



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**EXTRACCIÓN POR ULTRASONIDO DE  
COMPUESTOS BIOACTIVOS DE AJO  
(*Allium sativum*) PARA SU  
APLICACIÓN COMO ANTIOXIDANTE  
NATURAL EN CARNE PARA  
HAMBURGUESA.**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**INGENIERA EN ALIMENTOS**

P R E S E N T A  
**LISSET JIMÉNEZ FONSECA**

ASESORAS:

**DRA. MARÍA ANDREA TREJO MARQUEZ**  
**M. en C. SELENE PASCUAL BUSTAMANTE**

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**



**UNAM  
CUAUTITLÁN**

**DEPARTAMENTO  
DE TITULACIÓN**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE**

**ATN: DRA. MARIA DEL CARMEN VALDERRAMA BRAVO**  
Jefa del Departamento de Titulación  
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **Tesis y Examen Profesional**

**Extracción por ultrasonido de compuestos bioactivos de ajo (Allium Sativum) para su aplicación como antioxidante natural en carne para hamburguesa.**

Que presenta la pasante: **Lisset Jiménez Fonseca**

Con número de cuenta: **313131297** para obtener el título de: **Ingeniera en Alimentos.**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

**ATENTAMENTE**

**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 19 de Enero de 2023.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	<u>I.B.Q. Saturnino Maya Ramírez</u>	
<b>VOCAL</b>	<u>Dra. María de la Luz Zambrano Zaragoza</u>	
<b>SECRETARIO</b>	<u>Dra. María Andrea Trejo Márquez</u>	
<b>1er. SUPLENTE</b>	<u>Dra. María Guadalupe Sosa Herrera</u>	
<b>2do. SUPLENTE</b>	<u>I.A. Gabriela Hermosillo Moreno</u>	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional



Este proyecto se realizó con el apoyo del Proyecto PAPIME IT202419: Aplicación de tratamientos de ultrasonido, campos eléctricos y cocción solar en el procesamiento de productos hortofrutícolas típicos de México.



A mis padres, por apoyarme incondicionalmente, dándome su amor y guía para encontrar mi camino. Agradezco infinitamente el esfuerzo que han hecho por mí y espero que este trabajo sea una muestra de ello.

A mis hermanos, su cariño y confianza me motivan todos los días, los quiero mucho.

A mis amigas, el vínculo que formamos durante la carrera es extraordinario y estoy segura de que durará para siempre, gracias por todos los momentos que compartimos, los atesoraré por siempre.

A mi asesoras, por su apoyo durante todo este proyecto, agradezco su confianza y aprecio cada momento que se tomaron para aclarar mis ideas, sin lugar a duda son una fuente de inspiración



# ÍNDICE

ÍNDICE .....	II
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
ÍNDICE DE TABLAS.....	V
RESUMEN.....	6
1. INTRODUCCIÓN .....	7
2. ANTECEDENTES .....	9
2.1. Generalidades del ajo .....	9
2.1.1. Taxonomía y morfología .....	9
2.1.2. Estacionalidad .....	10
2.1.3. Producción mundial .....	11
2.1.4. Producción en México .....	11
2.1.5. Exportaciones e importaciones en México.....	12
2.2. Composición química.....	12
2.2.1. Principales componentes activos.....	13
2.2.2. Compuestos antioxidantes.....	13
2.3. Aplicaciones del ajo .....	15
2.4. Métodos de extracción .....	17
2.4.1. Extracción asistida por ultrasonido (UAE).....	19
2.4.1.1. Mecanismo de extracción .....	19
2.4.1.2. Tipos de ultrasonido .....	21
2.4.1.3. Equipo de ultrasonido.....	23
2.4.1.4. Aplicaciones de ultrasonido en la investigación alimentaria.....	24
2.5. Antioxidantes .....	26
2.5.1. Tipos de antioxidantes.....	26
2.5.2. Acción de los antioxidantes .....	29
2.6. Deterioro oxidativo de la carne.....	30
2.6.1. Mecanismo de oxidación lipídica .....	31
2.6.2. Factores que afectan la oxidación lipídica .....	32
2.6.3. Estrategias de prevención del deterioro oxidativo de la carne .....	32
3. OBJETIVOS .....	35
4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	36
4.1. Cuadro metodológico .....	36
4.2. Material biológico .....	37



4.3.	Tratamiento de muestras .....	37
4.3.1.	Pretratamiento.....	37
4.3.2.	Obtención del extracto de ajo .....	38
4.3.3.	Selección de la concentración de extracto de ajo para aplicación como antioxidante.....	39
4.3.4.	Comparación del efecto del extracto de ajo contra un aditivo sintético (BHT) .....	40
4.3.5.	Efecto de la presencia de extracto de ajo en carne para hamburguesas durante el almacenamiento .....	41
4.4.	Técnicas analíticas.....	42
4.4.1.	Fenoles totales .....	42
4.4.2.	Capacidad antioxidante .....	42
4.5.	Pruebas de calidad .....	43
4.5.1.	Color.....	43
4.5.2.	Índice de rancidez TBA.....	44
4.6.	Pruebas microbiológicas .....	45
4.7.	Análisis estadístico.....	45
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
5.1.	Análisis a los extractos de ajo .....	46
5.1.1.	Contenido de fenoles totales .....	46
5.1.2.	Capacidad antioxidante .....	47
5.2.	Concentración del extracto para aplicarse como antioxidante a la carne para hamburguesas.....	48
5.2.1.	Color.....	48
5.2.2.	Índice de TBA.....	50
5.3.	Análisis de la aplicación de extracto en carne para hamburguesas.....	51
5.3.1.	Color.....	51
5.3.2.	Índice de TBA.....	53
5.3.3.	Carnes para hamburguesa durante el almacenamiento.....	54
5.4.	Análisis de la carne para hamburguesas durante el almacenamiento .....	56
5.4.1.	Color.....	56
5.4.2.	Análisis microbiológico .....	58
6.	CONCLUSIONES.....	60
7.	RECOMENDACIONES .....	62
8.	REFERENCIAS .....	63



## ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Estructura de la planta de ajo.....</i>	<i>10</i>
<i>Figura 2. Reacción enzimática de aliina.....</i>	<i>14</i>
<i>Figura 3. Descomposición de alicina en los principales tiosulfatos.....</i>	<i>15</i>
<i>Figura 4. Naturaleza del sonido. ....</i>	<i>20</i>
<i>Figura 5. Proceso de cavitación de una burbuja por ultrasonido. ....</i>	<i>20</i>
<i>Figura 6. Mecanismo de cavitación en una superficie sólida.....</i>	<i>21</i>
<i>Figura 7. Limpiador de baño ultrasónico. ....</i>	<i>23</i>
<i>Figura 8. Equipo de ultrasonido. ....</i>	<i>24</i>
<i>Figura 9. Mecanismo de autooxidación de los lípidos. ....</i>	<i>32</i>
<i>Figura 10. Diagrama de proceso para la obtención de ajo en polvo.....</i>	<i>37</i>
<i>Figura 11. Procedimiento para la obtención de ajo en polvo. ....</i>	<i>38</i>
<i>Figura 12. Diagrama de proceso para la obtención de extracto de ajo.....</i>	<i>38</i>
<i>Figura 13. Extracción asistida por ultrasonido para la obtención de extracto de ajo.....</i>	<i>39</i>
<i>Figura 14. Empaque de la carne para hamburguesas.....</i>	<i>40</i>
<i>Figura 15. Diagrama de proceso para la elaboración de la carne para hamburguesas preparada. ....</i>	<i>41</i>
<i>Figura 16. Procedimiento del método para fenoles totales.....</i>	<i>42</i>
<i>Figura 17. Procedimiento del método para capacidad antioxidante. ....</i>	<i>43</i>
<i>Figura 18. Colorímetro KONICA MINOLTA CR-400.....</i>	<i>43</i>
<i>Figura 19. Procedimiento del método para índice de rancidez TBA.....</i>	<i>44</i>
<i>Figura 20. Contenido de fenoles totales de los extractos de ajo obtenidos por ultrasonido. ....</i>	<i>46</i>
<i>Figura 21. Actividad antioxidante de los extractos de ajo obtenidos por ultrasonido. ....</i>	<i>47</i>
<i>Figura 22. Luminosidad de la carne para hamburguesas con diferentes concentraciones de extracto de ajo (0.5, 1.5 y 2.5 %). ....</i>	<i>49</i>
<i>Figura 23. Cromaticidad de la carne para hamburguesas con diferentes concentraciones de extracto de ajo (0.5, 1.5 y 2.5 %). ....</i>	<i>50</i>
<i>Figura 24. Índice de TBA expresado µg de malonaldehído (MDA) por gramo de carne para hamburguesas con diferentes concentraciones de extracto de ajo (0.5, 1.5, 2.5 %).....</i>	<i>51</i>
<i>Figura 25. Luminosidad de la carne para hamburguesas almacenadas a 15 °C durante 8 días con diferentes antioxidantes: extracto de ajo y BHT.....</i>	<i>52</i>
<i>Figura 26. Cromo C* de la carne para hamburguesas almacenadas a 15 °C durante 8 días con diferentes antioxidantes: extracto de ajo y BHT.....</i>	<i>53</i>



<i>Figura 27. Índice de TBA expresado en <math>\mu\text{g}</math> de malonaldehído (MDA) por gramo de carne para hamburguesas con diferentes antioxidantes: extracto de ajo y BHT. ....</i>	<i>53</i>
<i>Figura 28. Luminosidad de la carne para hamburguesas con extracto de ajo y BHT como antioxidantes durante 48 días. ....</i>	<i>57</i>
<i>Figura 29. Cromaticidad de la carne para hamburguesas con extracto de ajo y BHT como antioxidantes durante 48 días. ....</i>	<i>57</i>

## ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Clasificación mundial de los países productores de ajo en 2016. ....</i>	<i>11</i>
<i>Tabla 2. Composición química del ajo fresco. ....</i>	<i>12</i>
<i>Tabla 3. Valor nutricional del ajo fresco ....</i>	<i>12</i>
<i>Tabla 4. Estudios sobre algunas aplicaciones del ajo ....</i>	<i>15</i>
<i>Tabla 5. Comparación de métodos. ....</i>	<i>17</i>
<i>Tabla 6. Aplicaciones de ultrasonido en alimentos. ....</i>	<i>25</i>
<i>Tabla 7. Clasificación de los antioxidantes. ....</i>	<i>27</i>
<i>Tabla 8. Antioxidantes naturales usados en carne y productos cárnicos. ....</i>	<i>34</i>
<i>Tabla 9. Condiciones de extracción ....</i>	<i>39</i>
<i>Tabla 10. Formulación de la carne para hamburguesas ....</i>	<i>41</i>
<i>Tabla 11. Carnes para hamburguesas durante 8 días de almacenamiento. ....</i>	<i>55</i>
<i>Tabla 12. Conteo microbiológico de la carne durante 48 días a <math>-5^{\circ}\text{C}</math>. ....</i>	<i>58</i>



## RESUMEN

La búsqueda por el consumo de aditivos de origen natural va en aumento en los últimos años. Esto ha impulsado llevar a cabo estudios sobre la efectividad de productos naturales como aditivos, específicamente alimentos con propiedades antioxidantes y antimicrobianas. El ajo ha demostrado tener estas propiedades debido a los componentes bioactivos que contiene, los cuales son eficaces para inhibir la formación de radicales libres, además se considera que la aplicación de ultrasonido para la extracción provoca un menor daño a las moléculas termosensibles, por ello se estudió la obtención de un extracto de ajo a diferentes condiciones de tratamiento de ultrasonido para su aplicación como agente antioxidante en hamburguesas de cerdo. Para la obtención de los extractos se utilizó ajo blanco procedente de Puebla, se aplicó ultrasonido durante 30 y 50 min utilizando diferentes concentraciones de etanol (70-30 % y 80-20 %) a diferentes temperaturas (25 y 50 °C). Una vez elegidas las condiciones de extracción se evaluaron distintas concentraciones de extracto (0.5, 1.5 y 2.5 %) por medio de análisis de color e índice de TBA para determinar que concentración sería la adecuada para agregar a la carne, utilizando 2.5 % de concentración de extracto se evaluó la capacidad antioxidante del extracto durante 8 días de almacenamiento a una temperatura de 15 °C. Por último se obtuvo extracto por medio de ultrasonido durante 50 min a 50 °C utilizando una concentración de etanol del 70 %, ya que de acuerdo con los resultados de capacidad antioxidante (6.55 mmoles TROLOX/ ml) y el contenido de fenoles (3.21 mg de GAE/ml) estas condiciones aseguran la obtención de compuestos antioxidantes, que hacen efectivo su uso como aditivo de origen natural, sin embargo, el contenido de fenoles obtenido indicó que no todos los compuestos antioxidantes presentes en el extracto son polifenoles. Finalmente se aplicó el extracto de ajo a carne para hamburguesas y se evaluó el índice de ácido 2-tiobarbiturico (TBA) y el color para valorar su eficacia. Los resultados de luminosidad variaron de 71.3 a 72.9, lo cual se le atribuye a la exudación de agua, para el índice de TBA se obtuvieron valores de 0.0407 a 0.1621  $\mu\text{g}$  de MDA que fueron 3 % mayores a los resultados presentados en la carne con butilhidroxitolueno BHT. De acuerdo con lo obtenido se demostró que el extracto de ajo a una concentración de 2.5 % resulta ser eficiente en la inhibición de la peroxidación lipídica de la carne, garantizando disminuir la formación de radicales libres, también ayuda a ralentizar el crecimiento microbiano, pero debido a las condiciones de extracción y al disolvente utilizado, algunos de los compuestos organosulfurados con propiedades antimicrobianas pueden llegar a perder su poder de inhibición.



## 1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años los consumidores han demostrado preocupación por el consumo de alimentos que contiene aditivos “sintéticos”, buscando cada vez más ingerir aditivos de origen natural. Esto ha impulsado llevar a cabo estudios sobre la efectividad de productos naturales como aditivos, específicamente con propiedades antimicrobianas y antioxidantes. Entre estos productos se encuentra el ajo, ya que se ha demostrado que contiene compuestos bioactivos con propiedades antimicrobianas y antioxidantes, que le permiten ser considerado como alimento funcional (Bender y Bárcenas, 2013).

El ajo fresco posee distintos componentes, su alto contenido de compuestos azufrados hace que sea factible utilizarlo como conservador de alimentos, ya que inhibe el crecimiento de microorganismos y la formación de radicales libres (López, 2017). En México la producción de ajo ha aumentado desde 2016, pero a diferencia de los países líderes en su producción, en nuestro país el comercio es poco tecnificado ya que el ajo se consume casi en su totalidad en forma seca o sin ningún tratamiento previo

Los métodos utilizados para obtener extractos a nivel industrial se basan en tiempos cortos de extracción, sin embargo, se obtiene una calidad de aceite baja debido al uso de solventes orgánicos que pueden llegar a ser perjudiciales a la salud del ser humano (Cerde, 2018). Por ello es necesario encontrar una nueva alternativa para la extracción de aceites esenciales, la cual elimine o reduzca drásticamente el uso de solventes orgánicos volátiles.

El ultrasonido es una potencia tecnológica emergente, se aplica como una alternativa de extracción o para asistir en procesos de extracción de componentes volátiles de plantas, incluyendo aceites esenciales. La proporción en la composición de los extractos y el rendimiento depende de la temperatura a la que se lleve a cabo el proceso y del disolvente, o mezcla de disolventes utilizados (Peredo *et al.*, 2009).

La carne de res es un alimento muy consumido, se estimó que en 2018 el consumo per cápita en México fue de 14.8 kg (COMECARNE, 2018). Las hamburguesas de carne tienen una vida útil corta debido a cierto deterioro durante el almacenamiento. Los cambios oxidativos (oxidación de lípidos) son uno de los principales factores ya que reducen la calidad y la vida útil de estos productos. Estas alteraciones ocurren con mayor frecuencia en carnes trituradas que en carnes intactas, debido a que al triturarlas la superficie de contacto de la carne con el aire aumenta sustancialmente (Naveena *et al.*, 2008).



La rancidez oxidativa da como resultado una serie de cambios indeseables en la carne, como cambios en el sabor, pérdida de color y daño estructural de las proteínas que reducen la calidad sensorial y la aceptabilidad de los productos cárnicos por parte del consumidor. Por lo tanto, los aditivos alimentarios de origen de origen natural han sido objeto de numerosas investigaciones en los últimos años (Serhat *et al.*, 2016).

Debido a lo anterior se propone la extracción asistida por ultrasonido de extracto de ajo, para evaluar sus compuestos bioactivos y utilizarlo como agente antioxidante en carne para hamburguesas almacenada en refrigeración.



## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Generalidades del ajo

El ajo (*Allium sativum* L.) es una hierba bulbosa que pertenece a la familia *Liliaceae*. El género *Allium* contiene más de 300 especies de plantas; entre ellas se encuentra el ajo, que es un bulbo perteneciente a la subfamilia *Alliaceae*. Sus características olorosas le permiten su denominación con el uso del término *Allium* que significa “oloroso” en latín (Greco, 2011). Diversas especies del género *Allium* han sido cultivadas durante miles de años por sus propiedades terapéuticas, higiénicas, su sabor y aroma. Esta hortaliza es un condimento natural por excelencia y forma parte de los hábitos alimentarios y terapéuticos de muchas culturas (Lancaster y Boland, 1990).

El ajo se caracteriza por tener un sistema radicular, al tener una raíz bulbosa compuesta de 6 a 12 bulbillos. Cada bulbillo se encuentra envuelto por una hoja protectora blanca o rojiza, membranosa muy delgada. De la parte superior del bulbo nacen las partes fibrosas, que se introducen en la tierra para alimentar y anclar a la planta. Los tallos de la planta son fuertes y crecen desde 40 a más de 55 centímetros de largo, terminando por las flores. Las flores se encuentran contenidas en una espata membranosa que se abre longitudinalmente en el momento de la floración (Bender y Bárcenas, 2013).

Su origen se ubica en el centro y sur de Asia donde se cultiva desde hace miles de años. En China se estima que en el año 2000 A.C. ya se conocía el ajo y formaba parte de la dieta diaria como condimento y componente medicinal importante. También se sabe que en Egipto alimentaban con ajos a los esclavos que construían las pirámides, porque se pensaba que les aportaba energía (Bender y Bárcenas, 2013).

#### 2.1.1. Taxonomía y morfología

La taxonomía y morfología de la planta del ajo es la siguiente:

Familia: *Liliaceae*

Subfamilia: *Alliaceae*

Nombre Científico: *Allium sativum* L.

Planta: Bulbosa, vivaz y bianual.

Raíces. Son blancas, fasciculadas, muy numerosas y con escasas ramificaciones.

Tallos. Son fuertes, de crecimiento determinado cuando se trata de tallos rastreros que dan a la planta un porte abierto, o de crecimiento indeterminado cuando son erguidos y erectos,



pudiendo alcanzar hasta 2-3 metros de altura. Dependiendo del marco de plantación, se suelen dejar de 2 a 4 tallos por planta. El tallo secundario brota de las axilas de las hojas, se asoma por el centro de las hojas (Cameroni, 2012) como se observa en la Figura 1.

Hojas. Son radicales, largas, alternas, comprimidas y sin nervios aparentes.

Flores. Se encuentran contenidas en una espata membranosa que se abre longitudinalmente en el momento de la floración y permanece marchita debajo de las flores. Se agrupan en umbelas. Cada flor presenta 6 pétalos blancos, 6 estambres y un pistilo. Aunque se han identificado clones fértiles, los bajos porcentajes de germinación de las semillas y las plántulas de bajo vigor hacen que el ajo se haya definido como un apomítico obligado, término que se refiere a su capacidad para producir embriones sin existir fecundación previa (Cameroni, 2012).

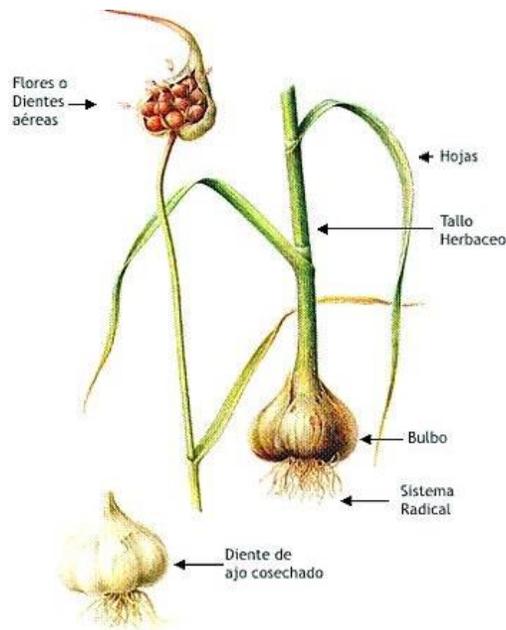


Figura 1. Estructura de la planta de ajo.

Fuente: Cameroni (2012).

### 2.1.2. Estacionalidad

El ajo es un cultivo de invierno que puede iniciar su desarrollo en el otoño o muy temprano en primavera al prevalecer temperaturas entre 13 y 24 °C como rango óptimo, 7 °C como mínimo y 30 °C como máxima (Zamora, 2016).

Este cultivo necesita un periodo de latencia para germinar, una vez recolectado varía en función de la variedad y la temperatura. En diversos cultivos es necesario someter los bulbos a bajas temperaturas para evitar que broten de nuevo. Para la formación de bulbos requiere fotoperiodos largos y temperaturas medias, además de tener un crecimiento



vigoroso con temperaturas nocturnas inferiores a 16 °C. Bajo condiciones de día corto y bajas temperaturas no forman bulbos. Esta planta no es sensible al frío, aunque se desarrolla mejor en climas templados (Cerda, 2018).

### 2.1.3. Producción mundial

A nivel internacional, se muestra la clasificación de los principales países productores de ajo en la Tabla 1, de manera general se pueden diferenciar cuatro grandes centros mundiales de producción (Greco, 2011). Estos son:

- a) El centro asiático que produce el 86 % del ajo del mundo.
- b) El centro europeo o mediterráneo, conformado por España, Francia e Italia (se anexan Egipto y Turquía por proximidad geográfica), que aporta el 6 %.
- c) El centro norteamericano, que agrupa a México y Estados Unidos, aporta el 3 %.
- d) El centro sudamericano, conformado por Brasil, Argentina y Chile, que aporta el 4 % de la producción global.

Tabla 1. Clasificación mundial de los países productores de ajo en 2016.

País	Posición	Producción anual (t)
China	1°	21,263,237
India	2°	1,400,000
Bangladesh	3°	381,851
Egipto	4°	280,216
Corea del Sur	5°	275,549
Estados Unidos	11°	167,370
México	20°	75,987

Fuente: FAOSTAT (2016)

### 2.1.4. Producción en México

La Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER) en 2018 informó que la producción de ajo ha aumentado desde 2016, donde Zacatecas produce más de 50 por ciento de la producción total del país, de echo el ajo “Hecho en México” aumentó en 10.5 % durante 2018. El ajo se cultiva en 21 entidades del país y los principales estados productores son Zacatecas, Guanajuato, Puebla, Baja California y Sonora, estados que aportan el 87.1 % de la producción nacional.

El Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) indicó que en 2019 la producción fue de 388 toneladas, con un rendimiento de 12 125 kg por hectárea.



En los últimos años, se ha avanzado en la creación de nuevas variedades de ajo y en mejorar las técnicas de conservación con el fin de ampliar la oferta nacional y la exportación. Actualmente, de la producción nacional, se exporta alrededor del 27 %, el 10 % es para uso industrial y el resto se destina al mercado interno, donde prácticamente se consume en fresco.

### 2.1.5. Exportaciones e importaciones en México

Referente a su comercio exterior, el ajo alcanzó en 2016 ventas por 21.3 millones de dólares, un avance de 61.3 % a tasa anual, comercializándose en 13 destinos internacionales. Entre 2013 y 2016, las ventas de ajo mexicano aumentaron en 83.3 % al pasar de 11.6 millones de dólares, a los más de 21.3 millones reportados el año pasado, lo que equivale a una Tasa Media de Crecimiento Anual de 16.4 % (SADER, 2017).

Los principales destinos de exportación son Estados Unidos, Australia, Brasil, Francia y Martinica, los cuales representan el 98.9 % de las ventas al exterior de este producto.

### 2.2. Composición química

El ajo fresco posee distintos componentes, como se puede observar en la Tabla 2 y 3 se destacan el agua y los carbohidratos, como la fructosa, compuestos azufrados, fibra y aminoácidos libres. También tiene altos niveles de vitamina C, asimismo, posee un alto contenido de compuestos fenólicos, polifenoles y fitoesteroles.

Tabla 2. Composición química del ajo fresco.

Composición química del ajo (g)	
Agua	70.3
Proteína	5.3
Lípidos	0.3
Carbohidratos	23
Fibra	1.1

Fuente: Moreiras *et al.* (2013).

Tabla 3. Valor nutricional del ajo fresco.

Valor nutricional del ajo (mg)	
Calcio	14
Hierro	1.5
Iodo ( $\mu\text{g}$ )	94
Magnesio	25
Zinc	1
Sodio	19
Potasio	529
Fósforo	134
Selenio ( $\mu\text{g}$ )	2

Fuente: Moreiras *et al.* (2013).



En general el ajo presenta un mayor contenido de proteínas que otros vegetales, pero a su vez tiene un contenido de grasa menor. En cuanto a los minerales, el ajo tiene niveles importantes de potasio, iodo, sodio, calcio y hierro (Rahman, 2003).

También presenta un contenido moderado de selenio y germanio, pero su concentración depende de los minerales presentes en el suelo donde crece el bulbo (Bender y Bárcenas, 2013).

### 2.2.1. Principales componentes activos

El ajo contiene diversos componentes bioactivos responsables de distintas propiedades benéficas para la salud, además sus características son muy variables, lo que lo hace ser un alimento funcional de muchos usos. Contiene por lo menos 33 compuestos azufrados, varias enzimas, 17 aminoácidos y algunos minerales. De todas las especies de *Allium*, el ajo es el que contiene la mayor concentración de compuestos azufrados lo que le da una actividad antimicrobiana muy potente. Los principales compuestos azufrados son la aliína, alicina, ajoeno, trisulfuro de dialilo, salicisteína, vinilditiínas, disulfuro de alilpropilo, S-alil-mercapto cisteína, entre otros. Entre las enzimas importantes en la actividad antimicrobiana se encuentran la alinasa, peroxidasa y mirosinasa. Los aminoácidos y sus glucósidos, en especial la arginina, también influyen de manera importante en la actividad antimicrobiana, al igual que el selenio, germanio, telurio y trazas de otros minerales (Bhandari, 2012).

También tiene una potente actividad antioxidante debido a que muchos de sus componentes activos son eficaces para inhibir la formación de radicales libres. Además, refuerza el mecanismo de captación de radicales endógenos, aumentan las enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa y protegen a las lipoproteínas de baja densidad de la oxidación causada por los radicales (López, 2007). Entre los componentes antioxidantes de importancia en el ajo se encuentran los compuestos azufrados, selenio y aminoácidos libres, en especial la cisteína, glutamina, isoleucina y metionina.

### 2.2.2. Compuestos antioxidantes

El componente con mayor capacidad antioxidante es la alicina, aunque su efecto depende de la dosis y del tiempo (López, 2007). Se genera por reacciones enzimáticas cuando el ajo se tritura o se corta, ya que la aliína, aminoácido azufrado inodoro que se encuentra en el citoplasma de las células del ajo fresco intacto, entra en contacto con la alinasa, enzima



presente en la vacuola, como consecuencia de la ruptura celular causada por la trituración o el corte (Bhandari, 2012). Lo anterior se presenta en la Figura 2, está reacción ocurre extremadamente rápido, en ella más del 80 % de aliina se metaboliza en los primeros 2 minutos.

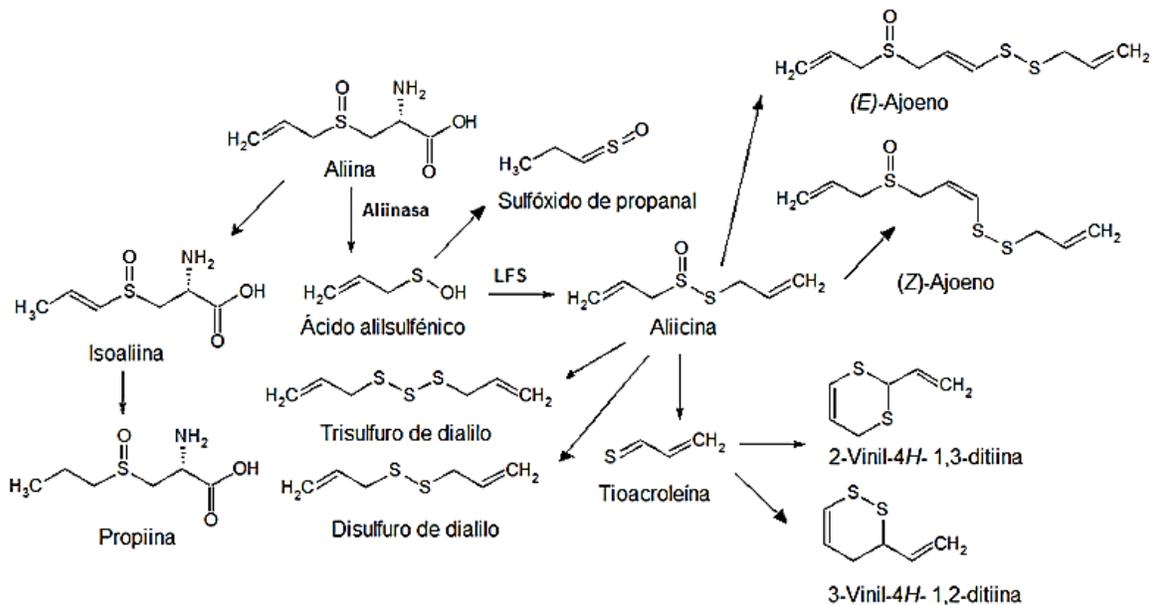


Figura 2. Reacción enzimática de aliina.

Fuente: Bender y Bárcenas (2013).

La alicina es un componente muy volátil e inestable, tiene una vida media muy corta, incluso a temperatura ambiente. En unas cuantas horas, ésta puede descomponerse en muchos tipos de tiosulfatos a través de diferentes rutas metabólicas como se presenta en la Figura 3. Por medio de otras degradaciones no enzimáticas, los tiosulfatos se transforman en otros compuestos azufrados tales como mono, di, tri y tetrasulfuros, tioles, tiofenos y anhídrido sulfuroso (Harris *et al.*, 2001).

Por ello se ha estudiado la extracción de aceite esencial, así como extractos, que además de mantener su potencial antioxidante por más tiempo incrementan el número de componentes estables hidrofílicos y altamente biodisponibles, además de contener fitoquímicos, selenio y flavonoides, en especial la alixina, la cual mejora la capacidad antioxidante.

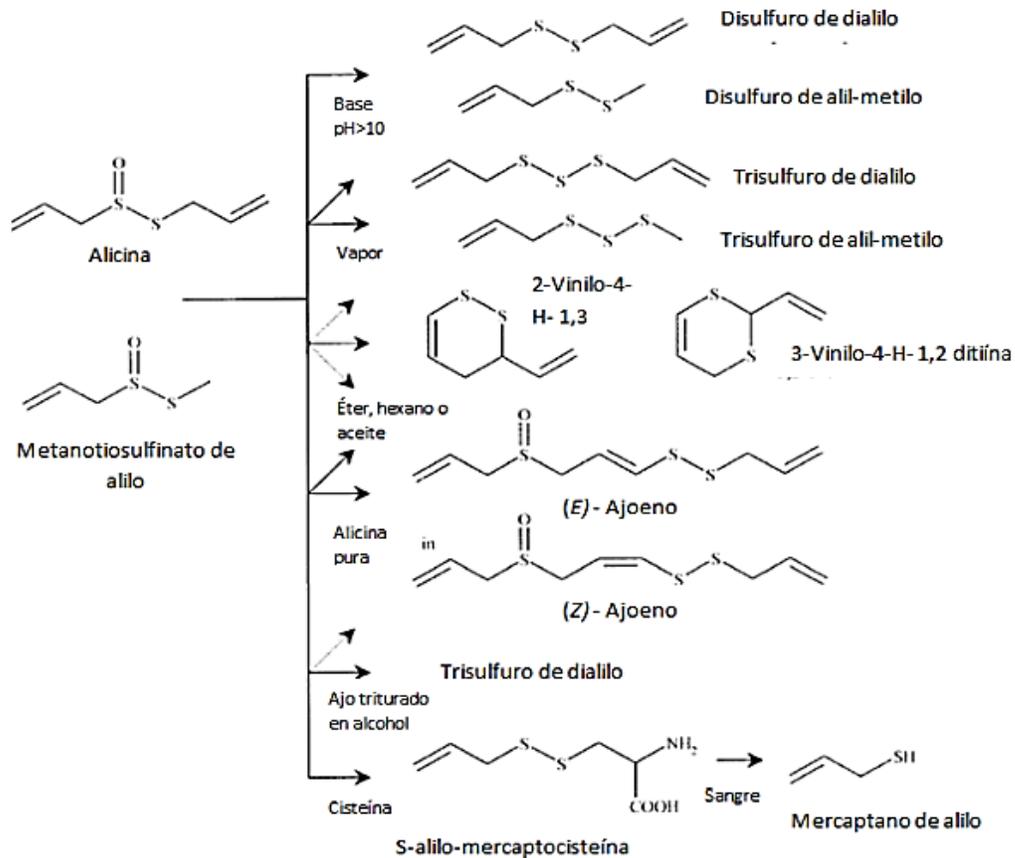


Figura 3. Descomposición de alicina en los principales tiosulfatos.

Fuente: con

### 2.3. Aplicaciones del ajo

Por sus propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antivirales y antifúngicas se consideran a los productos derivados del ajo para aumentar la vida de anaquel de algunos alimentos. Pero no solo son estudiados en el área de alimentos si no también en el área médica de forma terapéutica para combatir algunas enfermedades degenerativas. En la Tabla 4 se muestran algunas de estas aplicaciones a lo largo de los últimos años.

Tabla 4. Estudios sobre algunas aplicaciones del ajo.

Aplicación	Efecto o beneficio	Autor
Efecto de ajo fresco, ajo en polvo y aceite esencial de ajo en el crecimiento microbiano en salchicha de pollo cruda.	El ajo fresco (50 g/kg de salchicha) demostró mayor efecto, pero un sabor muy fuerte. La adición de 30 g de ajo fresco por cada kg de salchicha no tuvo un sabor tan fuerte y produjo importantes cambios antioxidantes y efectos antimicrobianos lo que prolongó la vida útil del producto hasta 21 días.	Sallam <i>et al.</i> (2004)



Tabla 4. Estudios sobre algunas aplicaciones del ajo (continuación)

Aplicación	Efecto o beneficio	Autor
Capacidad antioxidante y antimicrobiana de extractos de ajo con distintos solventes y adicionándolos a medallones de carne de cerdo molida,	Todos los extractos retardaban la oxidación de lípidos significativamente e inhibían el crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Escherichia coli</i> O157:H7 comparados con aditivos no naturales.	Park y Chin (2010)
Efectividad de encapsulados de ajo para la inactivación de <i>Salmonella spp.</i> y <i>Listeria spp.</i> , en espinacas frescas.	Se obtuvo un efecto sinérgico y una reducción del 50 % de la dosis de irradiación.	Gomes <i>et al.</i> (2011)
Influencia del ajo fresco en la vida de anaquel de pan parcialmente horneado almacenado en refrigeración.	La adición de ajo fresco a pan parcialmente horneado almacenado en refrigeración permitió prolongar la vida útil del producto 14 días más de lo que se logra con el pan sin ajo.	Luna (2012)
Efecto antioxidante que tiene el extracto de ajo por medio de estudios <i>in vitro</i> realizados con células amnióticas humanas	Disminución de la producción de radicales libres.	Navarro (2007)
Evaluación de las propiedades fisicoquímicas y antioxidantes de panza de cerdo adicionada con ajo en polvo.	Incremento en las tonalidades rojizas y amarillas de panza de cerdo y reducción del contenido de productos oxidativos volátiles.	Park <i>et al.</i> (2008)
Encapsulación de aceite esencial de ajo con $\beta$ -ciclodextrinas para incrementar la estabilidad de los compuestos activos	Al aplicarlo en tomates frescos extendieron su vida útil hasta por 5 semanas.	Ayala y González (2010)
Aplicación de diferentes formulaciones de ajo y BHA a salchichas.	La adición de BHA no incrementaba significativamente la efectividad antioxidante y antimicrobiana del ajo, pero la adición de este último mejoraba significativamente su conservación.	Kim <i>et al.</i> (2009)
Aplicación de diferentes presentaciones de ajo (fresco, polvo, aceite) a carne de camello almacenada en refrigeración.	Un retardo en la oxidación de lípidos y crecimiento microbiano, siendo los ingredientes más efectivos el ajo fresco o en polvo para la conservación de este producto.	Gheisari y Ranjbar (2012)



Tabla 4. Estudios sobre algunas aplicaciones del ajo (continuación)

Aplicación	Efecto o beneficio	Autor
Efecto quimiopreventivo del extracto de ajo frente al cáncer de colon.	La inhibición de las células cancerígenas del colon mediante la inhibición de la mitosis de estas células.	Katsuki <i>et al.</i> (2006)
Estudio aleatorizado a largo plazo con ajo, junto con otros micronutrientes (vitamina B12, vitamina E y vitamina C) para inhibir al <i>Helicobacter pylori</i> .	Debido a que <i>H. Pylori</i> tiene la capacidad de disminuir la concentración de folatos en plasma, demostraron un significativo incremento en la concentración sérica de folatos y glutatión (GSH).	Wang <i>et al.</i> (2009)
Extracción de fructanos tipo inulina a partir de ajo blanco.	El porcentaje extraído es del 18 %.	Fuertes (2014)

## 2.4. Métodos de extracción

Para obtener extractos de origen vegetal existen diferentes métodos de obtención, estos son procesos que sirven para separar y concentrar los componentes y así obtener aceites esenciales y otros extractos vegetales aromáticos. Los métodos de extracción más utilizados son la destilación por arrastre de vapor, extracción con disolventes, extracción por fluidos supercríticos y extracción por microondas (Peredo *et al.*, 2009).

A continuación, se muestra una tabla comparativa de los métodos de extracción (Tabla 5), tanto convencionales como no convencionales, en la tabla se señalan las ventajas y desventajas de cada uno de ellos.

Tabla 5. Comparación de métodos.

Método	Ventajas	Desventajas
<p><b>Arrastre de Vapor</b> Fuente: Márquez (2003).</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>🕯️ Buenos rendimientos</li> <li>🕯️ Obtención de aceite puro libre de solventes</li> <li>🕯️ Bajo costo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>🕯️ Polimerización y resinificación de los terpenos</li> <li>🕯️ Hidrólisis de ésteres</li> <li>🕯️ Destrucción térmica de algunos componentes</li> <li>🕯️ Tiempos de extracción largos</li> </ul>



Tabla 5. Comparación de métodos (continuación)

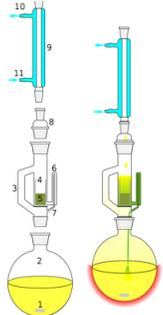
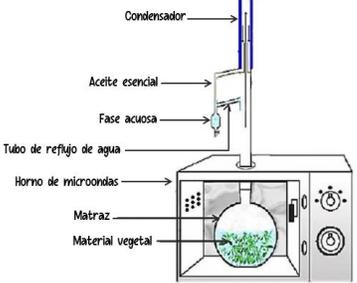
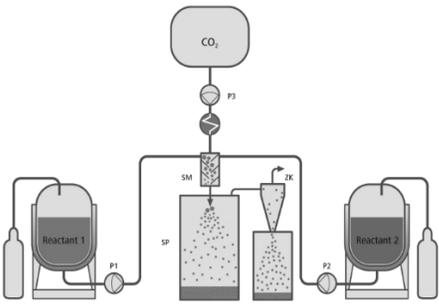
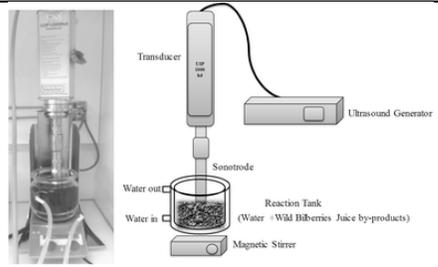
Método	Ventajas	Desventajas
 <p><b>Hidrodestilación</b> Fuente: Márquez (2003).</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>⦿ Configuración sencilla y económica</li> <li>⦿ Método muy utilizado</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>⦿ Tiempos de extracción largos</li> <li>⦿ Pérdida de compuestos volátiles por las altas temperaturas</li> <li>⦿ Alto consumo energético</li> <li>⦿ Calentamiento difícil de controlar</li> <li>⦿ Parcial solubilización de los compuestos más polares</li> </ul>
 <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Buzo / agitador / granallas o esferas</li> <li>2. Balón</li> <li>3. Brazo para ascenso del vapor</li> <li>4. Cartucho de extracción o cartucho Soxhlet</li> <li>5. Muestra (resoluo)</li> <li>6. Entrada del sifón</li> <li>7. Descarga del sifón</li> <li>8. Adaptador</li> <li>9. Refrigerante (condensador)</li> <li>10. Entrada de agua de refrigeración</li> <li>11. Salida de agua de refrigeración</li> </ol> <p><b>Soxhlet</b> Fuente: Campos (2009).</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>⦿ No provoca alteración química ni termo destrucción de los componentes</li> <li>⦿ Se pueden separar los componentes</li> <li>⦿ Utiliza temperaturas bajas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>⦿ Existe riesgo de incendio y/o explosión</li> <li>⦿ Los aceites esenciales obtenidos contienen trazas de solvente</li> <li>⦿ Algunos solventes tienen restricciones en residuos máximos</li> <li>⦿ Tiempos de extracción largos</li> <li>⦿ Costo elevado</li> <li>⦿ Contamina el medio ambiente.</li> </ul>
 <p><b>Microondas</b> Fuente: Bayramoglu <i>et al.</i> (2008).</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>⦿ Reducción considerable de tiempo y energía</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>⦿ Influye en los bioactivos debido a que suministran un rápido calentamiento</li> <li>⦿ Pérdida de polifenoles</li> </ul>
 <p><b>Fluidos supercríticos</b> Fuente: Khajeh <i>et al.</i> (2004).</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>⦿ Altos rendimientos</li> <li>⦿ Ecológico</li> <li>⦿ Bajas temperaturas de extracción</li> <li>⦿ No hay alteración química del aceite</li> <li>⦿ Fácil retiro y reciclaje del solvente</li> <li>⦿ Se puede cambiar la composición del aceite extraído cambiando los parámetros de operación</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>⦿ Alto costo</li> <li>⦿ Ácidos grasos, pigmentos y ceras también pueden ser extraídos junto con el aceite</li> <li>⦿ Alta inversión inicial.</li> </ul>



Tabla 5. Comparación de métodos (continuación)

Método	Ventajas	Desventajas
 <p><b>Ultrasonido</b> Fuente: Chemat <i>et al.</i> (2011).</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>☯ Alto rendimiento</li> <li>☯ Reducción considerable de tiempo</li> <li>☯ Bajas temperaturas de extracción</li> <li>☯ Alta transferencia de masa.</li> <li>☯ Provoca un menor daño en las moléculas termosensibles.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>☯ Uso de disolvente</li> <li>☯ Filtración necesaria</li> <li>☯ Costos elevados (Desde \$30,000 hasta más de \$100,000)</li> </ul>

### 2.4.1. Extracción asistida por ultrasonido (UAE)

El ultrasonido se aplica como una alternativa de extracción o para asistir en procesos de extracción de componentes volátiles de plantas, incluyendo aceites esenciales. La proporción en la composición de los extractos y el rendimiento depende de la temperatura a la que se lleve a cabo el proceso y del disolvente, o mezcla de disolventes utilizados (Peredo *et al.*, 2009).

La UAE es una potencia tecnológica emergente que puede acelerar la transferencia de calor y masa, y ha sido sucesivamente utilizada en el campo de la extracción. Las ondas de ultrasonido después de la interacción con material vegetal alteran sus propiedades físicas y químicas y su efecto cavitacional facilita la liberación de compuestos extraíbles y mejora el transporte de masa mediante la ruptura de las paredes celulares de las plantas (Chemat *et al.*, 2011).

#### 2.4.1.1. Mecanismo de extracción

Las ondas de ultrasonido, al igual que todas las ondas de sonido, se componen de ciclos de compresión y expansión (rarefacción). Los ciclos de compresión son regiones densas en las que un número de moléculas se agrupan acercándose mucho entre sí, ejerciendo una presión positiva sobre el líquido; los ciclos de expansión (regiones que tiene relativamente pocas moléculas, corresponde a zonas bajas de presión) ejercen una presión negativa, creando distancia entre las moléculas (Chemat *et al.*, 2011) (Fig.4).

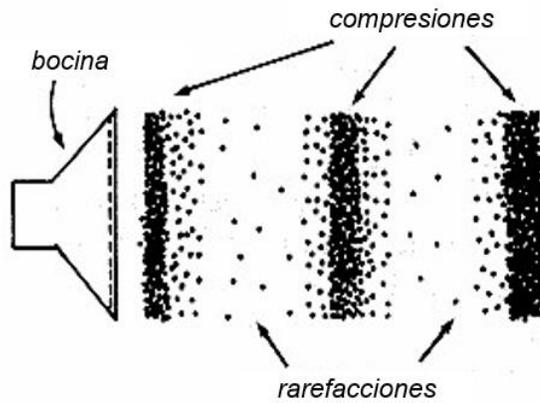


Figura 4. Naturaleza del sonido.

Fuente: Chemat *et al.* (2011).

Cada medio tiene una distancia molecular crítica, por debajo de este valor crítico, el líquido permanece intacto, pero por encima de esta distancia generando huecos o vacíos. En el caso del ultrasonido, si el ciclo de expansión es lo suficientemente fuerte, la distancia entre las moléculas contiguas puede alcanzar o incluso superar la distancia crítica molecular del líquido generándose huecos fenómeno conocido como “cavitación” (Chemat *et al.*, 2011).

En los vacíos creados en el medio se encuentran las burbujas de cavitación que son responsables del efecto ultrasónico. De hecho, estas burbujas de la cavitación son capaces de crecer durante las fases de expansión y disminuir de tamaño durante el ciclo de compresión. Cuando el tamaño de estas burbujas alcanza un punto crítico colapsan durante el ciclo de compresión y ocurre una liberación de grandes cantidades de energía. La temperatura y la presión en el momento del colapso se ha estimado de hasta 5 000 K y 2 000 atmósferas en un baño ultrasónico (Fig. 5) (Mason *et al.*, 1996).

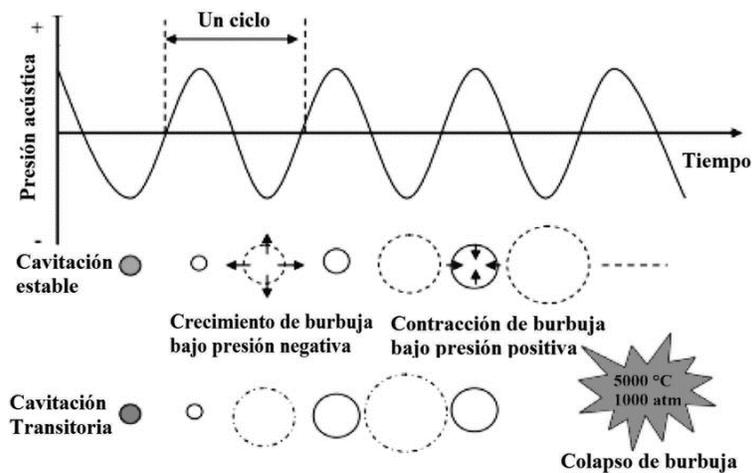


Figura 5. Proceso de cavitación de una burbuja por ultrasonido.

Fuente: Navajas (2019).



Esto crea puntos que son capaces de acelerar dramáticamente la reactividad química en el medio. Cuando estas burbujas colapsan en la superficie de un material sólido, la alta presión y temperatura liberada generan microflujos dirigidos hacia la superficie sólida. Estos microchorros son responsables del efecto desengrasante de los ultrasonidos en las superficies metálicas que es ampliamente utilizado para la limpieza de los materiales.

Como se muestra en la Figura 6, una burbuja de cavitación se puede generar cerca de la superficie del material vegetal (a) a continuación, durante un ciclo de compresión, esta burbuja colapsa (b) y se crea un microflujo dirigido hacia la planta matriz (b y c). La alta presión y temperatura que participan en este proceso destruye las paredes celulares de la planta matriz y su contenido puede ser puesto en libertad en el medio (d) (Chemat *et al.*, 2011).

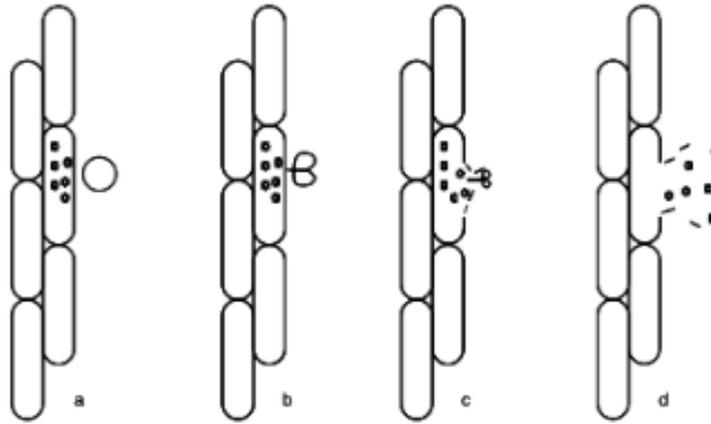


Figura 6. Mecanismo de cavitación en una superficie sólida.

Fuente: Chemat *et al.* (2011).

#### 2.4.1.2. Tipos de ultrasonido

Sus aplicaciones pueden dividirse en dos: ultrasonido de señal y de potencia, esto debido a que el ultrasonido es utilizado para realizar evaluaciones no invasivas ni destructivas y por ser fuente de energía según el Centro de Sonoquímica de la Universidad de Coventry en el Reino Unido (Mulet *et al.*, 1999).

##### a) Ultrasonido de señal (100 kHz a MHz)

En este ultrasonido el producto modifica la señal y esta proporciona información sobre dicho producto. Es utilizado para monitorear un proceso o producto; además son señales de ultrasonido de baja intensidad. Ejemplos de aplicaciones en la industria alimentaria incluyen: medida del grosor de la cáscara de huevo, detección de agujeros en quesos y papas, medición del estado de maduración de melones y aguacates, determinación de



propiedades reológicas en quesos, propiedades de textura de frutas como manzana, kiwi y melocotón (Mulet *et al.*, 1999).

b) Ultrasonido de potencia (18 a 100 kHz)

Hoy en día, según el Centro de Sonoquímica el ultrasonido de potencia se considera una prometedora tecnología para la industria de procesamiento de alimentos. Son señales de alta intensidad que se utilizan para modificar un proceso o un producto (Mulet *et al.*, 1999).

Con una frecuencia más baja y mayor potencia producen cambios físicos y químicos en el medio a través de la generación y subsiguiente colapso de burbujas de cavitación, las cuales aparecen, crecen y colapsan dentro del líquido. Esto ocurre asimétricamente cerca de las interfases y golpes sobre la superficie sólida. Se requiere de un medio líquido, un generador de energía y un transductor, el cual convierte la energía eléctrica, magnética o cinética en energía acústica (Mulet *et al.*, 2003).

Actualmente existen tres diferentes tipos de transductores:

1. Transductores de manejo de líquidos: producen una onda acústica cuando la energía cinética del líquido hace que una parte móvil del sistema vibre. Son equipos muy durables especialmente importantes para procesos de homogeneización y mezclado (Mason, 1999).
2. Transductores magnéticos: se basan en el cambio de dimensión de un material debido a la aplicación de un flujo magnético (Mulet *et al.*, 2003).
3. Transductores piezoeléctricos: la piezoelectricidad es la habilidad de los cristales para generar un voltaje en respuesta a un estrés mecánico aplicado. Estos transductores producen energía acústica por medio de cambio de tamaño, debido a señales eléctricas en materiales piezocerámicos (Azuola y Vargas, 2007). Son los equipos más ampliamente utilizados; usan cargas con distintas polaridades hacia las cuales el material responde por contracción o expansión. Pueden utilizarse en un amplio rango de frecuencias (Mason, 1999).

Algunos posibles usos del ultrasonido de potencia son: limpieza y desinfección de productos difícilmente cubiertos por métodos convencionales, generación de bases emulsificadas para sopas y salsas, impregnación de pigmentos en cueros, filtración, cristalización, congelación, deshidratación de arroz, zanahorias, cebolla y manzana, y extracción (Azuola y Vargas, 2007).



### 2.4.1.3. Equipo de ultrasonido

Existen dos tipos diferentes de equipos de ultrasonido que se utilizan comúnmente en el laboratorio. El primero es el baño de limpieza por ultrasonido (Figura 7) que se utiliza comúnmente para una dispersión sólida en disolvente (el ultrasonido reducirá dramáticamente el tamaño del sólido lo que aumentará su solubilidad), para la desgasificación de soluciones o incluso para la limpieza de material pequeño por inmersión del objeto en el baño. Los ultrasonidos son menos utilizados para las reacciones químicas, incluso si son fáciles de manejar y económicamente ventajoso porque la reproducibilidad de la reacción es baja. De hecho, la intensidad deliberada es baja y es muy atenuada por el agua contenida en el baño y en las paredes del recipiente de vidrio utilizado para el experimento (Chemat *et al.*, 2011).



Figura 7. Limpiador de baño ultrasónico.

Fuente: Biostad Analytical (1995)

El segundo equipo de ultrasonido es más potente porque la intensidad de ultrasonidos se delibera en una superficie pequeña (sólo la punta de la sonda) en comparación con el baño de ultrasonido. Otro cambio es que la sonda se sumerge directamente en el matraz de reacción como se muestra en la Figura 8. Este sistema de sonda se utiliza ampliamente para sonicación de pequeños volúmenes de muestra, pero hay que tener cuidado especial por el aumento rápido de la temperatura en la muestra (Chemat *et al.*, 2011).



Figura 8. Equipo de ultrasonido.

Fuente: China Internet Information Center (2007)

#### 2.4.1.4. Aplicaciones de ultrasonido en la investigación alimentaria

El uso de ultrasonido puede mejorar el proceso de extracción al aumentar la transferencia de masa entre el solvente y el material vegetal. El colapso de las burbujas de cavitación conduce a una mejor disrupción celular a través de la formación de micro chorros debido al colapso asimétrico de las burbujas cerca de una superficie sólida. Esto permite una mejor penetración del solvente en el cuerpo de la planta y también puede romper las paredes celulares (Tómas *et al.*, 2001). Como consecuencia, el uso de ultrasonido en el uso de la extracción de plantas tiene beneficios en el aumento de la transferencia de masa, mejor penetración del solvente, menor dependencia del solvente utilizado, extracción a temperaturas más bajas, tasas de extracción más rápidas y mayores rendimientos del producto (Vinatoru, 2001).

Las primeras extracciones de aromas son difíciles de fechar con precisión. Antiguos testimonios permiten concluir que los hindúes controlaban la fermentación y obtenían aceites odorantes a partir de aparatos de destilación rudimentarios. Actualmente, este proceso de destilación ha sido mejorado por su acoplamiento con ultrasonidos o incluso por el desarrollo de nuevas extracciones asistidas por ultrasonidos (Chemat *et al.*, 2011) como se muestra en la Tabla 6.



Tabla 6. Aplicaciones de ultrasonido en alimentos.

Matriz	Analito	Observaciones	Autor
Brandis añejos	Compuestos aromáticos	Utilizando baño ultrasónico a 20° C se extrajeron 37 compuestos, incluidos Linalool (297 µg/L) α-terpineol (248 µg/L) y citronelol (397 µg/L).	Caldeira <i>et al.</i> (2004)
Vino	Compuestos volátiles	Con baño ultrasónico a 40 kHz se extrajeron 12 compuestos con concentraciones de 0.422 mg/L a 168 mg/L.	Cabredo-Pinillos <i>et al.</i> (2006)
Lavándula angustifolia	Aceite esencial	Con sonda de ultrasonido a 20 kHz a 60° C aumento el contenido de alcanfor y acetato de linalilo de 2 a 3 veces en comparación con la hidrodestilación.	Porto <i>et al.</i> (2009)
Cítricos	Linalol	Mas del 80 % de los compuestos detectados son derivados del linalol.	Alissandrakis <i>et al.</i> (2003)
Tomates	Licopeno	El rendimiento se mejora cuando el ultrasonido se combina con microondas.	Liangfu y Zelong (2008)
Frambuesas	Antocianinas	Se tiene el mismo rendimiento después de 3.3 min por extracción asistida por ultrasonido en comparación a 53 min utilizando extracción convencional.	Chen <i>et al.</i> (2007)
Ajo	Aceite esencial: compuestos organosulfúricos	Existe una menor degradación térmica con el ultrasonido en comparación con la destilación convencional y asistida por microondas.	Kimbaris <i>et al.</i> (2006)

Para la industria alimentaria el uso de ultrasonidos es cada vez más importante en cualquier proceso. La matriz principal de la extracción asistida por ultrasonido es vegetal. Los compuestos extraídos se utilizan de muchas formas: de forma inmediata (licor), como aditivos alimentarios o cosméticos (aceite esencial).

Las extracciones asistidas por ultrasonido han estudiado una amplia variedad de frutas y verduras porque los antioxidantes están presentes en diferentes cantidades en diferentes variedades de plantas y estos antioxidantes provienen de diferentes familias (Tabla 6). Uno de los antioxidantes más comunes es el licopeno, como en el caso de Liangfu y Zelong en 2008, ellos no solo trabajaron con el ultrasonido sino también en el acoplamiento de



ultrasonidos con microondas, lo que brinda una extracción de licopeno en solo 6 minutos. Otro ejemplo es la extracción de antocianinas desarrollada por Chen et al. en 2007.

## 2.5. Antioxidantes

Un antioxidante es cualquier molécula capaz de prevenir o retardar la oxidación, entregando uno o más de sus electrones para estabilizar algún componente biológico desapareado por efecto del ataque de radicales libres (Valenzuela y Pérez, 2016). Muchos estudios han indicado que la oxidación lipídica puede ser controlada o, al menos, minimizarse efectivamente mediante el uso de antioxidantes. Estos compuestos pueden ir desde antioxidantes fenólicos comerciales, hasta los más exóticos compuestos aislados de productos naturales.

El principal motivo de la adición de antioxidantes a diferentes tipos de productos es retardar la oxidación de lípidos. En productos cárnicos esta oxidación es una de las principales causas de deterioro en muchos alimentos naturales y procesados. Provoca cambios en varios atributos como el sabor, la textura, la vida útil, la apariencia y el valor nutricional, y se puede observar tanto en grasas vegetales como animales. Los aceites ricos en ácidos grasos insaturados (FAS), y FAS particularmente poliinsaturados, son más susceptibles a la degradación oxidativa de las AF saturados (Bravi *et al.*, 2017).

### 2.5.1. Tipos de antioxidantes

Los antioxidantes se pueden clasificar considerando su naturaleza y solubilidad (Jamanca y Alfaro, 2017):

- a. Por su naturaleza: Los antioxidantes pueden ser naturales o sintéticos.
  - I. Los antioxidantes naturales son los que se encuentran de manera natural en los alimentos, son principalmente de origen vegetal, como: vitaminas (vitaminas A, C y E), minerales (selenio, zinc y cobre) o sustancias fotoquímicas (polifenoles).
  - II. Los antioxidantes sintéticos son producidos por síntesis química y usualmente son codificados para su aplicación en la industria de los alimentos. Dentro de los antioxidantes sintéticos más usados en alimentos se encuentran el BHT, BHA, TBHQ y los ésteres del ácido gálico, como el galato de propilo (Politeo *et al.*, 2007). Sin embargo, estos antioxidantes tienen la desventaja de que son volátiles y se descomponen fácilmente a altas temperaturas. En la Tabla 7 se muestran algunos ejemplos de éstos.



Tabla 7. Clasificación de los antioxidantes.

Nombre	Código	Origen	Uso habitual	Posibles efectos secundarios
Ácido láctico	E 270	Bacteriano	Judías, pepinos, alimentos infantiles, bebidas carbónicas, margaritas, salsas de ensalada.	Ninguno
Ácido L-ascórbico (Vitamina C)	E 300	Síntesis artificial	Bebidas de frutas, mermeladas, productos congelados con huevo, papa deshidratada	Ninguno en la dosis habitual
Ascorbato sódico	E 301	Síntesis artificial	Embutidos	Ninguno en la dosis habitual
Ascorbato cálcico	E 302	Síntesis artificial	Comida preparada	Ninguno
Palmitato de ascorbilo	E 304	Síntesis artificial	Embutidos, extracto de caldo de pollo	Ninguno
Tocoferoles de origen natural	E 306	Extractos de aceites	Postres preparados, aceites esenciales	Ninguno
Alfa-tocoferol sintético	E 307	Síntesis artificial	Embutidos	Ninguno
Gama-tocoferol sintético	E 308	Síntesis artificial	Embutidos	Ninguno
Delta-tocoferol sintético	E 309	Síntesis artificial	Embutidos	Ninguno
Lecitina	E 322	Habas de soja, maíz, cacahuete, huevo	Postres, crema, yogurt, leche en polvo, chocolate, margarina ligera, pastelería	Ninguno
Lactato de sodio	E 325	Sal potásica del ácido láctico	Queso, dulces	Ninguno
Lactato de potasio	E 326	Sal potásica del ácido láctico	Pasteles rellenos, merengues, empanadas	Ninguno
Lactato de calcio	E 327	Sal potásica del ácido láctico	-	Ninguno
Ácido cítrico	E 330	-	Frutas, hortalizas en conserva, sopas, helados, pescado, marisco congelado, bollería	Ninguno
Citrato de sodio	E 331	Síntesis artificial	Queso, helados, bebidas, vino, dulces	Ninguno
Citrato de potasio	E 332	Síntesis artificial	Leche condensada y en polvo, queso, nata, bollería, postres de crema, vino, dulces, bebidas, mermeladas light	Ninguno



Tabla 7. Clasificación de antioxidantes (continuación)

Nombre	Código	Origen	Uso habitual	Posibles efectos secundarios
Citrato de calcio	E 333	Síntesis artificial	Queso, confitería, vino, bebidas	Ninguno
Acido L-tartárico	E 334	Síntesis artificial	confitería, jaleas, mermeladas, bebidas	Ninguno
Tartrato de sodio	E 335	Síntesis artificial	-	Ninguno
Tartrato de potasio	E 336	Síntesis artificial	Mermelada, merengue de limón, pasteles	Ninguno
Tartrato doble de sodio y potasio	E 337	Síntesis artificial	Derivados del pescado y quesos	Ninguno
Ortofosfato mono, di o tri sódico	E 339 a, b o c	Síntesis artificial	Carne cocida, mantequillas, margarinas, embutidos, tartas de queso, queso	Ninguno
Ortofosfato mono, di o tri potásico	E 340 a, b o c	Síntesis artificial	Salsa, mermeladas, leche de soja en polvo	Ninguno
Ortofosfato mono, di o tri cálcico	E 341 a, b o c	Síntesis artificial	Levadura química, relleno de cereza, pasteles y repostería	Ninguno
Esteres cítricos de mono y triglicéridos de ácidos grasos	E 472 c	Ácido cítrico natural o idéntico al natural	Salsas instantáneas de repostería	Ninguno
Galato de sodio	E 312	Síntesis artificial	Copos de cereales, chicles, puré de papa instantáneo, aperitivos, grasas y aceites vegetales	Prohibido a lactantes y niños, provoca dolores de estómago, peligro de asmáticos y alérgicos a la aspirina
Acidocitrórbico	E 315	Síntesis artificial	Carnes en conserva	No se han descrito
Eritorbato sódico	E 316	Síntesis artificial	Carnes en conserva, mermeladas, confituras, jaleas, productos con huevo	No se han descrito
Butilhidroxianisol (BHA)	E 320	Síntesis artificial	Galletas, dulces, nueces, arroz aromatizado, pastel	Aumento de colesterol, degradación de vitamina D, prohibido a lactantes y niños
Butilhidroxitolueno (BHT)	E 321	Síntesis artificial	Chicle	Alergizante, degradación de vitamina D, prohibido en lactantes y niños

Fuente: Jamanca y Alfaro (2017).

Adicionalmente, los antioxidantes sintéticos han sido fuertemente cuestionados en torno a su seguridad y toxicidad (Valencia *et al.*, 2008); debido a esto, en la actualidad el interés en el desarrollo y uso de antioxidantes naturales ha tenido un incremento marcado; la mayoría



de los antioxidantes naturales evaluados para productos cárnicos son materiales alimenticios extraídos especialmente de plantas aromáticas, medicinales o especias, que contienen compuestos químicos que exhiben propiedades antioxidantes, tales como polifenoles, flavonoides, vitamina C y vitamina E (Hussain *et al.*, 2008).

- b. Por su solubilidad: Los antioxidantes pueden ser solubles en agua (hidrofílicos) o solubles en lípidos (hidrófobos):
- I. Los antioxidantes solubles en agua mejor conocidos como hidrofílicos se ubican principalmente en el interior de la célula ya que parte de este núcleo central y de los fluidos, están compuestos por agua, por lo tanto, la función que les ocupa a estos antioxidantes es de proteger el interior celular, actuando como regenerador y protector de la zona del citoplasma central y también del plasma sanguíneo. Como ejemplos tenemos a la vitamina C, glutatión, ácido úrico, catequinas, selenio y polifenoles (Jamanca y Alfaro, 2017).
  - II. Los antioxidantes solubles en lípidos se instalan en la zona externa de la célula, su función corresponde a la de proteger las membranas contra los radicales libres y peróxidos lípidos (degradación oxidativa de lípidos). Como ejemplos tenemos a la vitamina E o tocoferoles, vitamina A y carotenoides (Jamanca y Alfaro, 2017).

### 2.5.2. Acción de los antioxidantes

Existen diversos tipos de antioxidantes, según su mecanismo de acción. El utilizar unos u otros, depende de la tecnología de la industria alimentaria. Normalmente se utilizan asociaciones de varios, buscando un sinergismo, una potenciación de los efectos antioxidantes.

Los antioxidantes contrarrestan la oxidación de dos maneras diferentes; por ejemplo, protegiendo los lípidos objeto de la oxidación de iniciadores o por instalación en la fase de propagación. En el primer caso, los así llamados antioxidantes preventivos impiden la formación de las especies reactivas del oxígeno o atrapan las especies responsables de iniciar la oxidación. En el segundo caso, los llamados antioxidantes de rompimiento de cadena interceptan los radicales propagadores de la oxidación (LOO.) o participan indirectamente en detener la reacción de propagación (Laguerre *et al.*, 2007).

Normalmente trabajan descomponiendo los peróxidos, o impidiendo la formación de complejos con los restos de metales libres. Hay que tener en cuenta que los antioxidantes,



no deben cambiar las características del alimento en cuanto a su sabor, color, olor (Bueno, 2010). Es muy importante su estabilidad según el pH del alimento al que se adicionan, para que no sufran reacciones químicas que evitan su función. Deben ser inocuos para la salud, aunque el hecho de que sean autorizados no significa que sean inocuos, al igual que ocurre con los medicamentos. Por eso ocurre con frecuencia que después de ser autorizados durante años, se desautorizan (Jamanca y Alfaro, 2017).

Los antioxidantes no funcionan indefinidamente, en el momento en que se saturan, ya no pueden captar más radicales libres y dejan de ser efectivos, pues el proceso de oxidación continúa, simplemente estabilizan los radicales libres en lo que hemos denominado periodo de latencia (Bueno, 2010).

## **2.6. Deterioro oxidativo de la carne**

La carne se define como la parte comestible de los músculos de los animales de abasto, y de otras especies aptas para el consumo humano. Mientras que los productos cárnicos son los resultantes del procesamiento de la carne, y los principales son cecinas y hamburguesas (Valenzuela y Pérez, 2016). La carne y los productos cárnicos son parte fundamental de la dieta humana. El contenido en proteínas y vitaminas, así como en ácidos grasos esenciales, les confiere una composición adecuada para completar los requerimientos nutricionales (Domínguez *et al.*, 2019).

La carne en estado fresco y conservada bajo condiciones de refrigeración (4-5 °C), que es el formato de mayor distribución y consumo dentro de los países, posee una vida útil limitada (5-6 días). Debido a cambios autolíticos post mortem propios de la transformación del músculo en carne, fenómenos de oxidación de lípidos y proteínas, y crecimiento de microorganismos se desarrollan de manera natural en su superficie. Estos fenómenos disminuyen la calidad organoléptica y vida útil de la carne, convirtiéndola en un alimento altamente perecible (Valenzuela y Pérez, 2016).

Particularmente para el caso del deterioro de la carne por oxidación, este se debe a que la estabilidad de sus lípidos principalmente y proteínas dependen del balance entre los antioxidantes musculares y los componentes pro-oxidantes (Faustman *et al.*, 2010). La exposición al oxígeno y a la luz de la carne durante su vida de anaquel son unos de los principales factores que originan su oxidación. Los componentes pro-oxidantes pueden llevar a los tejidos a sufrir una disminución de los sistemas antioxidantes, llevando a la formación de especies reactivas del oxígeno (hidroxilos, superóxidos, y radicales del óxido



nítrico) que pueden interactuar con lípidos y proteínas constituyentes de la carne, causando su oxidación (Zhang *et al.*, 2013), y aparición de olores y sabores desagradables, alteración del color, y en general una disminución de su calidad organoléptica y valor nutritivo, además de generar compuestos potencialmente nocivos para la salud del consumidor como aminas heterocíclicas en carnes cocinadas (Tsen *et al.*, 2006).

La oxidación de las proteínas puede llevar a una disminución del valor nutritivo de la carne, debido a una menor biodisponibilidad de sus aminoácidos esenciales y digestibilidad de las proteínas. También se altera el color rojo brillante característico de la carne, dado por la oximioglobina, ya que cuando este pigmento se oxida, se torna púrpura (deoximioglobina) o amarronado (metamioglobina), afectando de manera negativa la percepción del consumidor (Lund *et al.*, 2011). Algunos procedimientos como el picado, cocción y otros, antes de la conservación de la carne o sus derivados por medio de la refrigeración y/o congelación, rompen la membrana de la célula muscular facilitando la interacción de los lípidos insaturados con las sustancias pro-oxidantes, acelerando la oxidación de los lípidos y permitiendo el rápido deterioro de la calidad y el desarrollo de la rancidez. La susceptibilidad del tejido muscular a la oxidación de los lípidos se relaciona también con el grado de insaturación de éstos, al tipo de músculo, a la dieta del animal, a la presencia de algunos aditivos, al método de cocción, la manera en que se ha conservado la carne y al pH del músculo (Valenzuela y Pérez, 2016).

### **2.6.1. Mecanismo de oxidación lipídica**

La oxidación lipídica es un fenómeno complejo inducido por el oxígeno en presencia de iniciadores tales como calor, radicales libres, luz, fotosensibilización, pigmentos y iones metálicos. Esta puede ocurrir mediante tres procesos principales: autooxidación no enzimática mediada por radicales libres (reacción espontánea del oxígeno atmosférico con los lípidos), fotooxidación no enzimática y no radical, y oxidación enzimática. Entre ellos, la autooxidación es el proceso más frecuente que provoca el deterioro oxidativo (Pokorny *et al.*, 2005). La autooxidación genera principalmente hidroperóxidos y compuestos volátiles, generalmente a través de tres fases que son mostradas en la Figura 9. El primer paso es la iniciación, la cual envuelve el rompimiento homolítico de un hidrógeno en posición  $\alpha$  relativo al doble enlace (RH) de la cadena del ácido graso y se forman los radicales libres (especies químicas con un electrón desapareado) a partir de las moléculas lipídicas (Laguerre *et al.*, 2007).



La propagación implica la reacción del radical lipídico ( $R\cdot$ ) con el oxígeno molecular para formar un radical lipídico peroxi ( $ROO\cdot$ ). Este radical peroxi es capaz de abstraer un átomo de hidrógeno de otro ácido graso insaturado y, por tanto, propagar la reacción en cadena (Pokorny *et al.*, 2005). Las reacciones de terminación, donde los radicales libres e hidroperóxidos (productos primarios de la oxidación lipídica, que no poseen ningún olor) son finalmente descompuestos para generar moléculas estables con bajo peso molecular (productos secundarios de la oxidación lipídica) tales como aldehídos, cetonas, ácidos y una larga variedad de compuestos que contienen nitrógeno y sulfuro imparten malos olores y sabores a los alimentos (Estévez *et al.*, 2003).

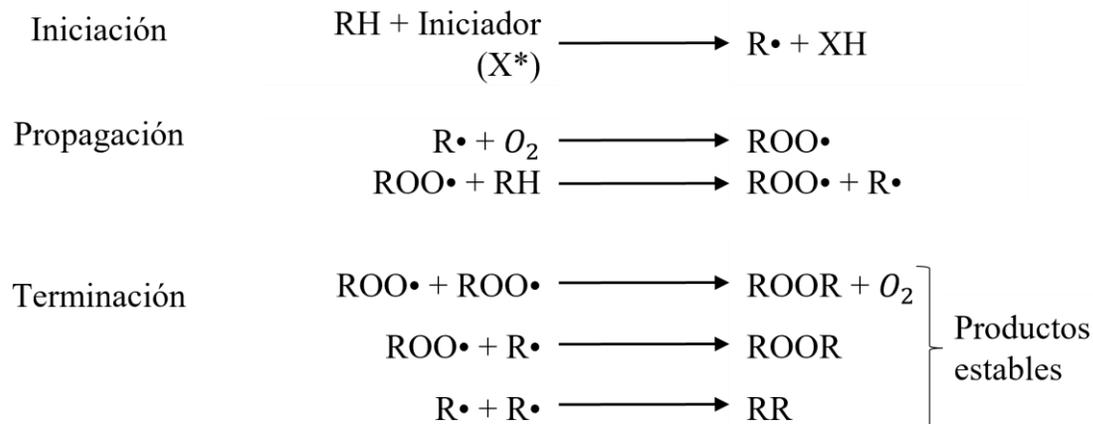


Figura 9. Mecanismo de autooxidación de los lípidos.

Fuente: Pokorny *et al.* (2005).

### 2.6.2. Factores que afectan la oxidación lipídica

La oxidación lipídica es influenciada por la composición de los ácidos grasos, factores de procesamiento, concentración y tipo de oxígeno, metales de transición, peróxidos, compuestos térmicamente oxidados, pigmentos y antioxidantes. Estos factores en conjunto afectan la oxidación de los lípidos y no es fácil diferenciar su efecto individual (Choe y Min, 2006).

### 2.6.3. Estrategias de prevención del deterioro oxidativo de la carne

Durante el siglo XXI un ambiente de progreso tecnológico y evolución en los estilos de vida, que coexisten con mayores exigencias de los consumidores, han generado a nivel mundial diversas estrategias para prevenir el deterioro oxidativo de la carne. Aunque se han estudiado varias metodologías de conservación, en la actualidad prolongar la vida útil de la carne sigue siendo un gran desafío tecnológico, debido a las altas pérdidas que se generan



de este costoso y nutritivo producto, que según la FAO en 2014 pueden llegar a ser entre un 25 a 33 % de la producción (Valenzuela y Pérez, 2016).

Las principales estrategias usadas para la conservación de la carne y productos cárnicos son:

- a) Intervención de la dieta de animales de abasto con compuestos antioxidantes naturales: Para disminuir el alto grado de oxidación que presenta la carne, hace varias décadas se ha intervenido la dieta de los animales, agregándoles antioxidantes naturales. Existen una serie de investigaciones en donde se han probado diferentes extractos naturales con propiedades antioxidantes en la ración de animales productivos como: Alberti *et al.* en 2014 uso de praderas naturales o sembradas en la crianza de bovinos, semillas de lino, vitamina E y ácido linolénico conjugado añadido a la ración de bovinos, mientras que Andrés *et al.* en 2014 realizó una adición de quercetina y semillas de lino a la ración de corderos. Sin embargo, la eficiencia de la transferencia de los compuestos antioxidantes de la dieta hacia la carne es baja, resultando esta metodología costosa y poco eficiente, lo que genera un producto susceptible a oxidarse después de la faena del animal cuando el músculo se transforma en carne y ésta queda expuesta a factores ambientales que gatillan su oxidación. Una de las ventajas de esta estrategia es que hay una baja transferencia de olores y sabores desagradables a la carne (Valenzuela y Pérez, 2016).
  
- b) Tecnologías de conservación físicas: Tradicionalmente, los métodos de conservación que previenen el daño oxidativo de la carne se enfocan en las tecnologías la refrigeración, y el uso de atmósferas modificadas, que son las más utilizadas por la industria de la carne debido a su bajo costo y fácil implementación. Sin embargo, el control de la temperatura que debiese estar alrededor de los 4 °C para mantener la calidad de la carne carece por completo de control, siendo dependiente de los canales de distribución del producto, y las condiciones de almacenamiento de los consumidores. Por otra parte, el envasado al vacío, en donde se retira el aire del envoltorio de la carne con la ayuda de una bomba de vacío; o se cambia la composición de gases, principalmente O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> del ambiente de la carne, ha tenido muy buenos resultados en relación con la disminución del daño por oxidación de la carne (Argyri *et al.*, 2012).



c) Tecnologías aplicadas al producto final: En México no es común el uso de antioxidantes extraídos de fuentes naturales en carnes frescas. En productos cárnicos se utiliza la incorporación de los antioxidantes permitidos por la legislación de acuerdo con las normas mexicanas existentes, en las cuales se establece su límite máximo de incorporación, entre los que destacan: los tocoferoles, las isoformas del ácido ascórbico (vitamina C), BHA, BHT, GP, entre otros. En estos productos la incorporación de antioxidantes naturales es más fácil debido que se adicionan en formato de polvo a la formulación de mezcla que les da origen. En la Tabla 8 se muestran algunos productos cárnicos a los cuales se les han agregado antioxidantes naturales principalmente en formato de polvo, en donde el principal efecto observado es una disminución de la oxidación de lípidos y proteínas. En estos productos es muy importante la adición de antioxidantes ya que tienen un mayor contenido de grasa que la carne fresca (Valenzuela y Pérez, 2016).

Tabla 8. Antioxidantes naturales usados en carne y productos cárnicos.

Producto antioxidante	Forma de aplicación	Efecto del antioxidante	Autor
Aceite de orégano (0.5-1.5 %)	Película Comestible	Aumenta la vida útil de la carne fresca de vacuno.	Zinoviadou <i>et al.</i> , (2009)
Orégano + hojas de salvia (0.2 %) + miel (5-10 %)	Inmersión	Reduce la oxidación lipídica de carne de pollo cocinada.	Sampaio <i>et al.</i> , (2012)
Extracto de semillas de uva (0,1 y 1 %)	Inmersión	Reduce la oxidación lipídica de carne cruda y cocida de vacuno y cerdo	Brannan y Mah (2007)
Extracto de hojas de cacao (200 mg/kg)	Extracto en polvo	Reduce la oxidación lipídica de carne de pollo desmenuzada cocida	Hassan y Fan (2005)
Jugo de granada (1:2 p/v, músculo: jugo)	Inmersión	Reduce oxidación lipídica de pechuga de pollo cruda	Vaithyanathan <i>et al.</i> , (2011)
Extracto de brócoli (1,5 y 2 % p/p)	Extracto en polvo	Reduce oxidación lipídica de "nugget" de carne de cabra	Banerjee <i>et al.</i> , (2012)
Extracto de té verde y de romero (500 y 400 ppm, respectivamente)	Extracto en polvo	Reduce la oxidación lipídica y proteica de salchichas de cerdo	Jongberg <i>et al.</i> , (2013)
Té verde (50, 200 y 1.000) y de semilla de uva (50, 200 y 1.000 mg/kg)	Extracto en polvo	Mejora la estabilidad oxidativa de lípidos y el color del paté	Pateiro <i>et al.</i> , (2015)

Fuente: Valenzuela y Pérez. (2016)



### 3. OBJETIVOS

#### OBJETIVO GENERAL

Evaluar un extracto de ajo (*Allium sativum*) obtenido a diferentes condiciones de extracción asistida por ultrasonido y comparar su efecto como antioxidante natural con respecto al BHT aplicado en hamburguesas de cerdo conservadas a -5 °C.

#### OBJETIVO PARTICULAR 1

Establecer las condiciones por ultrasonido a 30 y 50 min utilizando diferentes mezclas de agua-etanol (30-70 % y 20-80 %) y dos temperaturas (25 y 50 °C), para seleccionar las condiciones que permitan obtener mayor capacidad antioxidante y contenido de fenoles en los extractos de ajo.

#### OBJETIVO PARTICULAR 2

Determinar la concentración de extracto de ajo (0.5, 1.5, 2.5 %) aplicado a carne de hamburguesas, evaluando color e índice de rancidez (TBA) seleccionando la concentración que disminuya la rancidez del producto.

#### OBJETIVO PARTICULAR 3

Comparar el efecto de la aplicación de extracto de ajo contra un antioxidante sintético (BHT al 0.01 %) sobre la oxidación lipídica en carne para hamburguesas de cerdo, evaluando parámetros de calidad (índice de rancidez TBA y color), con el fin de establecer su efectividad con respecto al aditivo sintético.

#### OBJETIVO PARTICULAR 4

Aplicar el extracto de ajo obtenido por ultrasonido a carne para hamburguesa durante su almacenamiento a -5 °C, evaluando el color y parámetros microbiológicos (coliformes totales y mesófilos aerobios) para comparar su efectividad frente a un aditivo sintético (BHT).



## 4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

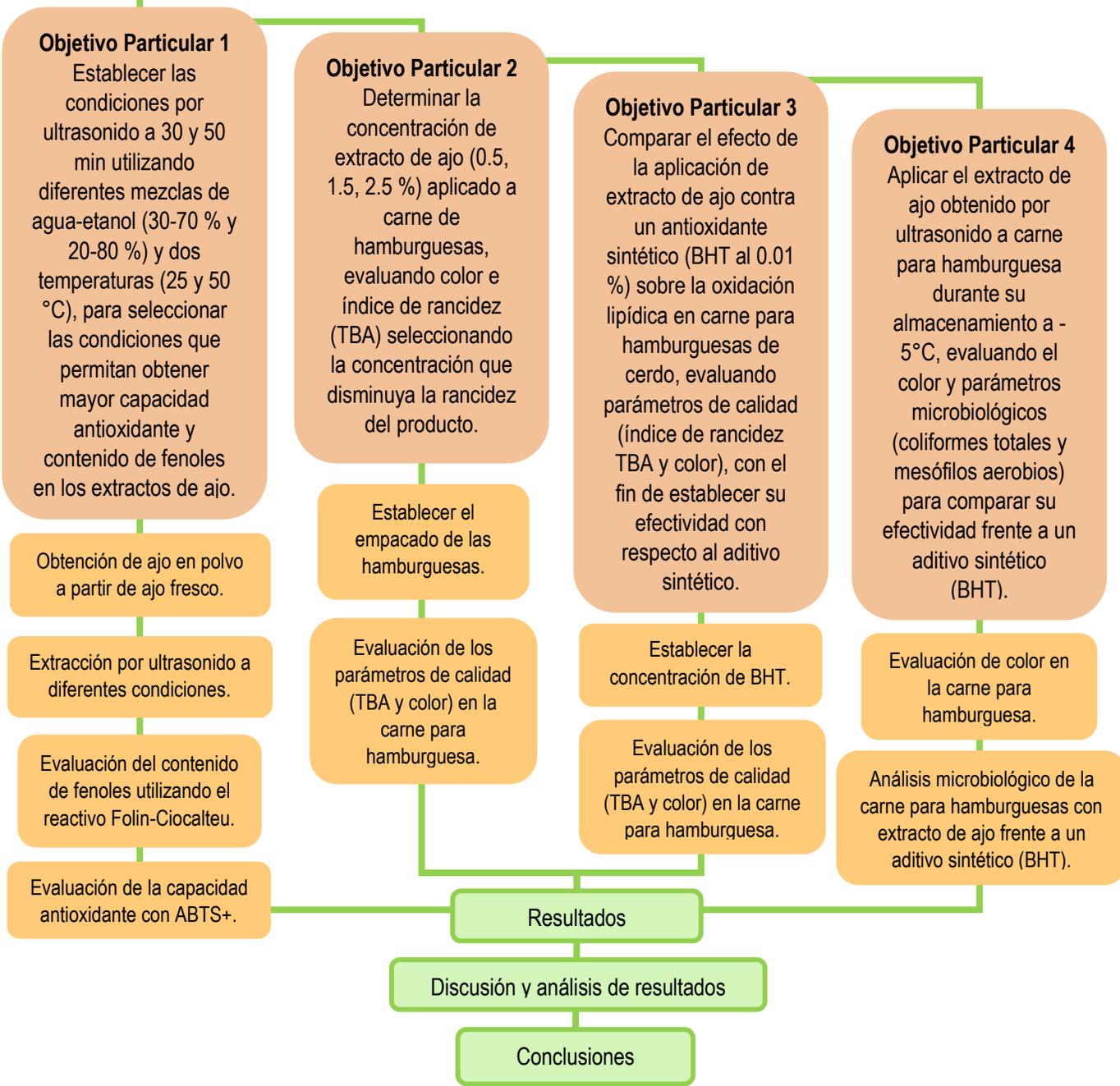
### 4.1. Cuadro metodológico

**Problema:** Impulsar la aplicación del aceite de ajo en los alimentos como agente antioxidante de origen natural.

**Objetivo general:** Evaluar un extracto de ajo (*Allium sativum*) obtenido a diferentes condiciones de extracción asistida por ultrasonido y comparar su efecto como antioxidante natural con respecto al BHT aplicado en hamburguesas de cerdo conservadas a -5 °C.

ACTIVIDADES

ACTIVIDADES





#### 4.2. Material biológico

Los ajos (*Allium sativum*) utilizados fueron frescos en estado de madurez comercial provenientes de estado de Puebla y llevados al Laboratorio de Postcosecha de Productos Vegetales del Centro de Asimilación Tecnológica de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

#### 4.3. Tratamiento de muestras

##### 4.3.1. Pretratamiento.

Los ajos se sometieron a un pretratamiento de secado con el fin de obtener ajo en polvo de acuerdo con la Figura 10 con una humedad final del  $5\% \pm 1$ . Una vez recibidos los ajos se seleccionaron, separando los bulbos de ajo en mal estado, como aquellos que presentaron signos de deterioro físico y microbiano. Una vez que se tuvieron solo ajos en buen estado se pesaron con la finalidad de obtener el rendimiento cuando se obtuviera el producto final. Los ajos se pelaron separando los bulbos y la cáscara de cada uno de ellos, para luego lavarlos con la finalidad de eliminar cualquier materia extraña, posteriormente se dejó airear por 10 minutos. Los bulbos de ajo se picaron en un picador de alimentos marca Hamilton Beach 72850-MX durante 3 minutos, aproximadamente.

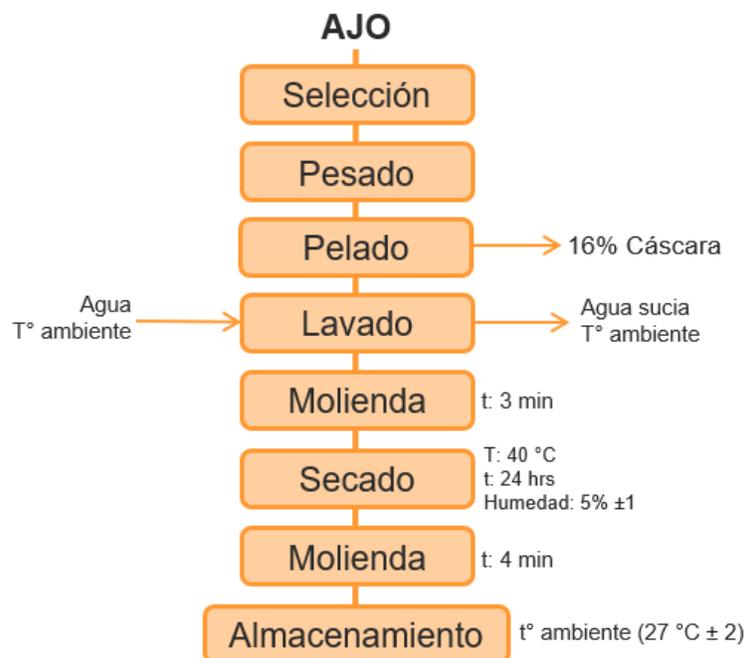


Figura 10. Diagrama de proceso para la obtención de ajo en polvo.

Una vez obtenida la pasta se colocó en charolas de metal de 50 x 30 cm forradas de papel encerado (Figura 11) para someterse a un secado por estufa durante 24 horas a 40 °C.



Luego de que la muestra estuviera seca y presentará una humedad promedio del  $5\% \pm 1$  se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 10 min. El ajo seco se colocó dentro de un molino durante 4 min para obtener el ajo en polvo con tamaño de partícula menor a 0.177 mm.

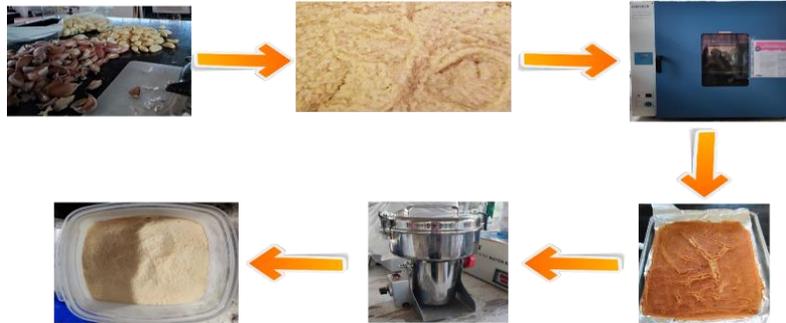
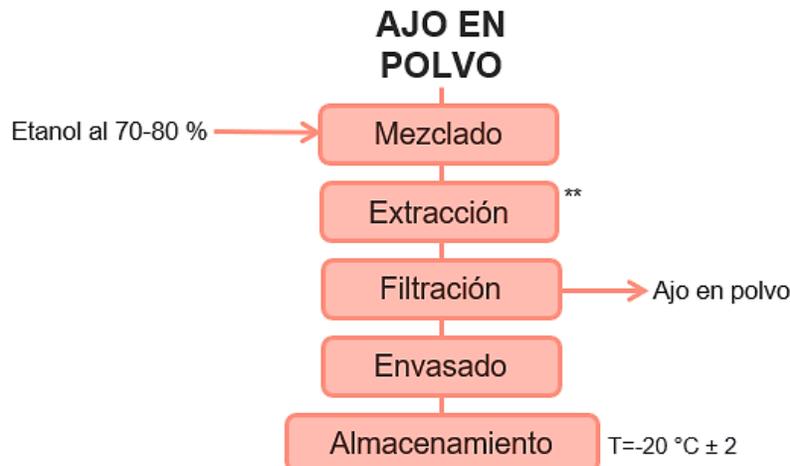


Figura 11. Procedimiento para la obtención de ajo en polvo.

#### 4.3.2. Obtención del extracto de ajo

Como se muestra en la Figura 12 una vez obtenido el ajo en polvo se procedió a la obtención de extracto de ajo por medio de una extracción asistida por ultrasonido (UAE). Se trabajó con una relación 1:3 (muestra: disolvente) utilizando etanol al 70 y 80 % como solvente. Se pesaron 50 g y se colocaron dentro de un vaso de precipitado de 250 ml; al cual se le agregaron 150 ml de etanol al 70 % u 80 % dependiendo y se colocó aluminio en la parte superior como se muestra en la Figura 13. Los vasos de precipitados se colocaron dentro de un baño ultrasónico marca Cole-Parmer con frecuencia de 42 KHz y utilizando diferentes condiciones que se presentan en la Tabla 9.



\*\* Las condiciones de extracción variaron y se muestran en la Tabla 9.

Figura 12. Diagrama de proceso para la obtención de extracto de ajo.



Cumplido el tiempo de extracción se realizó una filtración con ayuda de papel filtro, para separar los residuos sólidos del extracto líquido. Los extractos obtenidos se colocaron en recipientes de vidrio color ámbar con tapa, se etiquetaron y finalmente se almacenaron en congelación.



Figura 13. Extracción asistida por ultrasonido para la obtención de extracto de ajo.

Tabla 9. Condiciones de extracción

Concentración del solvente (etanol: agua)	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
70: 30	30	25 ± 5
	50	50 ± 2
80: 20	30	25 ± 5
	50	50 ± 2

A los extractos de ajo obtenidos se les evaluó el contenido de fenoles totales utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteou y la capacidad antioxidante con ABTS+, estos métodos se describen más a fondo en el apartado 4.4.1 y 4.4.2, respectivamente.

#### 4.3.3. Selección de la concentración de extracto de ajo para aplicación como antioxidante.

Para establecer la concentración de extracto de ajo que se utilizaría como antioxidante en la carne para hamburguesas, se realizó una pequeña prueba utilizando 3 piezas de 50 g de carne para hamburguesas a las cuales se le agregaron 3 diferentes porcentajes: 0.5, 1.5 y 2.5 %, los cuales se eligieron tomando en cuenta estudios anteriores que mencionan que los efectos antioxidantes depende directamente de la concentración de los extractos, por ejemplo Park y Chin, 2010 utilizaron una concentración de 0.5 % y autores como Sallam *et al.*, (2004) mencionan que concentraciones muy altas pueden afectar en gran medida el

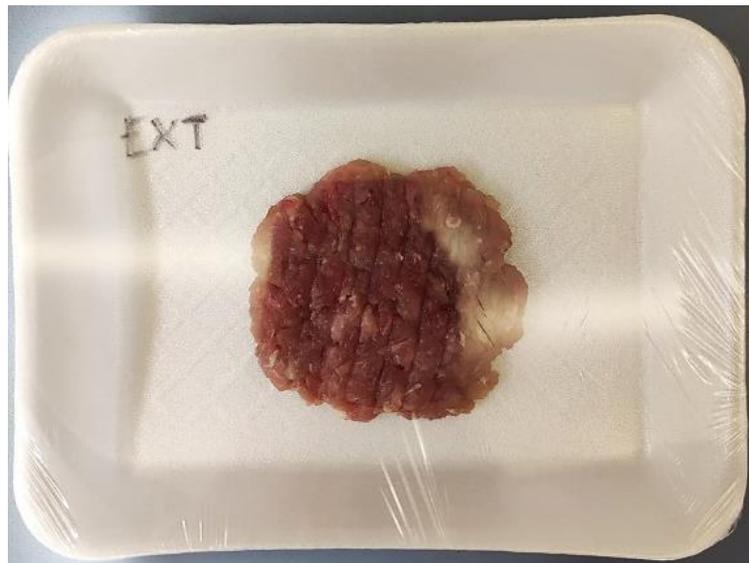


sabor y el olor por lo que la aceptabilidad del producto se podría ver afectada. Las hamburguesas con el extracto se almacenaron a 30 °C durante 72 horas, se evaluó el color (ver en apartado 4.5.1) y el índice de rancidez TBA (ver en apartado 4.5.2) en el día cero y después de las 72 horas con el fin de determinar cuál de esas concentraciones reducía en mayor proporción la rancidez de la carne.

#### **4.3.4. Comparación del efecto del extracto de ajo contra un aditivo sintético (BHT)**

Para la comparación de extracto de ajo con el BHT primero se estableció una concentración del BHT de 0.01 %, esto de acuerdo con Park y Chin en 2010, que utilizaron esa concentración para compararla con extractos de ajo y la aplicaron a medallones de carne cerdo.

Las carnes para hamburguesa fueron de 100 % carne de cerdo y cada una pesó 50 g, se empacaron en platos de unicel previamente esterilizados con radiación UV-C durante 20 min tapados con una película de plástico elástico (Figura 14). Los parámetros de calidad evaluados fueron: color (ver en apartado 4.5.1) e índice de rancidez TBA (ver en apartado 4.5.2) cada 48 horas durante 8 días comparando 3 muestras: control, una con extracto de ajo (2.5 %) y una con antioxidante sintético BHT (0.01 %), esto con el fin de comparar la efectividad del extracto de ajo frente a un aditivo sintético.



*Figura 14. Empaque de la carne para hamburguesas.*



#### 4.3.5. Efecto de la presencia de extracto de ajo en carne para hamburguesas durante el almacenamiento

Para evaluar el efecto del extracto de ajo en carne para hamburguesas durante su almacenamiento se decidió trabajar con carne preparada, la formulación se muestra en la Tabla 10.

Tabla 10. Formulación de la carne para hamburguesas

Ingrediente	%
Carne molida de res	46.47
Carne molida de cerdo	19.39
Cebolla	9.40
Tocino	7.79
Pan molido	7.79
Huevo	3.91
Salsa inglesa	1.91
Mostaza	1.73
Perejil	0.78
Sal	0.68
Pimienta	0.15

Adaptada de: Garay (2020).

Como se muestra en la Figura 15 para la preparación de la carne primero se pesaron todos los ingredientes y se agregaron en un recipiente previamente desinfectado, todo se mezcló durante aproximadamente 5 min, luego la mezcla se dividió en porciones de 50 g y se moldearon a la forma de una hamburguesa, finalmente se empacaron en platos de unicel previamente esterilizados y se taparon con una película de plástico elástico.



Figura 15. Diagrama de proceso para la elaboración de la carne para hamburguesas preparada.



Las carnes para hamburguesa se almacenaron a  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 48 días, se evaluó el color (ver en apartado 4.5.1) y se hizo un análisis microbiológico para coliformes totales y mesófilos aerobios utilizando el método descrito en el apartado 4.6, estas pruebas se realizaron cada 8 días comparando las 3 muestras: control, con extracto de ajo (2.5 %) y con antioxidante sintético BHT (0.01 %), esto con el fin de comparar la efectividad del extracto de ajo frente a un aditivo sintético.

#### 4.4. Técnicas analíticas

##### 4.4.1. Fenoles totales

La cantidad de compuestos fenólicos totales dentro de los extractos se determinó utilizando el método Folin-Ciocalteu propuesto en 1927. Primero en tubos de ensayo se agitaron 200  $\mu\text{l}$  de extracto de ajo con 1500  $\mu\text{l}$  de agua destilada, 100  $\mu\text{l}$  de Folin-Ciocalteu y 200  $\mu\text{l}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . En la Figura 16 se muestra que se dejó reposar la mezcla durante 30 min para después leer la absorbancia de las muestras con ayuda de un espectrofotómetro UV/VIS (marca VELAB) a 765 nm, las lecturas se realizaron por triplicado. La curva patrón se obtuvo a diferentes concentraciones de ácido gálico que oscilaban entre los 0 y 1 mg/ml como estándar. Los fenoles totales se expresaron en miligramos de ácido gálico por mililitro (mg GAE/ml).



Figura 16. Procedimiento del método para fenoles totales.

##### 4.4.2. Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante se evaluó utilizando el método de Re *et al.* (1999), que utiliza el reactivo ABTS+, que es una solución azul verdosa que contiene radicales libres altamente estables (Figura 17). A 100  $\mu\text{l}$  de extracto se le agregaron 1900  $\mu\text{l}$  de solución ABTS+ y se leyó la absorbancia a 734 nm. Las lecturas se realizaron por triplicado, y por cada punto se usó un blanco de metanol al 80 % ( $A_0$ ). La curva patrón se realizó con una solución de Trolox con concentraciones de 60 a 300  $\mu\text{M}$  y el porcentaje de inhibición se calculó para cada solución estándar de Trolox. La actividad antioxidante se expresó en milimoles de Trolox por mililitro (mmoles de Trolox/ml).





$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}}$$

Ecuación 1

#### 4.5.2. Índice de rancidez TBA

Se determinó el índice de TBA (2-tiobarbiturico) de acuerdo con el método de extracción descrito por Pfalzgraf *et al.* (1995) con algunas modificaciones. En la Figura 19 se muestra cómo se homogeneizó 1 g de muestra con 2 ml de ácido tricloroacético al 10 %, con ayuda de un agitador (marca DLAB MEX-S). Posteriormente el homogeneizado se centrifugó durante 15 min a 3000 rpm y el sobrenadante se decantó a través de papel filtro con ayuda de un filtro para volver a centrifugarse bajo las mismas condiciones. Se tomó 1 ml del filtrado y se le agregó 1 ml de TBA (300 mg de TBA con 100 ml de H<sub>2</sub>O). La mezcla se incubó durante 20 min a 92 °C con ayuda de un baño. Después de que la mezcla se enfrió a temperatura ambiente se midió la absorbancia a 530 nm. Para la curva patrón se utilizaron concentraciones de malonaldehído (MDA) que oscilaban entre los 0 y 2.5 µg/ml, la curva patrón se realizó graficando los valores de absorbancia contra la concentración de MDA estándar. Finalmente, el contenido de MDA de los extractos se calculó a partir de la ecuación de regresión lineal de la curva patrón. El índice TBA se expresó en microgramos de malonaldehído por gramo de muestra (mg MAE/g).

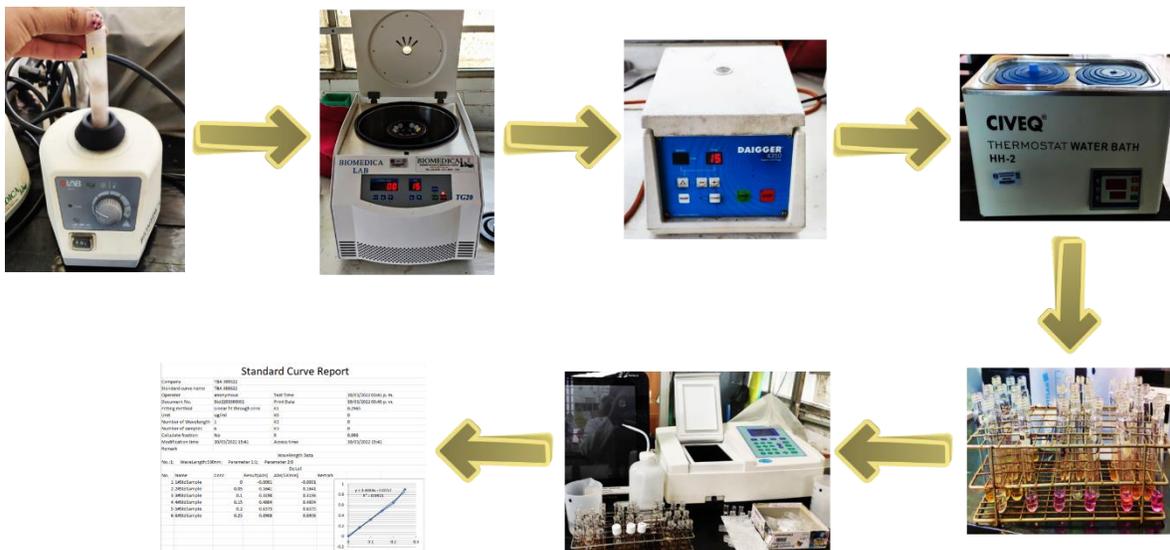


Figura 19. Procedimiento del método para índice de rancidez TBA.



#### 4.6. Pruebas microbiológicas

Para las pruebas microbiológicas se utilizó el método de conteo de placa establecido en la NOM-113-SSA1-1994 para coliformes totales y NOM-092-SSA1-1994 para mesófilos aerobios utilizando diluciones de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$ . Para coliformes totales se utilizó el medio de cultivo agar bilis y rojo violeta, se incubó a una temperatura de 37 °C por 24 horas (NOM-113-SSA1-1994). Para mesófilos aerobios se utilizó el medio de cultivo agar nutritivo, se incubó a una temperatura de 37 °C por 48 horas (NOM-092-SSA1-1994). Los resultados de ambos métodos se expresaron como logaritmo base 10 de unidades formadoras de colonias (UFC).

#### 4.7. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron con un análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias, aplicando un nivel de significancia del  $p \leq 0.05$ , para determinar si existe una diferencia significativa entre las condiciones y los aditivos aplicados a la carne para hamburguesas.



## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Análisis a los extractos de ajo

Una vez obtenidos los extractos de ajo por medio de ultrasonido a diferentes condiciones de extracción se analizó el contenido de fenoles y la capacidad antioxidante a cada uno.

#### 5.1.1. Contenido de fenoles totales

El contenido de fenoles totales se determinó en el extracto de ajo, con el fin de identificar la presencia de estos compuestos.

De acuerdo con la Figura 20, la temperatura muestra una diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ), ya que en los extractos a 50 °C se presentaron mayores valores; en estos extractos el contenido de ácido gálico es significativamente mayor a 30 min en comparación a los obtenido a 50 min, esto puede atribuirse a que, al ir aumentando el tiempo de extracción, los compuestos fenólicos se fueron degradando. El extracto obtenido a 50 °C y 30 min utilizando etanol al 80 % muestra el mayor contenido de compuestos fenólicos con 5.54 mg de GAE/ml, el cual fue 42 % mayor al reportado por el extracto con las mismas condiciones, pero a 25 °C.

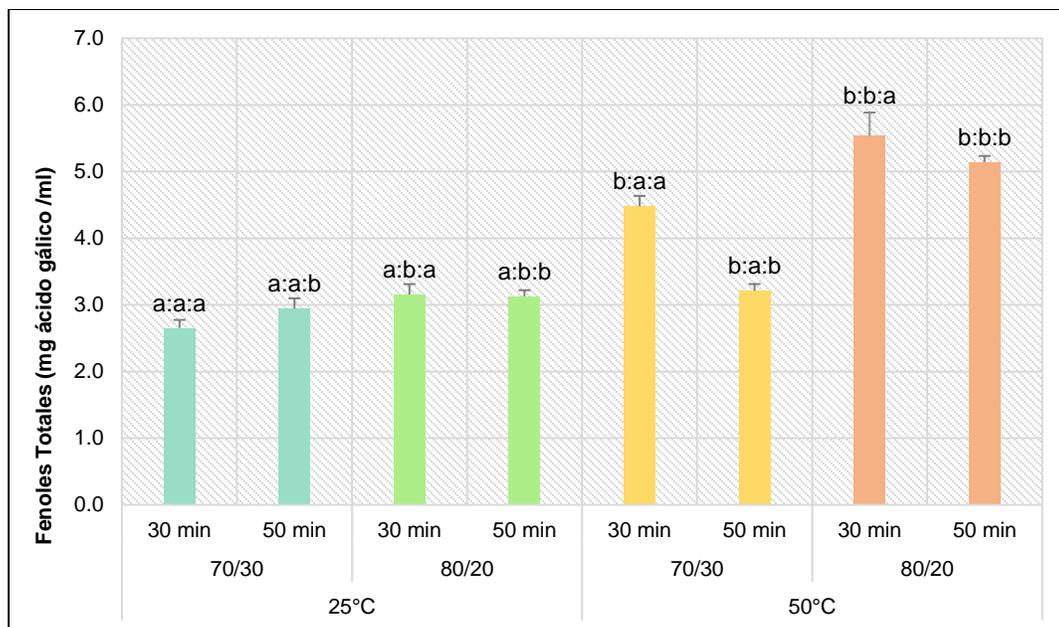


Figura 20. Contenido de fenoles totales de los extractos de ajo obtenidos por ultrasonido.

La primera letra <sup>a-b</sup> representa diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) por temperatura, la segunda letra <sup>a-b</sup> representa diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) por concentración de solvente, la tercera letra <sup>a-b</sup> representa diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) por tiempo.



Los valores registrados en el presente trabajo fueron de 5.54 mg de GAE/ml; mientras que Wongsa *et al.* (2012) reportan valores de 3.31 mg de GAE/g dw con un extracto obtenido por hidrodestilación a 95 °C durante 30 min utilizando ajo blanco deshidratado proveniente de Tailandia. Queiroz *et al.* (2009) obtuvieron 6.21 mg GAE/g trabajando con extractos con metanol obtenidos por ultrasonido durante 20 min utilizando una mezcla de ajo fresco (20 %) con ajo deshidratado (80 %), y Espaminondas *et al.* (2015) registraron valores de 10.55 mg de GAE/g dw en su extracto con etanol obtenido por baño de agua termostático con agitación a 25 °C durante 2 horas utilizando ajo fresco, ambos estudios trabajaron con ajo proveniente de Brasil, reforzando la idea de que es importante considerar que el contenido de fenoles depende en gran medida de las condiciones de cultivo, tipo de disolvente y condiciones de extracción.

### 5.1.2. Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante se determinó con el fin de seleccionar el extracto con mayor actividad para aplicarlo a la carne, así como delimitar si esta actividad provenía mayormente de compuestos fenólicos de acuerdo con los resultados obtenidos en ambas pruebas (Figura 21).

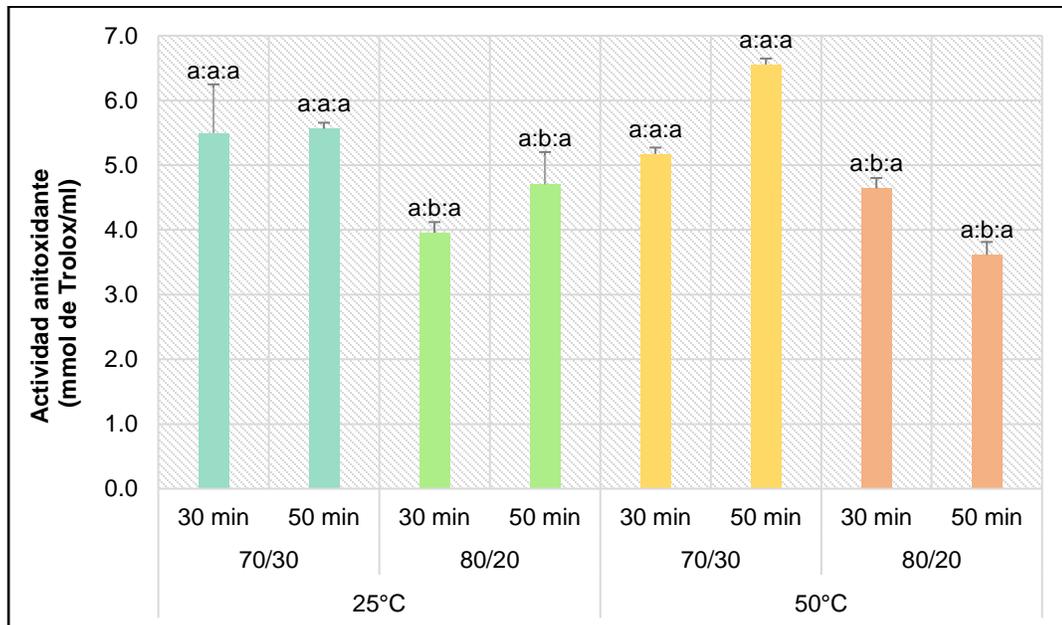


Figura 21. Actividad antioxidante de los extractos de ajo obtenidos por ultrasonido.

La primera letra <sup>a-b</sup> representa diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) por temperatura, la segunda letra <sup>a-b</sup> representa diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) por concentración de solvente, la tercera letra <sup>a-b</sup> representa diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) por tiempo.



La actividad antioxidante osciló entre los 3.61 y 6.55 mmoles de Trolox/ml, que es mayor a la reportada por Yachachin en 2013 (1.17 mmoles de Trolox/ml) con un extracto obtenido por hidrodestilación a 88 °C durante 30 min. Como se observa en la Figura 21 no hay una correlación entre la temperatura y el tiempo ( $p \leq 0.05$ ), pero si entre las proporciones del solvente. El extracto con mayor actividad antioxidante fue el obtenido a 50 °C por 50 min utilizando etanol al 70 %, ya que presentó 6.55 mmoles de trolox/ml que representa 44.89 % más que el extracto obtenido a las mismas condiciones de temperatura y tiempo, pero utilizando etanol al 80 %. Sin embargo, este extracto no presentó un alto contenido de fenoles totales, lo cual indica que estos compuestos fenólicos no contribuyen a la actividad antioxidante de los extractos de ajo, lo cual concuerda con lo mencionado por Cai *et al.* (2004) que, aunque la mayoría de las actividades antioxidantes de fuentes vegetales se derivan de compuestos de tipo fenólico, estos efectos no siempre se correlacionan con la presencia de grandes cantidades de fenoles.

Con base en los resultados de la capacidad antioxidante de los extractos de ajo, la condición de extracción con la que se decidió trabajar fue con etanol al 70 % a 50 °C durante 50 min, que aunque no muestra una diferencia significativa con respecto a la extracción durante 30 min los resultados de actividad antioxidante son mayores, lo que favorece su aplicación como antioxidante de origen natural en cualquier tipo de alimentos, sin embargo, el contenido de fenoles totales obtenido fue disminuyendo conforme se aumentaba la temperatura de extracción, lo que puede indicar que no todos los compuestos antioxidantes presentes en los extractos de ajo son polifenoles, debido a que algunas veces la capacidad antioxidante no está dada simplemente por la suma de las capacidades antioxidantes de cada uno de sus componentes, sino también por la interacción entre ellos, lo que puede producir efectos sinérgicos o antagónicos.

## **5.2. Concentración del extracto para aplicarse como antioxidante a la carne para hamburguesas**

Para la aplicación de extracto de ajo en la carne fue necesario determinar la concentración de extracto que se aplicaría, esto por medio de pruebas preliminares de color e índice de TBA.

### **5.2.1. Color**

El color es un factor importante a la hora de comprar un producto, por ello es considerado como estándar de clasificación y criterio de calidad. La luminosidad y el croma se



determinaron a muestras de carne almacenadas a 15 °C, debido a que el croma depende enormemente del tiempo que lleve la carne expuesta al oxígeno. La luminosidad corresponde a la posición en una escala de negro a blanco, por lo tanto, es una contribución acromática al color percibido (Purslow *et al.*, 2020). Los valores de luminosidad están reflejados en el estado físico de la carne, la estructura de las fibras musculares y la cantidad de luz que reflejan, de modo que cuanto mayor es su valor, más luminosa resulta la carne (Alberti *et al.*, 2016). En la Figura 22 se observa que la luminosidad se mantiene casi constante en las tres muestras, sin embargo, se muestra diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre la concentración más baja (0.5 %) y la más alta (2.5 %), donde a mayor concentración de extracto la luminosidad disminuyó en un 5.05 %.

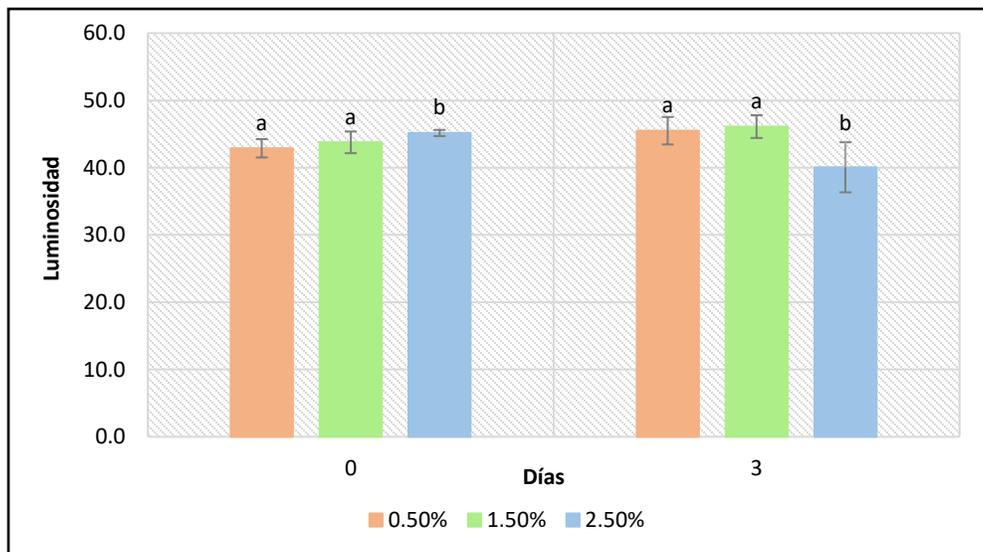


Figura 22. Luminosidad de la carne para hamburguesas con diferentes concentraciones de extracto de ajo (0.5, 1.5 y 2.5 %).

La letra <sup>a-b</sup> representa diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) por concentración de extracto.

La diferencia entre aplicar 0.5 % y 1.5 % de extracto de ajo no es significativa ( $p \leq 0.05$ ) ambas condiciones se comportan de manera estable debido a que durante el tiempo de exposición de la carne esta se va oxidando y variando su color, pero no su luminosidad. Alberti *et al.* (2016) determinaron que la luminosidad de la carne en buen estado está dada en un rango estandarizado de 35 a 42 dependiendo del tipo de carne comercial, de acuerdo con los resultados presentados en este estudio están dentro del rango para carne rosada aun después de los 3 días de almacenamiento.



En la Figura 23 se observa que el croma disminuyó significativamente ( $p \leq 0.05$ ) en función de la concentración de extracto, para el caso de la concentración de extracto más alta (2.5 %) el croma disminuyó un 30 %. Los resultados son similares a los presentados por Alberti *et al.* (2016) donde el intervalo estandarizado para croma  $C^*$  de carnes rosadas es de 14 a 22.

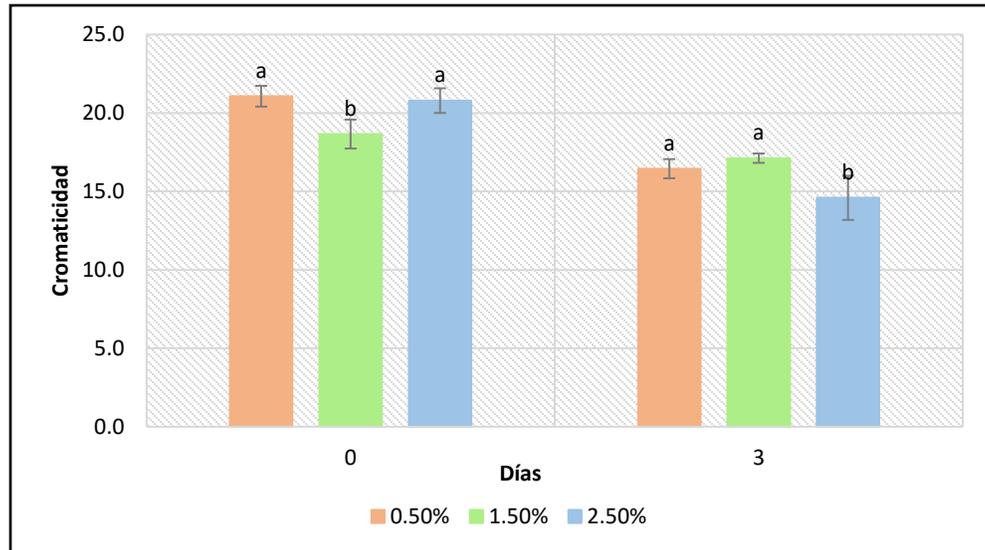


Figura 23. Cromaticidad de la carne para hamburguesas con diferentes concentraciones de extracto de ajo (0.5, 1.5 y 2.5 %).

La letra <sup>a-b</sup> representa diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) por concentración de extracto.

### 5.2.2. Índice de TBA

El índice de TBA se utiliza habitualmente como un índice de oxidación de lípidos en productos cárnicos almacenados (Raharjo y Sofos, 1993). Consiste en una técnica colorimétrica de un complejo formado entre ácido tiobarbitúrico TBA y malonaldehído MDA, sin embargo, es bien sabido que la reacción no es específica de MDA si no que existen múltiples aldehídos y productos de oxidación que también reaccionan con el TBA (Domínguez *et al.*, 2019). Como una prueba preliminar se analizó el índice de TBA a carne para hamburguesas almacenada a 15 °C durante 3 días con el fin de determinar la concentración de extracto que se aplicará como antioxidante.

De acuerdo con la Figura 24 el índice de TBA aumenta conforme aumenta el tiempo, existe una diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre la concentración más baja (0.5 %) y la más alta (2.5 %), al aplicar la menor concentración de extracto el índice de TBA aumenta un 45.26 % en comparación a la concentración más alta que solo aumenta un 32.14 %.

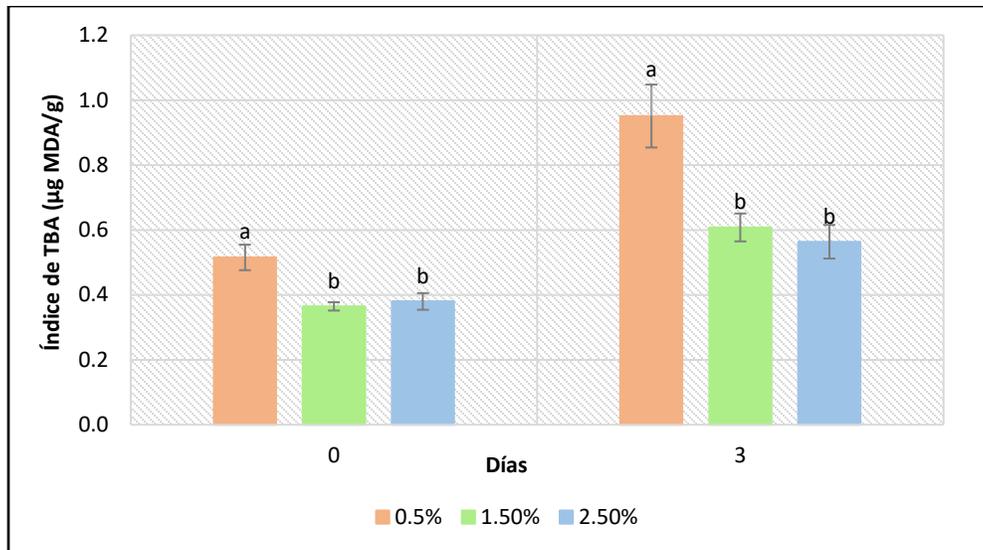


Figura 24. Índice de TBA expresado  $\mu\text{g}$  de malonaldehído (MDA) por gramo de carne para hamburguesas con diferentes concentraciones de extracto de ajo (0.5, 1.5, 2.5 %)

La letra <sup>a-b</sup> representa diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) por concentración de extracto.

Se decidió trabajar con la concentración de extracto más alta (2.5 %) debido a que al finalizar los 3 días de almacenamiento existía presencia de olores y colores característicos de crecimiento microbiano y aunque en el índice de TBA no existe diferencia significativa con respecto a la concentración de 1.5 % visualmente la concentración de 2.5 % mostraba menores síntomas de podredumbre, así también, la luminosidad y el croma de esta concentración se encuentran dentro de los intervalos estandarizados propuestos por Alberti *et al.*, 2016 y el índice de TBA es significativamente menor ( $p \leq 0.05$ ) con respecto a la concentración de 0.5 %.

### 5.3. Análisis de la aplicación de extracto en carne para hamburguesas

Una vez determinada la concentración de 2.5 % de extracto de ajo, se trabajaron tres tipos de muestras de carne para hamburguesa, una muestra control, una muestra con extracto de ajo y una muestra con BHT al 0.1 %, las cuales fueron almacenadas a 15 °C durante 8 días, las pruebas de color y rancidez se realizaron cada 2 días.

#### 5.3.1. Color

El color fue analizado por medio de la luminosidad y el croma C\*. El croma se utiliza para determinar el grado de diferencia de un color en comparación a un gris con la misma claridad, es considerado un atributo cuantitativo de visualización de la intensidad de un color (González *et al.*, 2014). Esta correlacionado positivamente con el rojo y en carnes es



determinado por la cantidad de pigmento del músculo (mioglobina), varía de rosa pálido a rojo intenso (Alberti *et al.*, 2016).

En la Figura 25 se muestran los resultados de luminosidad durante el almacenamiento. Al utilizar los 2 diferentes antioxidantes (extracto de ajo y BHT); la luminosidad es significativamente diferente ( $p \leq 0.05$ ) al pasar 4 días, para el caso de la muestra con BHT la luminosidad fue aumentando, lo cual puede atribuirse a la exudación de agua de ésta, lo que causa un mayor grado de luminosidad. Mientras que la muestra con extracto de ajo se mantuvo relativamente constante, con valores de 71.3 a 72.9, esto puede deberse a la carga microbiológica de la carne, ya que al encontrarse en una temperatura de 15 °C ésta favorece en gran medida al crecimiento de microorganismos y el extracto de ajo actuó en gran medida como antioxidante, pero no como antimicrobiano.

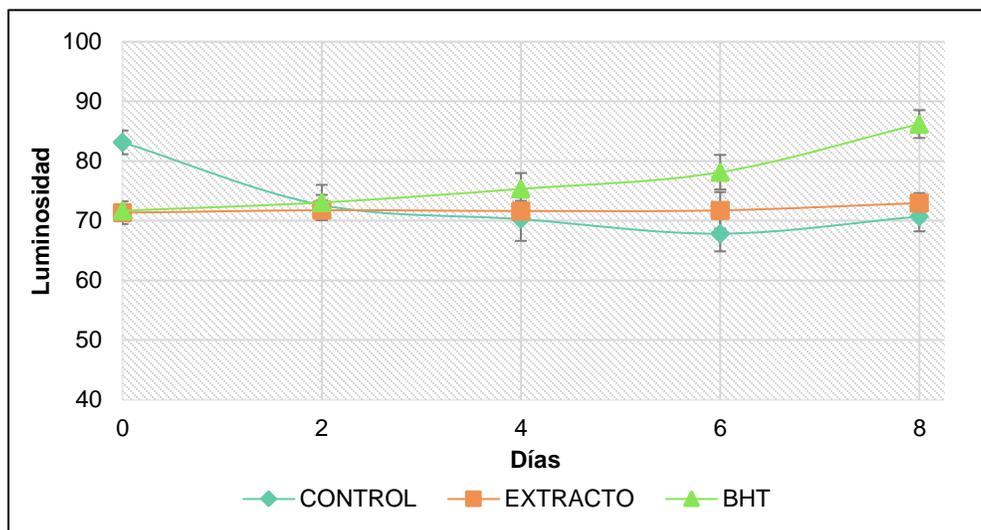


Figura 25. Luminosidad de la carne para hamburguesas almacenadas a 15 °C durante 8 días con diferentes antioxidantes: extracto de ajo y BHT

El croma muestra la saturación de los colores, es decir, la proporción de luz monocromática que existe en un color. En la Figura 26 se observa que el croma aumenta conforme pasan los días, al pasar los 4 días la muestra control y la muestra con BHT tienen una diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) con respecto a la muestra con extracto, esto se atribuye a la oxidación, en donde al obtener radicales hidroxilos ( $\text{OH}^-$ ) se favorece la degradación de color y la oxidación de las grasas degradando la saturación del color cambiando de rojo brillante a marrón (Mac Dougall *et al.*, 1982).

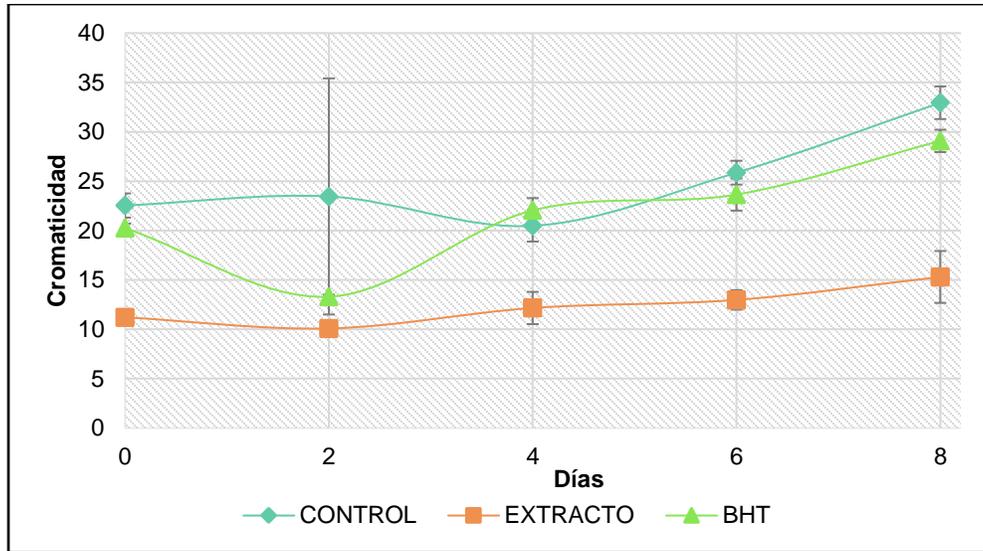


Figura 26. Cromo  $C^*$  de la carne para hamburguesas almacenadas a  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 8 días con diferentes antioxidantes: extracto de ajo y BHT

### 5.3.2. Índice de TBA

Para la aplicación del extracto en la carne para hamburguesas se analizó el índice de TBA durante su almacenamiento a  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$  con el fin de establecer la efectividad de este frente a otros aditivos sintéticos, a continuación, se muestra el gráfico con los resultados obtenidos.

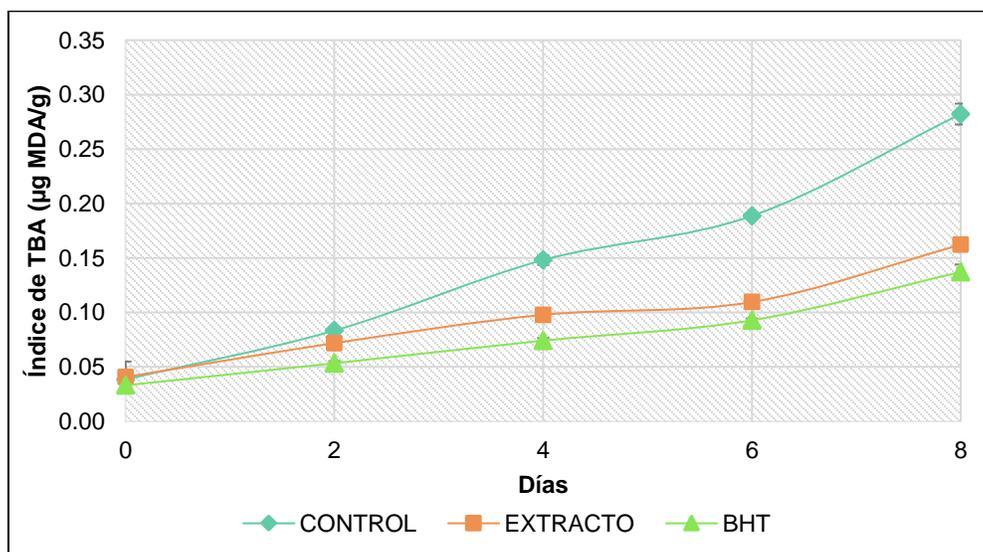


Figura 27. Índice de TBA expresado en  $\mu\text{g}$  de malonaldehído (MDA) por gramo de carne para hamburguesas con diferentes antioxidantes: extracto de ajo y BHT.

El índice de TBA osciló entre los 0.033 y 0.282  $\mu\text{g}$  de MDA/g, como se observa en la Figura 27. La concentración de MDA aumentó conforme pasan los días de almacenamiento, lo



cual es consistente con los resultados presentados por Park y Chin en 2010, quienes demostraron que la aplicación de extracto de ajo puede mejorar la estabilidad y la seguridad de la carne de cerdo molida cruda. La adición del extracto de ajo disminuyó significativamente ( $p \leq 0.05$ ) la oxidación de lípidos en la carne para hamburguesas, ya que sólo aumentó un 3 % su concentración de MDA durante los 8 días, en comparación a la muestra control que aumentó un 7 %. El valor de TBA en la muestra con BHT es significativamente menor ( $p \leq 0.05$ ) en comparación con las muestras con extracto, ya que ésta presentó una concentración final de 0.1621  $\mu\text{g}$  de MDA que es 15.36 % mayor al presentado en la muestra con BHT. En cambio, la diferencia entre la muestra control y la muestra con extracto fue de 42.56 %.

Los resultados anteriores demuestran que el extracto de ajo a pesar de ser un aditivo de origen natural ayudó a inhibir considerablemente la peroxidación lipídica de la carne. También son consistentes a los presentados por Sallam *et al.* (2004), quienes obtuvieron valores de TBA significativamente más bajos en las salchichas formuladas con ajo (fresco y extracto) y BHA en comparación a las muestras control. Diferentes estudios como Campos *et al.* (2009) y Domínguez *et al.* (2019) han establecido valores de 0.2-0.25  $\mu\text{g}$  de MDA/g como límite en el que la rancidez es aceptable en carnes y productos cárnicos. Melton en 1983 por su parte informó que los sabores oxidados eran detectables en valores de TBA de 0.3-1.0  $\mu\text{g}$  de MDA/g, sin embargo, estos rangos de números no deben de considerarse como una referencia general para los umbrales de rancidez en carnes porque además de que existen variaciones entre las diferentes especies animales, los valores de TBA están influenciados por otros factores, como el estado dietético, la edad de los animales, si la carne es cruda o cocida, el almacenamiento y el tipo de método de TBA utilizado para los análisis.

### 5.3.3. Carnes para hamburguesa durante el almacenamiento

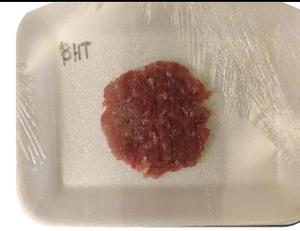
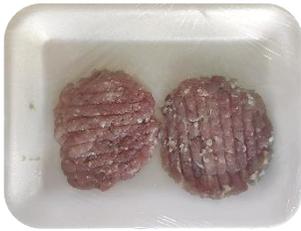
En la Tabla 11 se muestra una serie de imágenes que se tomaron a las carnes para hamburguesas a lo largo del ensayo, en la columna de observación se menciona las diferencias más notorias entre ellas.

De acuerdo con las imágenes presentadas en la Tabla 11 el primer día se observa que la muestra con extracto presenta un tono más oscuro y pasados 2 días es ligeramente verde a diferencia de las demás. Después de 3 días esta diferencia de color disminuye, aunque la muestra con BHT se ve en un mejor estado en comparación al control que muestra un



claro avance de putrefacción. Pasados 6 días la descomposición de las muestras es muy notoria y la muestra control comenzó a mostrar una textura viscosa. Finalmente, a los 8 días las muestras se encontraban en total descomposición, las diferencias más notorias entre todas la muestras fueron la textura pegajosa de la muestra control y la coloración oscura de la muestra con extracto.

Tabla 11. Carnes para hamburguesas durante 8 días de almacenamiento.

Días	CONTROL	EXTRACTO	BHT
0			
2			
4			
6			
8			



De acuerdo con las observaciones mencionadas en la Tabla 11 el agregar extracto a la carne puede cambiar ciertas características organolépticas de consumidores tienden a rechazar el fuerte olor a ajo en algunos alimentos y también tienen estigmatizados ciertos colores en la carne a la hora de seleccionarla, lo que hace desalentadora la aplicación de extracto.

Finalmente, la muestra control mostró una textura pegajosa desde el día 4, esto debido a la presencia de microorganismos que han empezado a multiplicarse en la superficie que generalmente se muestra en una textura viscosa, mientras que la muestra con extracto tardo un poco más en presentar estas características, lo que demuestra que el extracto no solo está actuando como antioxidante si no que ralentiza el crecimiento de microorganismos.

#### **5.4. Análisis de la carne para hamburguesas durante el almacenamiento**

Para analizar las características físicas y microbiológicas de la carne para hamburguesas se almacenaron durante 48 días a una temperatura de -5 °C, las pruebas se realizaron cada 8 días.

##### **5.4.1. Color**

Como se observa en la Figura 28 la luminosidad se mantiene casi constante, no existe diferencia significativa ( $p \geq 0.05$ ) entre ninguna de las muestras, esto puede ser debido a que al mantener la carne almacenada durante tanto tiempo el extracto y el BHT, al no ser conservadores potenciales, previenen, pero no detienen por completo el crecimiento microbiano, lo que hace que la luminosidad se mantenga. Autores como Olivas *et al.* (2017) obtienen luminosidades promedio en carne de 48.97, muy cercanos a los presentados en esta investigación.

La carne fresca es un alimento perecedero, por lo que está constantemente expuesta al deterioro microbiano lo que trae como consecuencia cambios en sus características químicas y sensoriales a pesar de mantenerse a bajas temperaturas, por ello son determinantes para el tiempo de vida útil que pueda llegar a tener. El color de la carne depende en gran medida del estado físico de los pigmentos musculares como la mioglobina y la proporción de grasa y tejido que posea (Clydesdale y Francis, 1975).

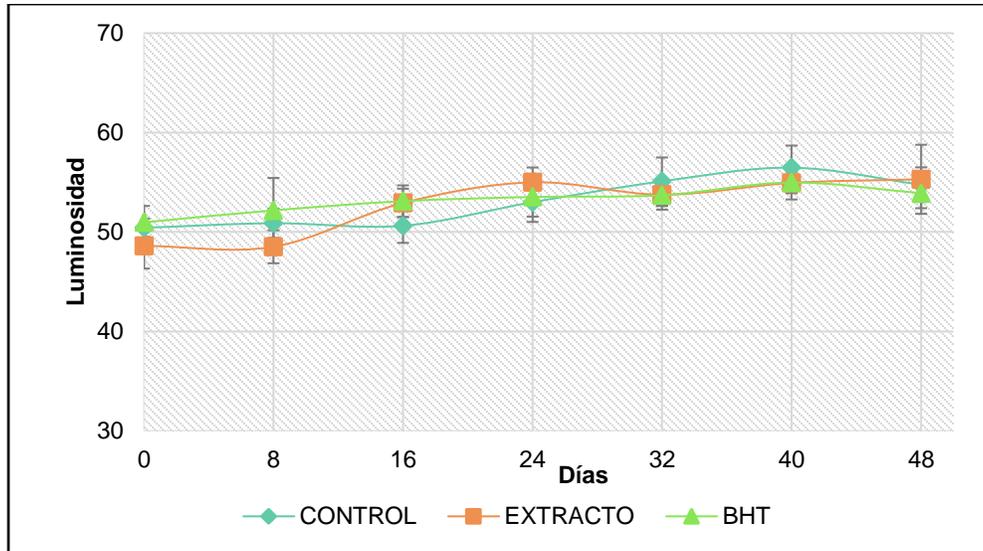


Figura 28. Luminosidad de la carne para hamburguesas con extracto de ajo y BHT como antioxidantes durante 48 días.

Como se observa en la Figura 29 no hay diferencia significativa ( $p \geq 0.05$ ) entre la muestra con BHT y la muestra con extracto, en todas las muestras el croma disminuyó, esto se puede atribuir a la oxidación y la contaminación microbiológica. Sin embargo, durante los primeros 32 días la carne para hamburguesa con el extracto mantuvo valores de croma superiores al control y la muestra con BHT; lo que indica que la oxidación se ralentizó, disminuyendo la degradación de color y saturación.

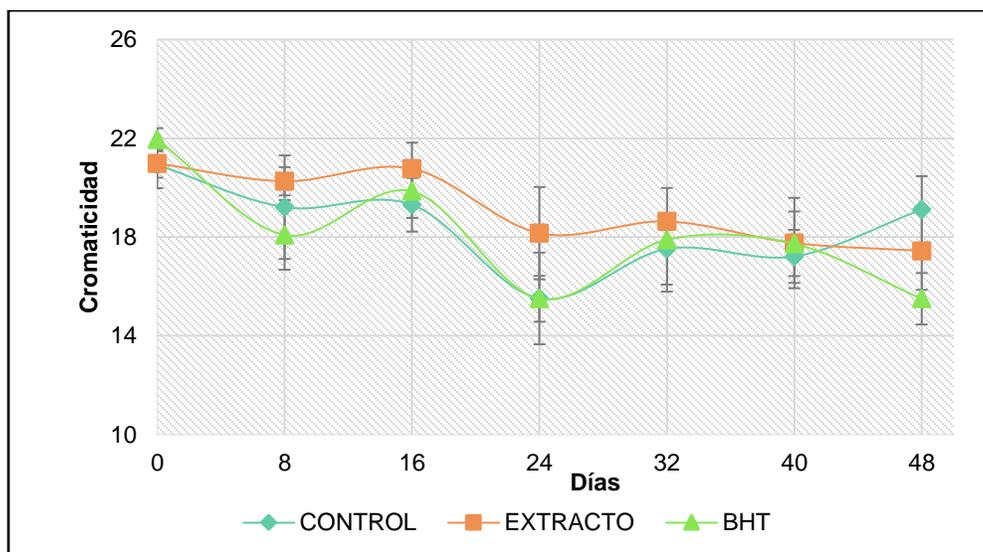


Figura 29. Cromaticidad de la carne para hamburguesas con extracto de ajo y BHT como antioxidantes durante 48 días.



#### 5.4.2. Análisis microbiológico

El crecimiento microbiano, es la principal causa del deterioro de la carne almacenada a temperaturas de refrigeración; el tipo y el número de microorganismos, son factores importantes que inciden en la velocidad de alteración (Hedrick *et al.*, 2001). Como consecuencia de ello, se presentan cambios sensoriales indeseables en el olor y la apariencia, que son determinantes en la aceptación y vida útil (Nalan, 2002).

Cuando la alteración microbiológica de la carne refrigerada es detectada por la aparición de olores, sabores o apariencia anómalos, normalmente desagradables, se dice a nivel general que tiene más de 2 Log UFC/g (Dainty y Mackeyl, 1992).

Como se observa en la Tabla 12 el conteo de mesófilos pasó de 3.25 a 6.13 en la muestra control, de 2.8 a 5.08 en la muestra con extracto y de 3.89 a 4.9 en la muestra con BHT. De acuerdo con la Tabla 12 y los resultados de color presentados anteriormente, al menos los primeros 8 días el extracto no solamente actuó como antioxidante sino que también ralentizó el crecimiento microbiano, pero no lo evitó por completo a lo largo del almacenamiento, esto puede atribuirse a que aunque el extracto contiene compuestos organosulfurados con propiedades antimicrobianas algunos de ellos pierden poder durante la extracción, por ejemplo Park y Chin en 2010 indican que la actividad anti microbiológica del ajo depende en gran medida del solvente utilizado y las condiciones de extracción, los autores señalan que las altas temperaturas tienden a disminuir la actividad antimicrobiana debido a la inactivación de la enzima alinasa, la cual se encarga de convertir la aliina en alicina uno de los compuestos con mayor poder antimicrobiano, entonces al no formar suficiente alicina la actividad antimicrobiana es baja.

Tabla 12. Conteo microbiológico de la carne durante 48 días a -5 °C.

Días	Mesófilos (Log UFC/g)			Coliformes (Log UFC/g)		
	CONTROL	EXTRACTO	BHT	CONTROL	EXTRACTO	BHT
0	3.81	3.99	4.06	3.22	3.20	2.61
8	6.13	5.08	4.90	2.35	2.45	2.57
16	3.25	4.86	5.09	2.04	1.90	2.35
24	3.90	4.41	4.19	1.00	2.80	2.20
32	3.69	4.46	3.89	1.18	1.00	1.00
40	4.18	2.80	4.17	1.00	1.00	1.65
48	5.01	3.56	4.07	1.30	1.60	1.80



Los microorganismos mesófilos aerobios pueden multiplicarse en un rango de temperatura de 10 a 37 °C, sin embargo, también pueden sobrevivir a temperaturas inferiores a la óptima, por lo que en refrigeración depende del tiempo y las condiciones de almacenamiento (Fernández *et al.*, 2006).

De acuerdo con la NOM-034-SSA1-1993 señala que el límite permisible de mesófilos en carne cruda y molida es de 6.69 log UFC/g; lo cual indica que todas las muestras se encuentran dentro de ese rango, sin embargo, esto no asegura que el alimento esté exento de la presencia de microflora patógena (Frazier y Westhoff, 2000). Autores como Félix-Fuentes *et al.* (2005) reportaron un promedio de 1.43 log UFC/g en 40 muestras de carne para hamburguesas, del total analizadas el 95 % de las muestras se encontraron dentro de las especificaciones microbiológicas de la NOM. El recuento de mesófilos aerobios refleja la calidad sanitaria de un alimento, las condiciones de manipulación y las condiciones higiénicas, por lo que un elevado recuento de mesófilos en los alimentos puede ser atribuidos a materias primas contaminadas o tratamientos no satisfactorios desde el punto de vista sanitario, también pueden indicar condiciones inadecuadas de tiempo/temperatura durante el almacenamiento (García *et al.*, 1995).

En relación con el conteo de coliformes totales expresado en log UFC/g en la Tabla 12, los valores fueron de 1 a 2.04 para la muestra control, de 1 a 2.8 para muestra con extracto y de 1 a 2.57 para la muestra con BHT. Los coliformes no se encuentran contemplados dentro de la norma, sin embargo, se utilizan como indicadores de contaminación fecal. De acuerdo con la ICMFS (International Commission On Microbiological Specifications For Food por sus siglas en inglés) la presencia de coliformes en los alimentos puede ser ocasionada por la contaminación directa o indirecta de origen fecal y su presencia en gran número puede indicar manipulación no higiénica y/o almacenamiento inadecuado.



## 6. CONCLUSIONES

Finalmente, a partir de los resultados obtenidos a lo largo de esta investigación se concluye que:

1. La capacidad antioxidante de un extracto depende en gran medida del solvente utilizado y las condiciones de extracción. Aunque la mayoría de las propiedades antioxidantes de fuentes vegetales provengan de compuestos fenólicos, en el caso del extracto de ajo la capacidad antioxidante no tuvo correlación con la presencia de gran cantidad de fenoles, esto debido a que las propiedades antioxidantes del ajo se les atribuyen principalmente a compuestos azufrados como la alicina, la aliina, el dialil disulfuro, entre otros. Muchas veces la capacidad antioxidante no es simplemente la suma de capacidades que tiene cada componente, sino también por la interacción que existe entre ellos, lo que puede ocasionar efectos sinérgicos o antagónicos. La extracción por ultrasonido a 50 °C utilizando etanol al 70 % durante 50 min mostró valores altos de capacidad antioxidante frente a otras condiciones, lo que asegura la obtención de compuestos antioxidantes termosensibles, que harán efectivo utilizarse como antioxidante de origen natural.
2. El extracto de ajo a una concentración de 2.5 % resulta ser eficiente en la inhibición de la peroxidación lipídica de la carne, garantizando disminuir la formación de radicales libres, esto demuestra que el extracto de ajo cumple su función como antioxidante de origen natural y puede llegar a sustituir a los aditivos de origen sintético con BHT. Sin embargo, es importante mencionar que al ser un producto a base de ajo y debido a que contiene compuestos azufrados, el extracto puede llegar a modificar el sabor y la apariencia del producto al que se desea aplicar.
3. El extracto de ajo ayuda a prevenir la oxidación y a ralentizar el crecimiento microbiano, pero no los inhibe por completo; esto puede deberse a las condiciones de extracción o al solvente utilizado, ya que algunos de los compuestos organosulfurados con propiedades antimicrobianas pueden llegar a perder su poder inhibitor durante la extracción, en ocasiones se pueden inactivar enzimas como la alinasa por trabajar con temperaturas relativamente altas.
4. Al conservar la carne para hamburguesa a -5 °C el extracto actúa de forma eficaz no solo como antioxidante si no como antimicrobiano, pero la oxidación lipídica y la descomposición, pero no se evitan del todo, por lo que al pasar estos 8 días la



capacidad antimicrobiana disminuye considerablemente haciendo visible el estado de descomposición y rancidez en la carne.



## 7. RECOMENDACIONES

**Con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo se recomienda:**

- ❖ Estudiar la vida de anaquel y elaborar un análisis organoléptico de la carne para hamburguesas adicionada con extracto de ajo.
- ❖ Identificar los compuestos presentes en el extracto de ajo por medio de Cromatografía de gases/Espectrometría de masas (GC/MS), para dar certeza de que compuestos atribuir las propiedades antioxidantes.
- ❖ Estudiar y evaluar la aplicación de extracto de ajo en otros alimentos con un alto contenido de lípidos que llegan a ser susceptibles a la oxidación.



## 8. REFERENCIAS

- Albertí, P., Beriain, M., Ripoll, G., Sarriés, V., Panea, B., Mendizabal, M., Purroy, A., Olleta, J. & Sañudo, C. (2014). Effect of including linseed in a concentrate fed to young bulls on intramuscular fatty acids and beef color. *Meat Science*, 96(12), 58-65. [10.1016/j.meatsci.2013.11.009](https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.11.009)
- Albertí, P., Ripoll, G., Alberti, C. & Panea, B. (2016). Clasificación objetiva del color de la carne de las denominaciones de venta de vacuno. *EUROCARNE*, 244, 131-142. <https://calidadcarnecita.files.wordpress.com/2016/04/eurocarne-244-131-142-color-denominaciones-venta-vacuno.pdf>
- Alissandrakis, E., Daferera, D., Tarantilis, P., Polissiou, M. & Harizanis, P. (2003). Ultrasound-assisted extraction of volatile compounds from citrus flowers and citrus honey. *Food Chemistry*, 82(4), 575-582. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00013-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00013-X)
- Andrés, S., Morán, L., Aldai, N., Tejido, M., Prieto, N., Bodas, R. & Giráldez, F. (2014). Effects of linseed and quercetin added to the diet of fattening lambs on the fatty acid profile and lipid antioxidant status of meat samples. *Meat Science*, 97(1), 56-63. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.02.001>
- Argyri, A., Panagou, E. & Nychas, G. (2012). *Advances in vacuum and modified atmosphere packaging of poultry products: Advances in meat, poultry, and seafood packaging*. (1ra ed.) Woodhead Publishing., PA, USA. <https://www.sciencedirect.com/book/9781845697518/advances-in-meat-poultry-and-seafood-packaging>
- Ayala, J. F. & González, G. A. (2010). Optimizing the use of garlic oil as antimicrobial agent on fresh-cut tomato through a controlled release system. *Journal of Food Science*. 75(7), 398-405. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01723.x>
- Azuola, R. & Vargas, P. (2007). Extracción de sustancias asistidas por ultrasonido (EUA). *Tecnología en Marcha*, 20(4), 30-40.



- Banerjee, R., Verma, A., Das, A., Rajkumar, V., Shewalkar, A. & Narkhede, H. (2012). Antioxidant effect of broccoli powder extract in goat meat nuggets. *Meat Science*, 91(2), 179-184. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.01.016>
- Bayramoglu, B., Shanin, S. y Summu, G. (2008). Solvent-free microwave extraction of essential oil from oregano. *Journal of Food Engineering*, 88(4), 535-540. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.03.015>
- Bender, D., & Bárcenas, M. (2013). El ajo y sus aplicaciones en la conservación de alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 7(1), 25-36. <https://TSIA-71-Bender-Bojalil-et-al-2013.pdf>
- Bhandari, P.R. (2012). Garlic (*Allium sativum* L.): A review of potential therapeutic applications. *International Journal of Green Pharmacy*. 6(2), 118-129. <https://greenpharmacy.info/index.php/ijgp/article/view/247>
- Biostad Analytical (1995). Ilustración del limpiador de baño ultrasónico [Figura 7].
- Brannan, R. & Mah, E. (2007). Grape seed extract inhibits lipid oxidation in muscle from different species during refrigerated and frozen storage and oxidation catalyzed by peroxy nitrite and iron/ascorbate in a pyrogallol red model system. *Meat Science*, 77(4), 540-546. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.05.001>
- Bravi, E., Perretti, G., Falconi, C., Ombretta, M. & Fantozzi, P. (2017). Antioxidant effects of supercritical fluid garlic extracts in sunflower oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(1), 102-107. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7690>
- Bueno, M. (2010). BIOSALUD. Instituto de Medicina Biológica y Antienvejecimiento.
- Cabredo-Pinillos, S., Cedrón-Fernández, M., González-Briongos, M., Puente-Pascal, L. & Sáenz-Barrio, C. (2006). Ultrasound-assisted extraction of volatile compounds from wine simples: Optimization of the method. *Talanta*, 69(5), 1123-1129. <https://doi.org.pbidi.unam.mx:2443/10.1016/j.talanta.2005.12.011>
- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M. & Corke, H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences*, 74(17), 2157-2184. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.09.047>



- Caldeira, I., Pereira, R., Clímaco, M., Belchior, A. & Bruno de Sousa, R. (2004). Improved method for extraction of aroma compounds in aged brandies and aqueous alcoholic wood extracts using ultrasound. *Analytica Chimica Acta*, 513(1), 125-134. <https://doi.org.pbidi.unam.mx:2443/10.1016/j.aca.2003.10.011>
- Cameroni, G. (2012). Cadena de ajo. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación de Argentina. Recuperado de: [https://alimentosargentinos.magyp.gob.ar/contenido/sectores/otros/horticola/informes/2012\\_12Dic\\_ficha\\_de\\_ajo.pdf](https://alimentosargentinos.magyp.gob.ar/contenido/sectores/otros/horticola/informes/2012_12Dic_ficha_de_ajo.pdf)
- Campos, H. (2009). Estudio de extracción de asfáltenos del crudo extrapesado Carabobo. Informe de Pasantía. Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela. Recuperado de: <http://portal.facyt.uc.edu.ve/pasantias/informes/P3285760.pdf>
- Cerda, E. A. (2018). *Estudio comparativo de la calidad del extracto de ajo obtenido por arrastre de vapor e hidroddestilación sometido previamente a un proceso de deshidratación*. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, México. Recuperado de: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/45675/Cerda%20Morales%2c%20Estefan%2c%20Alejandra.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Chemat, F., Zill-e-Huma & Kamram, K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation, and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(4), 813-835. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.11.023>
- Chen, F., Sun, Y., Zhao, G., Liao, X., Hu, X., Wu, J. & Wang Z. (2007). Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of anthocyanins in extract using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Ultrasonics Sonochemistry*, 14(6), 767-778. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2006.12.011>
- China Internet Information Center (2007). Ilustración del equipo de ultrasonido [Figura 8].
- Choe, E., & Min, D. B. (2006). Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 5(4), 169-186. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2006.00009.x>



- Clydesdale, F. & Francis F. (1975). *Food Colorimetry: Theory and Applications*. AVI Publisher Co. Inc.
- Consejo Mexicano de la Carne (2018). *Compendio estadístico 2018*. Recuperado de: <https://comecarne.org/wp-content/uploads/2019/04/Compendio-Estadi%CC%81stico-2018-VF.pdf>
- Dainty, H. & Mackey, M. (1992). The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. *J. Appl. Bact.* 21, 103-114. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1992.tb03630.x>
- Domínguez, R., Pateiro, M., Gagaoua, M., Barba, F., Zhang, W. & Lorenzo, J. (2019). A Comprehensive Review on Lipid Oxidation in Meat and Meat Products. *Antioxidants (Basel)*, 8(10), 429. <https://doi.org/10.3390/antiox8100429>
- Estévez, M., Morcuende, D., & Cava, R. (2003). Oxidative and colour changes in meat from three lines of free-range reared Iberian pigs slaughtered at 90 kg live weight and from industrial pig during refrigerated storage. *Meat Science*, 65(3), 1139-1146. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(02\)00343-1](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(02)00343-1)
- Espaminondas, P. S., Araújo, K. L. G. V., Nascimento, J. A., Souza, A. L., Rosenhaim, R. & Souza, A. G. (2015) Assessment of the antioxidant effect of ethanol extract of *Allium sativum L.*, isolated and/or synergistically associated with synthetic antioxidants, applied to linseed oil. *J Therm Anal Calorim*, 120, 617-625. <https://doi.org/10.1007/s10973-014-3870-8>
- Faustman, C., Yin, S., Tatiyaborworntham, N. & Novena, B. M. (2010). *Oxidation and protection of red meat. Oxidation in foods and beverages and antioxidant applications*. (1ra ed.) Woodhead Publishing., PA, USA. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20113026175>
- Félix-Fuentes, A., Campas-Baypoli, O., Meza-Montenegro, M. (2005). Calidad Sanitaria De Alimentos Disponibles Al Público De Ciudad Obregon, México. *Revista Salud Pública y Nutrición* 6(3). Disponible en: <https://respyn.uanl.mx/index.php/respyn/article/view/149/131>



- Fernández, A., Izquierdo, P., Valero, K., Allara, M., Piñero, M., & García, A. (2006). Efecto del Tiempo y Temperatura de Almacenamiento Sobre la Calidad Microbiológica de Carne de Hamburguesa. *Revista Científica*. 16(4), 315-324. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0798-22592006000400013&lng=es&tng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592006000400013&lng=es&tng=es)
- Folin, O. & Ciocalteu, V. (1927). On Tyrosine and Tryptophane Determinations in Proteins. *Journal Of Biological Chemistry*, 73(2), 627-650. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)84277-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)84277-6)
- Frazier, W. C. Y Westhoff, D. C. (2000). Microbiología de los alimentos, Parte I en Microbiología de los Alimentos. Zaragoza: Acribia, 30-58.
- Fuertes, M. (2014). Extracción y cuantificación de inulina a partir de ajo. Tesis de licenciatura. Universidad Central del Ecuador, Republica del Ecuador. Recuperado de: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/2868/1/T-UCE-0017-77.pdf>
- Garay, F. [Cocina delirante]. (2020, 12 de febrero). *Hamburguesa con carne de res y cerdo perfecta para vender*. [Video]. YouTube. [https://www.youtube.com/watch?v=P6U\\_y-8phHI](https://www.youtube.com/watch?v=P6U_y-8phHI)
- García, T., Martín, R., Sanz, B. & Hernández, P. (1995) Extensión de la vida útil de la carne fresca. *Rev. Españ. de Cien. y Tecnol. de Aliment.* 35(1): 1-18.
- Gheisari, H. R., & Ranjbar, V. R. (2012). Antioxidative and antimicrobial effects of garlic in ground camel meat. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 36(1), 77–83. <https://doi.org/10.3906/vet-1012-620>
- Gomes, C., Moreira, R. G., & Castell-Pérez, E. (2011). Microencapsulated antimicrobial compounds as a means to enhance electron beam irradiation treatment for inactivation of pathogens on fresh spinach leaves. *Journal of Food Science*. 76(6), E479-E488. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02264.x>
- González, L., Moreno, T., Bispo, E., Dugan, M. & Franco, D. (2014). Effect of supplementing different oils: Linseed, sunflower and soybean, on animal performance, carcass characteristics, meat quality and fatty acid profile of veal from “Rubia Gallega” calves. *Meat Science*. 96(2, Part A), 829-836 <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.09.027>



- Greco, M. F. (2011). *Estudio de procesos de deshidratación industrial de ajo con la finalidad de preservar alicina como principio bioactivo*. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional de Cuyo, Argentina. Recuperado de: [https://bdigital.uncu.edu.ar/objetos\\_digitales/4202/tesis-florenciagreco.pdf](https://bdigital.uncu.edu.ar/objetos_digitales/4202/tesis-florenciagreco.pdf)
- Harris, J., Cottrell, S., Plummer, S. & Lloyd, D. (2001). Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57: 282-286. <https://doi.org/10.1007/s002530100722>
- Hassan, O. & Fan, S. (2005). The anti-oxidation potential of polyphenol extract from cocoa leaves. *LWT-Food Sci Technol*, 38(4), 315-321. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.06.013>
- Hedrick W, Parker M. & Lee R. (2001). Using microsatellite and MHC variation to identify species, ESUs, and MUs in the endangered Sonoran topminnow. *Mol. Ecol.* 10(6), 1399-1412. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2001.01289.x>
- Hussain, A. I., Anwar, F., Hussain Sherazi, S. T., & Przybylski, R. (2008). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chemistry*. 108(3), 986-995. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.010>
- International Commission on Microbiological Specifications for Food (ICMFS). (1975) *Microbiología de alimentos. Técnicas y análisis microbiológico*. Editorial ACRIBIA. Zaragoza, España. 431 pp.
- Jamanca, N. & Alfaro, S. (2017). *Antioxidantes en los alimentos*. Editorial UNAB.
- Jongberg, S., Tornngren, M., Gunvig, A., Skibsted, L. & Lund, M. (2013). Effect of green tea or rosemary extract on protein oxidation in Bologna type sausages prepared from oxidatively stressed pork. *Meat Science*, 93(3), 538-546. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.11.005>
- Katsuki, T, Hirata, K, Ishikawa, H, Matsuura, N, Sumi, S & Itoh, H. (2006). Aged garlic extract has chemopreventative effects on 1,2-dimethylhydrazine-induced colon tumors in rats. *J Nutr*, 136(3), 847S-851S. <https://doi.org/10.1093/jn/136.3.847S>



- Kerry, J.P. (2012). *Advances in Meat, Poultry and Seafood Packaging*. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. <https://www.sciencedirect.com/book/9781845697518/advances-in-meat-poultry-and-seafood-packaging#book-info>
- Khajeh, M., Yamini, Y., Sefidkon, F. & Bahramifar, N. (2004). Comparison of essential oil composition of *Carun copticum* obtained by supercritical carbon dioxide extraction hydro distillation methods. *Food Chemistry*, 86(4), 587-591. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.09.041>
- Kim, Y. J., Nahm, B. A. & Choi, I. H. (2009). An evaluation of the antioxidant and antimicrobial effectiveness of different forms of garlic and BHA in emulsion-type sausages during refrigerated storage. *Journal of Muscle Foods*, 21, 813–825. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4573.2010.00221.x>
- Kimbaris, A. C., Siatis, N. G., Daferera, D. J., Tarantilis, P. A., Pappas, C. S., & Polissiou, M. G. (2006). Comparison of distillation and ultrasound-assisted extraction methods for the isolation of sensitive aroma compounds from garlic (*Allium sativum*). *Ultrasonics Sonochemistry*, 13(1), 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2004.12.003>
- Laguerre, M., Lecomte, J., & Villeneuve, P. (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in lipid research*, 46(5), 244-282. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2007.05.002>
- Lancaster, J. E. & Boland M.J. (1990). Onions and Allied Crops: Biochemistry, *Food Science, and Minor Crops*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780429355752>
- Liangfu, Z. & Zelong, L. (2008). Optimization and comparison of ultrasound/microwave assisted extraction (UMAE) and ultrasonic assisted extraction (UAE) of lycopene from tomatoes. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15(5), 731-737. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2007.12.001>
- López Alfaro, L. (2017). *Determinación de Antioxidantes en el Cacao (Theobroma cacao) y Ajo (Allium sativum) por el Método de Voltamperometría Cíclica*. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. México. Recuperado de: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/42186/K%2064735%20L%20c3%93PEZ%20ALFARO%2c%20LILIANA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>



- López, M. (2007). El ajo, propiedades farmacológicas e indicaciones terapéuticas. *Fitoterapia*. 26(1), 78-81. <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-el-ajo-13097334#:~:text=El%20ajo%20tiene%20propiedades%20diafor%C3%A9ticas,catarros%2C%20asma%20bronquial%20y%20gripe.>
- Luna, M. (2012). Evaluación de ajo como agente antimicrobiano para la conservación de pan parcialmente horneado y almacenado en refrigeración. Tesis de Maestría. Universidad de las Américas Puebla, México
- Lund, M., Heinonen, M., Baron, C. & Estévez, M. (2011). Protein oxidation in muscle foods: a review. *Molecular Nutr Food Res*, 55(1), 83-95. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201000453>
- MacDougall, D. (1982). Changes in the colour and opacity of meat. *Food Chemistry*. 9(1-2), 75-88. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(82\)90070-X](https://doi.org/10.1016/0308-8146(82)90070-X)
- Márquez, L. (2003). Extracción del aceite esencial de mandarina (*Citrus reticulata*) utilizando dióxido de carbono en condición supercrítica como solvente. Tesis de grado. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. Recuperado de: <http://saber.ucv.ve/bitstream/123456789/514/1/EXTRACCI%C3%93N%20DEL%20ACEITE%20ESENCIAL%20DE%20MANDARINA%20TESIS%202.pdf>
- Mason, T. J. (1999). Sonochemistry: current use and future prospects in the chemical and processing industries. *Philosophical Transactions of The Royal Society A: Mathematical Physical and Engineering Sciences*, 357(1715), 355-369. <https://doi.org/10.1098/rsta.1999.0331>
- Mason, T. J., Paniwnyk, J. & Lorimer, J. P. (1996). The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 3(3), S253-S260. [https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1016/S1350-4177\(96\)00034-X](https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1016/S1350-4177(96)00034-X)
- Melton, S. L. (1983). Methodology for following lipid oxidation in muscle foods. *Food Technol*. 37, 105-111.
- Moreiras, O., Carbajal, A., Cabrera, L. & Cuadrado, C. (2013) Tablas de composición de alimentos. (16° ed.) Editorial PIRAMIDE.



[https://catedraalimentacioninstitucional.files.wordpress.com/2014/09/3-l-tablas de composicion de alimentos.pdf](https://catedraalimentacioninstitucional.files.wordpress.com/2014/09/3-l-tablas-de-composicion-de-alimentos.pdf)

Mulet, A., Benedito, J. & San Juan, N. (1999). Revisión: Ultrasonidos de baja intensidad en tecnología de alimentos. *Food Science and Technology International*, 5(4), 285-297.

Mulet, A., Carcel, J. A., Bon, J. & San Juan, N. (2003). New food drying technologies-Use of ultrasound. *Food Science and Technology International*, 9(3), 215-221. <https://doi.org/10.1177/1082013203034641>

Nalan, G. (2002). Descriptive method for sensory evaluation of mussels. *Food Science and Technology*, 35(7), 563-567. <https://doi.org/10.1006/fstl.2001.0868>

Navajas, C. (2019). *Estudio de metodologías limpias para la extracción de polifenoles en orujos de uva*. Tesis de grado. Universidad Pública de Navarra. Recuperado de: <https://academicae.unavarra.es/xmlui/bitstream/handle/2454/33676/TFG%20FINAL.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Navarro, C. (2007) Posibilidades terapéuticas del bulbo de ajo (*Allium sativum*). *Revista de Fitoterapia*, 7(2), 131-151. [https://www.fitoterapia.net/php/descargar\\_documento.php?id=4602&doc\\_r=sn&num\\_volumen=19&secc\\_volumen=5957#:~:text=El%20bulbo%20de%20ajo%20\(Allium,procesos%20infeccio%2D%20sos%2C%20etc.](https://www.fitoterapia.net/php/descargar_documento.php?id=4602&doc_r=sn&num_volumen=19&secc_volumen=5957#:~:text=El%20bulbo%20de%20ajo%20(Allium,procesos%20infeccio%2D%20sos%2C%20etc.)

Naveena B.M, Sen A.R, Vaithyanathan, S., Babji, Y. & Kondaiah, N. (2008) Comparative efficacy of pomegranate juice, pomegranate rind powder extract and BHT as antioxidants in cooked chicken patties. *Meat Science*, 80(4), 1304-1308. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.06.005>

Olivas, J., Díaz-Tenorio, L., Munguía-Xóchihua, J., Molina-Barros, R., & Hernández-Chávez, J. (2017). Indicadores de calidad en carne de cerdo de diferentes centros comerciales de Ciudad Obregón, Sonora. *Nacameh*. 11(2), 50-57. <https://drive.google.com/open?id=1LjjwtxqOjRuw2zaSiMrMHYYPyk2A9QR>

Park, S. Y., & Chin, K. B. (2010). Evaluation of pre-heating and extraction solvents in antioxidant and antimicrobial activities of garlic, and their application in fresh pork patties. *International Journal of Food Science and Technology*. 45(2), 365-373.



- <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.02153.x>
- Park, S. Y., Yoo, S. S., Shim, J. H. & Chin, K. B. (2008). Physicochemical properties, and antioxidant and antimicrobial effects of garlic and onion powder in fresh pork belly and loin during refrigerated storage. *Journal of Food Science*. 73(8), C577-C584. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00896.x>
- Pateiro, M., Lorenzo, J., Vázquez, J. & Franco, D. (2015). Oxidation stability of pig liver pate with increasing levels of natural antioxidants (grape and tea). *Antioxidants* 4(1), 102-123. <https://doi.org/10.3390/antiox4010102>
- Peredo, H. A., Palou, E., & López, A. (2009). Aceites esenciales: métodos de extracción. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 3(1), 24–32. [https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TZIA-3\(1\)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf](https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TZIA-3(1)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf)
- Pfalzgraf, A., Frigg, M. & Steinhart, H. (1995).  $\alpha$ -Tocopherol Contents and Lipid Oxidation in Pork Muscle and Adipose Tissue during Storage. *J. Agric. Food Chem*, 43(5), 1339-1342. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf00053a039>
- Pokorny, J., Yanishlieva, N., & Gordon, M. (2005). Antioxidantes de los alimentos. Zaragoza, Ed. Acribia S.A, 364p.
- Politeo, O., Jukic, M., & Milos, M. (2007). Chemical composition and antioxidant capacity of free volatile aglycones from basil (*Ocimum basilicum* L.) compared with its essential oil. *Food Chemistry*. 101(1), 379- 385. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.045>
- Porto, C., Decorti, I. & Kikic, I. (2009). Flavour compounds of *Lavandula angustifolia* L. to use in food manufacturing: Comparison of three different methods. *Food Chemistry*, 112(4), 1072-1078. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.015>
- Purslow P., Warner, R., Clarke, F. & Hughes J. (2020). Variations in meat colour due to factors other than myoglobin chemistry; a synthesis of recent findings. *Meat Science*, 159(1). <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.107941>
- Queiroz, Y., Ishimoto, E., Bastos, D., Sampaio, G. & Torres, E. (2009). Garlic (*Allium sativum* L.) and ready-to-eat garlic products: In vitro antioxidant activity. *Food Chemistry*, 115(1), 371-374. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.105>



- Raharjo, S. & Sofos, J. (1993). Methodology for measuring malonaldehyde as a product of lipid peroxidation in muscle tissues: A review. *Meat Science*. 35, 145-169. [https://doi.org/10.1016/0309-1740\(93\)90046-K](https://doi.org/10.1016/0309-1740(93)90046-K)
- Rahman, K. (2003). Garlic and aging: new insights into an old remedy. *Ageing Research Reviews*, 2(1), 29-56. [https://doi.org/10.1016/s1568-1637\(02\)00049-1](https://doi.org/10.1016/s1568-1637(02)00049-1)
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evas, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26,1231-1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Sallam, K. I., Ishioroshi, M & Samejima, K. (2004). Antioxidant and antimicrobial effects of garlic in chicken sausage. *Food Science and Technology*. 37(8), 849-855. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.04.001>
- Sampaio, G., Saldanha, T., Soares, R. & Torres, E. (2012). Effect of natural antioxidant combinations on lipid oxidation in cooked chicken meat during refrigerated storage. *Food Chem*, 135(3), 1383-1390. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.103>
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER). (2017). Aumenta producción de ajo “Hecho en México” 28.9 por ciento en 2016. Delegación SADER Zacatecas. <https://www.gob.mx/agricultura%7Czacatecas/articulos/aumenta-produccion-de-ajo-hecho-en-mexico-28-9-por-ciento-en-2016>
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER). (2018). Crece producción de ajo en Zacatecas. Delegación SADER Zacatecas. <https://www.gob.mx/agricultura%7Czacatecas/articulos/crece-produccion-de-ajo-en-zacatecas#:~:text=Hist%C3%B3ricamente%2C%20Zacatecas%20se%20mantiene%20dentro,la%20producci%C3%B3n%20total%20del%20pa%C3%ADs.>
- Secretaria de Salubridad y Asistencia (1993). NOM-034-SSA1-1993. Bienes y servicios. Productos de la carne, carne molida y carne molida moldeada, envasadas, especificaciones sanitarias. Disponible en: [https://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4680418&fecha=23/03/1994](https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4680418&fecha=23/03/1994)
- Secretaria de Salubridad y Asistencia (1994). NOM-092-SSA1-1994. Método para la



- cuenta de bacterias aerobias en placa. Bienes y Servicios. Disponible en: [http://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4886029&fecha=12/12/1995#:~:text=expide%20la%20siguiente%3A-NORMA%20OFICIAL%20MEXICANA%20NOM%20092%20DSSA1%20D1994%2C%20BIENES.DE%20BACTERIAS%20AEROBIAS%20EN%20PLACA.&text=Cuando%20se%20requiere%20investigar%20el,es%20la%20cuenta%20en%20placa.](http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4886029&fecha=12/12/1995#:~:text=expide%20la%20siguiente%3A-NORMA%20OFICIAL%20MEXICANA%20NOM%20092%20DSSA1%20D1994%2C%20BIENES.DE%20BACTERIAS%20AEROBIAS%20EN%20PLACA.&text=Cuando%20se%20requiere%20investigar%20el,es%20la%20cuenta%20en%20placa.)
- Secretaria de Salubridad y Asistencia (1994). NOM-113-SSA1-1994. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa. Bienes y Servicios. Disponible en: <http://www.ordenjuridico.gob.mx/Documentos/Federal/wo69536.pdf>
- Serhat-Turgut, S., Soyer A. & Işıkçı, F. (2016) Effect of pomegranate peel extract on lipid and protein oxidation in beef meatballs during refrigerated storage. *Meat Science*, 116, 126-132. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.02.011>.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), Sistema de Información Agroalimentaria de Consulta (SIACON), (1980-2019), consultado en <https://www.gob.mx/siap/documentos/siacon-ng-161430>
- Talens, P. (2017). Evaluación de color y tolerancia de color en alimentos a través del espacio CIELAB. Trabajo de investigación. Universidad Politécnica de Valencia. Tecnología de Alimentos. <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/83392/Talens%20-%20Evaluaci%C3%B3n%20del%20color%20y%20tolerancia%20de%20color%20en%20alimentos%20a%20trav%C3%A9s%20del%20espacio%20CIELAB.pdf?sequence=1>
- Tómas, M., Vinatoru, M., Paniwnyk, L. & Mason, T. (2001). Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8(2), 137-142. [https://doi.org/10.1016/S1350-4177\(00\)00033-X](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(00)00033-X)
- Tsen, S., Ameri, F. & Smith, J. (2006). Effects of rosemary extract on the reduction of heterocyclic amines in beef patties. *Journal Food Science*, 71(8) C469-C473. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00149.x>
- Vaithyanathan, S., Naveena, B., Muthukumar, M., Girish, P. & Kondaiah, N. (2011). Effect of dipping in pomegranate (*Punica granatum*) fruit juice phenolic solution on the shelf life of chicken meat under refrigerated storage (4 °C). *Meat Science*, 88(3), 409-414. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.01.019>



- Valencia, I., O'Grady, M. N., Ansorena, D., Astiasaran, I., & Kerry, J. P. (2008). Enhancement of the nutritional status and quality of fresh pork sausages following the addition of linseed oil, fish oil and natural antioxidants. *Meat Science*. 80(4), 1046- 1054. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.04.024>
- Valenzuela, C. & Pérez, P. (2016). Actualización en el uso de antioxidantes naturales derivados de frutas y verduras para prolongar la vida útil de la carne y productos cárneos. *Revista Chilena de Nutrición*, 43(2), 188-195. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182016000200012>
- Vinatoru, M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8(3), 303-313. [https://doi.org/10.1016/S1350-4177\(01\)00071-2](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(01)00071-2)
- Wang, Y., Zhang, L., Moslehi, R., Ma, J., Pan, K., Zhou, T., Liu, W., Brown, L. M., Hu, Y., Pee, D., Gail, M. H., & You, W. (2009). Long-term garlic or micronutrient supplementation, but not anti-Helicobacter pylori therapy, increases serum folate or glutathione without affecting serum vitamin B-12 or homocysteine in a rural Chinese population. *The Journal of nutrition*, 139(1), 106–112. <https://doi.org/10.3945/jn.108.091389>
- Wongsa, P., Chaiwarait, J. & Zamaludien, A. (2012). In vitro screening of phenolics compounds, potencial inhibition against  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase of culinary herbs in Thailand. *Food Chemistry*, 131(3), 964-971. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.088>.
- Yachachi, S. (2013). Caracterización fisicoquímica del extracto expectorante de ajo (*Allium sativum*), kió ( *Zingiber officinale* L.), eucalipto (*Eucalitus globulus* L.) y linaza (*Linum usitatissimum* L.). Tesis de licenciatura. Universidad Nacional del Centro del Perú. Facultad de Ciencias Aplicadas. Recuperado de: <https://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12894/1969/Yachachin%20Espinoza.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Zamora, E. (2016). El cultivo del ajo. *Serie guías - Producción de hortalizas: Universidad de Sonora*. 014, 1-7. Disponible en: <https://dagus.unison.mx/Zamora/AJO-DAG-HORT-014.pdf>



- Zhang, W., Xiao, S. & Ahn, D. (2013). Protein oxidation: basic principles and implications for meat quality. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 53(11), 1191-1201. [10.1080/10408398.2011.577540](https://doi.org/10.1080/10408398.2011.577540)
- Zinoviadou, K., Koutsoumanis, K. & Biliaderis, C. (2009). Physicochemical properties of whey protein isolate films containing oregano oil and their antimicrobial action against spoilage flora of fresh beef. *Meat Science*, 82(3), 338-345. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.02.0>