

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EFECTO DE LA BAJA TEMPERATURA EN EL PERFIL DE
COMPUESTOS FENÓLICOS Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE
DE AJO (*Allium sativum* L.) cv. COREANO”**

TESIS INDIVIDUAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA

ROCIO ARREGUÍN CAMPOS

DIRIGIDA POR

Dra. DULCE MARÍA RIVERA PASTRANA

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2015.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EFECTO DE LA BAJA TEMPERATURA EN EL PERFIL DE
COMPUESTOS FENÓLICOS Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE
DE AJO (*Allium sativum* L.) cv. COREANO**

TESIS

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

PRESENTA

ROCIO ARREGUIN CAMPOS

DIRIGIDA POR

Dra. DULCE MARÍA RIVERA PASTRANA

SINODALES

**Dra. DULCE MARÍA RIVERA PASTRANA
DIRECTOR**

**Dr. EDMUNDO MERCADO SILVA
SINODAL**

**Dra. MA ESTELA VÁZQUEZ BARRIOS
SINODAL**

**I.Q en A. MIGUEL DAVID DUFOO HURTADO
SINODAL**

Four handwritten signatures on horizontal lines, corresponding to the names listed in the sinodal section.

INDICE GENERAL

Contenido	Página
INDICE GENERAL	i
INDICE DE CUADROS	iii
INDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	1
1.1 El ajo	1
1.2 El cultivo de ajo	2
1.3 Composición química del ajo	6
1.4 Compuestos fenólicos y flavonoides en ajo	6
1.5 Propiedades funcionales del ajo	8
1.6 Capacidad antioxidante del ajo	11
1.7 Efecto de la baja temperatura sobre el contenido de compuestos fenólicos	13
2. HIPÓTESIS	16
3. OBJETIVOS	17
3.1 General	17
3.2 Específicos	17
4. METODOLOGÍA	18
4.1 Diseño experimental	18
4.2 Métodos	19
4.2.1 Cultivo y toma de muestras	19
4.2.2 Extracción de compuestos fenólicos	19
4.2.3 Cuantificación de fenoles totales	19
4.2.4 Cuantificación de flavonoides	20
4.2.5 Capacidad antioxidante	20
4.2.6 Análisis de perfil de compuestos fenólicos por HPLC	21
4.2.7 Análisis estadístico	22
5. RESULTADOS	23

5.1 Efecto del acondicionamiento a baja temperatura en el contenido de fenoles totales	23
5.2 Efecto del acondicionamiento a baja temperatura en el contenido de flavonoides	25
5.3 Efecto del acondicionamiento a baja temperatura sobre la capacidad antioxidante	27
5.4 Efecto del acondicionamiento a bajas temperaturas en el perfil de compuestos fenólicos por HPLC	30
6. DISCUSIÓN	38
6.1 Efecto del acondicionamiento a baja temperatura en el contenido de fenoles totales	38
6.2 Efecto del acondicionamiento a baja temperatura en el contenido de flavonoides.	40
6.3 Efecto del acondicionamiento a baja temperatura sobre la capacidad antioxidante	42
6.4 Análisis de perfil de compuestos fenólicos por HPLC-DAD	43
7. CONCLUSIONES	45
8. REFERENCIAS	46
ANEXOS	52

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Producción agrícola de ajo y sus variedades	4
2	Composición química del ajo	7
3	Composición fitoquímica del ajo	7
4	Contenido de fenoles totales en diferentes cultivares de cebolla y ajo	13
5	Gradiente de separación de compuestos fenólicos por HPLC-DAD	21
6	Valores de correlación entre fenoles y flavonoides respecto a capacidad antioxidante en túnica y hoja aérea de ajo acondicionado a 5°C y temperatura ambiente	30
7	Picos de compuestos fenólicos obtenidos por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC-DAD) en muestras de túnica de ajo durante el desarrollo	33
8	Picos de compuestos fenólicos obtenidos por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC-DAD) en muestras de hoja aérea de ajo durante el desarrollo	36

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Planta joven de ajo. Raíces adventicias (ra), tallo (t), bulbo (b) y hojas aéreas (ha), (B) bulbo, (C) sección longitudinal del bulbo, (D) bulbillo o diente, (E) inflorescencia, escapo floral (ef), bulbillos aéreos (ba) y flores (fl)	2
2	Producción mundial de ajo del año 2005 al 2011	3
3	Producción total de ajo por continente	3
4	Principales estados productores de ajo en México	4
5	Ajo no acebollado” (a), ajo “acebollado” (b), ajo rebrotado (c)	6
6	Estructura de flavonoides	9
7	Estructuras de compuestos organosulfurados presentes en ajo. DAS:sulfuro de dialilo, DADS:disulfuro de dialilo, DATS:trisulfuro de dialilo	12
8	Diagrama de diseño experimental	18
9	Contenido de fenoles totales (mg ácido gálico/g de muestra en peso seco, gps) en túnica de ajo del acondicionamiento a 5°C y temperatura ambiente (TA) durante el desarrollo (días después de siembra,DDS)	24
10	Contenido de fenoles totales (mg ácido gálico/g de muestra en peso seco, gps) en hoja aérea de ajo del acondicionamiento a 5°C y temperatura ambiente (TA) durante el desarrollo (días después de siembra,DDS)	25
11	Contenido de flavonoides (mg quercetina/g de muestra en peso seco, gps) en túnica de ajo del acondicionamiento a 5°C y temperatura ambiente (TA) durante el desarrollo (días después de siembra,DDS)	25
12	Figura 10. Contenido de flavonoides (mg quercetina/g de muestra en peso seco, gps) en hoja aérea de ajo del acondicionamiento a 5°C y temperatura ambiente (TA) durante	27

	el desarrollo (días después de siembra, DDS)	
13	Capacidad antioxidante (% de inhibición) en túnica de ajo del acondicionamiento a 5°C y temperatura ambiente (TA) durante el desarrollo (días después de siembra, DDS)	28
14	Capacidad antioxidante (% de inhibición) en hoja aérea de ajo del acondicionamiento a 5°C y temperatura ambiente (TA) durante el desarrollo (días después de siembra, DDS)	29
15	Perfil de compuestos fenólicos obtenido por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC-DAD) de túnica de ajo a temperatura ambiente a los 129 DDS	32
16	Perfil de compuestos fenólicos obtenido por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC-DAD) de túnica de ajo pre almacenada a 5°C a los 129 DDS	32
17	Perfil de compuestos fenólicos obtenido por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC-DAD) en muestra de hoja aérea de ajo a temperatura ambiente a los 78 DDS Perfil de compuestos fenólicos obtenido por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC-DAD) en muestra de hoja aérea de ajo pre almacenada a 5°C a los 78 DDS	35
18	Perfil de compuestos fenólicos obtenido por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC-DAD) en muestra de hoja aérea de ajo pre almacenada a 5°C a los 78 DDS	35

RESUMEN

El ajo (*Allium sativum* L.), es una planta anual perteneciente a la familia de las Aliáceas. Se cultiva alrededor del mundo, y sus propiedades médicas potenciales han sido reconocidas durante mucho tiempo. Estas propiedades dependen de los compuestos bioactivos que posee, especialmente los organosulfurados, que son también los responsables de su sabor. Además de estos compuestos, el ajo contiene compuestos fenólicos, particularmente flavonoides, los cuales presentan propiedades farmacológicas. Debido a que la propagación del cultivo de ajo es de tipo clonal, las condiciones de almacenamiento de la semilla tiene una influencia en la planta una vez en el campo. El acondicionamiento de las semillas a 5°C durante 5 semanas antes de la siembra acelera la iniciación, desarrollo y madurez de los nuevos bulbos durante su desarrollo en campo en comparación con aquellas plantas provenientes de semillas que se almacenan a temperatura ambiente (20°C). En el presente trabajo se evaluó el efecto del almacenamiento en frío (5°C) de la semilla de ajo previo a la siembra en el contenido y perfil de compuestos fenólicos en túnicas y hojas aéreas. Los resultados mostraron que la baja temperatura presentó un efecto positivo sobre el contenido de fenoles totales, flavonoides y capacidad antioxidante en túnicas de ajo, para las cuales se obtuvieron los mayores contenidos a 5°C y 144 días después de la siembra (DDS), con un máximo de 4.81 ± 0.89 mg de ácido gálico/g de muestra en peso seco, a los 129 DDS/5°C un contenido máximo de 1.53 ± 0.07 mg de quercetina/g de muestra en peso seco y a los 144 DDS/5°C con un porcentaje máximo de inhibición de 13 ± 1.10 respectivamente. Para el tejido de hoja aérea, la temperatura no tuvo un efecto significativo general sobre los fenoles totales, flavonoides y capacidad antioxidante, siendo 7.61 ± 1.27 mg de ácido gálico/g de muestra en peso seco a los 144 DDS y TA, 7.64 ± 0.43 mg de quercetina/g de muestra en peso seco a los 156 DDS y 5°C, y 18.78 ± 0.01 % de inhibición a los 106 DDS y 5°C los mayores valores obtenidos respectivamente. En el perfil por HPLC-DAD en túnica, se observaron cambios composicionales en los cromatogramas para la condición de 5°C respecto a la de temperatura ambiente, apareciendo 3 picos para esta condición que no se encuentran en el perfil de temperatura ambiente. De estos picos se identificó ácido ferúlico dentro de los compuestos fenólicos, mientras que para el tejido de hoja aérea, los cambios fueron menos visibles, y se identificó quercetina dentro de los picos observados.

1. ANTECEDENTES

1.1 El ajo

La familia de las Aliáceas, es una de las familias de plantas con flores más grandes y ciertamente, una de las de mayor importancia hortícola. Desde el punto de vista económico, la más representativa de sus especies es la cebolla (Siurana, 1997).

El uso principal de los miembros de esta familia se encuentra dentro del campo. El género *Allium* es el único que tiene importancia alimenticia, las especies más conocidas son *Allium cepa* (cebolla), *A. porrum* (puerro) (Siurana, 1997).

El ajo posee un tallo anual en forma de disco sobre el que se apoyan los dientes y un tallo floral bienal, también llamado “escapo”, que en algunas razas no se desarrolla y la mayoría no florecen (IICA, 1982).

Las hojas adultas son planas de aproximadamente 3cm de ancho, lineales, terminadas en punta, delgadas y aquilladas con lígula y vaina, que al superponerse forman el falso tallo dándole el aspecto de hojas alternas (IICA, 1982).

Los dientes, por lo común más de diez por cabeza, son pequeños bulbos o bulbillos de forma variada, con 2-3 caras planas, dorso convexo de tamaño y color externo variable. Haciendo un corte del diente se puede observar de afuera hacia adentro:

- Hoja protectora: lignificada que es la responsable del color del diente.
- Hoja de reserva: o de almacenamiento engrosada y que constituye el 80-85% del peso total del diente.
- Hoja germinadora: o de renuevo, que es la que aparece en la brotación, protegiendo las hojas foliares en su desarrollo inicial.
- Hojas aéreas: o verdaderas.
- Disco basal: Con yema central, donde se apoyan todos los elementos anteriores. Éste crece al germinar el diente hasta alcanzar 1-2cm de diámetro y 0.5-1 cm de espesor (IICA, 1982).

En la Figura 1 se muestran las partes componentes de la planta de ajo.

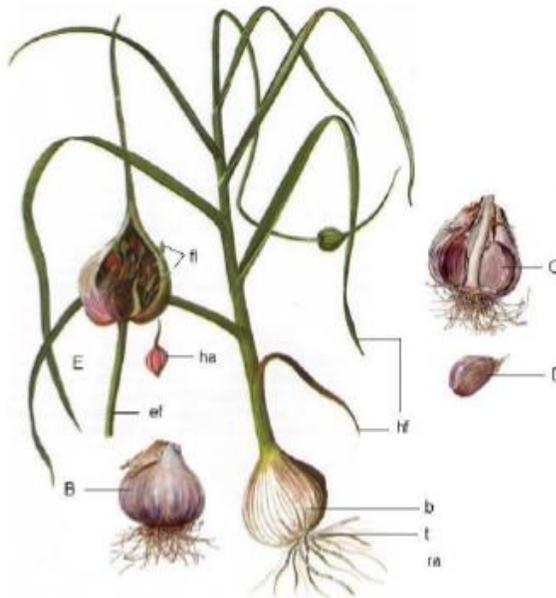


Figura 1. Planta joven de ajo. Raíces adventicias (ra), tallo (t), bulbo (b) y hojas aéreas (ha), (B) bulbo, (C) sección longitudinal del bulbo, (D) bulbillo o diente, (E) inflorescencia, escapo floral (ef), bulbillos aéreos (ba) y flores (fl) (Purseglove, 1985).

1.2 El cultivo de ajo

Las especies hortícolas son de gran importancia para la agricultura en México, puesto que de los veinte millones de hectáreas cultivadas, el 3.5% corresponde a hortalizas. La producción nacional hortícola es de 8.5 millones de toneladas, de las cuales 1500000 toneladas se dedican a la exportación y el resto al mercado nacional (Villanueva, 1992).

El ajo es una de las plantas cuyo cultivo se conoce desde la antigüedad, los Sumerios ya lo mencionaban hace aproximadamente 5000 años. La planta es originaria de Europa, de África mediterránea o de Asia central, se cultiva en casi todo el mundo, principalmente en climas cálidos y templados (Fonegra, 2007).

La producción mundial de ajo, en el 2005 fue de 15 millones de toneladas, aumentando hasta 25 millones de toneladas para el año 2011, como se muestra en la Figura 2.

De la producción total de ajo anual, tres cuartas partes se originan en China, que es por mucho el exportador más exitoso de ajo (Figura 3).



Figura 2. Producción mundial de ajo del año 2005 al 2011(FAOSTAT, 2011).

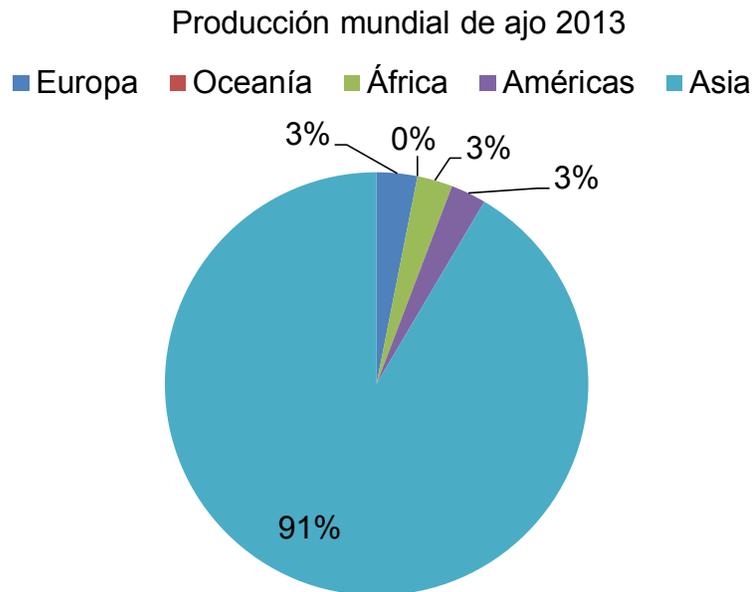


Figura 3. Producción total de ajo por continente (FAOSAT, 2013).

En México se cultivan aproximadamente 6000 hectáreas de ajo, con una producción de 56811 toneladas anuales (Cuadro1). Los estados de mayor producción son: Zacatecas, Guanajuato, Sonora, Baja California y Aguascalientes (Figura 4) (SIAP, 2013).

Cuadro 1. Producción agrícola de ajo y sus variedades.

Cultivo	Variedad	Producción (ton)
Ajo	Todas	56,811.39
Ajo	Blanco	1479.30
Ajo	Criollo	114.35
Ajo	Morado	556.80
Ajo	Orgánico	53.00

(SIAP, 2013)

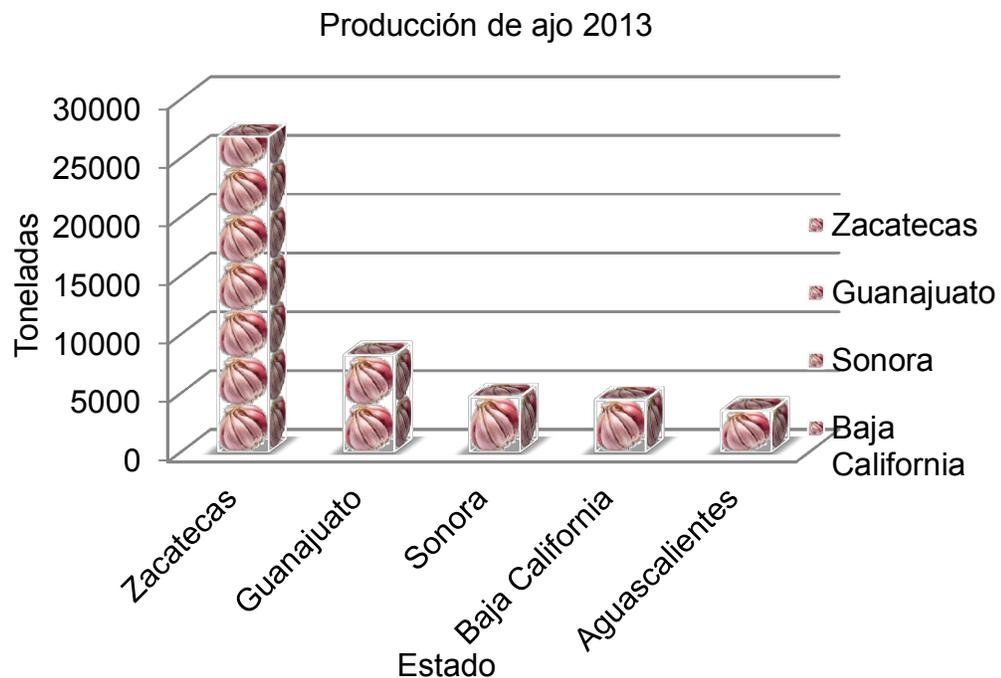


Figura 4. Principales estados productores de ajo en México (SIAP, 2013).

El ajo crece mejor en zonas geográficas cálidas que proveen un rango de temperatura de 12°C a 24°C, debido a que la semilla requiere temperaturas prolongadas inferiores a 18°C para producir bulbos maduros y a que temperaturas arriba de 30°C inhiben la bulbificación (Nonnecke, 1989).

La brotación de los dientes, el crecimiento vegetativo, la bulbificación y la maduración son las etapas fenológicas principales que se presentan en el cultivo del ajo. La formación de los dientes está controlada principalmente por la temperatura en la ausencia de latencia (Del Pozo y col., 2005).

La bulbificación está promovida por exposición previa de las semillas a bajas temperaturas y además por largos fotoperiodos durante el desarrollo del cultivo (Del Pozo y col., 2005).

En el ajo se producen algunos fenómenos que se pueden agrupar como anomalías. Tienen su origen en causas de tipo fisiológico o pueden ser consecuencia de deficiente manejo del cultivo (Giaconi, 1976).

El ramaleo o rebrote es un fenómeno que se caracteriza por el crecimiento de las hojas envoltentes de cada diente sobresaliendo por el falso cuello, imprimiéndole un engrosamiento característico que muestra un excesivo crecimiento vegetativo aéreo. En casos extremos podrían formarse bulbos adicionales que rodean al central. Las causas son de orden ambiental: excesiva nutrición nitrogenada muy tarde en el cultivo, períodos fríos en primavera, distancias excesivas con dientes muy grandes influyen en la aparición de este problema (Giaconi, 1976).

Las plantas que no dan bulbos diferenciados y sólo tallos gruesos se denominan "acebollados" por su semejanza con la cebolla, es decir bulbos con hojas concéntricas sin formación o nulo desarrollo de dientes. Es un fenómeno que se produce por exceso de humedad y de malezas, particularmente en las plantaciones realizadas con considerable retraso. También se producen cuando los bulbos no han recibido el frío suficiente para la diferenciación de bulbillos. Por otro

lado, la incidencia de virus puede llevar a provocar este problema, estos fenómenos se muestran en la Figura 5 (Giaconi, 1976).



Figura 5. Ajo no acebollado” (a), ajo “acebollado” (b), ajo rebrotado (c) (Utrilla, 2008).

1.3 Composición química del ajo

Se señala que 100 gramos de dientes de ajo libres de piel contienen la composición que se presenta en el Cuadro 2 (Quiroga, 1999).

El ajo se compone principalmente de agua seguido de carbohidratos. Los componentes más significativos desde el punto de vista medicinal, son los compuestos organosulfurados (Quiroga, 1999).

Las plantas de ajo son ricas en micronutrientes, pero también contienen una gran cantidad de metabolitos secundarios biológicamente activos que proveen a la planta de color, sabor y toxicidad natural (Johnson y Williamson, 2003).

El perfil fitoquímico del ajo se muestra en cuadro 3.

1.4 Compuestos fenólicos y flavonoides en ajo

Los efectos del ajo sobre la salud dependen de los compuestos bioactivos que éste posee, especialmente los compuestos organosulfurados, que también son responsables de su sabor característico. Además de estos compuestos, el ajo se caracteriza por sus compuestos fenólicos, los cuales tienen propiedades farmacológicas interesantes y se encuentran en cantidades relativamente altas (Beato, 2011).

Cuadro 2. Composición química del ajo.

Componente	Contenido por 100g
Agua	62.5%
Proteína	4.0g
Grasa	0.2
Hidratos de Carbono	20.0
Celulosa	1.2
Cenizas	1.1
Calcio	37.0mg
Fósforo	118.0
Hierro	0.9
Tiamina	0.19
Riboflavina	0.07
Niacina	0.04
Ácido ascórbico	13.0

(Quiroga, 1999)

La química y clasificación de estas sustancias es aún objeto de investigación y de debate (Johnson y Williamson, 2003).

Cuadro 3. Composición fitoquímica del ajo.

Componente	Porcentaje (%)
Alcaloides	2.54
Taninos	0.07
Carotenoides	0.00
Saponinas	4.60
Flavonoides	1.16
Esteroides	0.04
Carnenólidos	0.20

(Otunola, 2010)

Los fenoles son metabolitos secundarios ubicuos en las plantas. Comprenden un gran grupo de compuestos biológicamente activos. En base al número de subunidades de fenoles, la clasificación moderna forma dos grupos básicos:

- Fenoles simples
- Polifenoles

El grupo de fenoles simples contienen los conocidos “ácidos fenólicos”, que son fenoles con un grupo carboxílico que determinan la especificidad de su función. Por su parte, los polifenoles contienen al menos dos anillos de fenol. Los flavonoides, que han sido objeto de estudios en años recientes, pertenecen a este grupo (Prasad, 1995).

Los fenoles poseen un amplio espectro de actividades bioquímicas, tales como antioxidantes, antimutagénicas, anticarcinogénicas y además poseen la habilidad para modificar la expresión genética (Prasad, 1995).

Los flavonoides son compuestos polifenólicos que generalmente se producen como derivados glicosilados (Figura 6).

Los bioflavonoides son compuestos polifenólicos que se encuentran ubicuamente en alimentos. Se cree que estos constituyentes de la dieta son importantes en el mantenimiento de la salud, especialmente para mantener la integridad del sistema cardiovascular (Ishizawa, 2011).

1.5 Propiedades funcionales del ajo

El uso del ajo como medicina y condimento data de mucho tiempo atrás, se ha reportado que diferentes especies *Allium* aportan muchos beneficios a la salud. *Allium sativum* ha sido investigado de manera profunda. Extractos de esta especie han mostrado capacidad para disminuir lípidos, actividad antiplaquetaria y también antiaterosclerótica (Bozin y col., 2008).

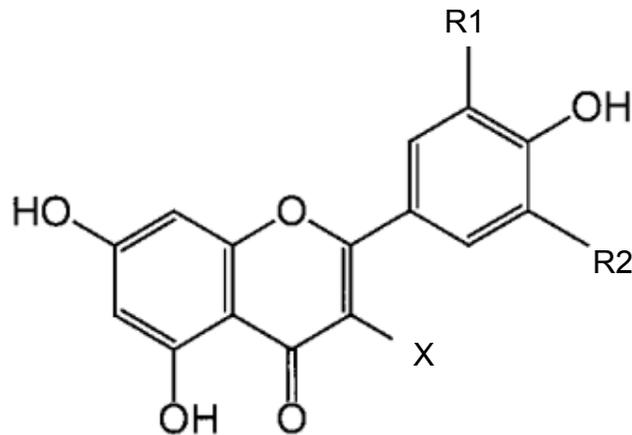


Figura 6. Estructura de flavonoides. Flavonoles: X=OH; quercetina, R1=OH, R2=H; kaempferol, R1=H, R2=H; miricetina, R1=OH, R2=OH Flavones: X=H; apigenina, R1=H, R2=H; luteolina, R1=OH, R2=H (Hertog, y col., 1992).

Los usos medicinales del ajo se están ampliando y creciendo. Estudios epidemiológicos, clínicos y preclínicos han mostrado una relación cercana de los hábitos dietarios, incluyendo la ingesta de ajo y la ocurrencia de enfermedades. El ajo ha sido investigado extensivamente por sus beneficios a la salud, lo que ha resultado en más de 1000 publicaciones en la década pasada (Bozin, 2008).

Un amplio conjunto de efectos terapéuticos como hipolipidémico, antiesclerótico, hipoglucémico, anticoagulante, anti hipertensivo, antimicrobiano y hepatoprotector se han reportado, además de prevenir la gripe y sus síntomas (Bozin, 2008).

El estrés oxidativo que resulta de un desbalance entre la generación de radicales libres y la defensa antioxidante endógena en tejidos, juegan un rol clave en la iniciación y progresión de estas enfermedades. Sin embargo, los mecanismos exactos de protección a estas condiciones no están bien comprendidos (Bozin, 2008).

Actualmente hay mucho interés en los compuestos fitoquímicos como componentes bioactivos de los alimentos. Estudios recientes han mostrado que muchos de los polifenoles presentes en la dieta derivados de plantas son antioxidantes *in vitro* más efectivos que la vitamina E o C, lo cual podría contribuir significativamente a los efectos protectores *in vivo* (Rice-Evans, 1997).

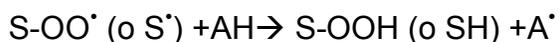
Los compuestos fenólicos tienen propiedades antioxidantes y pueden actuar como protectores contra enfermedades crónico degenerativas en las cuales las especies reactivas del oxígeno se encuentran involucradas (Dykes y Rooney, 2007).

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se debe principalmente a sus propiedades redox, que les permiten actuar como agentes reductores, donadores de hidrógeno, además de que tienen potencial de quelación de metales (Kähkönen y col., 1999).

Algunos compuestos fenólicos en plantas comestibles han recibido mucha atención como poderosos antioxidantes, no solamente para proteger contra el deterioro oxidativo a los alimentos, sino también por reducir las enfermedades inducidas por oxidación debido a su ingestión. El principal mecanismo de los compuestos fenólicos como antioxidantes es la capacidad que poseen para estabilizar las especies radicales. Esta propiedad es muy importante en los sistemas biológicos por atrapar los radicales de oxígeno. Se cree que el proceso antioxidante se divide en dos etapas, como se muestra:

S es la sustancia que se oxidará, AH es el antioxidante y A[•] es el radical antioxidante (Masuda y col., 1999).

Etapa de captura



Etapa de terminación de radical

A[•] → material no radical

Los efectos cardiovasculares del ajo se encuentran entre los más investigados de todas las plantas medicinales y por otra parte, se ha demostrado en estudios que el consumo regular diario de ajo puede prevenir el riesgo de padecer cáncer (Keusgen y col., 2002).

Los atributos benéficos del ajo a la salud se atribuyen también a los compuestos organosulfurados que se encuentran en él, siendo el principal de éstos la aliina. Este compuesto se convierte en alicina cuando el ajo es dañado mecánicamente y entra en contacto con oxígeno, es inestable por lo que se degrada a lo largo del tiempo para dar paso a una segunda generación de sulfuros de alilo y polisulfuros (Quintero-Fabián, 2013).

La aliina, es un potente antioxidante con actividad cardioprotectora y neuroprotectora, además de que ayuda a disminuir los niveles de glucosa, insulina, triglicéridos y ácido úrico en sangre (Quintero- Fabián, 2013).

Los compuestos organosulfurados del ajo son aquellos que contienen grupos funcionales sulfuros, disulfuros o polisulfuros en su estructura, siendo éstos los responsables de su actividad biológica. Se ha encontrado que el enlace disulfuro es el responsable de la actividad anti microbiana y anti cancerígena (Schäfer y Kaschula, 2014).

1.6 Capacidad antioxidante del ajo

Se ha encontrado en estudios recientes, que las plantas pertenecientes al género *Allium* poseen propiedades antioxidantes.

Especialmente, los ajos y diferentes extractos de ajo, han mostrado tener esta actividad en diferentes modelos *in vitro*. La actividad antioxidante en las plantas del género *Allium* se ha atribuido principalmente a una variedad de compuestos sulfurados y sus precursores. De acuerdo a Kim y col. (1997), la alicina, disulfuro de dialilo y trisulfuro de dialilo (Figura 7) resultaron ser los principales compuestos antioxidantes en ajo (Prasad, 1995)

El potencial antioxidante de los extractos de plantas, y de compuestos puros puede ser medido utilizando numerosos ensayos *in vitro*. Cada uno de estos, están basados en el efecto de actividad antioxidante, como la habilidad de quitar radicales libres o inhibir peroxidación lipídica (Prasad y col., 1995).

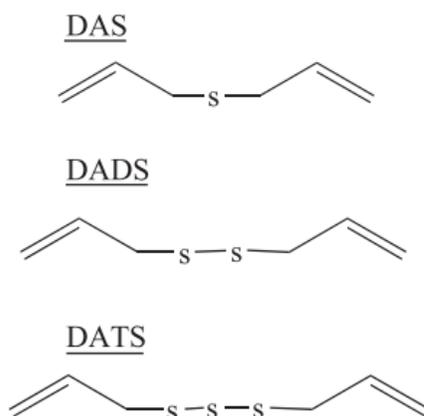


Figura 7. Estructuras de compuestos organosulfurados presentes en ajo. DAS:sulfuro de dialilo, DADS:disulfuro de dialilo, DATS:trisulfuro de dialilo (Chen y col., 2004).

Los antioxidantes, como flavonoides y fenoles se encuentran en varias plantas. Como elementos en la dieta, son ampliamente conocidos como compuestos que inhiben la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (Rauha, 2000). Recientemente ha habido un interés creciente en separarlos para su uso como antioxidantes naturales. Se han utilizado diferentes solventes para este propósito, siendo el etanol, metanol y acetona los más comunes. Los extractos con mayor capacidad antioxidante también tienen un mayor contenido de polifenoles. Aquellos extractos obtenidos utilizando solventes con mayor polaridad son más capaces de captar radicales libres (Roby y col., 2013).

En el Cuadro 4. Se puede observar el contenido fenólico de diferentes cultivares de ajo y cebolla liofilizados, en el cual se encuentra una relación entre la pigmentación del cultivar y los equivalentes de ácido gálico.

La actividad antioxidante de algunos fenoles se ha mencionado frecuentemente que posee una conexión con su función farmacológica en el sistema cardiovascular debido a la modificación oxidativa de las lipoproteínas de baja densidad (Ishizawa y col., 2011).

Cuadro 4. Contenido de fenoles totales en diferentes cultivares de cebolla y ajo.

Cultivar	Parte	Equivalentes ácido gálico mg/kg
Cebolla roja	túnica	79820
Cebolla amarilla	túnica	26105
Ajo finlandés orgánico	túnica	175
Ajo húngaro	semilla	95

(Nuutila, 2003)

1.7 Efecto de la baja temperatura sobre el contenido de compuestos fenólicos

Durante el proceso normal de crecimiento y desarrollo, las plantas se encuentran sujetas a diferentes tipos de estrés, como sequía, calor, exposición a luz ultravioleta, contaminación del aire y ataques de patógenos. La mayoría de las plantas sufren daños fisiológicos y bioquímicos debido a su exposición a temperaturas mayores o menores a sus óptimas de crecimiento. Los resultados, que se ven reflejados en los procesos metabólicos, pueden afectar la capacidad de crecimiento del cultivo, la cual se ve reducida y por lo tanto culmina en menor rendimiento comercial. Se ha demostrado que el estrés térmico induce la producción de compuestos fenólicos como flavonoides y fenilpropanoides (Rivero y col., 2001).

Los compuestos fenólicos se producen por la ruta de los fenilpropanoides. La Fenilalanina amonio-liasa (PAL) es considerada como la principal enzima de la ruta, catalizando la transformación por desaminación de la fenilalanina a ácido trans-cinámico, el cual es el principal intermediario en la biosíntesis de los fenoles. Esta enzima incrementa su actividad en respuesta al estrés térmico y es considerada por varios autores como una de las principales líneas de la aclimatación de las plantas contra el estrés (Rivero y col., 2001).

Debido a que la propagación del cultivo de ajo es de tipo clonal, es decir, los bulbos son la semilla para el siguiente ciclo de cultivo, las condiciones de almacenamiento de la semilla tiene una influencia en el cultivo una vez sembrado en el campo. El acondicionamiento de las semillas a 5°C durante 5 semanas antes de la siembra acelera la iniciación, desarrollo y madurez de los bulbos en comparación con aquellas semillas que se almacenan a 20°C (Dufoo-Hurtado y col., 2013).

Se desconoce cómo la temperatura de almacenamiento de la semilla afecta el contenido de compuestos fenólicos de los nuevos bulbos, sin embargo, hay reportes que indican que el estrés ambiental durante el desarrollo del cultivo estimula la biosíntesis de algunos compuestos fitoquímicos, particularmente antocianinas que proporcionan una coloración morada más intensa a los bulbos provenientes de semillas almacenadas a baja temperatura (Dufoo-Hurtado y col., 2013).

Mediante espectrometría de masas, se han identificado algunas antocianinas derivadas de cianidina presentes en ajo, Dufoo-Hurtado y col. (2013) identificaron las siguientes compuestos: glucósido 3-O, glucósido 3-O (3''-malonil), glucósido 3-O-(6''malonil) y glucósido 3-O- (6'' malonil acetil) de cianidina (Dufoo-Hurtado y col., 2013).

Durante el desarrollo de la planta se presenta un cambio en los tipos de antocianinas, y se han encontrado diferencias cuantitativas asociadas al desarrollo, aunado al tratamiento de temperatura que se aplique a la semilla. Aquellos bulbos "semilla" acondicionados a 5°C han generado plantas con mayor contenido de antocianinas en comparación con las plantas provenientes de semillas almacenadas a temperatura ambiente, confirmando que el almacenamiento a 5°C incrementa la biosíntesis de los compuestos durante las etapas de desarrollo de las plantas y bulbos cosechados (Dufoo-Hurtado y col., 2013).

Además, este acondicionamiento permite disminuir el tiempo de cosecha hasta 6 semanas en comparación con aquellas semillas acondicionadas a temperatura ambiente (Dufoo-Hurtado y col., 2013).

Dado que no se ha reportado el efecto de los cambios en el desarrollo del cultivo como consecuencia del pre almacenamiento de la semilla a bajas temperaturas en el perfil fitoquímico del ajo, en este trabajo se busca analizar las modificaciones en la síntesis de compuestos fenólicos , impactando así en la capacidad antioxidante de algunos tejidos de ajo como consecuencia del pre almacenamiento de la semilla a bajas temperaturas.

2. HIPÓTESIS

El almacenamiento del bulbo “semilla” de ajo a baja temperatura induce un aumento en la síntesis de compuestos fenólicos, flavonoides y capacidad antioxidante de algunos tejidos de ajo (*Allium sativum* L.) de la variedad coreano durante su desarrollo en campo.

3. OBJETIVOS

3.1 General

Determinar el efecto del almacenamiento de los bulbos “semilla” a baja temperatura en la producción de metabolitos secundarios durante el desarrollo de los bulbos de ajo de la variedad coreano en campo.

3.2 Específicos

Cuantificar los cambios en el contenido de fenoles totales, flavonoides y actividad antioxidante inducidos por las bajas temperaturas pre-siembra durante el desarrollo del ajo.

Evaluar el efecto de baja temperatura pre-siembra en el perfil de compuestos fenólicos en tejidos de hoja y túnica de ajo por HPLC durante el desarrollo del cultivo.

Correlacionar los cambios en el contenido de compuestos fenólicos con la capacidad antioxidante en los diferentes tejidos analizados durante el desarrollo del cultivo.

4. METODOLOGÍA

4.1 Diseño experimental

El diseño experimental utilizado fue unifactorial completamente aleatorizado donde el factor temperatura de almacenamiento de la semilla se evaluó a dos niveles: 5°C y temperatura ambiente (TA). Se evaluaron las variables: respuesta fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante. En la Figura 8 se muestra de manera gráfica el diseño.

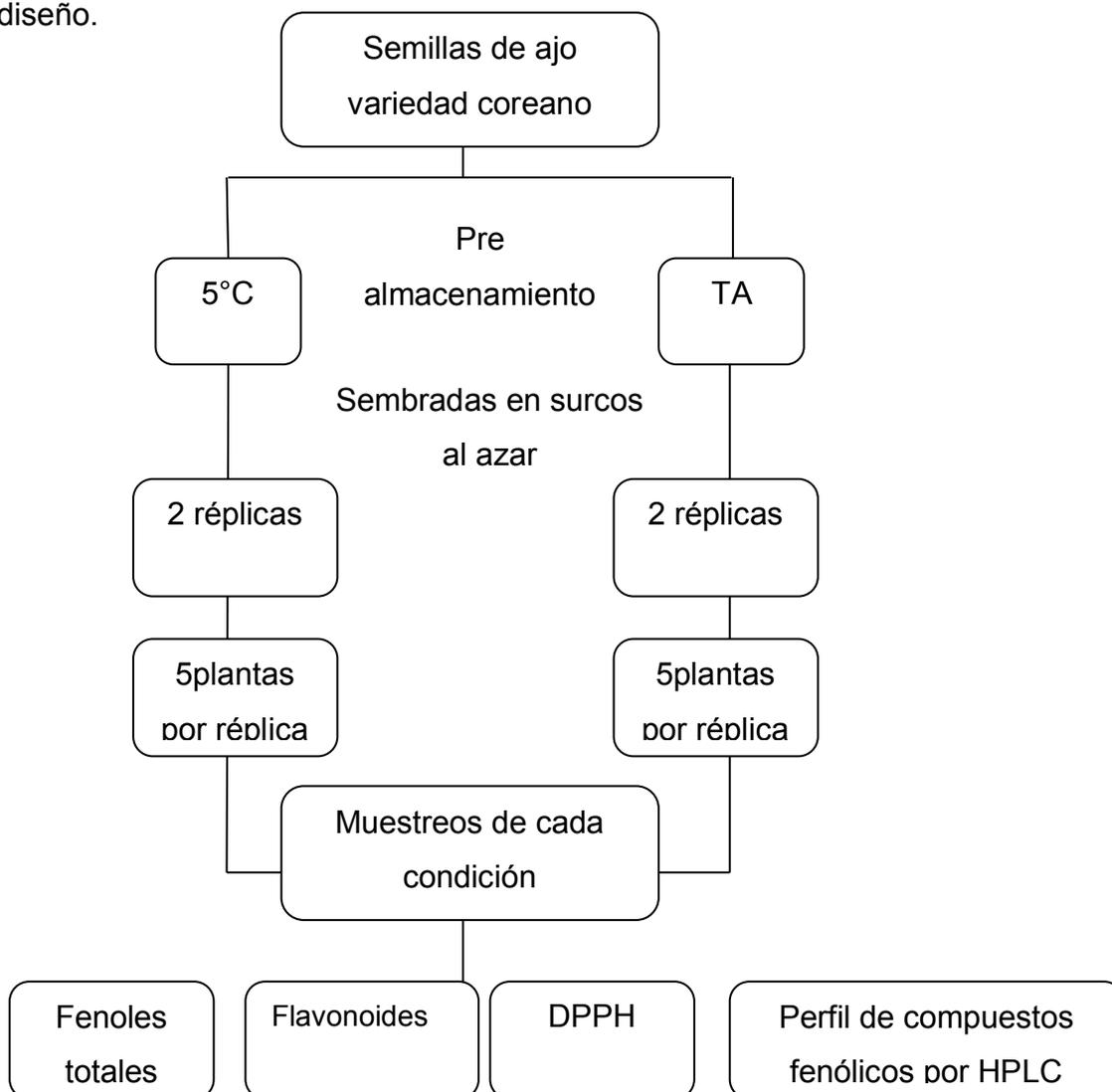


Figura 8. Diagrama del diseño experimental.

4.2 Métodos

4.2.1 Cultivo y toma de muestras

Bulbos “semilla” de ajo variedad Coreano obtenidos de la temporada 2012-2013, se separaron en dos grupos para almacenarse a temperatura ambiente y 5°C durante cinco semanas; posteriormente, los bulbos se desgranaron, se seleccionaron de acuerdo a su peso (5-6 gramos) y se formaron dos conjuntos de 250 dientes para ser sembrados a doble hilera y 7 centímetros de distancia en un huerto comercial en Rincón de Romos, Aguascalientes. Las prácticas culturales aplicadas fueron las recomendadas por el Consejo de Ajo de Aguascalientes. Cada mes se tomaron 5 plantas al azar de cada tratamiento y cada una de tres réplicas, las cuales se llevaron al laboratorio, donde se separaron las túnicas y hojas aéreas, que fueron congeladas en nitrógeno líquido y se conservaron a -70°C hasta su análisis de compuestos fenólicos, flavonoides y capacidad antioxidante. Para realizar los análisis correspondientes se liofilizaron y molieron las muestras.

4.2.2 Extracción de compuestos fenólicos

La extracción de compuestos fenólicos se llevó a cabo de acuerdo al protocolo descrito por Rivera-Pastrana y col. (2010). Una muestra liofilizada de hoja aérea o de túnica liofilizada de 0.5 g se homogeneizó con 20 ml de metanol al 80% utilizando un equipo Ultra Turrax- T25 durante 60 s a 8000 rpm. El homogeneizado se centrifugó por 30 min a 15700 X g a 4°C, el sobrenadante se colectó y se considera como extracto metanólico (EM) , el precipitado se re suspendió en 20 ml de metanol al 80% y se repitió el procedimiento para colectar aproximadamente 30 ml de extracto, el cual se almacenó a -20°C para la posterior cuantificación de fenoles, flavonoides y determinación de la capacidad antioxidante

4.2.3 Cuantificación de fenoles totales

La cuantificación de totales se llevó a cabo utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu, metodología que se basa en la reacción entre los fenoles presentes y el fosfomolibdato , que se usa como agente oxidante, el resultado es la formación de

un complejo de color azul que presenta absorbancia a 760nm. El fundamento del método es la reacción de transferencia de electrones y medición de la capacidad reductora de la muestra (Kishor, 2005). A 50µl de EM se adicionaron 125µl de reactivo Folin-Ciocalteu al 1N, se agitó durante 5min, se agregaron 625µl de Na₂CO₃ al 20%, 950µl de agua destilada y se dejó reposar 30min. La absorbancia se midió a 760nm en un espectrofotómetro UV-VIS Perkin Elmer modelo Lambda 40, y los resultados fueron calculados en base a una curva patrón de ácido gálico, y fueron expresados en mg equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra en peso seco (mg ácido gálico/gps).

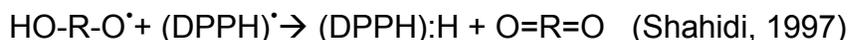
4.2.4 Cuantificación de flavonoides

La cuantificación de flavonoides se llevó a cabo siguiendo el método de Zhishen y col. (1999). Los flavonoides pueden reaccionar con las sales de aluminio, plomo y circonio, produciendo un complejo colorido cuando el compuesto de interés tiene dos grupos orto-hidroxi fenólicos, un 3 hidroxilo, o un 4 ceto-5 hidroxilo. Con el cloruro de aluminio, se observará coloración amarilla (Willow y col., 2011). A 1ml del extracto metanólico se añadieron 4 ml de agua, 300 µl de NaNO₃ al 50% y se agitó por 5 min, se adicionaron 300 µl de AlCl₃ al 10%, se dejó reposar por 1 minuto, se agregaron 2 ml de NaOH 1M y 2.4 ml de agua destilada. La absorbancia se leyó a 415 nm en un espectrofotómetro UV-VIS y los resultados fueron calculados en base a una curva patrón de quercetina, y fueron expresados en mg equivalentes de quercetina por gramo de muestra en peso seco.

4.2.5 Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante se determinó utilizando el método del DPPH. Este reactivo es uno de los pocos radicales de nitrógeno orgánico estable y disponible comercialmente, tras su reacción con la muestra, el radical se reduce y el color de la solución se desvanece. La reacción puede ser medida utilizando un espectrofotómetro (Huang y col., 2005)

La reacción que se lleva a cabo es la siguiente:



A 100 μl del EM se añadieron 3.9 ml de DPPH (absorbancia a 515 nm= 1). La mezcla de reacción se dejó reposar por 30 min y la absorbancia se midió a 515 nm en un espectrofotómetro UV-VIS. Los resultados se expresaron en porcentaje de inhibición.

4.2.6 Análisis de perfil de compuestos fenólicos por HPLC

Aproximadamente 25 ml de EM se concentraron a 2.5 ml en un equipo rotavapor Büchi baño caliente B-490 a 40°C y 110 rpm, el concentrado se filtró en membrana de nylon de 0.2 μm e inyectó a un cromatógrafo de líquidos de alta resolución acoplado a un detector de arreglo de diodos, que registró la absorbancia de la muestra a 280 y 320 nm. Se utilizó un equipo HPLC Waters Alliance 2695 y un detector de arreglo de diodos Waters 2998 equipado con una columna Symetry C₁₈ de 3.5 μm tamaño de partícula y de 4.6 x 100 mm de diámetro y largo respectivamente. Para la separación se utilizaron dos fases móviles; fase A (agua grado HPLC-1% ácido fórmico) y fase B (acetonitrilo 100%) con un gradiente lineal como se establece en el Cuadro 5. El tiempo de corrida para cada muestra fue de 55 min a un flujo de 0.5 mLmin⁻¹, el volumen de inyección fue de 20 μl de EM concentrado.

Cuadro 5. Gradiente de separación de compuestos fenólicos por HPLC-DAD.

Minuto	Flujo (ml/min)	%A	%B
0	0.5	98	2
50	0.5	100	0
55	0.5	98	2

A= agua grado HPLC-1%ácido fórmico, B= acetonitrilo 100%

Se realizó la identificación de los compuestos fenólicos individuales mayoritarios en base al tiempo de retención y máximos de absorción UV-VIS. La concentración se calculó en base a una curva estándar de ácido gálico (Anexo A).

4.2.7 Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para evaluar el efecto de la temperatura de almacenamiento de la semilla sobre las variables respuesta y en los casos en los que resultaron significativos, se realizó una prueba de medias de Tuckey. El análisis se llevó a cabo en el paquete estadístico JMP.

5. RESULTADOS

Dufoo-Hurtado y col. (2013) reportaron que aquellas plantas procedentes de bulbos almacenados a 5°C mostraron un ciclo de desarrollo más corto (158 días después de siembra) en comparación con aquellos bulbos almacenados a temperatura ambiente (200 días después de siembra), lo cual deriva en un tiempo de cosecha menor con una diferencia de tiempo de 6 semanas aproximadamente. Por lo tanto, las cuantificaciones y análisis realizados para las muestras provenientes de “semillas” almacenadas a 5°C difieren dos meses de aquellos resultados presentados para temperatura ambiente.

5.1 Efecto del acondicionamiento a baja temperatura en el contenido de fenoles totales

La temperatura de acondicionamiento de la semilla del ajo tuvo un efecto significativo sobre el contenido de compuestos fenólicos, siendo el tratamiento de 5°C el que mostró mayores valores de fenoles totales durante y al final del desarrollo de los bulbos, aumentando de 3.02 ± 0.03 mg equivalentes de ácido gálico/gramo de muestra en peso seco (mg ácido gálico/gps) a los 44 días después de siembra (DDS) hasta 4.81 ± 0.89 mg ácido gálico/gps a los 144 DDS. En contraste, los valores correspondientes a las muestras derivadas del almacenamiento a temperatura ambiente, disminuyeron su concentración de fenoles de 2.53 ± 0.52 a los 44 DDS a 1.55 ± 0.37 mg ácido gálico/gps a los 206 DDS (Figura9). Cabe mencionar que a los 144 DDS únicamente se muestreó la condición de temperatura de 5°C, siendo además, el último muestreo de la misma.

En el tejido de hoja aérea, la temperatura de almacenamiento de la semilla de ajo no tuvo un efecto significativo sobre el contenido de fenoles totales, sin embargo, después de los 106 DDS se observaron diferencias entre las muestras correspondientes a 5°C y TA. Mientras que en plantas derivadas de ajo almacenado a temperatura ambiente se cuantificaron alrededor de 2mg ácido gálico/gps, en las muestras derivadas de 5°C se cuantificaron 7mg ácido gálico/gps.

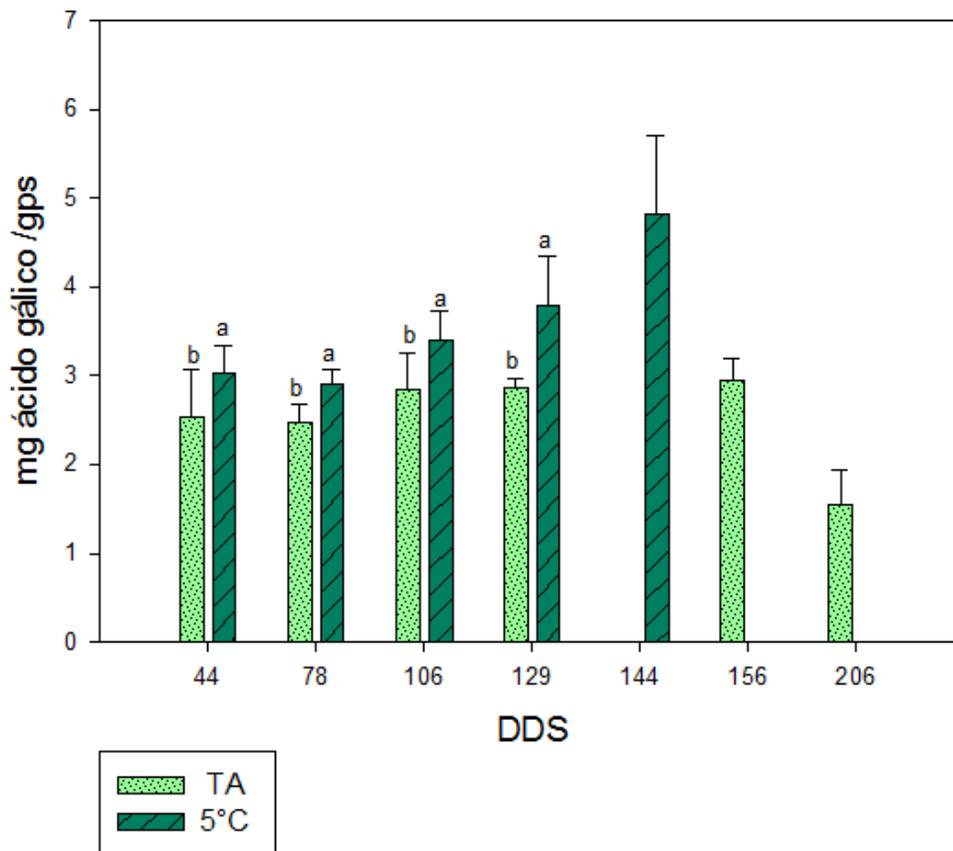


Figura 9. Contenido de fenoles totales (mg ácido gálico/g de muestra en peso seco, gps) en túnica de ajo del acondicionamiento a 5°C y temperatura ambiente (TA) durante el desarrollo (días después de siembra, DDS) Cada barra representa la media de las réplicas \pm el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas. ($p < 0.05$) entre tratamientos.

A los 129 días después de siembra, las hojas de ajo con acondicionamiento a 5°C, presentaron la menor cantidad de compuestos fenólicos, 3.69 ± 0.46 mg ácido gálico/gps, disminuyendo casi por mitad comparado con los contenidos logrados a los 78 DDS, de 6.66 ± 1.59 mg ácido gálico/gps. Por su parte, para el tratamiento TA, se observó un descenso de 7.89 ± 0.52 a 6.45 ± 0.67 mg ácido gálico/gps de inicio al fin del desarrollo (Figura 10).

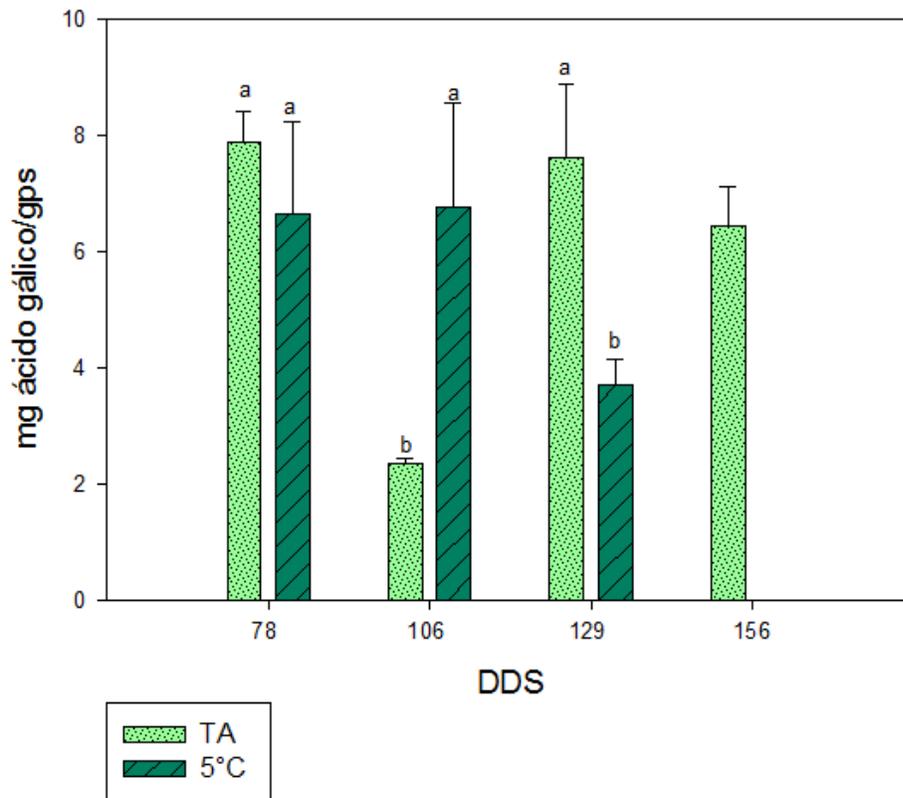


Figura 10. Contenido de fenoles totales (mg ácido gálico/g de muestra en peso seco, gps) en hoja aérea de ajo del acondicionamiento a 5°C y temperatura ambiente (TA) durante el desarrollo (días después de siembra, DDS) Cada barra representa la media de las réplicas \pm el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas. ($p < 0.05$) entre tratamientos.

5.2 Efecto del acondicionamiento a baja temperatura en el contenido de flavonoides

El contenido de flavonoides (mg quercetina/gramo de peso seco, gps) en túnicas de ajo de muestras provenientes de semillas acondicionadas a 5°C y TA durante el desarrollo de las plantas en campo se muestran en la Figura 11. A los 44 y 78 DDS los valores promedio son de 1.2 ± 0.03 , no mostrando diferencias significativas para la “semilla”, sin embargo, a los 106 y 129 DDS las muestras de 5°C mostraron mayor contenido de flavonoides que las de TA, presentando mayor diferencia a los 129 DDS.

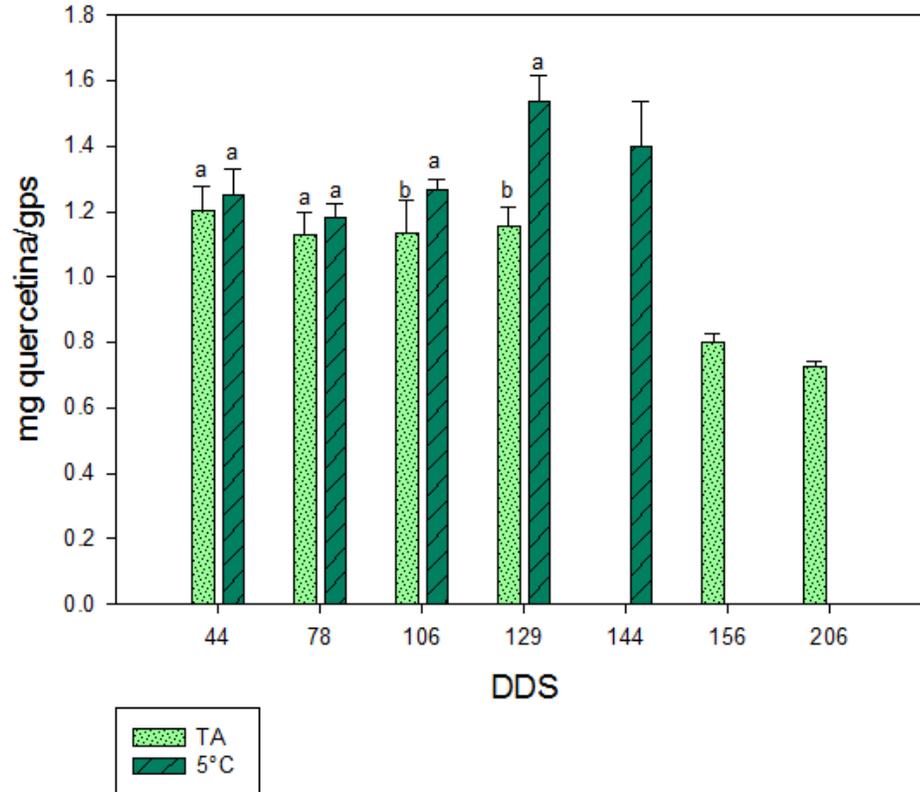


Figura 11. Contenido de flavonoides (mg quercetina/g de muestra en peso seco, gps) en túnica de ajo del acondicionamiento a 5°C y temperatura ambiente (TA) durante el desarrollo (días después de siembra, DDS) Cada barra representa la media de las réplicas \pm el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas. ($p < 0.05$) entre tratamientos.

El contenido de flavonoides en hoja aérea se muestra en la Figura 12. No se observó un efecto general debido al acondicionamiento de temperatura, sin embargo, a partir de los 78 días después de siembra, a los cuales el promedio del contenido de flavonoides es de 7.95 ± 0.31 mg quercetina/gps y hasta los 106, donde el contenido promedio es de 5.10 ± 0.17 mg quercetina/gps, se observó que los tratamientos mostraron diferencias entre sí, siendo este efecto transitorio, ya que a los 129 DDS no se encontraron diferencias

En plantas derivadas del acondicionamiento a 5°C, los valores indicaron una tendencia decreciente desde los 78 DDS de 7.6 ± 0.43 a 4.85 ± 0.49 mg quercetina/gps. A excepción de los 106 DDS, los niveles de flavonoides fueron

mayores para la condición de TA, en la cual, el contenido fue desde 8.26 ± 0.31 a 5.53 ± 0.3307 mg quercetina/gps.

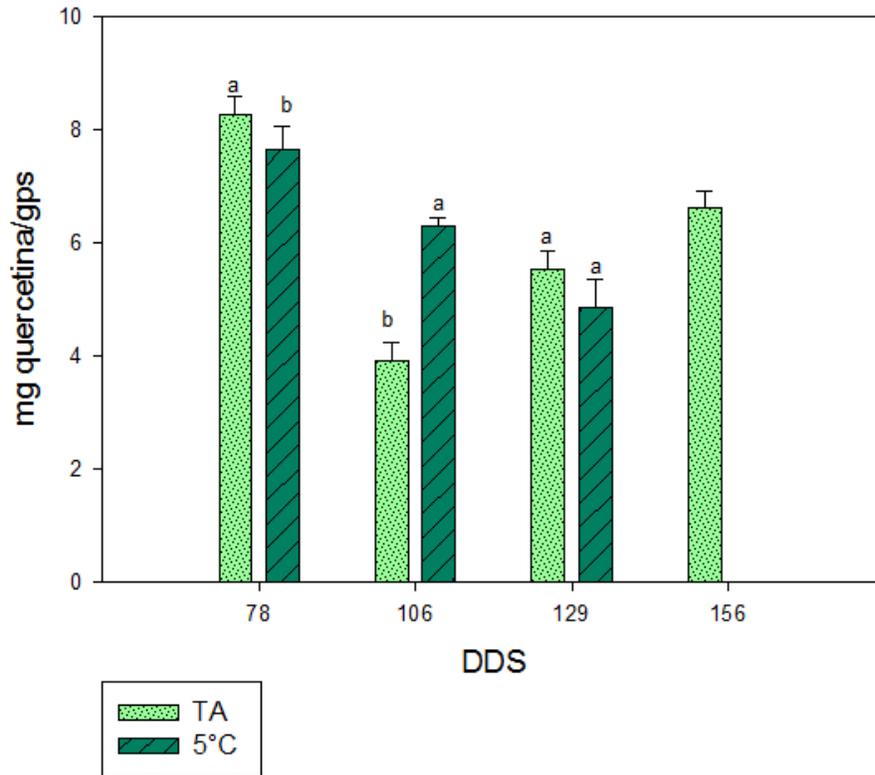


Figura 12. Contenido de flavonoides (mg quercetina/g de muestra en peso seco, gps) en hoja aérea de ajo del acondicionamiento a 5°C y temperatura ambiente (TA) durante el desarrollo (días después de siembra, DDS). Cada barra representa la media de las réplicas \pm el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas. ($p < 0.05$) entre tratamientos.

5.3 Efecto del acondicionamiento a baja temperatura sobre la capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante en túnicas de ajo se vio significativamente afectada por la temperatura a la que se almacenaron las semillas. Este efecto se presentó después de los 78 DDS y hasta la cosecha.

Para las túnicas de plantas derivadas de “semillas” a 5°C, los porcentajes de inhibición fueron mayores a los obtenidos para el tratamiento a TA, y mostraron un

incremento de 8.05 ± 1.03 a 13.04 ± 1.10 %, en comparación a los de TA, que disminuyeron de 7.28 ± 1.27 a 6.20 ± 1.89 % (Figura 13).

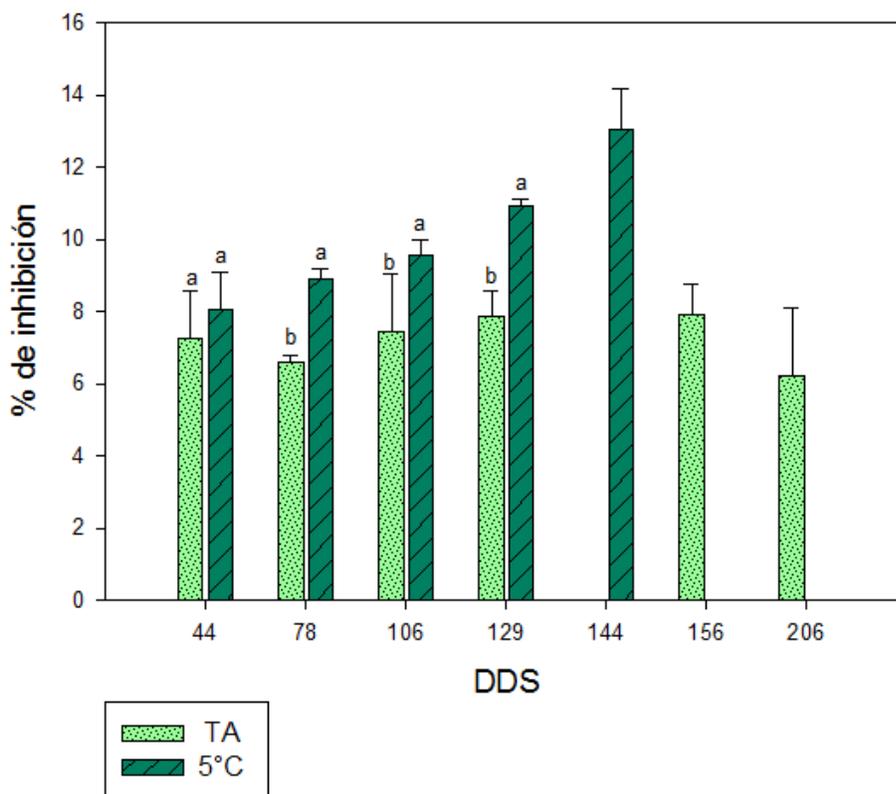


Figura 13. Capacidad antioxidante (% de inhibición) en túnica de ajo del acondicionamiento a 5°C y temperatura ambiente (TA) durante el desarrollo (días después de siembra, DDS). Cada barra representa la media de las réplicas \pm el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas. ($p < 0.05$) entre tratamientos.

La capacidad antioxidante en hoja aérea no se vio significativamente afectada por la temperatura a la que se almacenaron las semillas, sin embargo, a partir de los 106 DDS, se pudieron observar diferencias entre los tratamientos de temperatura de acondicionamiento de la semilla.

Para el acondicionamiento a 5°C, los valores mostraron un valor máximo de porcentaje de 18.78 ± 0.05 a los 106 DDS, mientras que para el tratamiento TA, los porcentajes se vieron disminuidos de 17.07 ± 0.01 a 13.43 ± 0.01 de los 78 DDS a

la cosecha. A excepción del muestreo a los 106 DDS, los porcentajes de inhibición fueron mayores para la condición de TA (Figura14).

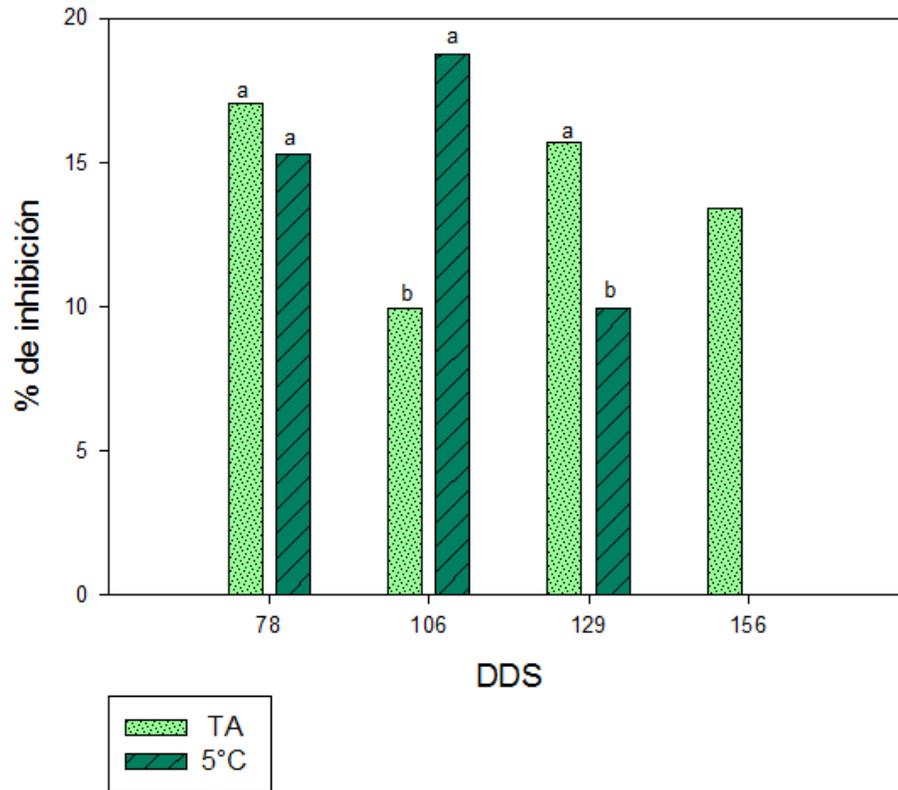


Figura 14. Capacidad antioxidante (% de inhibición) en hoja aérea de ajo del acondicionamiento a 5°C y temperatura ambiente (TA) durante el desarrollo (días después de siembra, DDS). Cada barra representa la media de las réplicas \pm el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas. ($p < 0.05$) entre tratamientos.

En el Cuadro 6 se observan las correlaciones entre contenido de fenoles totales y flavonoides con la capacidad antioxidante obtenida para los tejidos de túnica y hoja aérea de ajo, de plantas derivadas de bulbos de ambas temperaturas de acondicionamiento de su “semilla”.

En el tejido de túnica se encontró una mayor correlación de la capacidad antioxidante con los compuestos fenólicos que con los flavonoides, obteniéndose un máximo de 0.46 para las muestras a 5°C.

Por otro lado, en hoja aérea las correlaciones fueron menores que las que se observaron en el tejido de túnica, y además la correlación con los compuestos fenólicos mostró un mayor valor en la condición de temperatura ambiente.

Cuadro 6. Valores de correlación entre fenoles y flavonoides respecto a la capacidad antioxidante en túnica y hoja aérea de ajo acondicionado a 5°C y TA.

TÚNICA		
	FENOLES TOTALES	FLAVONOIDES
TA	0.1255	0.0167
5°C	0.4658	0.2999
HOJA AÉREA		
	FENOLES TOTALES	FLAVONOIDES
TA	0.3313	0.0141
5°C	0.047	0.0556

5.4 Efecto del acondicionamiento a bajas temperaturas en el perfil de compuestos fenólicos por HPLC

Se analizaron plantas derivadas de ambas condiciones de temperatura de almacenamiento. Las Figuras 15 y 16 muestran los cromatogramas obtenidos de los extractos metanólicos de las túnicas de ajo. Se observaron 6 picos de interés con tiempos de retención descritos en el Cuadro 7, en este mismo cuadro se detallan los tiempos de retención (TR), las longitudes de onda de máxima absorción (λ_{max}) así como el área bajo la curva de cada pico.

Analizando el espectro de absorción de dichos picos se pudo observar que el pico 1 con TR de 16.9 min presentó dos máximos de absorción a λ de 239 y de 329 nm, el pico 2 con TR de 17.65 min a $\lambda = 290$ y 312 nm y el pico 3 con TR de 18.62 min presentó máximos de absorción a $\lambda_{max}=238$ y 322 nm; estos picos se encontraron únicamente en las túnicas provenientes de semillas acondicionadas a 5°C y en las plantas de 106 y 129 DDS. De acuerdo con el espectro UV-VIS el pico número 3 se identificó como ácido ferúlico, ya que mostró valores de absorción a 238 y 322 nm,

coincidiendo con los máximos observados en el espectro del compuesto estándar (Anexo 2).

Los picos 1 ($\lambda_{\max}=239,329$), 2 ($\lambda_{\max}=290,312$) y 3 ($\lambda_{\max}=238$ y 322), se encontraron únicamente a los 106 y 129 DDS, específicamente en las tunicas provenientes de semillas acondicionadas a 5°C . De estos 3 picos, de acuerdo con el espectro UV-VIS correspondiente al número 3, se identificó ácido ferúlico, que mostró máximos de absorción a 238 y 322 nm, coincidiendo con los máximos observados en el espectro del compuesto estándar (Sigma Aldrich) (Anexo B). Mientras que considerando las áreas bajo la curva, la de los picos 1 y 3 aumentaron de $3.63\text{E}+04$ a $9.54\text{E}+04$ $\mu\text{V}\cdot\text{seg}$, y de $9.45\text{E}+04$ a $2.87\text{E}+05$ $\mu\text{V}\cdot\text{seg}$ respectivamente de los 106 a los 129 DDS, mientras que para el pico 2 el área disminuyó de $6.33\text{E}+04$ a $5.59\text{E}+04$ $\mu\text{V}\cdot\text{seg}$ (Cuadro 7).

Por otro lado, el pico 4 con TR de 23.69 min presentó un máximo de absorción a $\lambda=233$ nm, el pico 5 con TR de 24.49 min un máximo a $\lambda=240.3$ nm; estos picos se encontraron en plantas derivadas de ambas temperaturas de acondicionamiento y con 78, 106 y 129 DDS; finalmente el pico 6 con TR de 26.16 min presentó un máximo de absorbancia a $\lambda=262$ nm y se presentó sólo en plantas derivadas de ajos acondicionados a 5°C con 78 y 106 DDS pero no en plantas de 129 DDS; mientras que en plantas derivadas del almacenamiento a TA solo se pudieron identificar en plantas de 106 y 129 DDS.

El Cuadro 7 muestra las áreas bajo la curva de los picos de interés a través del desarrollo de las plantas en campo (78, 106, y 129 DDS).

El pico número 4, de la condición de TA mostró un decremento en el área desde $6.66\text{E}+04$ a $3.89\text{E}+05$ $\mu\text{V}\cdot\text{seg}$, mientras que a temperatura de 5°C se observó un incremento de áreas desde $1.38\text{E}+05$ a $6.02\text{E}+05$ $\mu\text{V}\cdot\text{seg}$ para el tejido de hoja aérea. Para el pico número 5 se observó un comportamiento parecido al 4, ya que para TA, el área disminuyó de $4.67\text{E}+05$ a $5.45\text{E}+04$ $\mu\text{V}\cdot\text{seg}$, en contraste con la condición de 5°C , en la cual aumentó de $5.25\text{E}+05$ a $7.06\text{E}+04$ $\mu\text{V}\cdot\text{seg}$. Por último, el pico 6 se encontró a partir de los 78 DDS en muestras de temperatura de 5°C y

en adelante en ambas condiciones hasta los 129 DDS, observándose que de la misma manera que para los picos 4 y 5, en 5°C se observó un incremento de área de $2.83E+04$ a $7.58E+04 \mu\text{V}\cdot\text{seg}$ y para TA disminuyó de $9.22E+03$ a $7.67E+04 \mu\text{V}\cdot\text{seg}$ (Cuadro 5).

Las concentraciones no pudieron ser calculadas debido a que no se contaban con los estándares y los niveles encontrados fueron muy bajos.

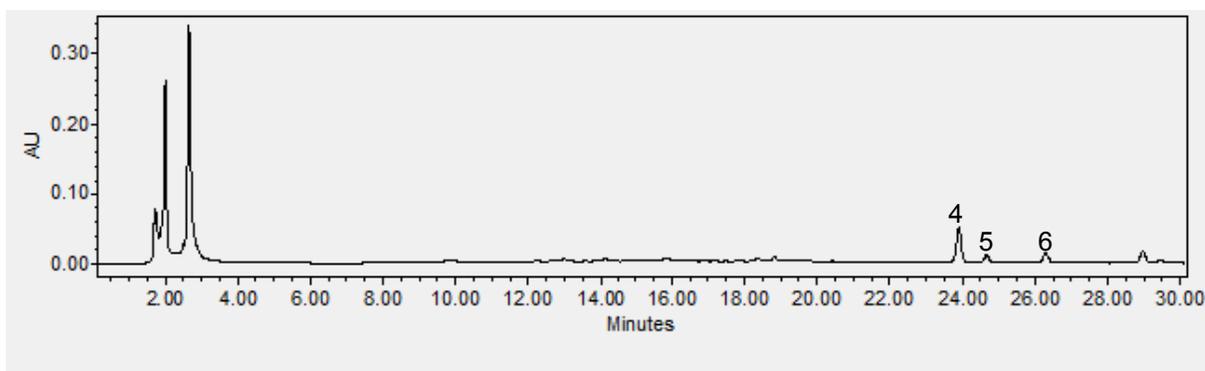


Figura 15. Perfil de compuestos fenólicos obtenido por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC-DAD) de túnica de ajo a temperatura ambiente a los 129 DDS.

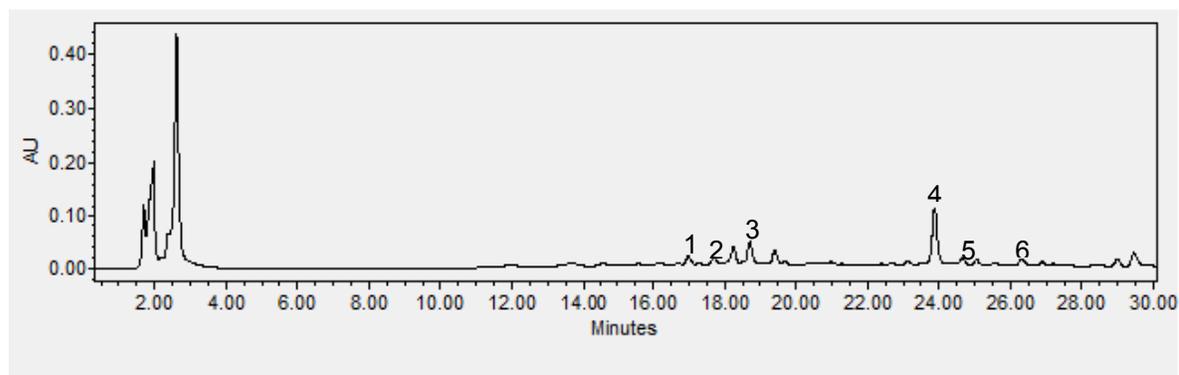


Figura 16. Perfil de compuestos fenólicos obtenido por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC-DAD) de túnica de ajo pre almacenada a 5°C a los 129 DDS.

Cuadro 7. Picos de compuestos fenólicos obtenidos por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC-DAD) en muestras de túnica de ajo durante el desarrollo.

Pico	Tiempo de retención (min)	Muestra	DDS	Abs. Máxima (nm)	Área ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$)
1	16.9	5C	106	239,329	3.63E+04
		5C	129		9.54E+04
2	17.65	5C	106	290,312	6.33E+04
		5C	129		5.59E+04
3	18.62	5C	106	238,322	9.45E+04
		5C	129		2.87E+05
4	23.69	TA	78	232.58	6.66E+04
		5C	78		1.38E+05
		TA	106		6.45E+04
		5C	106		2.36E+05
		TA	129		3.89E+05
		5C	129		6.02E+05
5	24.49	TA	78	240.3	4.67E+05
		5C	78		5.25E+05
		TA	106		4.58E+05
		5C	106		2.36E+05
		TA	129		5.45E+04
		5C	129		7.06E+04
6	26.16	5C	78	261.95	2.83E+04
		TA	106		9.22E+03
		5C	106		4.84E+04
		TA	129		7.67E+04
		5C	129		7.58E+04

TA: acondicionamiento a temperatura ambiente, 5C: acondicionamiento a 5°C, DDS: días después de siembra.

En los cromatogramas obtenidos de los extractos metanólicos de las muestras de hoja aérea de las plantas de ajo, se identificaron los picos presentes a través de los DDS para las condiciones de temperatura de almacenamiento de la semilla a TA (Figura 17) y 5°C (Figura 18).

Para este tejido, se identificaron 7 picos, los cuales fueron cuantificados mediante una curva estándar de ácido gálico (Anexo A), compuesto utilizado debido a que fue uno de los estándares disponibles y a que es uno de los compuestos fenólicos reportados presentes en ajo. De estos picos, el más abundante fue el número 11 (TR=10.78min, λ_{\max} =254,323 nm), con un máximo de concentración de 9.68mg equivalentes de ácido gálico/g de muestra en peso seco*100 a los 78DDS para la condición de 5°C, mientras que los picos menos abundante fueron el 7 (TR= 5.54min, λ_{\max} 233,296nm) y el 10 (TR= 10.54min, λ_{\max} =234,265, 319nm), los cuales se encontraron trazas a través del desarrollo. Se identificó el pico 9 como quercetina de acuerdo con el espectro UV-VIS extraído del cromatograma, que mostró máximos de absorción a 254 y 366 nm, los cuales coinciden con los máximos observados en el espectro del compuesto estándar (Sigma Aldrich) (Anexo B).

Es notorio, que para el acondicionamiento a 5°C, la mayoría de los picos presentaron mayores concentraciones durante el desarrollo, siendo el pico 12 (TR=12.21min, λ_{\max} =265,323nm) el más abundante para esta condición con 9.51 mg equivalentes de ácido gálico/g de muestra en peso seco*100 a los 106 DDS.

Los picos correspondientes al tejido de hoja aérea, presentaron tiempos de retención menores que los correspondientes a los picos en túnicas de ajo, y mientras que para túnica las concentraciones fueron muy bajas para su cuantificación, para hoja aérea los picos fueron cuantificables (Cuadro 8).

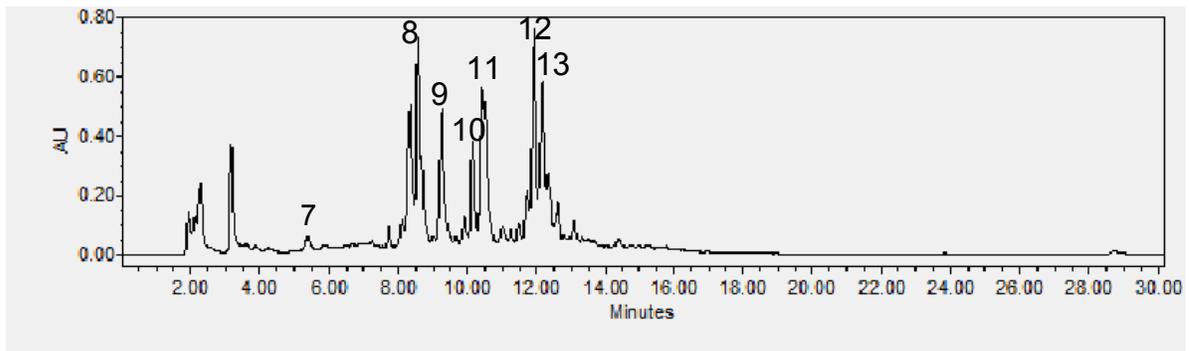


Figura 17. Perfil de compuestos fenólicos obtenido por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC-DAD) en muestra de hoja aérea de ajo a temperatura ambiente a los 78 DDS.

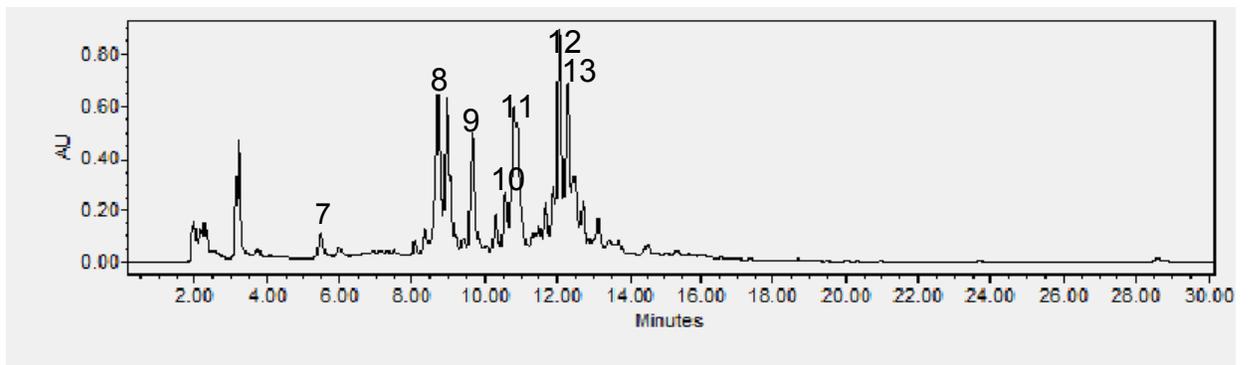


Figura 18. Perfil de compuestos fenólicos obtenido por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC-DAD) en muestra de hoja aérea de ajo pre almacenada a 5°C a los 78 DDS.

Cuadro 8. Picos de compuestos fenólicos obtenidos por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC-DAD) en muestras de hoja aérea de ajo durante el desarrollo.

Pico	Tiempo de retención (min)	Muestra	DDS	Abs. Máxima (nm)	Área ($\mu\text{V} \cdot \text{seg}$)	Concentración ($\frac{\text{mg ácido gálico}}{\text{gps}} \cdot 100$ *)
7	5.54	TA	78	233,296	2.41E+05	ND
		5C	78		5.92E+05	ND
		TA	106		1.04E+06	ND
		5C	106		5.25E+05	ND
		TA	129		1.54E+06	ND
		5C	129		8.36E+05	ND
8	8.81	TA	78	265,316,340	6.66E+06	16.9647
		5C	78		6.56E+06	17.6373
		TA	106		2.57E+06	3.4183
		5C	106		1.88E+06	3.7896
		TA	129		2.20E+06	3.1096
		5C	129		1.73E+06	1.5914
9	9.64	TA	78	254,366.6	3.35E+06	7.0541
		5C	78		2.69E+06	5.3615
		TA	106		1.93E+06	2.0247
		5C	106		2.11E+06	4.7617
		TA	129		3.25E+06	5.8010
		5C	129		3.71E+06	5.9342
10	10.54	TA	78	234,265,319	1.50E+06	ND
		5C	78		8.37E+05	ND
		TA	106		7.72E+05	ND
		5C	106		7.71E+05	ND
		TA	129		6.32E+05	ND

Cuadro 8. Picos de compuestos fenólicos obtenidos por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC-DAD) en muestras de hoja aérea de ajo durante el desarrollo (Continuación).

Pico	Tiempo de retención (min)	Muestra	DDS	Abs. Máxima (nm)	Área ($\mu\text{V} \cdot \text{seg}$)	Concentración ($\frac{\text{mg ácido gálico}}{\text{gps}} \cdot 100$)*
11	10.78	TA	78	254,323	5.32E+06	12.9482
		5C	78		5.76E+06	15.0941
		TA	106		3.44E+06	5.3221
		5C	106		4.26E+06	14.0482
		TA	129		3.85E+07	9.6850
12	12.21	TA	78	265,323	3.26E+06	6.7752
		5C	78		3.94E+06	9.3230
		TA	106		2.80E+06	3.9345
		5C	106		3.21E+06	9.5150
		TA	129		3.64E+06	6.8138
		5C	129		3.01E+06	4.3926
13	12.22	TA	78	248,329	1.99E+06	2.9627
		5C	78		2.55E+06	4.9059
		TA	106		2.00E+06	2.1695
		5C	106		2.15E+06	4.9565
		TA	129		2.76E+06	4.5461
		5C	129		1.75E+06	1.6505

TA: acondicionamiento a temperatura ambiente, 5C: acondicionamiento a 5°C, DDS: días después de siembra, ND: trazas PS: Peso seco.

6. DISCUSIÓN

Dufoo-Hurtado y col. (2013) reportaron que aquellas plantas procedentes de bulbos almacenados a 5°C mostraron un ciclo de desarrollo más corto, lo cual deriva en un tiempo de cosecha menor con una diferencia de tiempo de 6 semanas aproximadamente. Por lo tanto, las cuantificaciones y análisis realizados para muestras provenientes de “semillas” almacenadas a 5°C difieren dos meses de aquellos resultados presentados para temperatura ambiente.

6.1 Efecto del acondicionamiento a baja temperatura en el contenido de fenoles totales

La temperatura de acondicionamiento de las semillas tuvo un efecto significativo sobre los niveles de fenoles totales obtenidos en túnicas de ajo, reflejándose en mayores contenidos para 5°C que para TA. Esto se debe a que el frío impacta en el metabolismo de los compuestos fenólicos, promoviendo su biosíntesis durante el crecimiento de la planta en campo, como lo reportan Dufoo- Hurtado y col. (2013).

La enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) es considerada como la principal enzima en la ruta de los fenilpropanoides, catalizando la transformación por desaminación de la L-fenilalanina en ácido trans-cinámico, que es el intermediario primario en la biosíntesis de fenoles. Esta enzima incrementa su actividad en respuesta al estrés térmico y es considerada por varios autores (Kacperska y col, 1992), (Levine y col., 1994) como una de las principales vías de aclimatación de las plantas contra el estrés (Rivero y col., 2001).

El contenido de fenoles totales obtenidos en muestras provenientes de dientes “semilla” almacenados a 5°C y TA fue similar a lo reportado por Dufoo y col. (2013); a los 129 DDS, las túnicas de plantas provenientes de 5°C presentaron un contenido promedio de 3.78 ± 0.56 y 2.87 ± 0.10 mg ácido gálico/g de muestra en peso seco respectivamente. Dufoo y col., reportaron que a los 122 DDS para la condición de 5°C, el contenido fue de 3.24 ± 0.02 , y a TA 2.61 ± 0.019 mg ácido gálico/g de muestra en peso seco. Sin embargo, en contraste con estos autores,

quienes reportan una tendencia de decremento de los compuestos fenólicos a través del desarrollo de cultivo, los resultados (Figura 7) mostraron que para el acondicionamiento 5C se obtuvo un incremento total de 1.79 mg ácido gálico/g de muestra en peso seco. Probablemente se deba a que además de condiciones de estrés, hay diferentes factores ambientales que pueden provocar un alza en el metabolismo de los fenilpropanoides y en la cantidad de compuestos fenólicos (Michalak, 2006), como podría ser la temperatura del ambiente, de acuerdo con Ibrahim y col. 2011). Con respecto a este factor, el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuaria (2013), reporta el monitoreo del clima de las estaciones cercanas al huerto donde se sembraron las semillas, y para el desarrollo de los ajos utilizados para este estudio, se acumularon más horas de frío durante el crecimiento en comparación con las horas de frío a las cuales estuvieron expuestas los ajos para los cuales reporta Dufoo y col. (2013) los valores mencionados.

En comparación con Bozin y col. (2008), que reportan valores de 0.98 ± 0.004 mg de ácido gálico/g de muestra en peso seco, para extractos preparados a partir de ajo secado por aire, los contenidos de fenoles totales obtenidos para túnicas fueron superiores en todo el desarrollo y a ambas temperaturas, mientras que Beato y col. (2011), reportan un rango de 3.4-10.8 mg de ácido gálico/g de muestra en peso seco para cuatro cultivos de tipo blanco y dos de tipo chino.

Respecto al tejido de hoja aérea, se pudo observar que los valores correspondientes a compuestos fenólicos totales, fueron mayores que los resultados obtenidos para túnicas. Esto se debe probablemente a que las hojas son un tejido fotosintético, y por lo tanto la energía radiante es un factor ambiental de gran importancia. Zhao y col., (2002), reportan que a ciertos rangos de densidad de flujo de fotones, incrementa la absorción de éstos por la clorofila, resultando en un aumento de la fijación de CO_2 . Sin embargo, cuando las hojas presentan esta absorción, excediendo su capacidad de utilizarlos, se generan especies reactivas del oxígeno, la cuales oxidan algunas moléculas causando daño foto-oxidativo. Algunos compuestos fenólicos naturales en las plantas, son efectivos antioxidantes

endógenos, que pueden remover a las especies reactivas de oxígeno. Por lo tanto, la síntesis de estos compuestos en las hojas de la planta se da como defensa a las especies ya mencionadas.

La temperatura de acondicionamiento de la semilla no tuvo un efecto significativo sobre el contenido de fenoles totales en el tejido de hoja. Sin embargo, a los 106 y 129 DDS se pudo observar que hubo diferencias entre los tratamientos de temperatura. Esto podría deberse al efecto del fotoperíodo. Los ajos fueron sembrados en invierno, temporada en la cual las noches son largas y los días cortos, y fueron cosechados en marzo (aquellos que fueron acondicionados a 5°C) y mayo (TA), meses en los cuales, al irse acercando el verano, las noches comienzan a ser más cortas y los días largos, lo cual podría estar influenciando el cambio significativo en los niveles de compuestos fenólicos. Dufoo- Hurtado y col. (2013), reportan que la biosíntesis de compuestos fenólicos podría estar controlada por el fotoperíodo, y por otro lado, del Pozo y col. (2005) reportan que fotoperíodos largos son de gran importancia para los procesos vegetativos y reproductivos en ajo.

Para ambas temperaturas de acondicionamiento de la semilla se observó una tendencia de disminución en el contenido de compuestos fenólicos, lo cual podría ser atribuido a la senescencia de las hojas. Merzlyak y col. (1994) reportan que las hojas en este estado retienen sólo parcialmente su potencial de defensa contra las especies reactivas del oxígeno.

6.2 Efecto del acondicionamiento a baja temperatura en el contenido de flavonoides

La temperatura de acondicionamiento de las semillas tuvo un efecto significativo sobre el contenido de flavonoides en túnicas de ajo, reflejándose en mayores valores para 5°C. Esto es debido a que los flavonoides, al ser compuestos fenólicos y metabolitos secundarios, se ven influenciados por la temperatura. De acuerdo con Winkel-Shirley (2002), la acumulación de flavonoides rojos o morados es una marca de estrés en las plantas.

Mientras que para la condición de temperatura ambiente la cantidad de flavonoides disminuyó durante el desarrollo, para la condición de 5°C se observó un incremento hasta los 129 DDS. Ghasemzadeh y col. (2011) reportan que el estrés por frío tiende a elevar los niveles de flavonoides, siendo sintetizados por la vía de los fenilpropanoides, y utilizando la fenilalanina como componente de partida.

Los valores de flavonoides obtenidos pueden ser comparados con los reportados por Bozin y col. (2008), quienes reportan $6.99 \pm 0.01 \mu\text{g}$ quercetina/g de muestra en peso seco para ajo secado por aire, pudiendo remarcar que en este trabajo, se obtuvieron para ambas condiciones de almacenamiento de semilla y durante las etapas de desarrollo del cultivo, contenidos mayores.

Para el tejido de hoja aérea, los valores presentados fueron hasta 80% mayores que para los de túnicas de ajo. De acuerdo con Winkel-Shirley (2009, recientemente se ha sugerido que estos compuestos proveen a las hojas protección al daño foto-oxidativo, permitiendo de este modo la recuperación de nutrientes durante la senescencia.

Para ambas condiciones de temperatura de almacenamiento de la semilla, se observó un decremento en el contenido de flavonoides a través del desarrollo del cultivo, tendencia que es más visible para 5°C. Pourcel y col. (2007), mencionan que los flavonoides pueden ser oxidados a sus correspondientes semiquinonas y quinonas por enzimas como la polifenol oxidasa y peroxidasa. La oxidación no enzimática de los flavonoides, como auto oxidación y oxidación química, pueden también dar paso a la formación de compuestos quinoidales. Estas actividades se inducen durante el desarrollo de la semilla y de la planta, además también por estrés ambiental. Este complejo modo de acción es regulado a diferentes niveles, involucrando desde mecanismos transcripcionales hasta post traslacionales.

6.3 Efecto del acondicionamiento a baja temperatura sobre la capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante en túnicas de ajo después de los 78 DDS y hasta la cosecha se vio significativamente afectada por la temperatura a la que se almacenaron las semillas.

Las semillas de ajo acondicionadas a 5°C, presentaron mayores porcentajes de inhibición y mostraron un incremento durante el desarrollo de cultivo, en comparación con las semillas acondicionadas a TA, cuyos porcentajes de inhibición mostraron un decremento.

Respecto al tejido de hoja aérea, se observó hasta un 40% mayor capacidad antioxidante en comparación con túnicas de ajo, comportamiento que se observó también en el contenido de fenoles totales y flavonoides. Kirakosyan y col. (2003) mencionan que los tratamientos de estrés pueden aumentar los niveles de metabolitos secundarios importantes, y por lo tanto las capacidades antioxidantes en hojas de las plantas.

La capacidad antioxidante encontrada en este trabajo puede ser comparada con los resultados de Bozin y col. (2008), quienes reportan un valor de IC₅₀ de 4.41mg/ml para extractos metanólicos de ajo secado por aire, y respecto a los cuales, la capacidad antioxidante de ambos tejidos fue menor.

Además también se pudo ver una disminución del porcentaje de inhibición durante el desarrollo del cultivo, lo cual, como ya se mencionó antes pudo deberse a la senescencia del tejido.

En el tejido de túnica se encontró una mayor correlación de la capacidad antioxidante con los compuestos fenólicos que con los flavonoides, y además, se observó una tendencia creciente en la correlación con ambos contenidos, mientras que en hoja aérea las correlaciones fueron menores que las que se observaron en el tejido de túnica, y además la correlación con los compuestos fenólicos mostró un mayor valor en la condición de temperatura ambiente.

Se ha encontrado que las plantas pertenecientes a la familia *Allium*, poseen propiedades antioxidantes, en especial los ajos y sus diferentes extractos. Pennycoke y col. (2005), reportan que existe una relación lineal entre los compuestos fenólicos presentes y la capacidad antioxidante de plantas aclimatadas al frío, sin embargo también mencionan que puede existir alguna interacción de la capacidad antioxidante y otros mecanismos durante la aclimatación. Otros metabolitos endógenos, como los azúcares solubles podrían estar jugando un rol en mediar el estrés.

6.4 Análisis de perfil de compuestos fenólicos por HPLC-DAD

En los cromatogramas obtenidos de los extractos metanólicos de las muestras de túnica de ajo, se identificaron los picos presentes a través del desarrollo del cultivo para las condiciones de temperatura de almacenamiento de la semilla a TA y 5°C. Los picos 1 (TR= 16.9 min, λ_{max} =239 y 329 nm), 2 (TR= 17.65, λ_{max} =290,312) y 3 (TR= 18.62 min, λ_{max} =238, 322.3 nm), se encontraron únicamente a los 106 y 129 DDS, específicamente en las túnicas provenientes de semillas acondicionadas a 5°C. La presencia de estos picos únicamente en la condición de baja temperatura podría indicar respuesta de la planta al estrés por frío, como lo reportan Kaplan y col. (2007), quienes mencionan que la habilidad de las plantas para sobrevivir y recuperarse de condiciones de estrés es una función de mecanismos basales y adquiridos. Este proceso se conoce como aclimatación al frío, e involucra la activación de cambios moleculares, fisiológicos y bioquímicos, dentro de los cuales se encuentran los cambios en la composición de metabolitos.

De estos 3 picos, presentes exclusivamente en la condición 5°C, de acuerdo con el espectro UV-VIS correspondiente al número 3, se identificó el compuesto como ácido ferúlico, con máximos de absorción a 238 y 322 nm, coincidiendo con los máximos observados en el espectro del estándar inyectado y además con el espectro de absorción UV-VIS reportado por Mathew y col. (2008), para una solución de ácido ferúlico en etanol.

Los picos 4 (TR= 23.69 y λ_{\max} =232.58), el 5 (TR=24.49 min y λ_{\max} =240.3) y el pico 6 (TR= 26.16 min y λ_{\max} =262) se encontraron constantes de los 78 a los 129 DDS en las muestras de ambas temperaturas de acondicionamiento, y mostraron una tendencia clara en la cual para la condición de TA, las áreas de los picos presentaron un decremento a través del desarrollo mientras que para la condición de 5°C, los picos incrementaron sus áreas. Como se mencionó previamente, el estrés por frío induce a la acumulación de compuestos fenólicos en la planta activando su biosíntesis e inhibiendo su oxidación, lo cual es un mecanismo de aclimatación, de acuerdo con Rivero y col. (2001).

Para el tejido de hoja aérea, se identificaron 7 picos, de entre los cuales, de acuerdo con el espectro de absorción UV-VIS del pico 9, se puede sugerir que el compuesto al que pertenece es quercetina, flavonol que muestra máximos de absorción a 254 y 366 nm, los cuales coincidieron con los máximos observados en el espectro UV-VIS del estándar inyectado y con los espectros UV-VIS reportados para este flavonoide por Yao y col. (2004).

Se pudo observar, además, que para el acondicionamiento a 5°C, la mayoría de los picos presentaron mayores hacia el final del desarrollo. Esto se debe a que el frío impacta en el metabolismo de los compuestos fenólicos, promoviendo la biosíntesis de compuestos fenólicos durante el crecimiento de la planta en campo.

Los valores de concentración obtenidos para hoja aérea fueron superiores a los obtenidos para túnicas de ajo, en las cuales los compuestos se encontraron en cantidades trazas. Esto se debe probablemente a que las hojas son un tejido fotosintético, y que como ya se había mencionado, algunos compuestos fenólicos naturales en las plantas son efectivos antioxidantes endógenos, que pueden remover a las especies reactivas de oxígeno. Por lo tanto, la síntesis de estos compuestos en las hojas de la planta se da como defensa a las especies ya mencionadas (Zhao y col., 2002).

7. CONCLUSIONES

Se determinó el efecto del acondicionamiento de la semilla a baja temperatura en la producción de metabolitos secundarios durante el desarrollo de ajo variedad Coreano, siendo la condición de 5°C la que presentó mayor cantidad de compuestos fenólicos, flavonoides y por lo tanto una mayor actividad antioxidante en el tejido de túnica en comparación con las plantas provenientes de semillas que fueron almacenadas a temperatura ambiente. Por otro lado, en hoja aérea, este acondicionamiento no tuvo un efecto claro sobre el contenido de estos metabolitos secundarios durante el desarrollo de la planta.

La correlación entre la capacidad antioxidante y los compuestos fenólicos observada en túnica fue mayor que la obtenida con los flavonoides. Sin embargo, en este tejido ambos valores fueron superiores para la condición de temperatura de 5°C respecto a temperatura ambiente. Por otro lado la hoja aérea presentó menor correlación entre capacidad antioxidante con fenoles totales y flavonoides en comparación con túnica, encontrándose además un mayor valor para la condición de temperatura ambiente en el caso de compuestos fenólicos.

El perfil de compuestos fenólicos en túnica de ajo, obtenido por cromatografía de líquidos de alta resolución también se vio modificado por la baja temperatura, en el cual se observaron cambios composicionales y también en las áreas de los picos, observándose así una mayor cantidad de compuestos fenólicos en las túnicas provenientes de semillas almacenadas a 5°C, mientras que en el tejido de hoja aérea, este efecto de la temperatura en el perfil no fue perceptible.

En conclusión, el almacenamiento del diente “semilla” de ajo a baja temperatura induce un aumento en la síntesis de compuestos fenólicos, flavonoides y capacidad antioxidante de túnicas y hojas aéreas de ajo (*Allium sativum* L.) variedad Coreano durante su desarrollo en campo y en la cosecha, síntesis que sucede como respuesta de aclimatación a la condición de estrés por frío en la cual se encuentra esta semilla al ser acondicionada a 5°C

8. REFERENCIAS.

Beato, V. M., Orgaz, F., Mansilla, F., & Montaño, A. (2011). Changes in phenolic compounds in garlic (*Allium sativum* L.) owing to the cultivar and location of growth. *Plant foods for human nutrition*,66(3), 218-223.

Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., Goran, A., & Igic, R. (2008). Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae). *Food chemistry*,111(4), 925-929

Chen, C., Pung, D., Leong, V., Hebbar, V., Shen, G., Nair, S., ... & Kong, A. N. T. (2004). Induction of detoxifying enzymes by garlic organosulfur compounds through transcription factor Nrf2: effect of chemical structure and stress signals. *Free Radical Biology and Medicine*,37(10), 1578-1590.

Del Pozo, A. L., & González, M. I. A. (2005). Developmental responses of garlic to temperature and photoperiod. *Agricultura Técnica*,65(2), 119-126.

Dufoo-Hurtado, M. D., Zavala-Gutiérrez, K. G., Cao, C. M., Cisneros-Zevallos, L., Guevara-González, R. G., Torres-Pacheco, I., ... & Mercado-Silva, E. M. (2013). 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. *Journal of agricultural and food chemistry*,61(44), 10439-10446.

Dykes, L., & Rooney, L. W. (2007). Phenolic compounds in cereal grains and their health benefits. *Cereal Foods World*,52(3), 105-111.

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database. Reference. Consulta: 2011. URL: <http://faostat3.fao.org/home/E>

Fonegra, R., Gómez, G., Jiménez R. 2007. Plantas medicinales aprobadas en Colombia. Universidad de Antioquia.

Ghasemzadeh, A., & Ghasemzadeh, N. (2011). Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *Journal of medicinal plants research*, 5(31), 6697-6703.

Giaconi, V. Escaff, M. 1976. Cultivo de hortalizas. Decimoquinta edición. Santiago de Chile. Editorial Universitaria: 103

Hertog, M.G. Hollman, P. H., & Katan, M. B. (1999). Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food and Chemical Toxicology*, 37(9), 937-942.

Huang D, Ou B, Prior R. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem* (2005); 53:1841-1856.

Ibrahim, M. H., Jaafar, H. Z., Rahmat, A., & Rahman, Z. A. (2010). The relationship between phenolics and flavonoids production with total non structural carbohydrate and photosynthetic rate in *Labisia pumila Benth.* under high CO₂ and nitrogen fertilization. *Molecules*, 16(1), 162-174.

IICA. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. 1982. Cultivo de ajo colorado, análisis de costos y evaluación económica para una hectárea. Tomo V. IICA Biblioteca Venezuela.

INIFAP. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Consulta 2010. URL: <http://clima.inifap.gob.mx/redclima/clima/>.

Ishizawa, K., Yoshizumi, M., Kawai, Y., Terao, J., Kihira, Y., Ikeda, Y., ... & Tamaki, T. (2011). Pharmacology in health food: metabolism of quercetin in vivo and its protective effect against arteriosclerosis. *Journal of pharmacological sciences*, 115(4), 466-470

Johnson, Ian, Gary Williamson. Phytochemical Functional Foods. CRC Press. 2003

Kacperska, A. (1992). Water potential alterations--a prerequisite or a triggering stimulus for the development of freezing tolerance in overwintering herbaceous plants?. *Advances in plant cold hardiness*/edited by Paul H. Li, Lars Christersson.

Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., & Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*,47(10), 3954-3962.

Kaplan, F., Kopka, J., Sung, D. Y., Zhao, W., Popp, M., Porat, R., & Guy, C. L. (2007). Transcript and metabolite profiling during cold acclimation of *Arabidopsis* reveals an intricate relationship of cold-regulated gene expression with modifications in metabolite content. *The Plant Journal*,50(6), 967-981.

Keusgen, M., H. D. Rabinowitch, and L. Currah. "Health and alliums." *Allium* crop science: recent advances (2002) 357-378.

Kim, S. M., Kubota, K., & Kobayashi, A. (1997). Antioxidative activity of sulfur-containing flavor compounds in garlic. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 61(9), 1482-1485.

Kishor, S. Environmental Monitoring. APH Publishing. Nueva Delhi. 2005

Kirakosyan, A., Seymour, E., Kaufman, P. B., Warber, S., Bolling, S., & Chang, S. C. (2003). Antioxidant capacity of polyphenolic extracts from leaves of *Crataegus laevigata* and *Crataegus monogyna* (Hawthorn) subjected to drought and cold stress. *Journal of agricultural and food chemistry*,51(14), 3973-3976.

Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., & Lamb, C. (1994). H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*,79(4), 583-593.

Masuda, T., Hidaka, K., Shinohara, A., Maekawa, T., Takeda, Y., & Yamaguchi, H. (1999). Chemical studies on antioxidant mechanism of curcuminoid: analysis of radical reaction products from curcumin. *Journal of agricultural and food chemistry*,47(1), 71-77.

Merzlyak, M. N., & Hendry, G. A. F. (1994). Free radical metabolism, pigment degradation and lipid peroxidation in leaves during senescence. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh. Section B. Biological Sciences*, 102, 459-471.

Michalak, A. (2006). Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish Journal of Environmental Studies*,15(4), 523.

Nuutila, A. M., Puupponen-Pimiä, R., Aarni, M., & Oksman-Caldentey, K. M. (2003). Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity. *Food Chemistry*,81(4), 485-493.

Nonnecke, L. 1989. Vegetable Production. Macmillan of Canadá. Canadá: 313.

Otunola, G. A., Oloyede, O. B., Oladiji, A. T., & Afolayan, A. J. (2010). Comparative analysis of the chemical composition of three spices—*Allium sativum* L. *Zingiber officinale* Rosc. and *Capsicum frutescens* L. commonly consumed in Nigeria. *African Journal of Biotechnology*,9(41), 6927-6931.

Pourcel, L., Routaboul, J. M., Cheynier, V., Lepiniec, L., & Debeaujon, I. (2007). Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends in plant science*,12(1), 29-36.

Prasad, K., Laxdal, V. A., Yu, M., & Raney, B. L. Antioxidant activity of allicin, an active principle in garlic. *Molecular and cellular biochemistry*. **1995** 148: 183-189.

Purseglove, J. Tropical crops: Monocotyledons. (1985). El ajo en México: mejoramiento genético y tecnología de producción, ed. Heredia, G.E. SAGAR, INIFAP, Campo experimental Bajío.

Quintero-Fabián, S., Ortuño-Sahagún, D., Vázquez-Carrera, M., & López-Roa, R. I. (2013). Alliin, a garlic (*Allium sativum*) compound, prevents LPS-induced inflammation in 3T3-L1 adipocytes. *Mediators of inflammation*.

Quiroga, O. T. El cultivo del ajo. **1999.** Plural editores. Bolivia, 70-73.

Rauha, J. P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kähkönen, M., Kujala, T., & Vuorela, P. (2000). Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing

flavonoids and other phenolic compounds. International journal of food microbiology, 56(1), 3-12.

Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free radical biology and medicine, 20(7), 933-956.

Rivera-Pastrana, D. M., Yahia, E. M., & González-Aguilar, G. A. (2010). Phenolic and carotenoid profiles of papaya fruit (*Carica papaya* L.) and their contents under low temperature storage. Journal of the Science of Food and Agriculture, 90(14), 2358-2365.

Rivero, R. M., Ruiz, J. M., Garcia, P. C., López-Lefebvre, L. R., Sánchez, E., & Romero, L. (2001). Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. Plant Science, 160(2), 315-321.

Roby, M. H. H., Sarhan, M. A., Selim, K. A. H., & Khalel, K. I. (2013). Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. Industrial Crops and Products, 43, 827-831.

Schäfer, G., & Kaschula, C. H. (2014). The immunomodulation and anti-inflammatory effects of garlic organosulfur compounds in cancer chemoprevention. Anti-cancer agents in medicinal chemistry, 14(2), 233.

Shahidi, F. 1997. Natural Antioxidants: Chemistry, Health effects and applications. AOCS press.

SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Estadística básica: Agricultura. Consultas: **2010-2011**. URL: <http://infosiap.siap.gob.mx/>

Siurana, P. S., Breijo, F. J. G., & Caselles, J. R. 1997. Biología y Botánica. Ed. Univ. Politéc. Valencia.

Utrilla, V. 2008. Efecto del almacenamiento de la “semilla” y del metil jasmonato en el desarrollo y calidad de bulbos de ajo (*Allium sativum* L.) (tesis de maestría). Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México.

Villanueva, G., & Corven, J. 1992 Taller Regional Centroamericano y Consulta sobre Planificación de Investigación Hortícola: 5-8 noviembre 1991. IICA Biblioteca Venezuela.

Wang, J., Cao, Y., Sun, B., & Wang, C. (2011). Characterisation of inclusion complex of trans-ferulic acid and hydroxypropyl- β -cyclodextrin. Food Chemistry, 124(3), 1069-1075.

Willow, J. 2011 Traditional Herbal Medicine Research Methods: Identification, analysis, bioassay and pharmaceutical and clinical studies. Wiley .

Winkel-Shirley, B. (2002). Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. Current opinion in plant biology, 5(3), 218-223.

Yao, L., Jiang, Y., Datta, N., Singanusong, R., Liu, X., Duan, J., ... & Xu, Y. (2004). HPLC analyses of flavanols and phenolic acids in the fresh young shoots of tea (*Camellia sinensis*) grown in Australia. Food Chemistry, 84(2), 253-263.

Zhao, H. J., & Zou, Q. (2002). Protective effects of exogenous antioxidants and phenolic compounds on photosynthesis of wheat leaves under high irradiance and oxidative stress. Photosynthetica, 40(4), 523-527.

Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food chemistry, 64(4), 555-559.

ANEXOS

Anexo A. Curva de calibración de ácido gálico en HPLC-DAD para cuantificación de mg ácido gálico/gps

Cuadro A.1. Concentraciones utilizadas para realizar curva estándar de ácido gálico.

Concentración de ácido gálico (mg/ μ l)	Área del pico (μ V*seg)
0	0
0.01	911490
0.02	3769017
0.05	9908144
0.1	17034937
0.2	32260332
0.5	72238097

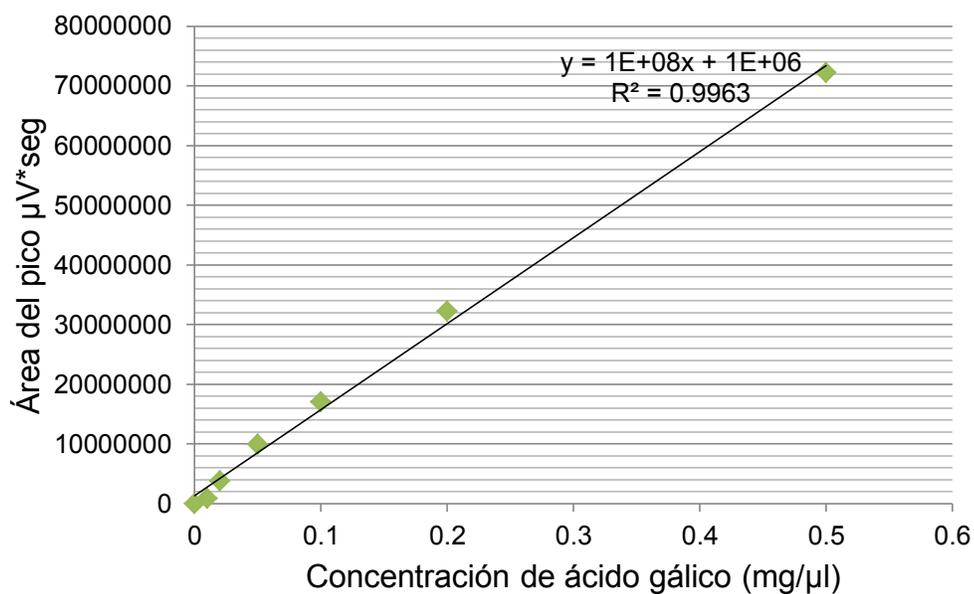


Figura A.1. Curva de Calibración de ácido gálico.

Anexo B. Espectros UV-VIS de los compuestos ácido ferúlico y quercetina

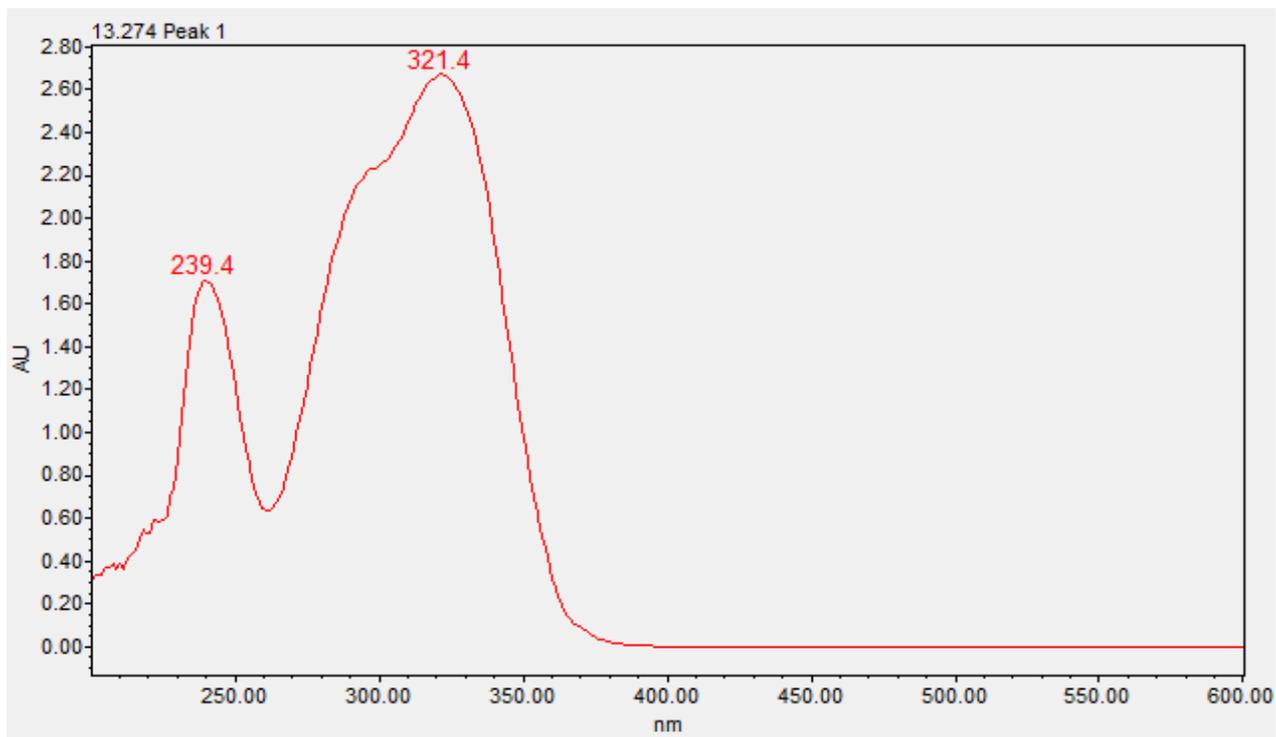


Figura B.1. Espectro UV-VIS de compuesto estándar de ácido ferúlico, AU= unidades de absorbancia.

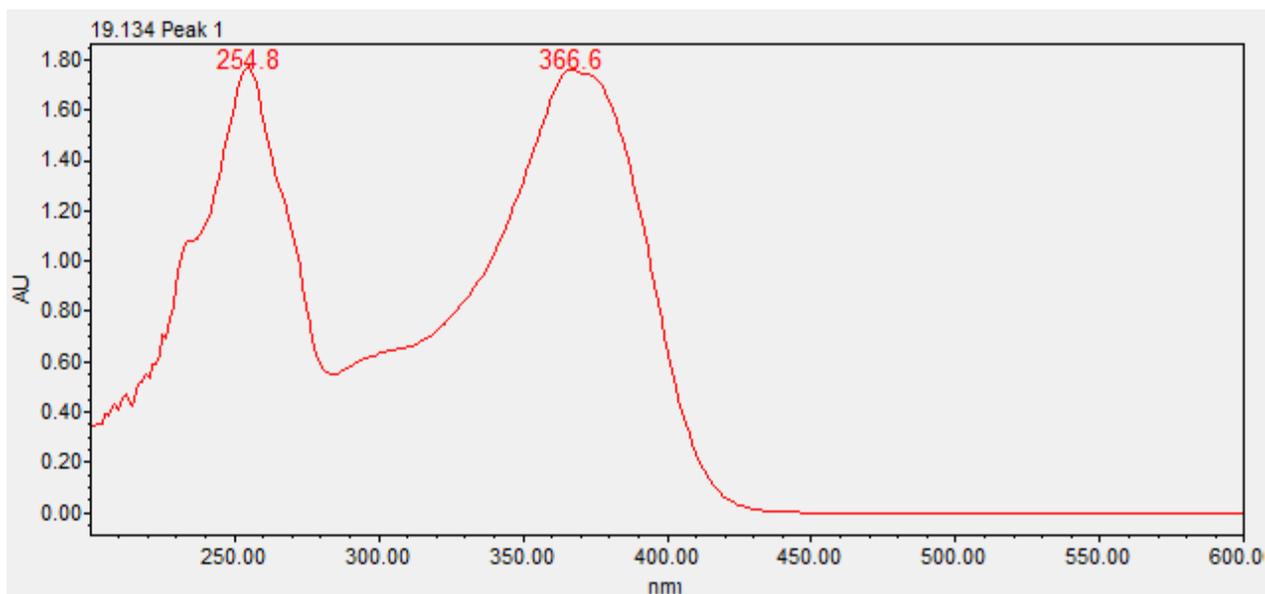


Figura B.2. Espectro UV-VIS de compuesto estándar de quercetina, AU= unidades de absorbancia.