ajo en 2014, destacándose entre ellos el estado de Zacatecas y Guanajuato con 27,573.50 y 4,827.2 toneladas respectivamente representando el 59.2% del total de la producción nacional. Querétaro presentó una producción de 990.93 toneladas colocándose en el 10º lugar de la producción nacional. Por su parte el estado de Aguascalientes presentó una producción de 2,859.80 toneladas colocándose en el 6º lugar de la producción nacional (SIAP, 2014).

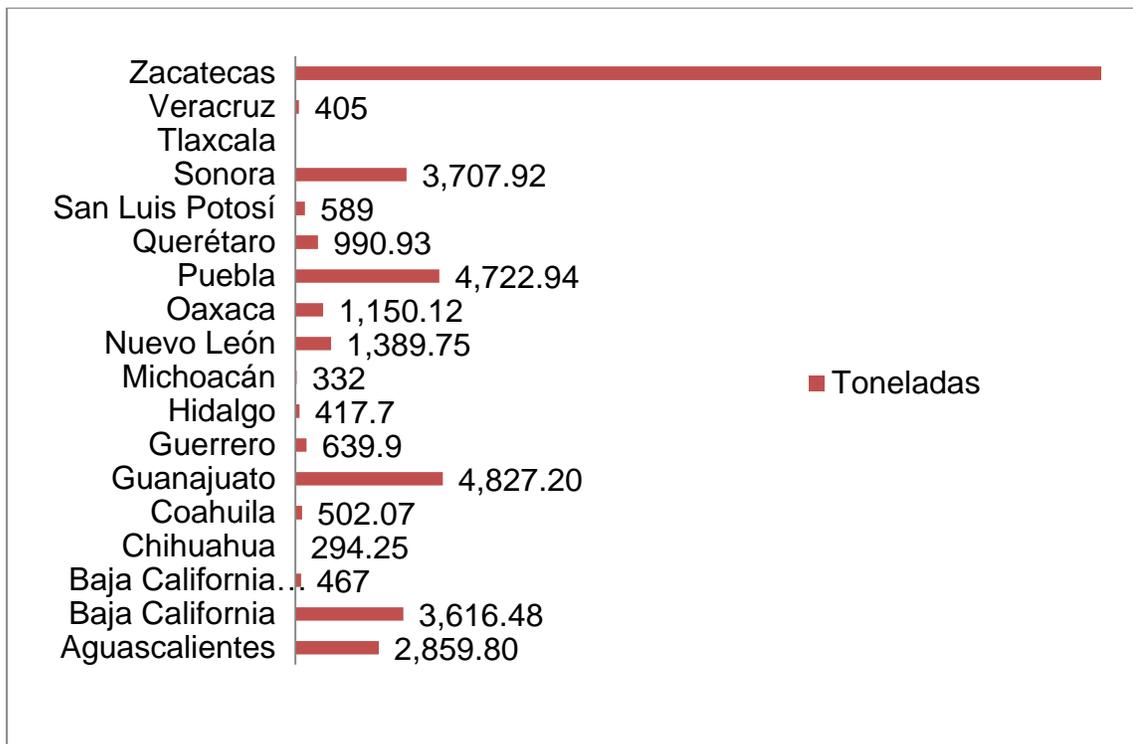


Figura 7. Producción nacional de ajo en 2014 (SIAP, 2014).

1.3. Tiosulfatos

1.3.1 Generalidades de los tiosulfatos

En 1944 el químico Chester J. Cavallito aisló un producto procedente de ajo picado con fórmula $C_6H_{10}S_2O$ al que nombró alicina (S-Alil-2-propentiosulfonato). La alicina es un tiosulfato o un disulfuro mono-oxidado, otros disulfuros como dimetil disulfuro y el n-dipropil disulfuro también se oxidan a sus correspondientes tiosulfatos los cuales juegan un rol importante en la química del género *Allium*.

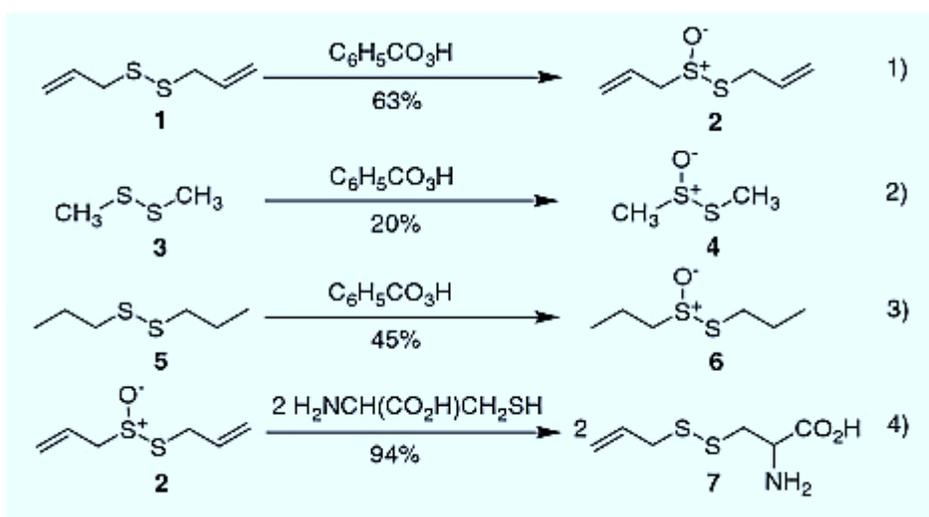


Figura 8. Síntesis de tiosulfatos (2, 4, 6). (4) Reacción de alicina (2) con cisteína obteniendo S-alilmercaptocisteína (7). Formación de alicina (2) a partir de aliina (1) (Block, 2010).

Cavallito también observó que otros tiosulfatos además de la alicina se formaban cuando se cortaba el ajo y que la alicina mostraba una importante actividad antibacteriana comparable incluso con la de la penicilina. Asimismo demostró que la alicina al igual que otros compuestos antibióticos es inactivada por la cisteína obteniendo S-alilmercaptocisteína (Figura 7). Experimentos posteriores demostraron que la alicina es producto de una acción enzimática sobre precursores encontrados en el bulbo de ajo intacto, precursor conocido como aliina (sulfóxido de S-alil-L-cisteína) y que la alicina así como otros tiosulfatos no son encontrados

en el ajo entero y que son resultado de una acción enzimática que se lleva a cabo por el rompimiento de las células del bulbo (Figura 8) (Block, 2010).

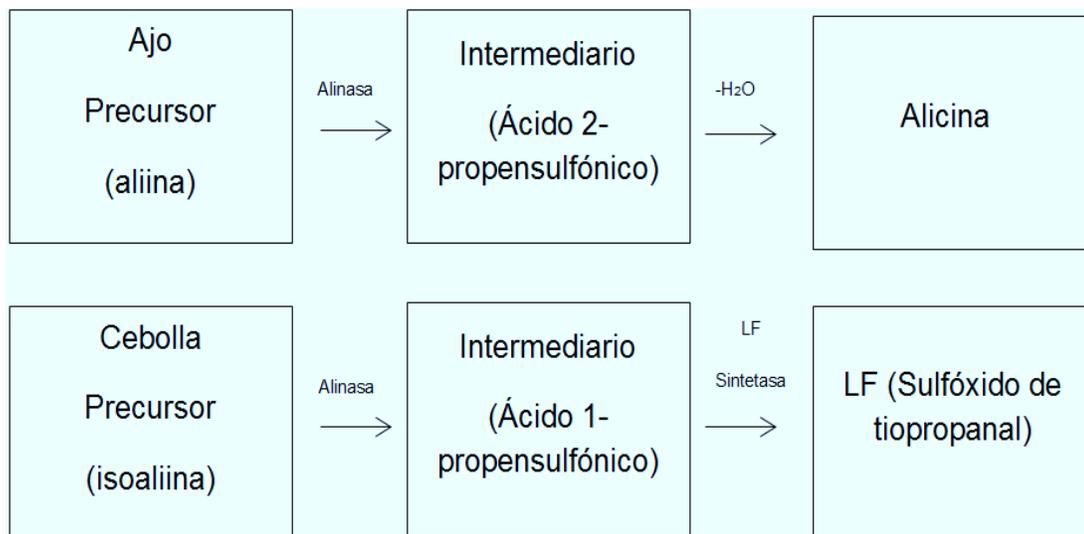


Figura 9. Proceso esquemático de las reacciones que generan los aromas al cortar ajo y cebolla (Block, 2010).

1.3.2 Tiosulfinatos en genero *Allium*

A partir de la identificación de la alicina como el principal compuesto responsable de las características olfativas y gustativas del ajo recién cortado (*Allium sativum*) se han implementado esfuerzos para encontrar los compuestos responsables del característico aroma de las especies recién cortadas miembros de la familia *Allium*. En 1992 Block y colaboradores llevaron a cabo un extensivo estudio con el fin de identificar y cuantificar los principales compuestos tiosulfinatos en 9 especies diferentes del genero *Allium* (ajo, ajo elefante, ajo salvaje, cebollín chino, cebolla, chalote, cebollín, puerro y cebolleta) mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) acoplada a un espectrómetro de masas. Algunos de los tiosulfinatos caracterizados en cada especie se encuentran en la Figura 9 así como algunos de sus precursores. En este estudio los autores concluyen que el tiosulfinato mayormente presente en ajo es la alicina. Además los tiosulfinatos en ajo que contienen grupos 1 y 2-propenil se forma diez veces más rápido que los tiosulfinatos con grupos metilo, la observación más importante de dicho estudio es

que la composición de tiosulfatos en las diferentes especies puede variar por efecto de las condiciones de fertilización, riego, humedad, variedad de la planta, transporte, condiciones de cosecha y almacenamiento como lo pudiera ser la temperatura de almacenamiento de los dientes “semilla” (Block y col.,1992).

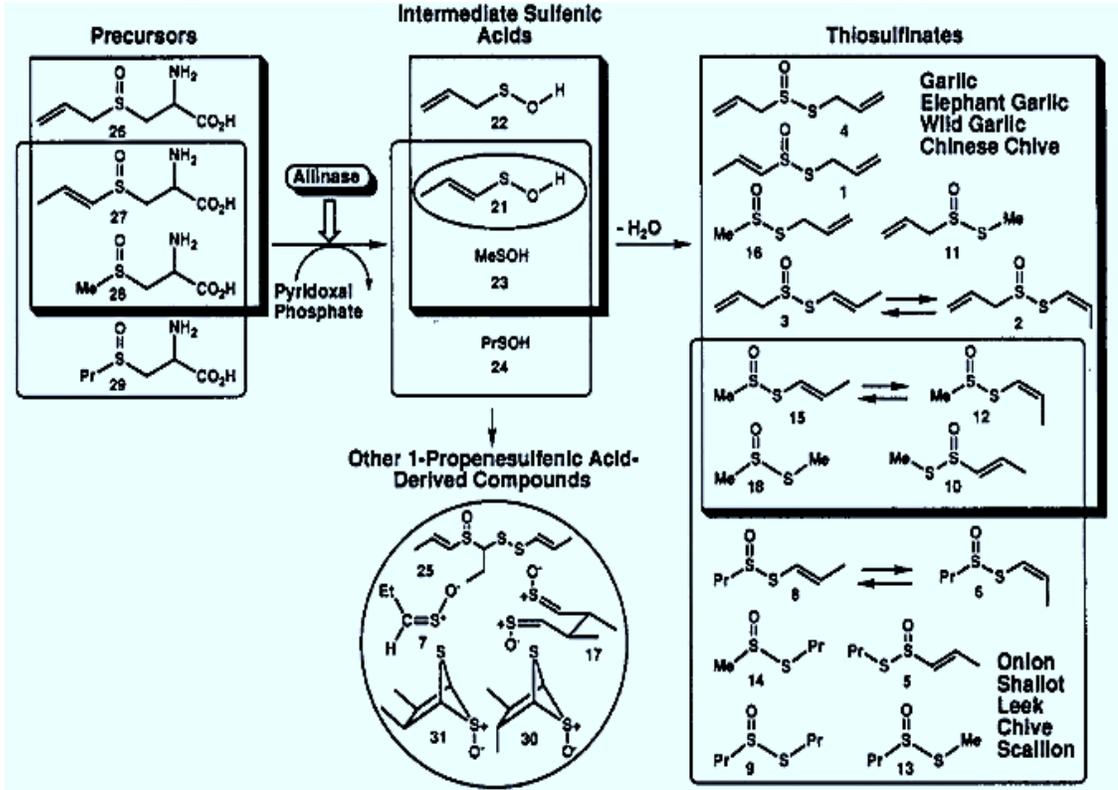


Figura 10. Esquematización de los precursores y de algunos tiosulfatos encontrados en nueve especies del genero *Allium* (ajo, ajo elefante, ajo salvaje, cebollín chino, cebolla, chalote, cebollín, puerro y cebolleta) (Block y col.,1992).

1.3.3 Tiosulfatos en ajo

El ajo (*Allium sativum*) es bien conocido por sus propiedades terapéuticas antibacteriales, antivirales antitrombóticas, antitumorales, hipolipidémicas, entre otras; estas propiedades son atribuidas a los compuestos organosulfurados que contiene el ajo principalmente los sulfóxidos de cisteína y los tiosulfatos (Huchette y col., 2004). La alicina es el tiosulfato producido por ajo más estudiado, éste compuesto se genera del precursor aliina por la acción catalítica de la enzima alinasa (localizada en las vacuolas), después de que el diente ha sido cortado

debido a que la aliina se libera del citoplasma. En la Figura 10 se esquematiza el mecanismo de formación de la alicina. Debido a la inestabilidad de la alicina, la cual es termolábil e inestable en medios ácido y alcalino, ésta no se encuentra disponible comercialmente y a pesar de que es conocida por sus propiedades biológicas y bioquímicas que incluyen efecto antibacterial, disminución de la presión ocular, reducción de colesterol y triglicéridos, entre otras, su análisis aun hoy es complicado. Los métodos reportados para el análisis de alicina de ajo incluyen métodos colorimétricos, por cromatografía de gases, por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), por densitometría, entre otros. A la fecha el método reportado que resulta más efectivo para la determinación de tiosulfatos involucra la cromatografía de líquidos de alta resolución desarrollado por Lawson y col. (1991).

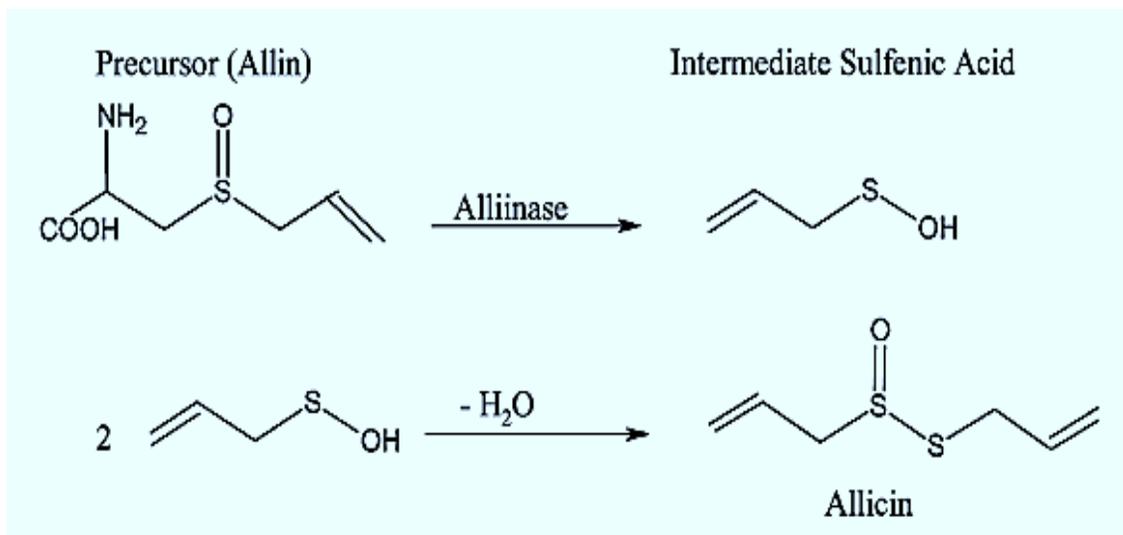


Figura 11. Mecanismo de la formación de alicina. El precursor aliina por medio de la alinasa produce ácido sulfónico intermediario que al perder agua produce alicina (Bocchini y col., 2001).

En el estudio realizado por Block y col. (1992) se identificaron algunos de los tiosulfatos más comúnmente encontrados en ajo. La estructura de algunos de ellos se muestra en la Figura 9: (4) alicina, (1) ácido propensulfinato-S-n-propil-éster, (3) ácido 2-propenona-1-tiosulfinato, entre otros.

En estudios realizados en el laboratorio de Bioquímica y Fisiología Poscosecha de Frutas y Hortalizas del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos de la Facultad de Química de la UAQ donde se ha sometido a estrés por frío a los dientes “semilla” de ajo de la variedad ‘Coreano’ se ha percibido un cambio en la pungencia entre los ajos provenientes de dientes “semilla” almacenados a 5°C y almacenados a temperatura ambiente.

La pungencia puede ser definida como la combinación de aroma y sabor de la cebolla, esta pungencia ocasiona una irritación en la mucosa de la nariz, la boca y los ojos. Las plantas del genero *Allium* poseen un número grande de compuestos orgánicos ligados al azufre que mediante un rompimiento enzimático generan compuestos pungentes como ácidos sulfénicos (precursores de tiosulfatos), tiosulfatos, ácido pirúvico y amonio, por lo anterior, un estudio profundo de los compuesto sulfurados presentes en los ajos provenientes de dientes semilla almacenados a 5°C y temperatura ambiente podría esclarecer la diferencia en la pungencia que presentan.

2. HIPÓTESIS

La temperatura de almacenamiento de los dientes “semilla” de ajo (*Allium sativum* L.) cv ‘coreano’ induce un cambio en la pungencia y en el perfil de tiosulfinatos.

3. OBJETIVOS

3.1 General

Evaluar el efecto de la temperatura de almacenamiento de los dientes ‘semilla’ en la pungencia y el perfil de tiosulfinatos de ajo (*Allium sativum* L.) cv. ‘coreano’.

3.2 Específicos

- Comparar la pungencia de bulbos de ajo provenientes de dientes ‘semilla’ almacenados a 5°C y a temperatura ambiente.
- Determinar el contenido de alicina y de tiosulfinatos totales de bulbos de ajo provenientes de dientes ‘semilla’ almacenados a 5°C y a temperatura ambiente.
- Cuantificar e identificar los principales tiosulfinatos presentes en bulbos de ajo provenientes de dientes ‘semilla’ almacenados a 5°C y a temperatura ambiente.

4. METODOLOGÍA

4.1. Material biológico y estrategia experimental

El material biológico utilizado fueron bulbos de ajo de la variedad 'coreano' cosechados en la temporada 2014-2015 procedentes de dientes 'semilla' almacenados a 5°C y a temperatura ambiente durante 5 semanas. Los bulbos de ajo de cada condición fueron desgranados y se seleccionaron los dientes más firmes y sin defectos visibles en tres réplicas de siete bulbos cada una. De cada una de estas replicas se determinó por duplicado la pungencia, el contenido de alicina y tiosulfatos totales y además se realizó el perfil de los principales tiosulfatos presentes en los ajos provenientes de ambas condiciones de almacenamiento de los dientes 'semilla' mediante HPLC-UV/Vis.

Los datos obtenidos fueron examinados a través de un análisis de varianza en el cual se comparó el efecto de la temperatura sobre cada una de las variables analizadas. Se realizó una comparación de medias utilizando la prueba de Tukey ($\alpha > 0.05$) para determinar diferencias estadísticas significativas mediante el paquete estadístico JMP 8.0.1.

4.2. Determinación de la pungencia de ajo

La determinación de la pungencia de los bulbos de ajo, se realizó de manera indirecta a través de la medición de ácido pirúvico de las muestras. Se siguió el método propuesto por Gordon y Barret (2003) con algunas modificaciones. La pungencia de los ajos y cebollas se deriva de compuestos sulfurados volátiles que son liberados cuando la célula del ajo es mecánicamente destruida, lo anterior provoca que la enzima conocida como alinasa entre en contacto con los sulfóxidos precursores de sabor, que además de producir compuestos sulfurados y amoníaco producen ácido pirúvico. Por lo tanto, la determinación de ácido pirúvico brinda una idea de la acción de la alinasa sobre los compuestos precursores de sabor y se ha demostrado que está relacionada con la medición de la pungencia (Schwimmer y Weston, 1961).

4.2.1 Preparación de las muestras

El procedimiento de extracción se llevó a cabo para ajo fresco y para ajo estéril; en este último caso se inactivó la enzima alinasa mediante ondas microondas con potencia de 1100 W (General Electric, modelo: JES1142SFE), para medir la cantidad de ácido pirúvico endógeno. Para el extracto fresco se homogenizaron las muestras mediante la adición de 1 ml de agua por cada gramo de ajo y se dejaron reposar por 10 minutos, posteriormente se filtró el extracto mediante manta de cielo. Para el extracto estéril se calentó en horno de microondas por 1 segundo por cada gramo de muestra y se dejó enfriar. Posteriormente se agregó agua hasta que el peso de la solución fue el doble que el peso de la muestra fresca, se homogeneizó y se filtró utilizando manta de cielo.

4.2.3 Determinación de ácido pirúvico de extractos de ajo

La determinación de ácido pirúvico se basa en la reacción del ácido pirúvico producido por la acción de la alinasa con 2,4,-dinitrofenilhidrazina (DNPH), esta reacción produce un compuesto colorido detectado por espectrofotometría UV Visible a 515 nm. Para determinar la cantidad de ácido pirúvico derivado únicamente de la acción enzimática de la alinasa se debe de hacer una corrección del ácido pirúvico endógeno (no enzimático) presente en las muestras, para ello, se inactivó mediante calor la enzima alinasa y la cantidad de ácido pirúvico obtenido de esta muestra se restó de la cantidad de ácido pirúvico total determinado de la muestra con la enzima activa. Para realizar la determinación se colocó en un tubo de reacción 25 μ L del extracto filtrado de ajo con 1 mL de agua y 1 mL de DNPH 0.25 gL⁻¹ (diluido en HCl 1M). Se incubó a 7°C por 10 minutos y posteriormente se agregó 1 mL de NaOH 1.5 M y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (Perkin Elmer Lambda 40) a 515 nm. Para una estimación precisa de la cantidad de ácido pirúvico obtenido de la reacción se construyó una curva estándar de calibración con soluciones de ácido pirúvico en un rango de concentraciones de 1 a 6 mM y la cantidad de ácido pirúvico en las muestras se expresó como mmoles de ácido pirúvico por gramo de ajo.

4. 3. Determinación de alicina y tiosulfatos totales

4.3.1 Preparación de las muestras

La determinación de alicina y tiosulfatos totales se llevó a cabo mediante el método de Han y Lawson (1994). Para la preparación de las soluciones de alicina se cortaron en rebanadas de aproximadamente 3cm de diámetro los bulbos de ajo los cuales se secaron en un deshidratador (Excalibur Economy) a 50°C durante 12 horas, se pulverizaron en un mortero y se prepararon soluciones de extracto de ajo en concentraciones de 1, 2, 3 y 4% (p/v) diluidas en buffer de HEPES 50 mM a pH 7.5.

4.3.2 Determinación de alicina mediante la reacción de cisteína con DNTB

La determinación de alicina y de tiosulfatos totales se llevó a cabo mediante la cuantificación espectrofotométrica de alicina, previamente se ha reportado que una molécula de alicina reacciona rápidamente con dos moléculas de cisteína para formar dos moléculas de S-alil-mercaptocisteína (SAMC) (Cavallito y col, 1944).

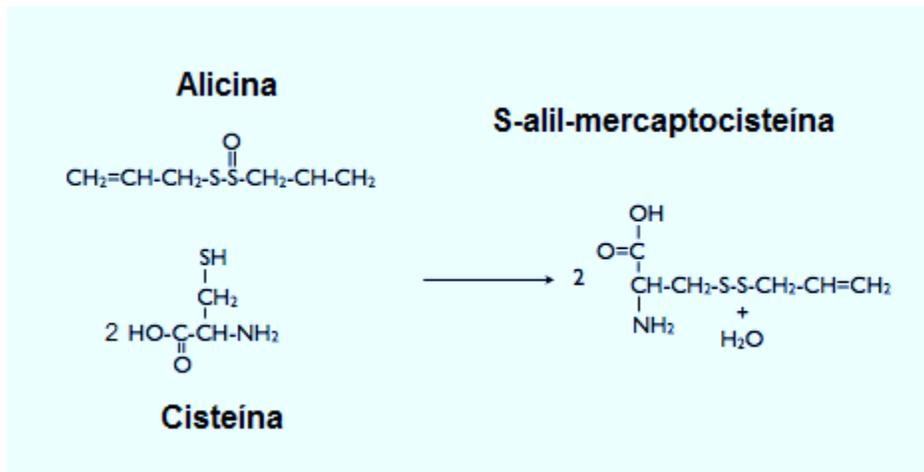


Figura 12. Reacción de alicina con dos moléculas de cisteína para obtener dos moléculas de S-alil-mercaptocisteína (Villalón, 2003).

La metodología utilizada fue la descrita por Han y Lawson (1994) con algunas modificaciones: 0.5 mL de solución de L-cisteína 20mM diluida en Hepes 50mM con pH de 7.5 se hizo reaccionar con 1mL de cada una de las soluciones de polvo de ajo preparadas, la reacción se incubó a 26°C durante 10 minutos, posteriormente 25µL de la mezcla de reacción se adicionaron a un tubo que contenía 4975 µL de ácido 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DNTB) 150µM (diluido en HEPES 50mM con pH 7.5). Después de 10 minutos la absorbancia se midió en un espectrofotómetro (Perkin Elmer Lambda 40) a 412 nm .La concentración residual de L-cisteína de cada reacción fue determinada midiendo la cantidad de 2-nitro-5-tiobenzoato (NTB) formado después de la reacción con DNTB y el cálculo se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$[Cisteína] = \frac{Abs_{412} \times Dilución}{Coeficiente\ de\ extinción\ molar}$$

Donde el coeficiente de extinción molar (del anión NTB) a 412nm es 14,150 mM cm⁻¹.

La concentración de tiosulfatos totales presentes en cada muestra se calcularon mediante la siguiente fórmula:

$$[THS\ totales] = \frac{([Cisteína\ inicial] - [Cisteína\ final])}{2}$$

Dado que la alicina constituye entre el 60- 80% de tiosulfatos totales en ajo (Han y Lawson, 1994), la concentración de alicina en las muestras se determinó mediante la fórmula:

$$[Alicina] = [THS\ totales] * 0.7$$

4.4. Determinación del perfil de tiosulfatos

Desde la identificación de los compuestos tiosulfatos y de sus propiedades biológicas y bioquímicas la caracterización precisa de estos compuestos en el género *Allium* ha tomado gran importancia. Debido a su buena resolución y a su

comprobada capacidad de identificación la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas ha figurado como una buena alternativa para la caracterización de los compuestos volátiles del género *Allium*, a pesar de estudios que sugieren que varios de los compuestos volátiles del género *Allium* pueden ser “productos del análisis” por cromatografía de gases (Saghir y col., 1964). Además estudios recientes han sugerido que se obtienen mejores resultados utilizando cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), con la posibilidad de que pueden ser separados la mayoría de los isómeros e incluso los compuestos más inestables como los provenientes del ajo sobreviven el análisis (Block y col., 1992).

La cromatografía de líquidos es importante debido a que la mayoría de los compuestos no son suficientemente volátiles para que se les pueda aplicar la cromatografía de gases, aunado a que muchos de estos compuestos no sobreviven al proceso debido a su alta inestabilidad. La cromatografía de líquidos de alta eficacia o de alta resolución (HPLC) utiliza una presión elevada para forzar al disolvente a pasar por la columna que contiene empaques muy finos consiguiendo así separaciones de gran resolución, la eficacia de una columna empaquetada aumenta al disminuir el tamaño de las partículas, es por eso que el tamaño típico de las partículas de una columna de HPLC es de 3-10 μm (Harris, 2007).

4.4.1 Preparación de las muestras

La determinación del perfil de tiosulfatos presentes en las muestras de ajo de ambas condiciones se realizó mediante HPLC siguiendo el método descrito por Lawson y col. (1991) con modificaciones sugeridas por Cañizares y col. (2004). Para la extracción de los tiosulfatos el ajo fue cortado en fragmentos de aproximadamente 3 mm de diámetro, a 25 g del ajo molido se le adicionaron 400 mL de acetona (99.5% de pureza), la solución se homogeneizó mediante una mezcladora (Osterizer Modelo:852-10,0441-13) y posteriormente se realizó la extracción en una placa agitadora (Barnstead Cimarec 2) durante 30 min, se filtró la solución con manta de cielo y el solvente se evaporó en un rotavapor (Buchi R-205).

4.4.2 Determinación del perfil de tiosulfinatos mediante HPLC

La determinación de tiosulfinatos de los extractos de ajo se llevó a cabo utilizando un equipo de HPLC (Water Alliance 2695 con detector de arreglo de diodos Water 2998) con una fase móvil de 3 componentes (metanol/ agua/ acetonitrilo) a razón (17/ 29/ 54) (v, v, v) con un flujo de 1mL/min, composición descrita por Cañizares y col. (2004) como la que aporta mejores resultados y con la que se obtienen dos compuestos puros y tres mezclas de parejas de isómeros de tiosulfinatos, lo anterior, representa una mejoría respecto al método descrito por Lawson y col. (1991). Se utilizó una columna C18 fase reversa (100 x 4.6mm, Simmetry) y un detector UV/Vis acoplado al equipo de HPLC, la elución de los compuestos se midió a una longitud de onda de 254 nm.

5. RESULTADOS

5.1. Determinación de pungencia

En el Cuadro 3 se concentran los datos del contenido de ácido pirúvico presente en los extractos de ajo de cada uno de los tratamientos. El contenido de ácido pirúvico fue de 0.448 gramos de ácido pirúvico por gramo de ajo en el tratamiento a temperatura ambiente (TA), mientras que en el tratamiento a 5°C fue de 0.337 gramos de ácido pirúvico por gramo de ajo.

Para la determinación de pungencia en extractos de ajo provenientes de ambos tratamientos (temperatura ambiente y 5°C) se construyó una curva de calibración a partir de soluciones de ácido pirúvico con un rango de concentración de 1 a 6 mM (Figura 13).

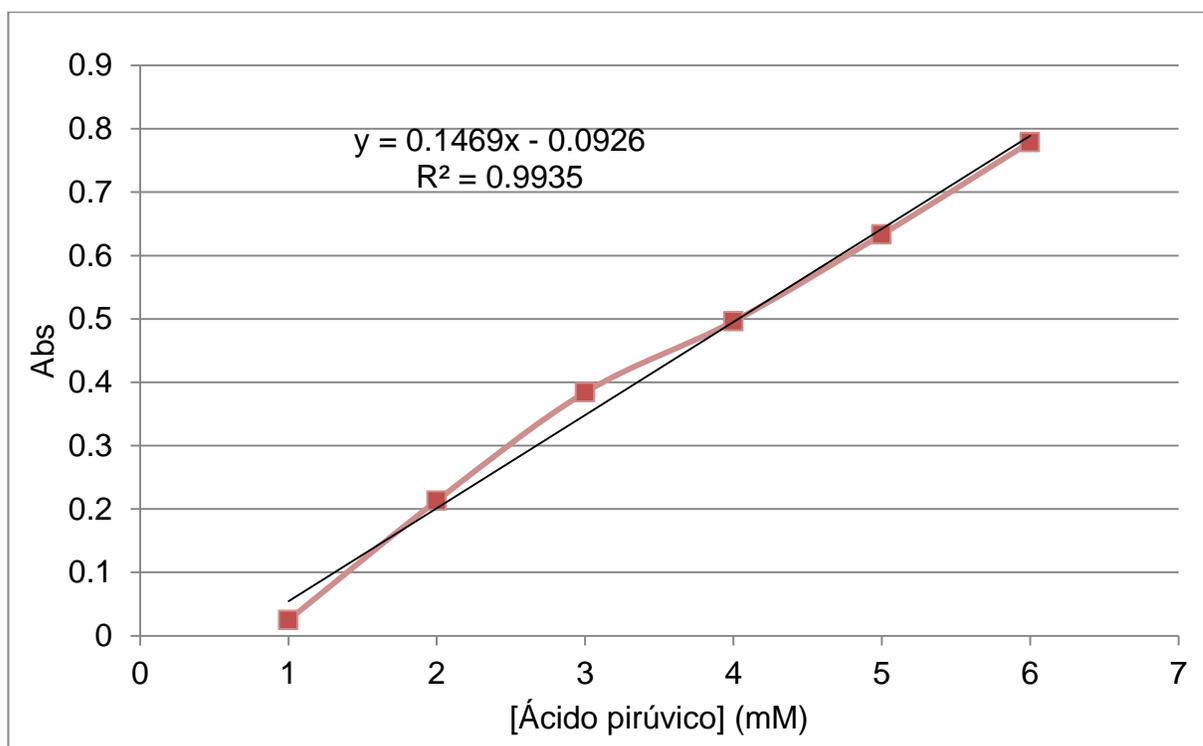


Figura 13. Curva estándar de soluciones de ácido pirúvico en un rango de concentraciones de 1 a 6 mM determinada a 515 nm.

Cuadro 3. Concentración de ácido pirúvico total y endógeno (g ac.pirúvico /g AJO) en extractos de ajo 'coreano' provenientes de dientes "semilla" almacenados a temperatura ambiente y a 5°C.

	g ac.pirúvico / g AJO	
	TA	5°C
Acido pirúvico total	0.448±0.07 a	0.337±0.053 a
Acido pirúvico endógeno	0.117±0.015 a	0.099±0.010 a

Tratamientos: TA (dientes "semilla" almacenados a temperatura ambiente) ,5°C (diente "semilla" almacenados a 5°C).La concentración de ácido pirúvico total y endógeno es expresada en gramos de ácido pirúvico por gramo de ajo.

5.2. Alicina y tiosulfinatos totales

En el Cuadro 4 se resumen los resultados del contenido de alicina y de tiosulfinatos totales presentes en ajos provenientes de dientes "semilla" almacenados a temperatura ambiente y a 5°C obtenidos por el método descrito por Han y Lawson (1994). El contenido de tiosulfinatos totales para ambos tratamientos fue de 0.2499 mMoles / g de ajo y de alicina de 0.0283 g alicina / g ajo, no se presentaron diferencias entre el contenido de tiosulfinatos y de alicina entre ambos tratamientos.

Cuadro 4. Concentración de tiosulfinatos totales y de alicina total en extractos de ajo 'coreano' provenientes de dientes "semilla" almacenados a temperatura ambiente (TA) y a 5°C.

	TA	5°C
THS totales (mM / g ajo)	0.2499±1.24824E-07 a	0.2499±1.93649E-06 a
Alicina (g alicina / g ajo)	0.0283±8.73767E-08 a	0.0283±1.35555E-06 a

Tratamientos: TA (dientes “semilla” almacenados a temperatura ambiente), 5°C (dientes “semilla” almacenados a 5°C). La concentración de tiosulfatos totales (THS totales) se expresa en mMoles por gramos de ajo, la concentración de alicina presente se expresa en gramos de alicina por gramos de ajo. Al resultar valores iguales no hay diferencias significativas entre ambos tratamientos.

5.3. Perfil de tiosulfatos

En la Figuras 14 y 15 se muestran los cromatogramas obtenidos de los extractos cetónicos de ajos provenientes de dientes “semilla” almacenados a temperatura ambiente y a 5°C respectivamente; en ambos cromatogramas se pueden observar cuatro picos correspondientes a compuestos tiosulfatos identificados previamente por Lawson y col. (1991), y más recientemente por Cañizares y col. (2004).

Los cuadros 5 y 6 presentan las medias de los datos obtenidos por los cromatogramas de ambas condiciones (TA y 5°C), número de pico, tiempo de retención, altura y absorbancia máxima de cada pico, además del posible tiosulfato al que pertenece cada uno.

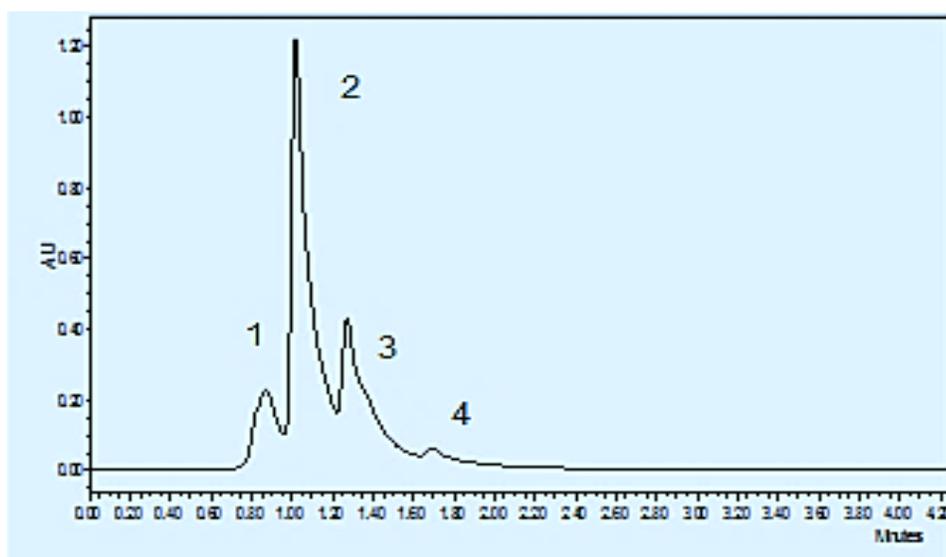


Figura 14. Cromatograma (254 nm) de los tiosulfatos presentes en extractos de ajo provenientes de diente “semilla” almacenados a temperatura ambiente (TA).

Cuadro 5. Resultados obtenidos por HPLC-UV/Vis en extractos de ajo provenientes de dientes “semilla” almacenados a temperatura ambiente (TA).

TA					
Número de pico	Tiempo de retención (min)	Área ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	Altura (μV)	Abs. Max	Tiosulfonato probable
1	0.874	2356452.3	281810.6	207, 272	Tiosulfonato de dimetilo
2	1.020	8145040	1286972.6	268.6	Tiosulfonato de dialilo (alicina)
3	1.274	4818800	480014.3	204,249	Tiosulfonato de alil-metil+ de metil-alil
4	1.6905	1037353	66794.5	254.6	Tiosulfonato de metil-1,propenil+ de 1,propenil-metil

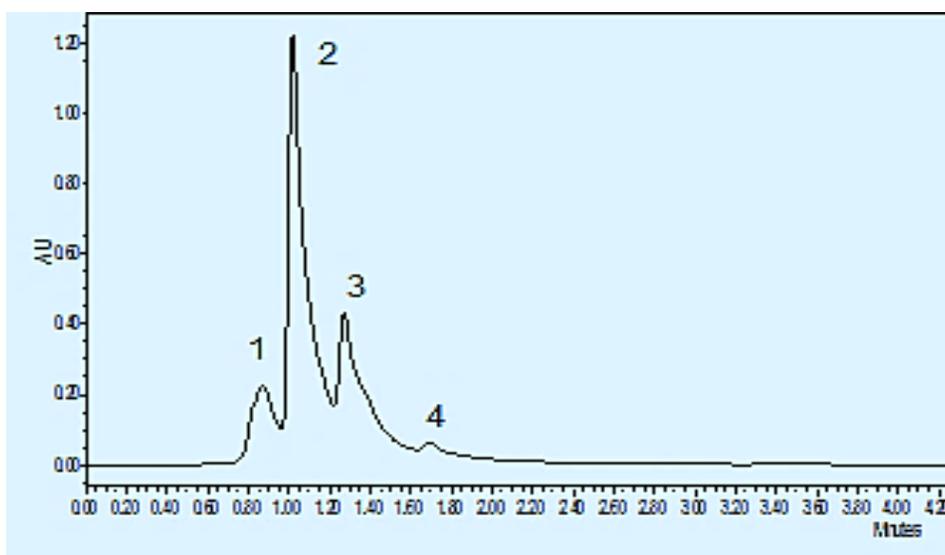


Figura 15. Cromatograma (254 nm) de los tiosulfonatos presentes en extractos de ajo provenientes de diente “semilla” almacenados a 5°C.

Cuadro 6. Resultados obtenidos por HPLC-UV/Vis en extractos de ajo provenientes de dientes “semilla” almacenados a 5°C.

5°C					
Número de pico	Tiempo de retención (min)	Área ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	Altura (μV)	Abs Max	Tiosulfonato probable
1	0.862	1586850.7	202479.7	207,274	Tiosulfonato de dimetilo
2	1.022	10478857	1745890.7	268.2	Tiosulfonato de dialilo (alicina)
3	1.272	4448296	427685.3	202,253	Tiosulfonato de alil-metil+ de metil-alil
4	1.709	970652	55947.3	255.9	Tiosulfonato de metil-1,propenil+ de 1,propenil-metil

El cuadro 7 presenta las áreas relativas (%) de los 4 picos obtenidos en ambas condiciones de temperatura (temperatura ambiente y 5°C), lo anterior con el objetivo de comparar la cantidad de cada tiosulfonato presente en los extractos de ambas condiciones de temperatura. Las áreas relativas de los picos 1,3 y 4 son mayores en la condición de temperatura ambiente, no obstante, el área relativa del pico 2 correspondiente a la alicina es de 59.932% en la condición de 5°C el cual es un porcentaje superior respecto al 49.793% que corresponde al pico 2 en la condición de temperatura ambiente, no se presentaron diferencias estadísticas significativas entre los resultados de ambas condiciones.

Cuadro 7. Áreas relativas (%) obtenidas por HPLC-UV/Vis en extractos de ajo provenientes de dientes “semilla” almacenados a temperatura ambiente (TA) y 5°C.

TA		5°C	
Número de pico	Área relativa (%)	Número de pico	Área relativa (%)
1	14.406 a	1	9.076 a
2	49.793 a	2	59.932 a
3	29.459 a	3	25.441 a
4	6.342 a	4	5.551 a

6. DISCUSIÓN

6.1 Determinación de pungencia

Se llevó a cabo la determinación de pungencia con el método descrito por Gordon y Barret (2003), el cual es una modificación al método original desarrollado por Schwimmer y Weston (1961), debido a que presenta algunas deficiencias que limitan su aplicación y que pueden arrojar resultados erróneos. En el método original la absorbancia de la reacción es medida a 420 nm mientras que en el método modificado es medida a 515 nm, lo anterior aumenta el grado de sensibilidad de la medición al disminuir la absorbancia del blanco (DNPH sin reaccionar) respecto a la absorbancia de la reacción. Otra deficiencia importante en el método original radica en que la curva de calibración obtenida con ácido pirúvico no presenta linealidad, lo anterior es corregido en el método modificado por medio del incremento en la concentración de DNPH y la medición de absorbancia a 515 nm.

La curva de calibración obtenida se ajustó a una línea recta y la ecuación resultante fue la siguiente: $y = 0.1469x - 0.0926$, el coeficiente de correlación que indica el grado de ajuste de un modelo con respecto a una distribución bidimensional de datos para este análisis fue de $R^2 = 0.9935$, lo anterior indica que el modelo lineal utilizado se ajusta bien a los datos obtenidos y que la curva de calibración es confiable para la determinación analítica de concentraciones de ácido pirúvico a partir de absorbancias obtenidas del analito.

Gordon y Barret (2003) reportaron concentraciones de ácido pirúvico para diferentes variedades de cebolla (blanca, roja, amarilla, Vidalia y Melody), las concentraciones obtenidas van desde $3.43 \mu\text{mol g}^{-1}$ para cebolla tipo Melody hasta $10.81 \mu\text{mol g}^{-1}$ para cebolla amarilla mientras que en los resultados obtenidos en este estudio los ajos provenientes de dientes "semilla" almacenados a temperatura ambiente y a 5°C presentaron una concentración de ácido pirúvico de 5.091 y $3.823 \mu\text{mol g}^{-1}$ respectivamente, la diferencia entre la pungencia del ajo y de ciertas variedades de cebolla puede explicarse debido al ácido pirúvico endógeno presente

en ambas especies. En los resultados obtenidos por Gordon y Barret (2003) el contenido de ácido pirúvico endógeno fue de $0.16 \mu\text{mol g}^{-1}$ para cebolla tipo Melody y de $0.32 \mu\text{mol g}^{-1}$ para cebolla amarilla, mientras que en el presente estudio para el ajo fue de $0.166 \mu\text{mol g}^{-1}$ y $0.112 \mu\text{mol g}^{-1}$ en las condiciones de almacenamiento de los dientes de temperatura ambiente y a 5°C respectivamente, por lo anterior, se puede inferir que el almacenamiento en frío de los dientes “semilla” ocasiona una reducción en el contenido de ácido pirúvico endógeno presente en el bulbo de ajo. Además se observó que el ajo variedad ‘coreano’ es más pungente respecto a ciertas variedades de cebolla (Melody, Vidalia y Roja) pero algunas como la amarilla lo son aún más. Igualmente se observó que un rango de tiempo de 1 a 1.2 segundos en un horno de microondas con 1100W de potencia son suficientes para la inactivación de la enzima alinasa, lo anterior es congruente con lo reportado por Yoo y Pike (2000), no obstante, la razón de la diferencia en pungencia entre variedades de una misma especie aún no ha sido dilucidada.

En un estudio realizado previamente en el laboratorio de Bioquímica y Fisiología Poscosecha de Frutas y Hortalizas del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos de la Facultad de Química de la UAQ por Corvera y Mercado, (2014), en el que se determinó la pungencia de dos variedades de ajo cv ‘coreano’ y cv ‘perla’ proveniente de dientes “semilla” almacenados a temperatura ambiente y a 5°C , se observó que la pungencia es menor en ajos provenientes de dientes almacenados a 5°C que en los almacenados a temperatura ambiente previo al cultivo en la variedad ‘coreano’ y que la pungencia de las dos variedades no fue estadísticamente diferente bajo las mismas condiciones de almacenamiento.

La comparación de contenido de ácido pirúvico por gramo de ajo entre ambos tratamientos indica que si bien existe una disminución en el contenido de ácido pirúvico en ajos provenientes de dientes “semilla” almacenados a 5°C durante cinco semanas, estadísticamente no se presentó diferencia significativa entre las medias de ambos tratamientos (Tukey $\alpha \geq 0.05$). No obstante, aunque la diferencia no sea estadísticamente diferente, los datos demuestran que hay diferencias perceptibles en el contenido de ácido pirúvico entre ambos tratamientos resultando que la

pungencia en ajos provenientes de dientes “semilla” sometidos a estrés por frío mediante su almacenamiento a 5°C es menor que en los almacenados a temperatura ambiente, lo anterior respaldaría lo percibido sensorialmente al cortar ajos provenientes de ambos tratamientos en estudios anteriores realizados en el laboratorio de Bioquímica y Fisiología Poscosecha de Frutas y Hortalizas del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos de la Facultad de Química de la UAQ .Wall y Corgan (1992) realizaron conjuntamente la determinación de ácido pirúvico descrita por Schwimmer y Weston (1961) y un análisis sensorial para la determinación de pungencia de seis bulbos de cebolla mediante un panel entrenado de ocho personas, los resultados que presentaron demostraron que existe una correlación significativa entre ambas determinaciones ($r=0.92$) concluyendo que la determinación analítica de ácido pirúvico mediante espectrofotometría es una técnica más al presentar menos variabilidad además de ser más económica y objetiva que la determinación sensorial de pungencia mediante un panel entrenado.

La determinación de pungencia o contenido de ácido pirúvico en ajos sometidos mecánicamente a un rompimiento enzimático es una medición indirecta del contenido de tiosulfatos, debido a que tanto el ácido pirúvico como los tiosulfatos se forman como productos de la reacción de los precursores sulfurados de sabor y olor con la enzima alinasa. El menor contenido de ácido pirúvico que presentaron los ajos de la condición de 5°C puede deberse a la actividad de la enzima alinasa, la cual pudo haber disminuido debido al estrés por frío al que es sometido el diente produciendo así en menor cantidad los productos de su reacción, incluyendo el ácido pirúvico, además como recientemente reportaron Zhou y col. (2015) algunos compuestos fenólicos, más específicamente las flavonas con alto número de grupos hidroxilo inhiben hasta en un 36.6% la actividad de la alinasa, lo anterior estaría directamente relacionado con un menor contenido de tiosulfatos y por ende a una menor pungencia en dientes almacenados a 5°C debido a como reportaron previamente (Dufoo-Hurtado y col. (2013) el almacenamiento a bajas temperaturas de los dientes “semilla” de ajo

incrementa la síntesis de compuestos fenólicos comparada con los almacenados a temperatura ambiente.

6.1 Alicina y tiosulfinatos totales

Han y Lawson (1994) demostraron que la determinación de tiosulfinatos y de alicina mediante la reacción de esta última con cisteína (Figura 12) es un método con la suficiente sensibilidad como para detectar alicina en un rango micromolar, además de que a diferencia de los métodos por cromatografía de gases (GC) y de líquidos de alta resolución (HPLC) no requiere de un estándar de alicina. Este método no solamente determina la concentración de alicina sino también de otros 7 tiosulfinatos presentes en ajo que constituyen del 20 al 40% del contenido total de estos, además determinaron que todos los tiosulfinatos presentes en ajo son altamente reactivos a grupos sulfhídricos y que al igual que la alicina, una molécula de cualquier tiosulfinato también reacciona con dos moléculas de cisteína, cabe mencionar que en este estudio también se comprobó que los tiosulfinatos son los únicos compuestos que pueden reaccionar con la cisteína en la reacción y que no se presentan cantidades importantes de otros compuestos que puedan interferir en la reacción. Por lo anterior, el método es apto para la identificación del contenido de alicina y de tiosulfinatos totales presentes en extractos de ajo. Los resultados obtenidos por Han y Lawson (1994) varían de 2.43 a 4.46 mM de tiosulfinatos para diferentes extractos de ajo, no obstante, se desconoce si la variedad o la procedencia del ajo utilizado es la misma en base a que el estudio simplemente busca la validación del método y no la comparación entre concentración de tiosulfinatos entre ajos de diversas condiciones. Los resultados obtenidos por el presente estudio al ser iguales entre sí, demuestran que el contenido de tiosulfinatos totales no varió en cada condición de almacenamiento (TA y 5°C), por lo cual restaría demostrar que el perfil es el mismo en ambas condiciones mediante los resultados aportados por la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

6.2 Perfil de tiosulfinatos

El método utilizado para la separación e identificación de tiosulfinatos presentes en ajo de ambas condiciones fue el descrito por Cañizares y col. (2004). Como previamente se ha mencionado la alicina y los tiosulfinatos en general no se encuentran comercialmente disponibles por su alta inestabilidad química, por lo anterior el análisis de estos compuestos requiere de su síntesis química y posterior purificación a nivel laboratorio, no obstante la inestabilidad de los mismos ha llevado al desarrollo de metodología analítica para su determinación que en general resulta compleja. El método que hasta la fecha resulta más factible y efectivo para el análisis de estos compuestos en extractos de ajo es el que incluye la utilización de cromatografía de alta resolución (HPLC) desarrollado por Lawson y col. (1991), sin embargo, este método requiere la síntesis de estándares de cada uno de los tiosulfinatos lo cual no resulta conveniente debido a la alta inestabilidad de los mismos lo cual dificulta su síntesis y posterior análisis. El método desarrollado por Cañizares y col. (2004) es una modificación del método de Lawson y col. (1991), que además de presentar mejorías en la cromatografía que resultan en una separación más eficiente de los compuestos, resulta más sencilla de desarrollar debido a la utilización de dimetilsulfóxido como estándar interno.

Ambos métodos lograron la identificación y cuantificación de 5 compuestos tiosulfinatos, el método de Cañizares y col. (2004) los identificó presentando el siguiente orden de elución: tiosulfonato de dimetilo, tiosulfonato de metil-propil + tiosulfonato de propil-metil, alicina, tiosulfonato de alil-metil + tiosulfonato de metil-alil y tiosulfonato de metil-1,propenil + tiosulfonato de 1,propenil-metil (Figura 14).

En los cromatogramas obtenidos (Figura 14 y 15) se observan 4 picos, y que de acuerdo al orden de elución descrito anteriormente podrían corresponder a los siguientes compuestos: tiosulfonato de dimetilo, tiosulfonato de dialilo (alicina), tiosulfonato de alil-metil+ tiosulfonato de metil-alil y tiosulfonato de metil-1,propenil+tiosulfonato de 1,propenil-metil. El pico 2 observado en el cromatograma del estudio realizado por Cañizares y col. (2004) (Figura 16) correspondiente al tiosulfonato de metil-propil y a su isómero tiosulfonato de propil-metil no se aprecia en

los cromatogramas obtenidos en este estudio, lo anterior se puede atribuir a que debido a su baja concentración el compuesto fue arrastrado por el pico correspondiente a la alicina, además como reporto previamente Lawson y col. (1991) este tiosulfonato y su respectivo isómero son los compuestos que se encuentran en menor proporción en la detección a 254 nm de tiosulfonatos presentes en extractos de ajo fresco, no se puede concluir que dichos isómeros no se encuentren presentes en las muestras simplemente que no fueron eficazmente identificados por este estudio. En cuanto al pico 5 correspondiente al dimetilsulfóxido utilizado como estándar interno (Figura 16), en los cromatogramas obtenidos (Figura 14 y 15) no se presentó, lo anterior debido a que por su baja concentración fue arrastrado por la fase móvil en la elución de los compuestos tiosulfonatos y no fue posible su identificación por el detector UV / Vis, por lo anterior, el perfil de tiosulfonatos de ajos procedentes de dientes “semilla” almacenados a temperatura ambiente y a 5°C resultó cualitativo en base al orden de elución reportado por Cañizares y col. (2004) y semicuantitativo por el área bajo la curva de cada pico obtenido.

En ambos cuadros se observa que los datos de los picos en ambas condiciones son similares entre si lo cual corresponde a los cromatogramas observados (Figura 14 y 15), en ambos extractos se presentaron 4 picos correspondientes a 4 compuestos tiosulfonatos (identificados en estudios previos) con tiempos de retención de 0.874,1.020, 1.274 y 1.6905 en el extracto acetónico correspondiente a la condición de temperatura ambiente y 0.862,1.022, 1.272 y 1.709 en el extracto acetónico correspondiente a la condición de 5°C, además las absorbancias máximas de cada pico son similares en ambas condiciones notándose en que en la condición de temperatura ambiente las áreas relativas de los picos son mayores a excepción de la correspondiente a la alicina (Cuadro 7) demostrándose que en esta condición ciertos tiosulfonatos podrían estar en mayor proporción que en la condición a 5°C al ser el área una representación de la cantidad de compuesto presente en cada pico. Las diferencias entre los tiempos de retención obtenidos y los reportados por Cañizares y col. (2004) (Figura 16) se deben a que la columna que ellos utilizaron era una C18 (150 x 4.6 mm) y la utilizada en el presente estudio

fue una C18 (100x 4.6 mm) por lo que al ser más corta los tiempos de retención de cada compuesto en la columna son menores.

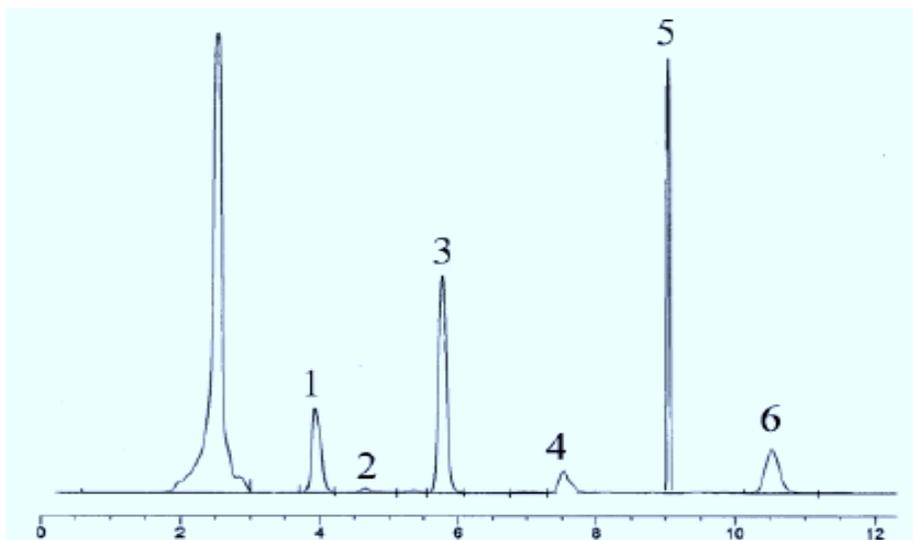


Figura 16. Cromatograma (254 nm) de los tiosulfatos presentes en extractos acetónicos de ajo. (Picos: 1= tiosulfato de dimetilo, 2= tiosulfato de metil-propil + de propil-metil, 3= alicina, 4= tiosulfato de alil-metil + de metil-alil, 5=dimetilsulfóxido, 6= tiosulfato de metil-1,propenil + de 1,propenil-metil. Tiempos de retención, picos: 1=3.5-5 min, 2=4.3-5.2 min, 3=5.6-6.6 min, 4=7.3-8.2 min, 6= 10-10.8 min (Cañizares y col. 2004).

Al no presentarse diferencias significativas entre los cromatogramas de ambas condiciones (TA y 5°C) se respaldan parcialmente los resultados obtenidos en la determinación de alicina y tiosulfatos totales en donde los ajos de ambas condiciones presentaron el mismo contenido de tiosulfatos y de alicina. Al ser la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) un método de mayor sensibilidad que el espectrofotométrico utilizado para la determinación de alicina y tiosulfatos totales, se puede explicar que en el primero no se hayan podido detectar diferencias en el contenido de tiosulfatos, aunado a que la concentración de alicina que representa cerca del 70% del total de tiosulfatos presentes se encuentre en mayor proporción en ajos de dientes “semilla” almacenados a 5°C.

Se puede concluir que en los ajos provenientes de dientes “semilla” almacenados a temperatura ambiente (TA) se encuentran los mismos compuestos tiosulfatos pero en proporción relativa superior que los encontrados en ajos provenientes de dientes

“semilla” almacenados a 5°C con excepción de la alicina cuya proporción es mayor en la condición de almacenamiento de 5°C, por lo anterior, la diferencia obtenida en la pungencia entre ambas condiciones no se debe a un cambio en el perfil de tiosulfatos pero si a una diferencia en la cantidad de cada tiosulfato producido por acción de la alinasa debido a la disminución que esta sufre en su actividad enzimática por el estrés generado al diente en su almacenamiento a 5°C, que si bien no es estadísticamente significativa puede ser suficiente para generar un cambio en la pungencia percibida. No obstante, la diferencia en la pungencia también puede deberse a ciertos compuestos del tipo tiosulfato presentes en ajo que no fueron identificados en el presente estudio, es posible que algunos de ellos contribuyan al cambio percibido en la pungencia, no obstante, los métodos requeridos para su eficaz identificación aún no han sido desarrollados. Además cabe mencionar que como se observó en los resultados obtenidos de la determinación de pungencia el contenido de ácido pirúvico endógeno es menor en dientes almacenados a 5°C y que de este compuesto depende en gran medida la pungencia percibida.

7. CONCLUSIONES

El almacenamiento de los dientes “semilla” de ajo a 5°C disminuyó la cantidad de ácido pirúvico total producido por acción de la alinasa en comparación con los dientes “semilla almacenados a temperatura ambiente, además se observó que el contenido de ácido pirúvico endógeno es menor en la condición de temperatura de 5°C.

El contenido de alicina y de tiosulfinatos totales obtenidos mediante espectrofotometría fue el mismo para ambas condiciones de almacenamiento, encontrándose $0.2499 \pm 1.24824E-07$ mM de tiosulfinatos / g de ajo y $0.2499 \pm 1.24824E-07$ g de alicina/ g ajo.

El perfil de tiosulfinatos obtenido por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) no presentó cambios en las dos condiciones de temperatura de almacenamiento de los dientes “semilla” de ajo, para ambas condiciones se observaron 4 picos correspondientes a compuestos tiosulfinatos, los cuales han sido previamente identificados, encontrándose la alicina en concentraciones más altas en las muestras a 5°C comparadas con las muestras a temperatura ambiente, no obstante, la proporción de los demás tiosulfinatos resultó menor en la condición de 5°C

Se evaluó el efecto de la temperatura de almacenamiento de los dientes “semilla” de ajo almacenados a 5°C y a temperatura ambiente encontrándose que la pungencia, determinada por el contenido de ácido pirúvico disminuye en los dientes “semilla” almacenados a 5°C, el perfil de tiosulfinatos para ambas condiciones es el mismo no obstante la cantidad de tiosulfinatos cambia, la alicina que representa del 60-80% del total de tiosulfinatos aumenta en la condición de 5°C mientras que el resto de los tiosulfinatos disminuye en esta misma condición. Por lo anterior, se requiere de un estudio más exhaustivo para poder identificar todos los compuestos tiosulfinatos presentes en ajo y así dilucidar si estos compuestos son los que causan una disminución en la pungencia de ajos provenientes de dientes “semilla” almacenados a 5°C.

8. BIBLIOGRAFÍA

Block E, Naganathan S, Putman D, Zhao S.H. Allium Chemistry: HPLC Analysis of Thiosulfinates from Onion, Garlic, Wild Garlic (Ramsoms), Leek, Scallion, Shallot, Elephant (Great-Headed) Garlic, Chive, and Chinese Chive. Uniquely High Allyl to Methyl Ratios in Some Garlic Samples. *J. Agrlc. Food Chem.* **1992**. 40: 2410-2430.

Block, E. Garlic and other Alliums, The lord and the science. 1st edition. Cambridge Royal Society of Chemistry, **2010**:66-71.

Bocchini P, Andalo C, Pozzi R, Galleti G.C., Antonelli A. Determination of diallyl thiosulfinate (allicin) in garlic (*Allium sativum* L.) by high-performance liquid chromatography a with a post-column photochemical reactor. *Analytical Chemical Acta*, **2001**.37–43.

Brewster, J. L. Onions and other vegetable alliums. CABI Publishing. CAB International. Wallingford, Reino Unido. **1994**. p 256.

Burba, J. Caracterización de cultivares y tipos clonales de ajo obtenidos e introducidos en Argentina. Curso/taller sobre producción, comercialización e industrialización de ajo. **1994**: 76-79.

Cañizares P, Gracia I, Gómez L.A., Martín de Arguila C, Boixeda D, García A, de Rafael L. Allyl-thiosulfinates, the Bacteriostatic Compounds of Garlic against *Helicobacter pylori*. *Biotechnol. Prog.* **2004**. 20: 397-401.

Cavallito, C. J.; Bailey, J. H. Allicin, the Antibacterial Principle of *Allium sativum*. I. Isolation, Physical Properties and Antibacterial Action, *J. Am. Chem. SOC.* **1944**. 66:1950-1951.

Corvera N, M. Mercado S.E.M. Determinación del efecto del almacenamiento refrigerado sobre la pungencia de dos variedades de ajo producidas en la región de Rincón de Romos, Aguascalientes. Verano de la Ciencia. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. **2014**. Querétaro, México.

Dufoo-Hurtado, M. D.; Zavala-Gutierrez, K. G.; Cao, C. M.; Cisneros-Zevallos, L.; Guevara-Gonzalez, R. G.; Torres-Pacheco, I.; Vazquez-Barrios, M. E.; Rivera-Pastrana, D. M.; Mercado-Silva, E. M. Low-temperature conditioning of “seed” cloves enhances the expression of phenolic metabolism related genes and

anthocyanin content in “coreano” garlic (*Allium sativum*) during plant development. J. Agric. Food Chem. **2013**, 61, 10439–10446.

FAOSTAT. FAO Dirección de Estadística. 2013. Producción: ProdSTAT. Consulta: Agosto 2015. Disponible en: URL: <http://faostat3.fao.org/home/E>

Gordon E. A, Barret D.M. Modified method for the determination of pyruvic acid with dinitrophenylhydrazine in the assessment of onion pungency. J Sci Food Agric. **2003**.1210–1213.

Han J, Lawson H, Ha G.Han. A spectrophotometric method for quantitative determination of allicin and total garlic thiosulfinates. Anal Biochem. **1994**.225(1):157-60.

Hanelt P. Taxonomy, evolution and History. En: Brewster, J.L. y Rabinowitch, H.D. (eds.). Onions and allied crops. CRC Press, Inc., Boca Ratón, Florida, EUA. **1990**: 1-26.

Harris D.C. Análisis químico cuantitativo. 3ª edición. Barcelona. Editorial Reverté. **2007**:608-610.

Heinerman, J. El ajo y sus propiedades curativas: historia, remedios y recetas. 1ª edición. Barcelona. Editorial Paidós. **1995**:13-18.

Huchette O, Kahane R, Auger J, Arnault. Influence of Environmental and Genetic Factors on the Alliin Content of Garlic Bulbs. ActaHortic. **2004**.688-9.

Izquierdo O. H., Quiones O. Y. Obtención de semilla de ajo mejorada mediante el empleo de técnicas biotecnológicas. **2001** Consulta: Julio 2011. Disponible en: <URL://http://www.utm.mx/temas-docs/nfnotas15R2.pdf>

Izquierdo, J., Paltrinieri, G., Arias C. Producción, poscosecha, procesamiento y comercialización del ajo, cebolla y tomate. FAO. **1992**. pp: 63-126.

Lawson D.; Wood G.; Hughes, G. HPLC analysis of allicin and other thiosulfinates in garlic clove homogenates. Planta Med. **1991**. 57:263-270.

Ledesma, A., Racca, W. R., Reale, M. I. Efecto de las condiciones de almacenaje y épocas de plantación sobre el crecimiento en ajo (*Allium sativum* L.) cv. Rosado Paraguayo. Phytol. **1983**. 43(2): 207-213.

López-Hernández, L. Efecto del almacenamiento a baja temperatura y aplicación de paclobutrazol a bulbos de ajo (*Allium sativum* L.) cv ‘Coreano’ en su

crecimiento, calidad de cosecha y perfil de fructanos. Tesis de Maestro en Ciencias y Tecnología de Alimentos. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. **2010**. Querétaro, México. 90 p.

Mann L.K. Anatomy of the garlic bulbs and factor affecting bulb development. *Hilgardia*. **1952**.195-251.

Pérez-Moreno L., García-Rincón P. M., Ramírez-Malagón R., Barrera-Guerra, J. L. Evaluación de cultivares de ajo morado y blanco por su rendimiento agronómico e industrial en Irapuato, Guanajuato. *Acta Universitaria*. **2003**.13: 57-65.

Portela, J. A. El ambiente como regulador del desarrollo de las plantas. Su efecto sobre el ajo (*Allium sativum* L.) **1996**. 1:19-40

Purseglove, J. W. Tropical crops: monocotyledons. 1st edition. New York, EUA. Editorial Longman.**1985**:p. 607

Rahim, M. A., Fordham, R. Environmental manipulation for controlling bulbing in garlic. *Acta Hort*. **2001**.555: 180-188.

Saghir A. R.; Mann L. K.; Bernhard R. A.; Jacobsen J. V. Determination of Aliphatic Mono- and Disulfides in *Allium* by Gas Chromatography and Their Distribution in the Common Food Species. *Proc. Am SOC. Hortic. Sci*.**1964**.84: 386-398.

Schwimmer S, Weston W.J. Enzymatic Development of Pyruvic Acid in Onion as a Measure of Pungency. Western Regional Research Laboratory Department of Agriculture.U.S.**1961**. 42(10):2085-2088.

SIAP 2014. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Estadística básica: Agricultura. Consulta: Agosto 2015.Disponible en:URL: <http://www.siap.gob.mx>

Takagi, H. Garlic (*Allium sativum* L.). En: Brewster, J.L. y Rabinowitch, H.D. (eds.). Onions and allied crops. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, EUA. **1990**. 109-107.

Villalón, G.C. Efecto de la alicina sobre el crecimiento y producción de biocapas en *Staphylococcus epidermidis*. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia de Sevilla. **2003**. España.3 p.

Wall, M.M, Corgan J.N. Relationship between pyruvate analysis and flavor perception for onion pungency determination. Department of Agronomy and Horticulture, Las Cruces, USA. **1992**. 27(9):1029-1030.

Yoo, K. S., Pike, L.M. Determination of background pyruvic acid concentrations in onions *Allium* species, and other vegetables. Vegetable and fruit improvement center, Department of Horticultural Sciences. Texas, USA. **2000**.89(2001):249-256.

Zavala-Gutiérrez, K. G. Estudio de los cambios del perfil transcriptómico en brotes de ajo (*Allium sativum* L.) cv. 'Coreano' procedentes de "semillas" almacenadas a diferentes temperaturas. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. **2011**. Querétaro, México. 92 p.

Zhou H, Li W, Zhou M, Hu X, Ou S, Yan R, et al. Characterization of phenolic constituents inhibiting the formation of sulfur-containing volatiles produced during garlic processing. *J Agric Food Chem* 2015. 63:787–94.