

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

**DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**



**“Determinación espectrofotométrica del contenido de alicina
presente en extractos de ajo obtenidos por ultrasonido a diferente
temperatura de sonicación.”**

Por:

GLORIA MARILIN NIGENDA CHANONA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:
INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

“Determinación espectrofotométrica del contenido de alicina presente en extractos de ajo obtenidos por ultrasonido a diferente temperatura de sonicación.”

Por:

GLORIA MARILIN NIGENDA CHANONA

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Aprobado por el comité de Asesoría:



Dra. Dolores Gabriela Martínez Vázquez

Director Interno



Dra. Judith Amador Hernández

Director Externo

Buenavista, Saltillo, Coahuila México.

Junio 2021

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

“Determinación espectrofotométrica del contenido de alicina presente en extractos de ajo obtenidos por ultrasonido a diferente temperatura de sonicación.”

Por:

GLORIA MARILIN NIGENDA CHANONA

TESIS

Que se somete a la consideración del H. Jurado examinador como requisito para obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Aprobado por:

Dra. Dolores Gabriela Martínez Vázquez
Presidente

Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez
Vocal

M.C. Sarahí del Carmen Rangel Ortega
Vocal Suplente

Dra. María Hernández Gonzalez
Vocal

Dr. José Dueñez Alanís
Coordinador de la
División de Ciencia Animal

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Junio 2021

DEDICATORIA

Esta tesis se la dedico con todo mi amor y respeto, primeramente a Dios.

Dios, tu amor y tu bondad no tienen fin, me permites sonreír ante todos mis logros que son resultado de tu ayuda, y cuando caigo y me pones a prueba, aprendo de mis errores y me doy cuenta de los pones en frente mío para que mejore como ser humano, y crezca de diversas maneras. Este trabajo de tesis ha sido una gran bendición en todo sentido y te lo agradezco padre, y no cesan mis ganas de decir que es gracias a ti que esta meta está cumplida. Gracias por estar presente no solo en esta etapa tan importante de mi vida, sino en todo momento ofreciéndome lo mejor y buscando lo mejor para mi persona. Cada momento que he vivido durante todos estos años, son simplemente únicos, cada oportunidad de corregir un error, la oportunidad de que cada mañana puedo empezar de nuevo, sin importar la cantidad de errores y faltas cometidas durante el día anterior.

A mi padre George Nigenda Morales y Alba Ruth Chanona Diaz.

Esta tesis va dedicada con todo mi amor, a los dos seres más maravillosos que la vida me pudo dar. Mis Padres, a ustedes les debo lo que soy, sin ustedes no hubiera llegado hasta acá y no hubiera logrado mi sueño. El amor recibido, la dedicación y la paciencia con la que cada día se preocupaban mis padres por mi avance y desarrollo de esta tesis, es simplemente único y se refleja en la vida de un hijo. Gracias a mis padres por ser los principales promotores de mis sueños, gracias a ellos por cada día confiar y creer en mí y en mis expectativas, gracias a mi madre por estar dispuesta a acompañarme cada larga y agotadora noche de estudio, gracias mamita por estar siempre conmigo, por apoyarme, aconsejarme y por los ánimos virtuales que me brindabas, hacían que volviera a seguir adelante con muchas ganas.

Gracias a mi padre por siempre desear y anhelar siempre lo mejor para mi vida, gracias por cada consejo y por cada una de sus palabras que me guiaron durante mi vida, gracias papito de mi corazón porque a pesar de las circunstancias me

brindabas tu apoyo incondicional. Gracias a Dios por la vida de mis padres, también porque cada día bendice mi vida con la hermosa oportunidad de estar y disfrutar a lado de las personas que sé que más me aman, y a las que yo sé que más amo en mi vida. Gracias a la vida por este nuevo triunfo. Y por ustedes va todo esto con mucho amor.

A mis hermanos

Fabiola, Itzayana, Yordi Leonardo y Davicito, les agradezco por acompañarme en este duro camino, por apoyarme desde principio hasta fin por ser tan buenos y admirables y sobre todo por darme tanto amor. Son lo mejor que la vida me ha dado, sin duda mi mejor ejemplo de amor y trabajo duro, gracias por estar aquí conmigo son sin duda lo mejor de lo mejor.

*Sin olvidar a mis cuñados **Mauricio** y **Chuy** que siempre confiaron en mí, que a pesar de la distancia me brindaron su apoyo y sus consejos, más que mis cuñados son como hermanos mayores.*

¡Gracias!

AGRADECIMIENTO

A mis profesores

Por enseñarme el verdadero valor de la vida, por guiarme para ser cada día mejor persona, gracias por ejercer tan bella profesión y sembrar siempre conocimiento, por compartir ante mí vivencias únicas y enseñanzas magníficas, quiero expresar mis más sinceros sentimientos de gratitud y mis infinitas gracias.

*Quiero de manera especial agradecer a la **Dra. Dolores Gabriela Martínez Vázquez** a quien hago llegar mi más sincero agradecimientos, por permitirme ser partícipe de uno de sus proyectos dentro de la Universidad y por su entrega incondicional durante el desarrollo de este trabajo de investigación, por confiar en*

mí, para realizar este proyecto, por haber sido muy paciente y haber sido esa persona que con sus directrices pudo explicarme aquellos detalles para culminar mi tesis. Gracias por sus enseñanzas.!!

*Y por último pero no menos importante, quiero agradecer de corazón a la **M.C. Alma Leticia Martínez Herrera** por las muchas veces que me ayudo durante el tiempo que trabajé en el laboratorio, le agradezco por a verme transmitido sus conocimientos. No tengo suficientes palabras de agradecimiento para expresarle lo que sus enseñanzas significaron para mí durante la parte experimental de mi tesis.*

¡GRACIAS TOTALES!

RESUMEN

El creciente interés por el uso de sustancias nutraceuticas de origen natural sugiere un estudio sistemático sobre la extracción y caracterización de los principales componentes activos contenidos en las plantas. Entre los productos vegetales de gran interés en la medicina tradicional, se encuentra el ajo (*Allium Sativum L.*) debido a su composición nutricional y química ya que dentro de su estructura cuenta con minerales, vitaminas, lípidos y proteínas importantes para una adecuada nutrición.

Entre los constituyentes de mayor actividad biológica del ajo destaca la alicina, compuesto sulfurado altamente inestable responsable de sus propiedades farmacológicas, además de su olor característico. Debido a la elevada degradabilidad de alicina, es importante el establecimiento de un método eficiente de extracción y de cuantificación que pueda ser usado en procesos de control de calidad en la industria de suplementos alimenticios. En este trabajo se describe un el método de extracción de alicina por ultrasonido.

La presente investigación tuvo como objetivo principal determinar la concentración de alicina presente en extractos acuosos de *Allium sativum L.* obtenidos a partir de bulbos de ajo con buenas características organolépticas sometidos a un proceso de extracción por sonicación a diferentes temperaturas y tiempos de exposición.

INDICE DE CONTENIDO

VII

INDECE DE TABLAS.....	6
INDICE DE FIGURAS	6
CAPITULO I	1
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 JUSTIFICACIÓN	2
1.2 OBJETIVOS	3
1.2.1 OBJETIVO GENERAL	3
1.2.2 OBJETIVO ESPECIFICOS.....	3
1.3 HIPÓTESIS.....	3
CAPÍTULO II	4
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1.1 Ajo (<i>Allium sativum</i> L.).....	4
2.1.2 Composición nutrimental.....	5
2.1.3 Composición química	6
2.2 Compuestos sulfurados de ajo.....	7
2.2.1 Aliína.....	8
2.2.3 Enzima alinasa	8
2.3 Tiosulfatos	9
2.4 Alicina	10
2.5 Métodos de Extracción de Productos Naturales.....	11
2.5.1 Métodos tradicionales.....	11
2.5.2 Métodos no convencionales	14
2.5.2.1 Extracción asistida por microondas	14
2.5.2.2 Extracción por fluidos supercríticos.....	14
2.5.2.3 Extracción turbo.....	15
2.5.2.4 Calentamiento óhmico.....	15
2.5.2.5 Extracción asistida por ultrasonido.....	15
2.6 Variables del proceso extractivo	17
2.6.1 Tamaño de partícula	17
2.6.2 Agitación.....	17

2.6.3 Temperatura.....	17
2.6.4 pH	VIII
2.6.5 Naturaleza del solvente	
2.6.6 Tiempo de extracción.....	18
2.7 Métodos Analíticos.....	18
2.7.1 Cromatografía.....	19
2.7.2 Espectrometría de masas	19
2.7.3 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)....	19
2.7.4 Espectrofotometría UV-visible.....	20
2.7.5 Extracción en Fase Sólida (SPE por sus siglas en inglés)	20
CAPÍTULO III.....	21
3. MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1 Materiales.....	21
3.2 Reactivos y Equipos	22
3.3 Métodos.....	22
3.4 Análisis Estadístico	24
CAPÍTULO IV	24
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
5. CONCLUSIÓN	28
6. ANEXOS	30
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

INDECE DE TABLAS

	IX
Tabla 1. Taxonomía del ajo.....	4
Tabla 2. Composición nutricional del ajo.....	6
Tabla 3. Compuestos Sulfurados.....	7
Tabla 4 Contenido de alicina presente en extractos acuosos de ajo sometidos a diferentes tiempos de sonicación, y distintas temperaturas.	24

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de la aliína (Guapulema M, 2013).	8
Figura 3. Equipo Soxhlet (Azuola y col.2007)	13
Figura 4. Etapas del metodo SPE (CromLab S.L. 2014).....	21
Figura 5. Ajo (<i>Allium Stativum</i>).....	21
Figura 6. Efecto de la temperatura en el contenido de alicina	25
Figura 7. Contenido de alicina presente en extractos acuosos de ajo sometidos a diferentes temperatura y tiempo de sonicación.....	27

CAPITULO I

1. INTRODUCCIÓN

La especie *Allium Sativum L.* conocida comúnmente como ajo ha hecho parte del desarrollo de la humanidad desde hace más de 5000 años. No solo por sus usos alimenticios sino por sus diversas propiedades que benefician al ser humano. Entre los productos vegetales de gran interés en la medicina tradicional, el ajo es un producto natural empleado, desde la época de los egipcios, en la prevención y/o el tratamiento de una gran diversidad de enfermedades. Entre los principales componentes activos contenidos en el ajo podemos mencionar la alicina que es un compuesto organosulfurado (López T., 2007).

El ajo es una planta herbácea perenne, cultivada generalmente en regiones tropicales y de gran aplicación culinaria y terapéutica. La planta de ajo crece cerca de 100 cm y está constituida por hojas largas, estrechas y planas; pequeñas flores blancas y una estructura bulbosa comestible compuesta principalmente por agua (65%), carbohidratos (28%) y proteínas (2%). (Kuetze, 2017).

Adicionalmente es considerado uno de los bulbos más importantes debido a su contenido de metabolitos secundarios con una amplia gama de propiedades nutracéuticas, entre ellos la alicina, que es un compuesto sulfurado muy inestable responsable de la mayoría de las propiedades farmacológicas además del olor característico de este bulbo.

La alicina (S-2-propenil éster del ácido 2-propenol-1- sulfino) representa típicamente el 70% de los compuestos sulfurados presentes en ajo fresco, siendo así el tiosulfinato de mayor abundancia en la planta. Es importante mencionar que los compuestos sulfurados no solo contribuyen a las características organolépticas del ajo, sino que también le otorgan propiedades medicinales, tales como anticancerígenas, antiinflamatorias, antimicrobianas, antioxidantes, hipotensoras, hipocolesterolemiantes, entre otras (Madariaga y col., 2020).

En este trabajo se propone el uso de la técnica de ultrasonido como una alternativa de extracción de alicina a partir de la sonicación de material vegetal usando agua como disolvente, variando el tiempo de exposición y generando extractos acuosos con diferente contenido de alicina, la cual será cuantificada mediante espectrofotometría UV-visible. Cabe mencionar que previo a la cuantificación del analito de interés, cada extracto se somete a un proceso de preconcentración del analito mediante la técnica de extracción en fase sólida (SPE, por sus siglas en inglés).

1.1 JUSTIFICACIÓN

Dicha investigación se realiza con la finalidad de obtener un extracto lo más natural libre de trazas de disolventes orgánicos, al mismo tiempo hay que tomar en cuenta que los compuestos sulfurados presentes en el ajo (*Allium sativum L.*), en especial la alicina, poseen diversas propiedades nutracéuticas benéficas para la salud. Sin embargo, la mayor parte de estos compuestos son altamente inestables y termolábiles, lo que dificulta el estudio de sus propiedades.

Sobre la base de estos antecedentes, se considera que la optimización de un método rápido y eficiente (minimizando las pérdidas y la degradación) para la extracción de los principales compuestos activos será de gran utilidad para permitir la diversificación del uso de este recurso natural renovable.

La importancia del método de extracción radica en el rendimiento del extracto. Se busca un método que, con un bajo costo operativo, genere un extracto con un alto porcentaje de alicina, así como la facilidad del mecanismo de extrapolarse a una escala piloto.

Por lo tanto, se utilizará un método de extracción por ultrasonido ya que es una técnica rápida, con un bajo consumo de disolvente, y en donde se tiene un control de los parámetros de extracción, como lo es la temperatura y tiempo de sonicación. Encontrando las condiciones óptimas de extracción en función de la mayor concentración de alicina presente en los extractos.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar espectrofotométricamente el contenido de alicina de extractos acuosos obtenidos mediante sonicación a diferentes temperaturas y tiempos de exposición.

1.2.2 OBJETIVO ESPECIFICOS

- I. Obtener extractos acuosos de ajo, mediante la técnica de ultrasonido a diferentes temperaturas y tiempos de sonicación.
- II. Concentrar los extractos mediante la técnica de extracción en fase sólida (SPE).
- III. Determinar el contenido de alicina mediante la técnica espectrofotometría UV-Visible.

1.3 HIPÓTESIS

La técnica de ultrasonido es una alternativa para la obtención de alicina presente en extractos acuosos de ajo, y puede ser determinada mediante técnicas espectrofotométricas.

CAPÍTULO II

2. ANTECEDENTES

2.1.1 Ajo (*Allium sativum* L.)

El ajo cuya denominación científica es *Allium sativum* L. es una especie de la familia liliáceas, su fruto es un bulbo sólido que está formado de otros bulbillos de cara plana y convexa, que termina en punta en ambos extremos. El tallo erguido, cilíndrico; hojas lisas, estrechas, aquilladas; las flores son blanquizas o rojizas. El género *Allium* está formado por más de 300 especie de plantas, encontrándose entre ellos *Allium sativum*, que se caracteriza por su olor característico; en la Tabla 1 se muestra su taxonomía.

Tabla 1. Taxonomía del ajo

Reino	Plantae
División	Magnoliopyta
Clase	Liliopsida.
Familia	Amaryllidaceae
Género	Allium
Especie	Allium sativum L.

Ref. Mamani E, Mercado M. (2018)

Esta especie ha existido desde tiempos muy antiguos, utilizados por diversas generaciones como condimento y como planta medicinal. (López, 2018). Su uso se remonta a los comienzos de la humanidad, aproximadamente 3000 años a. C. era utilizado para combatir la parasitosis y prevenir epidemias. Ha sido mencionado en papiros egipcios que datan de aproximadamente el año 1500 a. C., y en los que se mencionan varios usos: cefaleas, trastornos cardíacos, parásitos y tumoraciones (Banerjee S. K. y col., 2003).

Lograr identificar su origen exacto con certeza no se ha podido definir, lo único verdadero y fundamentado en la historia de la humanidad, es su cercanía con las grandes civilizaciones, de ahí se puede concluir que desde su origen ha pasado

por diferentes continentes logrando adaptarse de manera exitosa a climas y suelos dando como resultado diferentes variedades, las cuales radican principalmente por los diferentes mecanismos que se han utilizada para su conservación. Para el año 2014 la producción mundial dedicada a este cultivo fue de 1.547.38 t, el país principal productor fue China con el 80% de cobertura, ocupando el segundo lugar España con un 57% (Galves, 2017).

En México la producción de ajo es de 74 651 toneladas con un crecimiento de 11.58%; mientras que la superficie sembrada es de 9 400 hectáreas. Por otro lado, hay que mencionar que debido a estas cualidades esta hortaliza es considerada como uno de los cultivos más importantes en México, asimismo, en el país la mayor producción de ajo se concentra en el estado de Zacatecas donde se cultiva más del 50 por ciento del total a nivel nacional, seguido de Guanajuato y Baja California quienes ocupan el segundo y tercer lugar con una producción de 16 por ciento y siete por ciento del total respectivamente; el resto se cultiva en Aguascalientes y en Sonora, que en conjunto con los otros estados aportan más del 90 por ciento. Cabe resaltar que tan sólo en Zacatecas se producen cerca de 30 mil toneladas de ajo al año. (Velásquez Valle y col, 2010).

2.1.2 Composición nutrimental

El bulbo de ajo (*Allium sativum*), contiene una elevada proporción de agua (65%). Presenta como componentes mayoritarios los siguientes (Panchi Medina, L. F. 2016):

- Carbohidratos: caracterizados por la presencia de fructosa.
- Compuestos azufrados.
- Proteínas, aminoácidos libres, derivados fenólicos y fibra.
- Minerales como (fósforo, potasio, azufre, zinc) y en pequeñas cantidades (calcio, magnesio, sodio, hierro, manganeso).
- Saponinas, junto con niveles moderados de selenio y vitaminas A y C.

En la Tabla 2 se muestra la composición nutricional del ajo. Cabe mencionar que este bulbo contiene minerales como selenio y germanio, citral, geraniol, linalool, α -fellandreno, aldehídopropiónico, valeraldehído.

Tabla 2. Composición nutricional del ajo.

Componente	Contenido por cada 100g
Agua	67.8%
Proteína	3.5%
Lípidos	0.3%
Carbohidratos	27.4%
Fibra	0.7%
Cenizas	1%
Calcio	18 mg
Fósforo	88 mg
Hierro	1.5
Sodio	18 mg
Potasio	373 mg
Tiamina	0.24 mg
Riboflavina	0.05 mg
Niacina	0.4 mg
Vitamina C	10 mg
Ácido nicotínico	0.9 mg

Ref. Panchi Medina, L. F. (2016)

El ajo es un alimento nutricionalmente atractivo por sus componentes anteriormente mencionados, los cuales han sido de suma importancia para los consumidores a nivel mundial, por su uso como especia o condimento; así como para el cuidado ya que se le ha atribuido vínculos con el tratamiento de cuadros de origen infeccioso por su contenido compuestos bioactivos antimicrobianos.

2.1.3 Composición química

El ajo se ha considerado como una fuente abundante de alicina, un compuesto organosulfurado y el sustrato principal para la enzima alinasa que, una vez liberado de su compartimiento intracelular por daño o lisis celular, lo transforma en tiosulfato de alicina, sustancia inestable, incolora y ópticamente activa, responsable del olor característico del ajo, que además ejerce o tiene varias propiedades terapéuticas. (Camacho P, Villca R.2018).

Adicional a la alicina, el ajo también es fuente de y compuestos no volátiles con propiedades medicinales y terapéuticas como las amidas, óxidos de nitrógeno,

compuestos fenólicos, flavonoides, proteínas, saponinas y sapogeninas, con propiedades antioxidantes (Petropoulos y col, 2018).

2.2 Compuestos sulfurados de ajo

De acuerdo con la literatura reportada, los compuestos organosulfurados más importantes del ajo son aliina, ajoeno, alicina, y tiosulfatos, 8 alil mercaptano, sulfuro de dialilo, s-alil-cisteína (ver Tabla 3).

Tabla 3. Compuestos Sulfurados.

Característica	Compuesto	Actividad biológica
Hidrosolubles	S-alil-cisteína S-alil-mercaptocisteína S-metilcisteína γ -glutamyl-cisteína	Hipocolesterolemiantes, antioxidantes, quimioprotectores frente al cáncer. Favorecen la acción desintoxicante del hígado Frente a sustancias químicas.
Liposolubles	Sulfuro dialílico, Disulfuro dialílico (dialil disulfuro) Alicina (Oxido de disulfuro dialílico) Trisulfuro dialílico Trisulfuro alilmetílico Aliína Ditiína Viniloditiínas Ajoeno	Antibiótico, antifúngico, antiviral. Desintoxicante Anticancerígeno, previene daños químicos del ADN Hipocolesterolemiantes, previene la arterosclerosis, antitumoral Hipotensora, Hipoglucemiante Anti-inflamatorio, vasodilatador, hipotensor, antibiótico

Ref. Betancourt, C., y col. (2010).

Estos compuestos generan su actividad bioactiva a través de la liberación de compuestos azufrados siendo la alicina destacada como la sustancia con mayor actividad biológica del ajo, la cual se libera al momento de cortar o triturar este producto vegetal. El contenido total de sulfuros en el ajo es de aproximadamente 1.0% en peso seco y 0.35% en peso fresco.

Entre los compuestos sulfurados del ajo, la alicina ha ocupado el lugar más destacado por considerarse la sustancia con mayor actividad biológica. Sin embargo, en los últimos años investigaciones han demostrado que compuestos azufrados solubles en agua podrían ser más bioactivos (Alonso J., 2007).

2.2.1 Aliína

La aliína es un compuesto inodoro, estable y la más abundante del ajo fresco. En su estructura química consta de un grupo alil, sulfóxido y cisteína (Figura 1). El bulbo de ajo entero tiene de 7 a 14 mg de aliína por gramo de peso fresco (0,7 – 1,4%) y de 18 a 42 mg/g de peso seco (1,8 a 4,2%). La aliína se cristaliza en solución de etanol o acetona, siendo estable en soluciones acuosas y altas temperaturas. Cuando las células se rompen, la aliína es atacada por la enzima alinasa y en promedio de 10 segundos, la aliína se convierte en un nuevo producto, que es la alicina y sus derivados, los cuales son los responsables del aroma característico del ajo fresco. (Guapulema M, 2013).

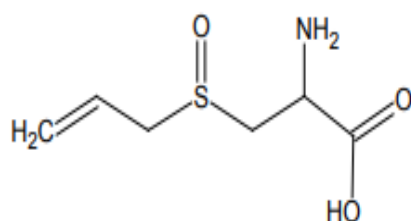


Figura 1. Estructura química de la aliína (Guapulema M, 2013).

2.2.3 Enzima alinasa

Es una de las enzimas que se encuentra en varias especies del género *Allium*, como en el caso de *Allium sativum* “ajo”. Contiene de 10 a 12% de proteínas solubles, se encuentra en el interior de los dientes de ajo, puesto que esta enzima se activa a pH 4.5 y 9, al mismo tiempo puede ser activada de manera irreversible a un pH 1.5 a 3. La temperatura óptima de activación de la alinasa es entre 35 y 37°C, empezando a decrecer su actividad enzimática a temperaturas mayores de 42°C, quedando completamente inactiva a más de 60°C (Jiménez F y col, 2018).

2.3 Tiosulfinatos

Los tiosulfinatos y sus compuestos derivados son, en gran medida, responsables de la bioactividad de estas plantas. Esta bioactividad ha sido demostrada a través de múltiples mecanismos incluyendo algunos asociados con sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas (Guillamón Enrique,2020).

2.3.1 Formación

Se forman al momento de cortar, triturar, machar o agregar agua al ajo deshidratado. La alicina alil-SS(O)-alil representa el 70 al 80% del total de tiosulfinatos formados, seguido de los tiosulfinatos alilSS-(O)- metil del 6 a 16% y el metil-SS-(O)-alil del 3 al 9%, entre otros con menos porcentajes. (López M. 2018)

Los tiosulfinatos se forman cuando el ajo es cortado o triturado, o cuando se agrega agua al ajo deshidratado (Méndez L. L. y Castaigne F., 2008).

La alicina representa el 70-80% del total de tiosulfinatos formados, seguido por los tiosulfinatos, alil-SS(O)-metil (6-16%), metil-SS(O)-alil (3-9%), trans-1-propenil-SS(O)-alil (1-7%), alil-SS(O)-trans-1-propenil (0.2-4%), trans-1-propenil-SS(O)-metil y metil-SS(O)-trans-1-propenil (0.1-2.5%), y metil-SS(O)-metil (2%).

La formación de alicina, se completa en 0.2-0.5 minutos a temperatura ambiente, mientras que la formación del metil tiosulfinato termina en 1.5-5 min. Los alil tiosulfinatos representan entre el 95 y 98% del total de los tiosulfinatos, y los metil tiosulfinatos entre el 10 y el 30% del total (Betancourt y col. 2010).

2.3.2 Estabilidad

Los tiosulfinatos son compuestos muy reactivos y experimentan un gran número de transformaciones que dependen de variables como la temperatura, el pH y las condiciones de extracción. Los alil-S-tiosulfinatos son considerados los compuestos sulfurados menos estables del ajo, porque tienden a formar tioacroleína ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}=\text{S}$) y alil mercaptano (alil-SH) como intermediarios para reacciones posteriores. En cambio, los alil-S(O) tiosulfinatos, son estables debido a que no pueden formar tioacroleína.

La velocidad de formación de los sulfuros incrementa considerablemente al someter a calentamiento al ajo. Los estudios del ajo en fresco, el deshidratado y el aceite de ajo indican que los trisulfuros se forman primero, seguidos por la lenta formación de algunos disulfuros, que son tan estables como los tetrasulfuros. A la temperatura de 100°C o más, se forman compuestos poli-sulfuros que contienen más de 5 átomos de azufre (Betancourt y col. 2010).

2.4 Alicina

La alicina es el principio activo con la mayor actividad biológica del ajo, representa cerca del 70% de todos los tiosulfonatos, que se forman cuando el ajo se tritura o se machaca. La alicina se produce por la interacción de la aliína con la enzima alinasa, siendo la alicina el principio activo más importante de los compuestos biológicamente activos que se encuentran en los bulbos de ajo triturado o machacado (López M, 2018).

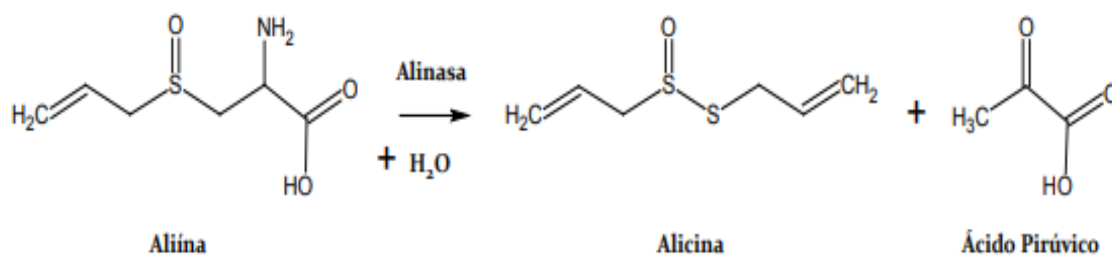


Figura 2. Reacción química de la formación de alicina (López 2018).

Para el caso del ajo deshidratado, a pesar de que la aliína y la enzima aliinasa sufren el proceso de secado a un se conserva el potencial de formación de alicina cuando entran en contacto con el agua (Bhagyalakshmi y col., 2005).

Enseguida, la alicina experimenta degradación en forma rápida, permitiendo la formación de nuevos compuestos sulfurados tales como sulfuro de dialílico, disulfuro de dialilo y trisulfuro de dialilo. Asimismo, en presencia del calor, la alicina puede transformarse en ajoeno y viniloditiínas.

Entre las propiedades nutraceuticas atribuidas a este compuesto, destacan su accion antitrombotica, hipotensora, antimicrobiana, antifungica, anticarcinogenica, antitumorogenica e inmunomoduladora (Lopez T., 2007).

Dado que la alicina es un compuesto altamente inestable y de reaccion oxidante, es facilmente transformada en otros compuestos azufrados tales como sulfuro, disulfuro y trisulfuro dialilico.

La vida promedio de la alicina a temperatura ambiente, en 1 mM de acido citrico con un pH 3 es de 10 dias, 4 dias en agua, 30hrs en diclorometano, 48 hrs en metanol o cloroformo, 24hrs en etanol o acetonitrilo, 3hrs en eter, 2h en hexano, y 16hrs en la ausencia de solventes (Lawson L. D., 2005).

Los compuestos obtenidos del ajo pueden variar segun las condiciones de temperatura, pH y el metodo de extraccion empleado.

Entonces para el analisis de los compuestos sulfurados, el empleo de solventes polares en el proceso de extraccion permite la estabilizacion de la mayoria de ellos, incluyendo la alicina.

2.5 Métodos de Extracción de Productos Naturales

La extraccion de un producto natural se puede realizar empleando numerosas tecnicas, siendo la mas habitual, comoda y rapida la maceracion. En esta extraccion solido-liquido se puede utilizar tanto agua como cualquier disolvente organico junto con el vegetal troceado.

2.5.1 Métodos tradicionales

2.5.1.1 Extracción líquido-líquido

La Extraccion liquido - liquido, tambien conocida como extraccion por disolventes, es una operacion unitaria que permite la recuperacion de un soluto de una solucion a partir de la mezcla de dicha solucion con un solvente. El fundamento de esta separacion es la diferencia de solubilidad del compuesto a extraer en dos diferentes solventes. Es utilizando una configuracion de flujo continuo, en la que se produzca la interaccion directa de las fases acuosa y organica, para llevar a cabo la transferencia del compuesto de interes (analito o interferente) desde una

de ellas a la otra. Además de esto, el sistema debe incluir como parte esencial un mecanismo eficiente de separación de las fases, de manera que al menos la fase donde se va a llevar a cabo la detección quede completamente libre de la otra y, de esta forma, no se produzcan interferencias por una separación incompleta (Richter, P, 1999).

La extracción líquido-líquido se lleva a cabo en dos etapas:

- Mezcla íntima del solvente de extracción con la mezcla de líquidos miscibles a procesar.
- Separación de la mezcla en dos fases líquidas inmiscibles.

2.5.1.2 Extracción sólido-líquido

La extracción Sólido-Líquido es una operación básica en la que uno o varios componentes de una fase sólida se transfieren a una fase líquida: "disolvente". El componente o componentes que se transfieren se denominan "solute" y el sólido insoluble "inerte" (Fito Suñer, 2018).

La extracción sólido-líquido es una operación cuya finalidad es la separación de uno o más componentes contenidos en una fase sólida, mediante la utilización de una fase líquida o disolvente. El componente o componentes que se transfieren de la fase sólida a la líquida reciben el nombre de soluto, mientras que el sólido insoluble se denomina inerte. (Ibarz R. A. y col 2005).

2.5.1.3 Método Soxhlet

Es un tipo de material de vidrio utilizado para la extracción de compuestos, generalmente de naturaleza lipídica, contenidos en un sólido, por medio de un solvente afín. El equipo está integrado por un extractor, un condensador especial de tipo bulbo y un matraz. Funciona cíclicamente, cuando se evapora el solvente sube hasta el área en donde es condensado; aquí al caer y regresar a la cámara de solvente, va separando los compuestos, hasta que se llega a una concentración deseada (Azuola y col.2007).

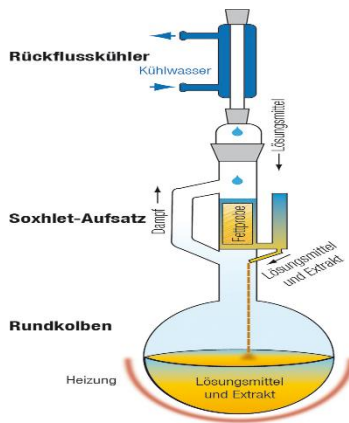


Figura 3. Equipo Soxhlet (Azuola y col.2007)

2.5.1.4 Destilación convencional

Es la operación de separar, mediante calor, los diferentes componentes líquidos de una mezcla, aprovechando las diferencias de volatilidades de los compuestos por separar. Los tipos más comunes son la hidrodestilación y la destilación por arrastre de vapor.

Hidrodestilación: La hidrodestilación es el método convencional empleado para la obtención de aceites esenciales de plantas, flores, fragancias y pigmentos antes del análisis por cromatografía de gases. La energía de microondas, por otra parte reduce considerablemente el tiempo de calentamiento. La hidrodestilación es un método de extracción de aceites esenciales en el cual el material está sumergido en agua en ebullición, la característica principal de este proceso es el contacto directo del agua y el material del cual se extraerá el aceite esencial. (Valencia Juliao Hugo, 2015)

Arrastre de vapor: Es una de las técnicas más comunes que permite la separación de sustancias ligeramente volátiles e inmiscibles en agua por medio de una destilación a baja temperatura. Es particularmente útil cuando la sustancia hierve a una temperatura superior a los 100°C y se descompone por debajo de su punto de ebullición o cuando se quiere separar una cantidad relativamente pequeña de una sustancia que se encuentra mezclada con gran cantidad de sólidos o productos alquitranosos y donde la destilación, filtración y extracción son difíciles o

impracticables. El proceso en si consiste en una vaporización a temperaturas inferiores a las de ebullición de cada uno de los componentes volátiles por efecto de una corriente directa de vapor de agua, el cual ejerce las funciones de calentar la mezcla hasta su punto de ebullición y disminuir la temperatura de ebullición por adición de la tensión del vapor que se inyecta a la de los componentes volátiles como podría ser en el caso de los aceites esenciales (Ruiz Antezana, 2017).

2.5.2 Métodos no convencionales

2.5.2.1 Extracción asistida por microondas

La irradiación de microondas causa movimiento moléculas por migración de iones y rotación de dipolos que contribuyen a una rápida transferencia de energía al solvente y materia vegetal (Azuola y col, 2007).

Las microondas, por su naturaleza, son radiaciones electromagnéticas no ionizantes, con una frecuencia que oscila entre los 0,3 y 300 GHz, correspondiente a una longitud de onda de 1 m a 1 mm, que se caracteriza por desplazarse en forma de ondas sinusoidales. Su principal efecto, cuando interactúan con un material receptivo, es de naturaleza térmica, la extracción asistida por microondas mediante disolvente consiste en el calentamiento de este último en contacto con la muestra. El proceso implica la perturbación de los enlaces por puente de hidrógeno, como resultado de la rotación de dipolos por la radiación en las moléculas y la migración de iones; con la consiguiente penetración del solvente en la matriz, y transporte al seno del líquido de los componentes (Salomón Izquierdo y col.,2013).

2.5.2.2 Extracción por fluidos supercríticos.

Un fluido supercrítico es cualquier sustancia a una temperatura y presión sobre su punto crítico termodinámico. Tiene una habilidad única para difundirse a través de los sólidos como un gas y de disolver materiales como un líquido, generando solventes de baja viscosidad, altas tasas de difusión y sin tensión superficial. Se utilizan principalmente, dióxido de carbono y agua. Se puede realizar una

extracción selectiva de diferentes compuestos utilizando distintas presiones del fluido supercrítico (Azuola y col, 2007).

2.5.2.3 Extracción turbo

Utiliza un agitador de la alta velocidad, que induce cavitación hidrodinámica, aumentando el rendimiento de extracción ya que se aumenta el contacto entre el material vegetal y el solvente y el proceso de difusión a través de las paredes celulares se incrementa (Azuola y Col, 2007).

2.5.2.4 Calentamiento óhmico

El calentamiento óhmico es un proceso cuidadoso y continuo para el calentamiento de productos, en especial para productos en trozos como frutas, verduras, especias y otros alimentos. El calentamiento se lleva a cabo mediante corriente eléctrica, actuando el producto como resistencia eléctrica.

Se aplican descargas eléctricas a la mezcla de extracción, incrementando la extracción hasta un 25% al formarse burbujas de cavitación (Azuola y col.2007).

2.5.2.5 Extracción asistida por ultrasonido

Utiliza sonidos de alta frecuencia, con el fin de desprender el compuesto buscado del material vegetal. Las partículas sólidas y líquidas y se aceleran ante la acción ultrasónica, como el resultado el soluto pasa rápidamente de la fase sólida al solvente.

Esta técnica es la más económica y tiene los requerimientos instrumentales más bajos entre las últimas técnicas de extracción desarrollada. (Azuola y Col.2007).

La agitación con ultrasonido usa el principio de sonidos cuya frecuencia es inaudible para el oído humano pero son de magnitud muy alta. Esta técnica, constituye una manera económica, simple y eficaz de producir una disolución en muestras sólidas (Azuola y Col.2007).

La extracción asistida por ultrasonido se basa en el uso de la energía ultrasónica para asegurar una mayor eficiencia en el contacto entre la muestra y el solvente de extracción, permitiendo rápidas extracciones de compuestos orgánicos en matrices líquidas y sólidas, minimizando el volumen de la muestra procesada y la

cantidad de solvente. Se define ultrasonido como una forma de energía que viaja en ondas de sonido iguales o mayores a 20000 vibraciones por segundo, dichas ondas de alta intensidad permiten que se produzca un cambio permanente en los medios tratados. Las colisiones entre las burbujas de cavitación constituyen la primera fuente de los efectos químicos y mecánicos de la energía de ultrasonido. La extracción ultrasonido involucra una serie de parámetros que afectan su efectividad, entre ellos se encuentra:

- La frecuencia: Las frecuencias del ultrasonido altas, del orden de los MHz dificulta la producción de burbujas de cavitación, es por ello por lo que la alta frecuencia debe ir junto a una alta intensidad de sonido para asegurarse que las fuerzas de cohesión del medio líquido sean vencidas y se cree el vacío.
- La intensidad: La cual es proporcional a la amplitud de la vibración de la fuente de ultrasonido. Un aumento en la amplitud de vibración producirá un incremento en la intensidad de vibración aumentando el efecto fotoquímico.
- El solvente: Debe ser mínimamente inhibitorio. Cuanto mayor sea su viscosidad y tensión superficial será más difícil la obtención de las burbujas de cavitación.
- Temperatura: La cavitación se obtiene mejor a bajas temperaturas con la generación del ultrasonido constante.
- Tiempo de extracción: Tiempos mayores al óptimo causa una reducción en las recuperaciones obtenidas, probablemente por la degradación del compuesto o a degradación del solvente, causada por las ondas ultrasonido (Martínez Barrantes, L. D. 2020).

Dentro de las ventajas del uso de la agitación con ultrasonido se encuentran la rapidez, el control de los parámetros de extracción, además de llevarse a cabo la agitación y extracción de modo simultáneo. Sin embargo, la principal desventaja de este método es el alto costo del equipo.

2.6 Variables del proceso extractivo

Las variables que interfieren en el proceso de extracción, independientemente del tipo de producto final, son: el tamaño de partícula, la agitación, la temperatura, el pH, la naturaleza del solvente y el tiempo de extracción.

2.6.1 Tamaño de partícula

La eficiencia del proceso extractivo será mayor cuando el tamaño de las partículas sea menor, ya que así se tiene una mayor área de contacto con el solvente. Aunque, la presencia de partículas muy finas dificulta el proceso de percolación, pues ocurre la compactación y formación de falsas vías, y el proceso de maceración, donde las partículas pasan al extracto, haciendo necesaria una filtración como etapa adicional (Betancourt y col,2010).

2.6.2 Agitación

La eficiencia del proceso extractivo ésta en función del equilibrio de saturación del solvente. La agitación hace que nuevas cantidades de solvente, entren en contacto con el sólido y un nuevo equilibrio de saturación sea alcanzado. El movimiento del líquido desplaza el equilibrio, aumentando la eficiencia del proceso.

Para lograr una mayor extracción de los metabolitos secundarios de una planta debe utilizarse una cantidad de energía ultrasónica suficiente que favorezca este proceso. Por ello la frecuencia y la intensidad de la radiación ultrasónica son parámetros que siempre deben ser evaluados en cada estudio de extracción. La frecuencia más empleada debe estar entre 20 y 100 kHz en un intervalo de potencia de 100 a 800 W. Respecto a la intensidad de la radiación, una magnitud mayor tiende a favorecer una completa extracción de los metabolitos de interés presentes en el material vegetal (Rodríguez-Riera, Z y col 2014).

2.6.3 Temperatura

Hay muchos principios activos son termolábiles y pueden ser destruidos, total o parcialmente, a temperaturas elevadas. El aumento de la temperatura también puede causar la pérdida de sustancias volátiles. De forma general, en la extracción de principios activos asistida por US, se emplean temperaturas inferiores a los métodos tradicionales. Tal es el caso de la alicina cuando se tiene

una temperatura superior a 40°C el contenido de la alicina se va deteriorando por lo tanto es importante mantenerla a una temperatura adecuada. Esta condición le confiere una gran ventaja a la utilización del ultrasonido dada la posibilidad de extraer, en estas condiciones, compuestos sensibles o que se degraden a elevadas temperaturas. (Rodríguez-Riera, Z y col 2014)

2.6.4 pH

El pH influye en la solubilidad de diversos compuestos ya que permite la posibilidad de formación de sales. Lo cual es favorable mantener el pH adecuado en la muestra como en la utilización de un buffer donde se respeta el pH indicado (Betancourt y col,2010).

2.6.5 Naturaleza del solvente

Dependiendo de la finalidad deseada, el solvente utilizado extrae, selectivamente o no, cierta clase de compuestos, dado que es la sustancia en que se disuelve un soluto, generando como resultado una solución química. Generalmente, el solvente es el componente que se encuentra en mayor proporción en la solución (Betancourt y col,2010).

2.6.6 Tiempo de extracción

Se determina en función del solvente y del equipo seleccionado. El tiempo de extracción debe ser suficiente para permitir la separación de los compuestos de interés. Por otro lado siempre debe evaluarse la cinética de extracción mediante la determinación del tiempo de sonicación óptimo, ya que una gran exposición a la irradiación ultrasónica puede influir en la calidad y el rendimiento de extracción del compuesto de interés. El tiempo estimado para la extracción depende del tipo y la estructura de la pared celular del material vegetal que se emplee, del grado de penetración del disolvente en el material vegetal y de la resistencia de la masa de los constituyentes solubles a ser transferidos por difusión de la parte interna del material vegetal al disolvente (Rodríguez-Riera, Z y col 2014).

2.7 Métodos Analíticos

Existen varios métodos analíticos con los cuales se puede detectar y cuantificar el analito de interés. A continuación, se mencionan los más utilizados.

2.7.1 Cromatografía

Método de análisis que permite la separación de gases o líquidos de una mezcla por adsorción selectiva, produciendo manchas diferentemente coloreadas en el medio adsorbente; está basado en la diferente velocidad con la que se mueve cada fluido a través de una sustancia porosa.

La cromatografía es un método muy utilizado en todas las ramas de la ciencia y que permite la separación, identificación y determinación de los componentes químicos en mezclas complejas. Ningún otro método de separación es tan potente y de aplicación tan general (Stashenko, E. E, 2010).

2.7.2 Espectrometría de masas

La espectrometría de masas es una técnica analítica destructiva de alta sensibilidad y especificidad que permite determinar la composición atómica y molecular (cualitativa y/o cuantitativa) de una gran variedad de analitos orgánicos e inorgánicos, las estructuras de una amplia variedad de especies moleculares complejas, la relación isotópica de los átomos en las muestras; así como también la estructura y composición de superficies sólidas (Siles S., 2010).

Un espectrómetro de masas consta de tres componentes fundamentales: la fuente de ionización, el analizador de masa y el detector. (Gomis Yagües, V. 2008).

2.7.3 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

Este es una técnica analítica que combina las características de la cromatografía de gases y la espectrometría de masas para identificar diferentes sustancias dentro de una muestra. Algunas de las aplicaciones de la técnica GC-MS incluyen la detección de drogas, análisis ambiental, investigaciones forenses, e identificación de muestras desconocidas. Además, se pueden identificar trazas de componentes en las muestras, que se creía degradados o desintegrados más allá de la identificación. El GC-MS se compone de dos bloques principales: el cromatógrafo de gas y el espectrómetro de masas. Estos dos componentes, juntos, permiten la identificación de sustancias con un mayor grado eficacia, que empleando ambas técnicas por separado (Marranzini, C y Col. 2020).

2.7.4 Espectrofotometría UV-visible

La espectroscopía ultravioleta-visible o espectrofotometría ultravioleta-visible (UV/VIS) es una espectroscopía de emisión de fotones y una espectrofotometría. Utiliza radiación electromagnética (luz) de las regiones visible, ultravioleta cercana (UV) e infrarroja cercana (NIR) del espectro electromagnético, es decir, una longitud de onda entre 380 nm y 780 nm. La radiación absorbida por las moléculas desde esta región del espectro provoca transiciones electrónicas que pueden ser cuantificadas.

La espectroscopia UV-visible se utiliza para identificar algunos grupos funcionales de moléculas, y además, para determinar el contenido y fuerza de una sustancia. Se utiliza de manera general en la determinación cuantitativa de los componentes de soluciones de iones de metales de transición y compuestos orgánicos altamente conjugados (Cromtek, 2020).

2.7.5 Extracción en Fase Sólida (SPE por sus siglas en inglés)

Es una técnica que permite concentrar y separar un analito, catiónico o aniónico de una matriz compleja, mediante una fase sólida estacionaria. Como resultado, se elimina la matriz interferente, no retenida y, el analito se puede analizar con la mejor sensibilidad posible, mediante la técnica analítica adecuada ICP-OES (Espectrometría de emisión óptica de plasma de acoplamiento inductivo) evitando el riesgo de las interferencias de matriz.

En los últimos años se ha hecho también muy popular la retención de componentes matriz. En este caso, el adsorbente elegido se utiliza para retener componentes no deseados de una matriz sin afectar los analitos de interés. De esta forma se logra una mejora en la sensibilidad del análisis de la muestra al eliminar especies potencialmente interferentes. Esta técnica se utiliza principalmente en la industria alimentaria. En ambos casos, el adsorbente se utiliza en cartuchos o columnas de cromatografía iónica que puedan admitir cantidades variables de muestras sin procesar.

Un método SPE consta generalmente de cuatro etapas:

Etapa 1	Acondicionamiento	Preparación del adsorbente para procesar la muestra
Etapa 2	Retención	Filtrar los analitos deseados o los componentes no deseados
Etapa 3	Aclarado	Arrastre por lavado de cualquier elemento no deseado que haya sido retenido simultáneamente.
Etapa 4	Elución	Desorción selectiva y recogida del analito de interés.

Figura 4. Etapas del metodo SPE (CromLab S.L. 2014)

CAPÍTULO III

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

Materia prima

Se usó como materia prima al ajo (*Allium sativum* L.) de la variedad morado obtenido del ejido Rinconada, N.L. El ajo es seleccionado en estado fresco.



Figura 5. Ajo (*Allium Stativum*)

3.2 Reactivos y Equipos

En la etapa de obtención del extracto por ultrasonido se utilizó agua destilada y el equipo de ultrasonido (Branson CPXH-3800). Para la concentración del extracto mediante extracción en fase sólida se utilizó n-hexano (Fisher ChemAlert® Guide), metanol (Analytyka), agua desionizada (Alquime) y cartuchos de octadecilo C18 como adsorbente (Supelco). Durante la medición por espectrofotometría UV se utilizó TRYS-HCl, cisteína (Sigma Aldrich), agua bidestilada (Analytyka), y DTNB (Trizma® hydrochloride, Scientific™).

3.3 Métodos

La fase experimental se dividió en 4 etapas las cuales se describen a continuación: (1) preparación y acondicionamiento de la muestra, (2) obtención del extracto por ultrasonido, (3) extracción en fase sólida (SPE) y (4) cuantificación de alicina por el método espectrofotométrico (UV-Visible).

3.3.1 Etapa 1. Preparación y acondicionamiento de la muestra

Se separaron los dientes de ajos, eliminando la cascara exterior manualmente, y se eligieron los que no presentaron daños, se utilizaron 20 g de ajo previamente cortado y 80 mL de agua destilada.

Posteriormente la mezcla fue sometida a un proceso de sonicación con una frecuencia de 40 kHz, utilizando un baño de ultrasonido Branson CPXH-3800. La técnica de ultrasonido se llevó a cabo a diferentes temperaturas (15°C, 25 °C y 35°C) variando el tiempo de sonicación de 5, 10 y 15 min de exposición. Cada muestra fue preparada por triplicado.

3.3.2 Etapa 2. Extracción en fase sólida (SPE)

El método de extracción en fase sólida o denominado SPE, por sus siglas en inglés, fue utilizado para eliminar el exceso de agua de los extractos acuosos de ajo, concentrando el analito de interés para su cuantificación.

El método consiste de cuatro etapas:

a) Acondicionamiento

Se agregan 3 mL de n-hexano a los cartuchos C18 con la finalidad de extender las cadenas de la fase estacionaria, seguido de 5 mL de metanol puro para desplazar

el hexano y generar una interface entre la matriz de la muestra y el adsorbente. Posteriormente, se le añade 10 mL de agua desionizada para desplazar el metanol.

b) Adsorción

Añadir el extracto previamente filtrado en el cartucho C₁₈.

c) Lavado

Para eliminar interferencias o sustancias que no son de interés y que están retenidas en el C18, se agregan 10 mL de una solución de metanol al 3 % V/V.

d) Elución

Para la remoción del analito de interés, se adicionan 3 mL de metanol puro como disolvente, recuperándolo en un tubo de ensaye.

3.3.3 Etapa 3. Cuantificación de alicina por el método espectrofotométrico (UV-Visible)

Para cuantificar el contenido de alicina de los extractos de ajo se utilizó el método espectrofotométrico, propuesto por Zhou en 2015; el cual consiste en mezclar 5 mL de una solución de L-cisteína al 10 µM preparada en un buffer de Tris-HCl a 50 µM (pH 7.5), con 1 mL del extracto obtenido por SPE. De la mezcla resultante se tomó 1 mL para ser diluida en 99 mL de H₂O bidestilada; de esta dilución se tomaron 4.5 mL y se le adicionaron 0.5 mL de DTNB al 1.5 µM preparado con Tris-HCl buffer 50 µM (pH 7.5). Para evidenciar una reacción colorimétrica es necesario dejar reposar la disolución por 15 min y posteriormente, mediante un espectrofotómetro UV-visible se obtuvo la absorbancia a 412 nm. Para el blanco se sustituyó el mL de extracto por 1 mL de H₂O bidestilada.

La concentración total de alicina fue determinada mediante la ecuación:

$$C_{alicina}(mmol/mL) = (\Delta A_{412} - \beta) / (2 * 14,150) \quad (1)$$

$$\Delta A_{412} = A_0 - A \quad (2)$$

Donde

Siendo A_0 , la absorbancia del blanco; A , la absorbancia de la muestra; β , la dilución de la L-Cisteína; 14,150, es el coeficiente de extinción molar (E) de la alicina en agua y $C_{alicina}$, es la concentración de la alicina en mmol/mL.

3.4 Análisis Estadístico

El contenido de alicina en los extractos de ajo fue evaluado por triplicado. Los resultados experimentales fueron analizados con el software JMP mediante el cálculo de medias y desviación estándar. Se aplicó la prueba de ANOVA de dos vías para un multifactorial 3 x 3, realizando la prueba de Tukey para determinar las posibles diferencias significativas entre los valores medios de cada parámetro. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas al nivel $p < 0.05$.

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Posterior a la obtención de los extractos acuosos a diferentes temperaturas y variando los tiempos de sonicación, se pre-concentró la alicina mediante la técnica SPE para su cuantificación. La determinación experimental del contenido de alicina mediante espectrofotometría UV-Visible a 412nm y el cálculo de la concentración a partir de la ecuación (1) mostraron los valores contenidos en la Tabla 4.

Tabla 4 Contenido de alicina presente en extractos acuosos de ajo sometidos a diferentes tiempos de sonicación, y distintas temperaturas.

Temperatura Inicial (°C)	Tiempo (min)	C _{ALICINA} (mmol/ml) X 10 ⁻⁵	Temperatura Final (°C)
15	5	3.85±0.216 ^B	15
	10	7.16±0.216 ^A	18
	15	3.52±0.216 ^{BC}	21
25	5	3.24±0.216 ^{BC}	25
	10	4.00±0.216 ^B	27
	15	2.52±0.216 ^{CD}	27
35	5	1.26±0.216 ^E	35
	10	1.60±0.0216 ^{DE}	36
	15	1.16±0.216 ^E	37

NOTA: Las mediciones se realizaron por triplicado. Literales diferentes en la columna de C_{ALICINA} indican una diferencia estadística significativa al nivel $p < 0.05$

Cabe mencionar que la exposición del ultrasonido, ocasionó un aumento de la temperatura de los extractos. Esto pudiera deberse a que cuando el ultrasonido pasa a través de un medio líquido, la interacción entre las ondas del ultrasonido, el líquido y el gas disuelto conduce a un fenómeno de excitación conocido como cavitación acústica, caracterizado por la generación y evolución de microburbujas en el medio líquido. La cavitación se produce en aquellas regiones de un líquido que se encuentran sometidas a presiones de alta amplitud que alternan

rápidamente. Las microburbujas que alcanzan un tamaño crítico implosionan o colapsan violentamente para volver al tamaño original. La implosión supone liberación de toda la energía acumulada, ocasionando incrementos de temperatura instantáneos y focales, que se disipan sin que supongan una elevación de temperatura sustancial en la temperatura del líquido tratado (Robles Ozuna, 2012).

La figura 6 muestra que, para las tres diferentes temperaturas de sonicación, el máximo contenido de alicina está presente en los extractos a un tiempo de exposición de 10 min. Resultados equivalentes fueron reportados por Pech-Damian y col., (2020). En esta figura se observa, que al aumentar el tiempo de sonicación a 15min, el contenido de alicina disminuye incluso a valores menores a los obtenidos a 5min. Adicionalmente, se observa que la mayor concentración de alicina se obtiene a 15°C, disminuyendo medida que aumenta la temperatura. Este comportamiento se puede atribuir a que la actividad enzimática decrece con la temperatura, específicamente la inactivación de la enzima alinasa se produce a partir de los 42°C y al llegar a los 60 °C es destruida en su totalidad, según estudios reportados por Krest y Keusgen (2000).

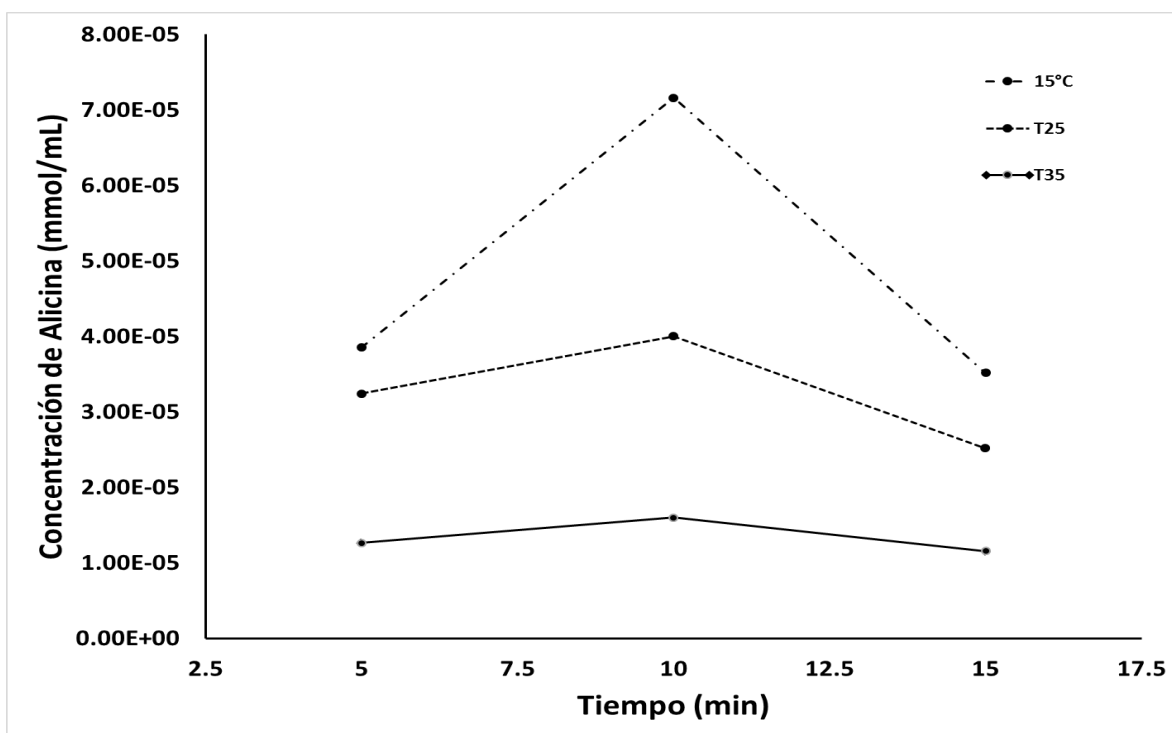


Figura 6. Efecto de la temperatura en el contenido de alicina

Cabe mencionar que la alicina es un compuesto altamente volátil, ya que una vez formada sufre una rápida descomposición hacia compuestos sulfurados. Debido a la elevada inestabilidad de este metabolito, es necesario el control de varios factores principalmente la temperatura y el tiempo de sonicación en el caso de la extracción por ultrasonidos para así realizar una extracción eficiente y su posterior cuantificación.

Lawson y Wang (1998), a su vez, argumenta que es muy importante que la temperatura se mantenga a temperaturas bajas, preferentemente por debajo de los 10°C, con el objetivo de evitar pérdidas de alicina durante el proceso de extracción y cuantificación. Por otra parte, también se pone especial énfasis en que el tiempo de extracción no sea muy largo para evitar la pérdida por degradación de este compuesto. Lo anterior corrobora los resultados obtenidos en este estudio.

Lourdes Diaz J. (2008) reporta varios métodos de análisis y cuantificación de alicina tanto en ajo fresco y seco como en extractos. En este estudio la preparación de la muestra para la extracción del principio activo y su posterior cuantificación se realiza bajo condiciones muy estrictas de temperatura así mismo de los solventes de los cuales se utilizaron hexano y metanol durante el proceso de extracción.

La figura 7, muestra el efecto tiempo-temperatura en la concentración de alicina para los diferentes tratamientos

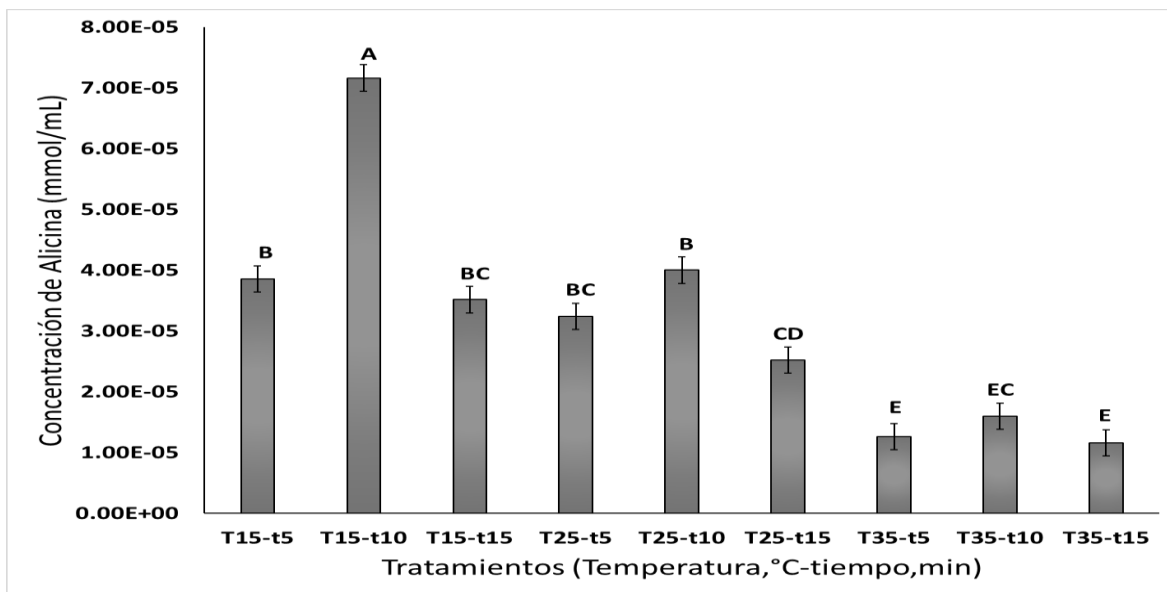


Figura 7. Contenido de alicina presente en extractos acuosos de ajo sometidos a diferentes temperatura y tiempo de sonicación.

En la figura 7 se observan los tratamientos llevados a cabo en esta investigación, indicando con letras diferentes aquellos que presentan una diferencia estadísticamente significativa al nivel de $p < 0.05$. De acuerdo con a estos resultados, el extracto obtenido a 15°C durante 10 minutos de sonicación fue el que presentó mayor contenido de alicina; mientras que a 35°C y cualquier tiempo de sonicación, no existen diferencias significativas en relación a la concentración del analito de interés, siendo el de menor contenido entre todos los tratamientos. En la sección de Anexos se presenta el análisis estadístico que sustenta estos resultados.

Son muchas las investigaciones acerca de la aplicación de la tecnología del ultrasonido en la extracción de compuestos activos, algunos ejemplos de ello es el

estudio realizado por González- Centeno y col. (2014), en donde evaluó el efecto de la frecuencia acústica (40, 80, 120 kHz) y el tiempo de extracción (5, 15, 25 min) en la obtención de fenoles totales, flavonoides totales y su capacidad antioxidante provenientes del orujo de uva, encontrando las mejores condiciones de extracción para esos compuestos activos a 40kHz y 25 min de tiempo de sonicación.

En otra investigación se realizó la extracción de compuestos fenólicos del rizoma *Sparganium*, en la cual se estudió la concentración de etanol utilizado como disolvente, el tiempo de extracción y la proporción de disolvente al material (Wang y col., 2013). Con lo anterior se muestra que los estudios de investigación utilizando ultrasonido están centrados en conocer las condiciones óptimas de extracción asistidos por esta técnica, enfocándose en estudiar sus principales variables como son la temperatura, la frecuencia, la potencia y el tiempo de sonicación. Sin embargo, existen muchos otros estudios que no solo se centran en las variables anteriores, sino en otros factores como el tipo de solvente, el tamaño de partícula y sus posibilidades de combinación con las variables antes mencionadas (Nojavan y col., 2014; Tobón-Arroyave, 2015).

La determinación y cuantificación de alicina en ajo fresco, seco o productos basados en ajo, ha sido un trabajo difícil de realizar debido a la dificultad de obtención de un compuesto de referencia de alicina, principalmente por la gran inestabilidad que presenta este metabolito. El problema ha sido superado, usando como patrón de referencia a extractos de ajo utilizando algún método de extracción.

5. CONCLUSIÓN

Se prepararon extractos acuosos de ajo mediante la aplicación de la técnica de ultrasonido con diferente tiempo de sonicación; posteriormente, se llevó a cabo la concentración de los mismos mediante el método de extracción en fase sólida y la evaluación del contenido de alicina por el método de espectrofotometría UV-Visible. Los resultados prueban que el ultrasonido es una herramienta alternativa para la extracción de compuestos bioactivos debido a su propiedad de cavitación,

además de que el uso de agua como disolvente, evita la presencia de impurezas ocasionadas por trazas de disolventes orgánicos tóxicos al ser humano.

Se observó que las condiciones óptimas de sonicación fueron de 10 min, a 15°C. Adicionalmente se determinó un aumento en la temperatura de los extractos conforme se prolongaba el tiempo de sonicación. Esto último debe ser considerado para evitar la inhibición de las enzimas y/o degradación de los compuestos bioactivos por efecto de la temperatura.

El método de ultrasonido es una técnica alternativa para la extracción de compuestos bioactivos, preferentemente a bajas temperaturas, evitando la degradación de los mismos. Así mismo, la determinación espectrofotométrica es adecuada para la cuantificación preliminar de analitos de interés, con la finalidad de evaluar las condiciones óptimas de extracción.

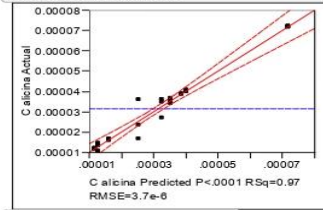
6. ANEXOS

datos- Fit Least Squares

Response C alicina

Whole Model

Actual by Predicted Plot



Summary of Fit

RSquare	0.970766
RSquare Adj	0.957773
Root Mean Square Error	0.000004
Mean of Response	0.000031
Observations (or Sum Wgts)	27

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
Model	8	8.33657e-9	1.0421e-9	74.7154	<.0001
Error	18	2.5105e-10	1.395e-11		
C. Total	26	8.58762e-9			

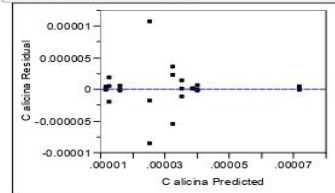
Parameter Estimates

Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t
Intercept	0.0000315	7.187e-7	43.76	<.0001
TEMPERATURA[T15]	0.000017	0.000001	16.71	<.0001
TEMPERATURA[T25]	0.000011	0.000001	1.05	0.3056
TIEMPO[t10]	0.0000111	0.000001	10.91	<.0001
TIEMPO[t15]	-0.000007	0.000001	-7.38	<.0001
TEMPERATURA[T15]*TIEMPO[t10]	0.0000121	0.000001	8.42	<.0001
TEMPERATURA[T15]*TIEMPO[t15]	-0.000006	0.000001	-4.04	0.0008
TEMPERATURA[T25]*TIEMPO[t10]	-0.000004	0.000001	-2.51	0.0218
TEMPERATURA[T25]*TIEMPO[t15]	1.3799e-7	0.000001	0.10	0.9246

Effect Tests

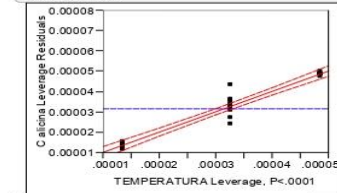
Source	Nparm	DF	Sum of Squares	F Ratio	Prob > F
TEMPERATURA	2	2	5.53933e-9	198.5820	<.0001
TIEMPO	2	2	1.72688e-9	61.9004	<.0001
TEMPERATURA*TIEMPO	4	4	1.07056e-9	19.1895	<.0001

Residual by Predicted Plot



TEMPERATURA

Leverage Plot

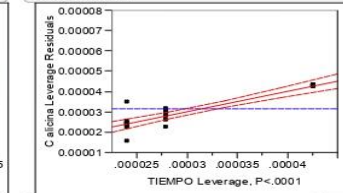


Least Squares Means Table

Level	Least Sq Mean	Std Error	Mean
T15	0.00004843	0.00000124	0.000048
T25	0.00003252	0.00000124	0.000033
T35	0.00001340	0.00000124	0.000013

TIEMPO

Leverage Plot

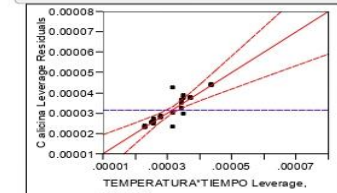


Least Squares Means Table

Level	Least Sq Mean	Std Error	Mean
t10	0.00004254	0.00000124	0.000043
t15	0.00002397	0.00000124	0.000024
t5	0.00002784	0.00000124	0.000028

TEMPERATURA*TIEMPO

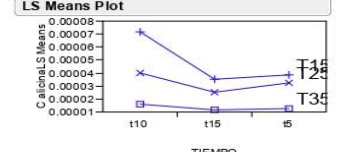
Leverage Plot



Least Squares Means Table

Level	Least Sq Mean	Std Error
T15,t10	0.00007162	0.00000216
T15,t15	0.00003853	0.00000216
T25,t10	0.00004000	0.00000216
T25,t15	0.00002518	0.00000216
T25,t5	0.00003239	0.00000216
T35,t10	0.00001600	0.00000216
T35,t15	0.00001158	0.00000216
T35,t5	0.00001261	0.00000216

LS Means Plot



LSMeans Differences Tukey HSD

Alpha= 0.050 Q= 3.50384

Mean[j]-Mean[i]	LSMean[i]								
	T15,t10	T15,t15	T15,t5	T25,t10	T25,t15	T25,t5	T35,t10	T35,t15	T35,t5
Lower CL Dif	0	0.00004	0.00003	0.00003	0.00005	0.00004	0.00008	0.00008	0.00008
Upper CL Dif	0	0.00004	0.00003	0.00003	0.00005	0.00004	0.00008	0.00008	0.00008
T15,t10	0	0.00004	0.00003	0.00003	0.00005	0.00004	0.00008	0.00008	0.00008
T15,t15	-3.8e-5	0	-3.4e-6	-4.9e-6	9.97e-6	2.76e-6	0.00002	0.00002	0.00002
T15,t5	3.05e-6	3.05e-6	0	3.05e-6	3.05e-6	3.05e-6	3.05e-6	3.05e-6	3.05e-6
T25,t10	-7.7e-5	0	-1.4e-6	-1.6e-6	-7.2e-7	-7.9e-6	8.47e-6	0.00001	0.00001
T25,t15	-2.8e-5	7.3e-6	0	7.3e-6	8.8e-6	0.00002	0.00001	0.00003	0.00003
T25,t5	-3.2e-5	3.38e-6	0	-1.5e-6	0.00001	8.15e-6	0.00002	0.00003	0.00003
T35,t10	3.05e-6	3.05e-6	0	3.05e-6	3.05e-6	3.05e-6	3.05e-6	3.05e-6	3.05e-6
T35,t15	-4.4e-5	-7.3e-6	0	-1.2e-5	2.67e-6	-4.5e-6	0.00001	0.00002	0.00002
T35,t5	-2.2e-5	0.00001	0	9.22e-6	0.00002	0.00002	0.00003	0.00004	0.00004
T25,t10	-3.2e-5	4.85e-6	1.47e-6	0	0.00001	7.61e-6	0.00002	0.00003	0.00003
T25,t15	3.05e-6	3.05e-6	0	3.05e-6	3.05e-6	3.05e-6	3.05e-6	3.05e-6	3.05e-6
T25,t5	-1.2e-5	-5.8e-6	-9.2e-6	0	4.13e-6	-3.1e-6	0.00001	0.00002	0.00002
T35,t10	-2.1e-5	0.00002	0.00001	0	0.00002	0.00002	0.00003	0.00004	0.00004
T35,t15	-4.8e-5	-1e-5	-1.3e-5	-1.5e-5	0	-7.2e-6	0.19e-6	0.00001	0.00001
T35,t5	3.05e-6	3.05e-6	3.05e-6	3.05e-6	0	3.05e-6	3.05e-6	3.05e-6	3.05e-6
T25,t10	-5.7e-5	-2.1e-5	-2.4e-5	-2.8e-5	0	-1.8e-5	-1.5e-6	2.91e-6	1.89e-6
T25,t15	-3.8e-5	7.10e-7	-2.7e-6	-4.1e-6	0	3.48e-6	0.00002	0.00002	0.00002
T25,t5	-3.9e-5	-2.8e-6	-6.1e-6	-7.6e-6	7.21e-6	0	0.00002	0.00002	0.00002
T35,t10	3.05e-6	3.05e-6	3.05e-6	3.05e-6	3.05e-6	0	3.05e-6	3.05e-6	3.05e-6
T35,t15	-5e-5	-1.3e-5	-1.7e-5	-1.9e-5	-3.5e-6	0	5.71e-6	0.00001	0.00001
T35,t5	-2.9e-5	7.92e-6	4.54e-6	3.07e-6	0.00002	0	0.00003	0.00003	0.00003
T15,t10	-5.8e-5	-1.9e-5	-2.3e-5	-2.4e-5	-9.2e-6	-1.0e-5	0	4.41e-6	3.38e-6
T15,t15	3.05e-6	3.05e-6	3.05e-6	3.05e-6	3.05e-6	0	3.05e-6	3.05e-6	3.05e-6
T15,t5	-6.8e-5	-3e-5	-3.3e-5	-3.5e-5	-2e-5	-2.7e-5	0	-6.3e-6	-7.3e-6
T25,t10	-4.8e-5	-8.5e-6	-1.2e-5	-1.3e-5	1.5e-6	0	0.00002	0.00002	0.00001
T25,t15	-4e-5	-2.4e-5	-2.7e-5	-2.8e-5	-1.4e-5	-2.1e-5	-4.4e-6	0	-1e-6
T25,t5	3.05e-6	3.05e-6	3.05e-6	3.05e-6	3.05e-6	0	3.05e-6	3.05e-6	3.05e-6
T35,t10	-7.1e-5	-3.4e-5	-3.8e-5	-3.9e-5	-2.4e-5	-3.1e-5	-1.5e-5	0	-1.2e-5
T35,t15	-4.8e-5	-1.3e-5	-1.6e-5	-1.8e-5	-2.9e-6	-1e-5	6.27e-6	0	0.66e-6
T35,t5	-5.9e-5	-2.3e-5	-2.6e-5	-2.7e-5	-1.3e-5	-2e-5	-3.4e-6	1.03e-6	0
T15,t10 A	0.00007162								
T25,t10 B	0.00004000								
T15,t5 B	0.00003853								

datos- Fit Least Squares

Response C alicina

TEMPERATURA*TIEMPO

LSMeans Differences Tukey HSD

Level		Least Sq Mean
T 15,t15	B C	0.00003515
T 25,t5	B C	0.00003239
T 25,t15	C D	0.00002518
T 35,t10	D E	0.00001600
T 35,t5	E	0.00001261
T 35,t15	E	0.00001158

Levels not connected by same letter are significantly different

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso, J. Tratado de fitofármacos y nutraceuticos. 2007. Argentina, Editorial CORPUS.
- Antezana Ruiz, B. F. 2017. Obtención de aceite esencial e hidrolato de hierbabuena (*Mentha Spicata*) mediante el proceso de destilación por arrastre con vapor (Doctoral dissertation).
- Azuola, Rocio, Vargas, Pedro. 2007.extracción de sustancias asistida por ultrasonido (EUA). Tecnología en marcha. Vol. 20-4
- Banerjee S. K., Mukherjee P. K. y Maulik S. K. 2003. Garlic as an antioxidant: the good, the bad and the ugly. *Phytotherapy Research*, volume 17, pp. 97-106.
- Betancourt, C., & de los Ángeles, M. (2010). Oaxaca. Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.) implicaciones analíticas.
- Bhagyalakshmi N., Thimmaraju R., Venkatachalam L., Chidambara N. K. y Sreedhar R. V. 2005. Nutraceutical Applications of Garlic and the Intervention of Biotechnology. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, volume 45 , pp. 607-621.
- Camacho P, Villca R.2018. Rev Univ. Cienc. Soc. Determinación de la actividad antibacteriana in vitro del ajo (*Allium sativum*) contra *Streptococcus pyogenes* mediante el método por dilución.
- CromLab S.L.2014.EXTRACCIÓN EN FASE SOLIDA. SolidPhaseExtraction. http://www.scpscience.com/pdfs/Catalogues/Spanish/Solid Phase Extraction_s p.pdf
- CROMTEK, 2020. Espectrofotometría UV-VIS.
- Fito Suñer, P. J., Castro Giráldez, M., Tomás Egea, J. Á., Barat Baviera, J. M., y Ortolá Ortolá, M. 2018. Funcionamiento del software ExtraSL para la simulación del proceso de extracción sólido-líquido.

- Gálvez, L. 2017. Etiología, epidemiología y estrategias de control de la podredumbre Del diente de ajo (*Allium sativum* L.) <https://core.ac.uk/download/pdf/148686859.pdf>
- Gomis Yagües, V. 2008. Tema 5. Espectrometría de masas. Técnicas Instrumentales en el Análisis Industrial.
- Guapulema M. Proceso y Elaboración de Cápsulas de Ajo. 2013. Ecuador. Universidad de Guayaquil, Facultad de Ingeniería Química. [Tesis para obtener el Título Profesional de Ingeniero Químico].
- Guillamón Enrique. 2020. Efecto de compuestos fitoquímicos del género *Allium* sobre el sistema inmune y la respuesta inflamatoria. SCIELO. Vol.59 (no. 3). <https://www.cromtek.cl/espectrofotometria-uv-vis/>.
- Ibarz Ribas A. y Barbosa-Cánovas G. V. 2005. México. Operaciones unitarias en la ingeniería de alimentos. Ediciones MUNDI-PRENSA, pp. 767-814.
- J.G. Krest y M. Keusgen. 2000. "Cysteine sulfoxidos and alliinase activity of some allium species" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol.48, pp. 3753-3760.
- Jiménez F, Zambrano M. 2018. Efecto antibacteriano del extracto de *Allium sativum* (ajo) blanco, púrpura y Clorhexidina al 0,12% sobre cepas de *Streptococcus mutans*. Disponible en: <http://www.dx.doi.org/10.23857/dom.cien.pocaip.2017.3.1.234-247>
- Kuete, V. 2017. Chapter 15 - *Allium sativum*. In V. Kuete (Ed.), *Medicinal Spices and Vegetables from Africa*. Academic Press.
- L.D. Lawson, 1998. Garlic: A review of its medicinal effects and indicated active compounds. In *Phytomedicines of Europe: Chemistry and Biological Activity*. J. Amer. Chem. Soc., Vol. 691.
- Lawson L. D. y Wang Z. J. 2005. Allicin and allicin –derived garlic compounds increase breath Acetone through Allyl Methyl Sulfide: Use in measuring Allicin

- bioavailability. Journal of agricultural and food chemistry, volume 53, pp. 1974-1983.
- López L. T. El ajo.2007. *Ámbito Farmacéutico: Fitoterapia*, volumen 26, pp. 77-81.
- López M.2018. CD. El ajo y sus propiedades farmacológicas e indicaciones terapéuticas. *Revista de fitoterapia*. <http://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-pdf-13097334-S300>
- Lourdes Díaz J., a Karla Jiménez L. b. 2008. Validación de un Método de Extracción de Alicina en Ajo y su Cuantificación por HPLC.
- M. R. González-Centeno, K. Knoerzer, H. Sabarez, S. Simal, C. Rosselló y A. Femenia, “Effect of acoustic frequency and power density on the aqueous ultrasonic-assisted extraction of grape pomace (*Vitis vinifera* L.) - A response surface approach”, *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(6), 2176–2184. <http://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.01.021>, (2014).
- Madariaga, M., Serrano, A., Ramírez, I., Molina, A., y Freire, M. 2020. Compuestos bioactivos en ajo. *Boletín INIA-Instituto de Investigaciones Agropecuarias*.
- Mamani E, Mercado M. 2018.Efecto in vitro del ajo (*Allium sativum* L.) liofilizado, sobre la *Candida albicans*, Juliaca. *Revista Estomatológica del Altiplano* <http://www.huajsapata.unap.edu.pe/journal/index.php/REA/article/view/38>
- Marranzini, C., Bello, L., Degaudenzi, A. V., Gómez, A. M., & Echavarría, E. 2020. Determinación de contaminantes orgánicos persistentes en leche de vaca de producción nacional por medio de la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS). *Ciencia, Ambiente y Clima*, 3(2), 5-18.
- Martínez Barrantes, L. D. 2020. Evaluación de la obtención de un conservante de alimentos natural basado en la extracción de alicina para aplicarlo en frutas y/o verduras (Bachelor's thesis, Fundación Universidad de América).
- Méndez L. L. y Castaigne F. 2008. Effect of temperature cycling on allinase activity in garlic. *Journal of Food Chemistry*, volume 111.

- N.C. Tobón-Arroyave “Extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos de la pulpa de café (*Coffea arabica* L.) variedad Castillo” Tesis de Maestría Corporación Universitaria Lasallista. Facultad de Ingenierías. Caldas Antioquía, 2015.
- Panchi Medina, L. F. 2016. Efecto Antimicrobiano de los extractos de las hojas de Tomillo (*Thymus vulgaris*) y de las pepas de ajo (*Allium sativum*) sobre las cepas de *Enterococcus faecalis*. estudio in vitro (Bachelor's thesis, Quito: UCE).
- Petropoulos, S. A., Fernández, Â., Ntatsi, G., Petrotos, K., Barros, L., y Ferreira, I. C. 2018. Nutritional Value, Chemical Characterization and Bulb Morphology of Greek Garlic Landraces. *Molecules*.
- Richter, p., Toral, m., y Manriquez, R. 1999. Sistema de extracción líquido-líquido en continuo con separador de fases tipo sandwich para la determinación de cobre al estado del complejo cobre (i)-batocuproina. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*, 44(4), 451-458.
- Robles-Ozuna, L. E., & Ochoa-Martínez, L. A. (2012). ULTRASONIDO Y SUS APLICACIONES EN EL PROCESAMIENTO DE ALIMENTOS. *Revista iberoamericana de tecnología postcosecha*, 13(2), 109-122.
- Rodríguez-Riera, Z., Robaina-Mesa, M., Jáuregui-Haza, U., Blanco-González, A., & Rodríguez-Chanfrau, J. E. 2014. Empleo de la radiación ultrasónica para la extracción de compuestos bioactivos provenientes de fuentes naturales. Estado actual y perspectivas. *Revista CENIC Ciencias Químicas*, 45(1), 139-147.
- S. Nojavan, T. Gorji y Hossiny Davarani, A. Saied Saeed Morteza Najarian, “Solvent selection in ultrasonic-assisted emulsification microextraction: Comparison between high- and low-density solvents by means of novel type of extraction vessel”, *Analytica Chimica Acta*, 838, 51–57. <http://doi.org/10.1016/j.aca.2014.06.004> , 2014.
- Salomón Izquierdo, S., Bermello Crespo, A., Márquez Conde, T., López Hernández, O. D., González Sanabria, M. L., & Llópiz Yurell, J. C. 2013.

- Extracción asistida por microondas de lípidos de las semillas de Cucurbita pepo L.(calabaza). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(1), 17-26.
- Siles Alvarado, S. 2010. Curso Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas.
- Stashenko, E. E., y Martínez, J. R. 2010. Algunos aspectos prácticos para la identificación de analitos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. *Scientia Chromatographica*, 2(1), 29-47.
- Valencia Juliao Hugo.2015.México.Hidrodestilación.CienciamxNOTICIAS. <http://www.cienciamx.com/index.php/vocabulario/13128-hidrodestilacion>
- Velásquez-Valle, R., Chew-Madinaveitia, Y. I., Amador-Ramírez, M. D., & Reveles-Hernández, M. 2010. Zacatecas, México. Presencia de virus en el cultivo de ajo (*Allium sativum* L.) en. *Revista mexicana de fitopatología*, 28(2), 135-143.
- X. Wang, Y. Wu, G. Chen, W. Yue, Q. Liang y Q. Wu, “Optimisation of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from *Sparganii* rhizoma with response surface methodology”, *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(3), 846–854. <http://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.11.007>, 2013.