

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	5
II. GENERALIDADES	
II.1 Descripción general del ajo	8
II.1.1 Características botánicas.	8
II.2 Antecedentes históricos	
II.2.1 Usos y tradiciones.	9
II.2.2 Historia de las investigaciones	10
II.3 Composición química del ajo	11
II.3.1 Compuestos sulfurados	13
II.3.2 Compuestos no sulfurados	13
II.4 Aspectos bioquímicos del ajo	15
II.5 Propiedades Fisicoquímicas	18
II.5.1 De alina	18
II.5.2 De alicina	19
II.6 Dosificación del ajo	19
II.7 Toxicidad del ajo	20
II.8 Propiedades Microbiológicas	22
II.8.1 Actividad bactericida	21
II.8.2 Actividad antimicótica	22
II.8.3 Actividad antiviral	22
II.8.4 Actividad antiparasitaria	23
II.8.5 Como insecticida	24
II.9 Propiedades Inmunológicas	24



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

II.10 Aplicaciones patológicas	27
II.10.1 Como Hipocolesterolémico	25
II.10.2 En la disminución de la agregación plaquetaria	29
II.10.3 Como Anticancerígeno	31
II.10.4 Otras aplicaciones	33
III. MÉTODOS ANALÍTICOS	
III.1 Antecedentes	36
III.2 Métodos por Cromatografía de Gases	41
III.2.1 Para la determinación de alicina	41
III.2.2 Para la determinación de alina	46
III.3 Método de Cromatografía de Líquidos para la determinación de alina.	49
III.4 Métodos de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)	
III.4.1 Determinación cuantitativa de alicina	56
III.4.2 Determinación cuantitativa de alicina y alina	63
III.4.3 Determinación cuantitativa de alina	74
III.4.4 Determinación y caracterización de los productos de de transformación de alicina: ajoenes y ditiinas	84
III.5 Identificación y cuantificación de alina utilizando CLAR y CCF	85
III.5.1 En ajo fresco	88
III.5.2 En ajo en polvo	92
III.6 Métodos espectrofotométricos	
III.6.1 Determinación de alicina y tiosulfatos totales por Ultravioleta	94
III.6.2 Determinación cualitativa de los componentes del ajo por espectroscopia de Infrarrojo	98
IV. DISCUSIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS	106
CONCLUSIONES	111
BIBLIOGRAFÍA	113

AGRADECIMIENTOS

A mi gran profesor: Q. Pedro Villanueva G.

A mis padres: Filemón y Leonor

A mi esposo: Héctor Gonzálo Tlatelpa

A mis mejores amigas:

Verónica Castillo

Tania Huerta

Ma. Luisa García

Patricia Bárcenas

A mi Universidad y a todos y cada uno de los que directa e indirectamente hicieron posible ver cumplir esta meta.

Y sobre todo a mi Dios y Salvador Jesucristo, porque .

“... por la gracia de Dios soy lo que soy; y su gracia no ha sido en vano para conmigo, antes he trabajado,... pero no yo, sino la gracia de Dios conmigo,... para mostrar a los siglos venideros las abundantes riquezas de su gracia en su bondad para con nosotros en Cristo Jesús. ...Porque las cosas invisibles de Él, su eterno poder y deidad, se hacen claramente visibles desde la creación del mundo... ¡Oh profundidad de las riquezas, de la sabiduría y de la ciencia de Dios! ... porque de Él, por Él y para Él son todas las cosas. A Él sea la gloria por los siglos”.

1 Cor. 15:10, Efe. 2:7, Rom. 1:20; 11:33,36.

Gracias

AGRADECIMIENTOS

A mi gran profesor: Q. Pedro Villanueva G.

A mis padres: Filemón y Leonor

A mi esposo: Héctor Gonzálo Tlatelpa

A mis mejores amigas:

Verónica Castillo

Tania Huerta

Ma. Luisa García

Patricia Bárcenas

A mi Universidad y a todos y cada uno de los que directa e indirectamente hicieron posible ver cumplir esta meta.

Y sobre todo a mi Dios y Salvador Jesucristo, porque .

“... por la gracia de Dios soy lo que soy; y su gracia no ha sido en vano para conmigo, antes he trabajado,... pero no yo, sino la gracia de Dios conmigo,... para mostrar a los siglos venideros las abundantes riquezas de su gracia en su bondad para con nosotros en Cristo Jesús. ...Porque las cosas invisibles de Él, su eterno poder y deidad, se hacen claramente visibles desde la creación del mundo... ¡Oh profundidad de las riquezas, de la sabiduría y de la ciencia de Dios! ... porque de Él, por Él y para Él son todas las cosas. A Él sea la gloria por los siglos”.

1 Cor. 15:10, Efe. 2:7, Rom. 1:20; 11:33,36.

Gracias

“DETERMINACIÓN DE ALINA Y ALICINA CONTENIDOS EN EXTRACTO DE AJO EN POLVO (*Allium sativum L.*) MEDIANTE MÉTODOS INSTRUMENTALES DE ANÁLISIS”

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

En vista del gran auge que están teniendo nuevamente los productos herbolarios en el área de la medicina, se han estado realizando investigaciones científicas de las propiedades farmacológicas y nutricionales que poseen los principios activos contenidos en las plantas medicinales; para conocer sus efectos, se han hecho varios estudios tanto *in vitro* como *in vivo* en ratones, conejos, humanos, etc.

Por otra parte, además de los productos naturales, los productos procesados que se venden en las tiendas naturistas requieren de la identificación, análisis y control del contenido de los marcadores terapéuticos, de tal forma que garanticen al consumidor los grandes beneficios que proveen a la salud.

En el caso particular del ajo (*Allium sativum L.*), éste ha sido usado a través de todos los tiempos como un excelente medicamento herbolario, ya que posee una gran diversidad de propiedades terapéuticas. Los componentes, a quienes se les atribuye el poder curativo, son principalmente la alicina y sus productos de transformación.

Entre otras propiedades, tiene actividad antimicrobiana de amplio espectro^(1,26,60), tiene actividad antifúngica, ya que inhibe el crecimiento de aproximadamente 60 especies de hongos y levaduras, (incluida *Candida albicans*, causante de vaginitis)^(20,26); tiene actividad antiviral, pues ayuda a aliviar gripes comunes en la etapa temprana de la enfermedad^(10,24); tiene actividad antiparasitaria, destruye las amibas que causan la disentería^(15,30); disminuye los niveles de colesterol endógeno y la síntesis de triacilgliceroles^(15,19,25,39,47,51,57); disminuye la agregación plaquetaria^(18,50,51); disminuye la actividad de las células cancerígenas^(21,40-45,52-54); incrementa la respuesta inmune a nivel de las células T "helper"^(9,36,66).

Para lograr estos efectos, se debe consumir una cierta cantidad de ajo; sin embargo, la cantidad mínima necesaria para obtener buenos resultados, aún es cuestionada. Si bien, se sabe que se requiere ingerir un promedio de 3 g de ajo fresco al día⁽¹⁹⁾, equivalente a un diente de ajo en promedio,^(25,51) o 900 mg de extracto de ajo (3 cápsulas o tabletas diarias de 300 mg cada una) durante 4 meses por lo menos para lograr obtener efectos terapéuticos significativos⁽³⁹⁾; dicho de otra manera, el extracto de ajo estandarizado debería contener al menos 1.3 a 1.5% de alina*⁽¹⁴⁾, para poder garantizar al consumidor el alcance de sus beneficios, como se mencionará con detalle más adelante. Por estas razones, es importante conocer el contenido de los principios activos en el extracto de ajo en polvo*.

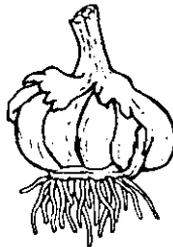
Gracias al avance en el campo de la química analítica, existen varios métodos instrumentales que por su sensibilidad y selectividad son capaces de auxiliarnos en la identificación y determinación de los componentes activos de las plantas medicinales. La fluorometría, espectroscopía infrarroja, espectrometría de masas, absorción

* La **alina** es un aminoácido secundario que proviene de la cisteína, el cual a su vez es transformado enzimáticamente por la alinasa en alicina. Aunque no posee propiedades terapéuticas, es considerado como un excelente marcador, dada su termoestabilidad y propiedades fisicoquímicas, para la evaluación del ajo fresco y de los extractos de ajo.

ultravioleta, etc., cualquiera de éstos acoplados a equipos de cromatografía de gases o cromatografía de líquidos de alta resolución son los sistemas que más se utilizan en la determinación de la alina y la alicina, de acuerdo a la literatura revisada.

En este trabajo se discuten varios métodos instrumentales de análisis reportados para la determinación de alina, alicina y sus derivados de sulfuro; en él se incluyen métodos de Cromatografía de Gases (CG), de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR), de Cromatografía en Capa Fina (CCF), métodos espectrométricos, como el Ultravioleta (UV) y el Infrarrojo (IR). Después de analizarlos y compararlos, se sugieren los métodos que reúnan las mejores ventajas en la identificación y evaluación del contenido del ajo fresco y del extracto de ajo en polvo.

Cabe señalar que la United States Pharmacopoeia (USP), 24a. edición⁽⁶⁵⁾, publica en la monografía del ajo la identificación cualitativa y el contenido de alina mediante cromatografía de líquidos de alta resolución; sin embargo, esta metodología aún no ha sido implementada en México en las empresas de medicina herbolaria, por lo que me enfocaré en los resultados obtenidos por investigaciones extranjeras, de acuerdo a los artículos publicados en Estados Unidos de Norteamérica, Alemania y Japón.



CAPITULO II

GENERALIDADES

II.1 DESCRIPCION GENERAL DEL AJO.

Existen alrededor de 500 especies de ajo^(33,36), pero la especie a la cual me refiero en este trabajo es *Allium sativum* L., originario de Asia, miembro de la familia de las liliáceas, es una planta perenne que se cultiva en varias regiones del mundo. Se producen en los bosques abiertos del Hemisferio Norte⁽²⁹⁾. En la actualidad, México es el segundo país productor en el continente Americano, después de Estados Unidos⁽²⁷⁾. Por mencionar un ejemplo, en el estado de Guanajuato se producen hasta 40 mil toneladas al año⁽⁷²⁾.

II.1.1 Características botánicas.

El ajo (*Allium sativum* L.) es una planta vivaz, forma parte de la familia de las cebollas, puerros y cebollinos, caracterizada por un bulbo (ver el dibujo, parte 1) compuesto por grandes bulbillos (dientes) individuales, ovales y puntiagudos en el extremo superior, recubiertos por una membrana consistente y unidos en una parte común leñosa. La membrana de los bulbillos o dientes tiene varias capas. El tallo (ver el dibujo, parte 2) es simple,



cilíndrico, lampiño y con unas hojas inferiores sésiles. Las hojas son planas con un canal central, de color verde ceniciento, puntiagudas en el extremo superior y de unos 12 mm de anchura. Las flores, que en un principio están rodeadas de una espata (ver el dibujo, parte 3) forman una umbela laxa, son blanquecinas, rosáceas o incluso verdosas, están provistas de 6 pétalos libres y lanceolados y de 6 estambres unidos por sus filamentos ensanchados al periantio. Las semillas son negras y brillantes. Entre las flores de la periferia de la umbela se desarrollan otros tipos de bulbillos esféricos (ver el dibujo, parte 4) que pueden aparecer también en la base del tallo^(28,29,32). El bulbo, fresco o deshidratado, se usa en la cocina como condimento o con propósitos medicinales⁽⁵⁷⁾.

II.2 ANTECEDENTES HISTÓRICOS.

II.2.1 Usos y tradiciones.

A través de los años, el ajo ha tenido un lugar prominente en muchas culturas. El documento de Sanskrit, escrito hace aproximadamente 5000 años, registra el uso del ajo como remedio medicinal, también los chinos lo han utilizado por lo menos 3000 años. El Código Ebers, un papiro de medicina egipcia que data de 1550 años A.C., menciona al ajo como un remedio muy efectivo para reducir la presión arterial, problemas respiratorios e infecciones, dolores de cabeza, para desinfectar heridas y en general mantener una buena salud utilizándolo en una gran variedad de alimentos. Hipócrates, Aristóteles, Dioscórides, Plinio, Aristófanes y otros como Celso en su "*Historia de la Medicina Alejandrina*" citaron numerosos usos terapéuticos del ajo⁽⁵⁷⁾.

Cuentan que en 1721, en la ciudad de Marsella se abatió sobre la población una terrible peste, miles de personas morían diariamente y no había quien quisiera enterrar a las víctimas por temor a un contagio fatal. A falta de voluntarios, las autoridades optaron por liberar a cuatro condenados a muerte para que realizaran esta desagradable tarea, cosa que hicieron porque no tenían otra alternativa.

Sorprendentemente no les afectó la peste y se descubrió que tomaban vino con ajo macerado, esta bebida llegó a ser conocida como “*Vinaigre des quatre voleurs*” (el vinagre de los cuatro ladrones), la cual se consume en Francia hoy en día^(21,59).

Se han escrito muchas historias, costumbres y versos acerca de los poderes curativos del ajo, un ejemplo de éstos es el citado por Murray⁽⁵⁷⁾ y escrito por John Harrington, en 1609, dice:

*“Garlic then have power to save from death
Bear with it though it maketh unsavory breath
And scorn not garlic like some that think
It only maketh men wink and drink and stink”*

También se cree que posee facultades mágicas, según el folklore de muchas regiones, tales como encantos y hechizos para protegerse contra la maldad.

II.2.2 *Historia de las investigaciones.*

No fue antes del siglo XVIII que se hicieron las primeras investigaciones científicas acerca del ajo. Hasta finales del siglo XIX, en 1858, Pasteur describió la actividad antibiótica del ajo⁽⁵⁷⁾; en 1892, Semmler y Weltheim, reportaron en una revista farmacéutica alemana los compuestos extraídos del ajo: alilsulfuros, dialilmonosulfuro, dialidisulfuro y otros. En 1944, el estadounidense Cavallito y sus colaboradores⁽⁶⁰⁾ reportaron que el olor característico del ajo se debía a la presencia de la alicina. En 1948, Stoll y Seebeck de Suiza, demostraron que la alicina se forma enzimáticamente a partir de un aminoácido al que llamaron “alinala”. Este resultado hizo posible postular un mecanismo de las reacciones químicas involucradas en la formación simultánea de la alicina^(1, 16).

Actualmente, hay suficiente y confiable información para conocer los componentes activos del ajo y los constituyentes efectivos de sus productos. Reportes médicos y científicos publicados en revistas científicas en los pasados 50 años tan unánime y

claramente soportan que la alina, alicina y los compuestos relacionados son los ingredientes activos del ajo⁽³⁰⁾.

II.3 COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL AJO

El ajo contiene más de 200 diferentes fitoquímicos (bioflavonoides). Kalra, *et al*⁽¹⁵⁾, hicieron una recopilación de diferentes investigadores que se dedicaron a buscar los diversos compuestos químicos del ajo e informan en su artículo que Virtanen y Mattila aislaron el péptido γ -glutamyl-S-allyl-L-cisteína en forma cristalizada, Han *et al* aislaron a la alina en forma de cristal puro y otros más reportan los siguientes componentes:

Carbohidratos: glucosa, fructosa, sacarosa, lactosa, almidón y dextrina.

Pectinas

Aminoácidos: arginina, ácido aspártico, asparagina, histidina, leucina, metionina, fenil alanina, prolina, serina, treonina, triptófano, valina, glutamina, tirosina, cisteína y metionina.

Vitaminas: ácido ascórbico, vitamina A, ácido nicotínico, tiamina, riboflavina, niacina y biotina.

Lípidos: glicolípidos, fosfolípidos, triglicéridos, ácidos grasos libres (linoleico, palmítico y oleico), ésteres de esteroles.

Pigmentos: α -carotenoides, β -caroteno, xantófilos, antocianina y clorofila. La presencia de antocianina varía dependiendo de la temperatura, el almacenamiento y la humedad.

Elementos traza/Minerales: Na, K, Cu, Fe, Cr, Cd, Co, Ni, Ca, P, S, Mg, Zn, V, Mo, Ti, Ce, Li y Se.

Cavallito y Bailey⁽⁶⁰⁾ identificaron las propiedades físicas y estructura química de la alicina.

Por otra parte, una compañía norteamericana (Pure-Gar)⁽³⁰⁾ dedicada a la producción de extractos de plantas medicinales provee la siguiente información nutricional del extracto de ajo en polvo por cada 100 gramos (Ver cuadro No. II.3.1).

Categoría nutricional	Promedio por lote	Valores ADOGA**	Unidades
Calorías	371.80	289.00	Cal
Total de ácidos grasos	0.07	0.40	g
Ácidos grasos saturados	0.01	N/P***	g
Colesterol	N/D*	0.00	mg
Sodio	25.300	29.00	mg
Total de carbohidratos	79.64	74.10	g
Fibra	19.90	17.90	g
Azúcares	2.34	2.40	g
Proteínas	13.22	15.30	g
Vitamina A	162.80	N/P***	IU
Vitamina C	3.42	2.00	mg
Calcio	162.00	123.00	mg
Hierro	2.20	6.00	mg
Vitamina E	0.86	N/A****	IU
Tiamina	0.13	0.39	mg
Riboflavina	0.13	0.14	mg
Niacina	N/D*	N/A****	mg
Vitamina B6	5.71	N/A****	mg
Folatos	N/D*	N/A****	mcg
Vitamina B12	0.11	N/A****	mcg
Biotina	N/D*	N/A****	mg
Ácido pantoténico	0.62	N/A****	mg
Fósforo	380.00	350.00	mg
Yodo	N/D*	N/A*	mcg
Magnesio	71.60	70.00	mg
Zinc	3.86	2.40	mg
Cobre	0.28	0.60	mg
Selenio	0.02	N/A****	mg
Humedad	3.61	6.80	g
Cenizas	3.47	3.91	g

Cuadro No. II.3.1. Información nutricional del extracto de ajo en polvo por cada 100 gramos.

* No detectado (N/D)

** Análisis nutricional obtenido por la Asociación Americana de Cebollas y Ajos (ADOGA).

*** No presenta niveles significativos para reportarlos.

**** No disponible (N/A)

Imada *et al*⁽⁶²⁾, Block *et al*⁽⁶³⁾ y otros investigadores⁽³⁹⁻⁵⁵⁾ se han dedicado a buscar los beneficios de la gran variedad de compuestos que contienen sulfuros, además de la alicina, y de los que no contienen sulfuros, éstos los han clasificado como indico en las tablas No. II.3.1 y II.3.2 donde se informa acerca de los compuestos sulfurados (solubles e insolubles en agua) y los no sulfurados, respectivamente.

<i>Insolubles en agua</i>	<i>Solubles en agua (Incluyen derivados de cisteína)</i>
alicina	alina
dialilsulfuro (DAS)	S-alil cisteína (SAC)
dialildisulfuro(DADS)	S-alil mercapto cisteína (SAMC)
dialiltrisulfuro	S- metil cisteína
alilmetiltrisulfuro	γ-glutamil cisteína y sus derivados
ditiinas	
ajoene	
aminoalquilsulfóxidos	
óxidos de disulfuro	
óxido de tritio dodecatrieno	
sulfuro de propileno *	

Tabla No. II.3.1. COMPONENTES SULFURADOS.
Subclasificados en componentes insolubles y solubles en agua.

16 aminoácidos	magnesio
saponinas	selenio **
potasio	zinc
germanio	vitaminas
calcio	lípidos
cobre	proteínas
hierro	geraniol

Tabla No. II.3.2. COMPONENTES NO SULFURADOS.
Todos estos compuestos tienen propiedades terapéuticas.

* El **sulfuro de propileno**, encontrado en el extracto de ajo y cebolla es moderadamente efectivo contra tumores. actúa sobre la enzima liposaminasa, se cree que puede estar relacionado con el desarrollo del cáncer si no se controla apropiadamente.

** El **selenio** tiene actividad antioxidante.

El extracto oleoso del ajo contiene principalmente sulfuros, los cuales son olorosos, mientras que los compuestos solubles en agua son inoloros. (No hay datos científicos que muestren que la fracción de aceite represente todos los beneficios del ajo). Por otra parte, los componentes solubles en agua son más estables que los solubles en aceite.⁽³⁶⁾

El extracto de ajo en polvo contiene a la alina, la enzima alinasa y por consiguiente pueden producir alicina *in vitro* con la adición de agua. Sin embargo, no hay suficiente evidencia científica que compruebe que la alicina se produzca en el estómago. El ajo en polvo contiene solamente una cantidad residual de alina comparada con el ajo crudo. Químicamente no hay diferencia entre los extractos de ajo en polvo que venden en la tienda de abarrotes y los que venden en tiendas de alimentos para la salud.⁽³⁶⁾

Las estructuras de los compuestos del ajo que contienen grupos S-S y S-H, típicos de la mayoría de las enzimas y hormonas, regulan la función corporal y su respuesta a los nutrientes y drogas⁽³⁶⁾.

II.4 ASPECTOS BIOQUÍMICOS DEL AJO

Cortando o macerando los dientes de ajo se desata una secuencia de eventos bioquímicos: se activa la alinasa (alin alquil sulfonato liasa), la cual cataliza la reacción que convierte la alina ((+)-S-alil-L-cisteína sulfóxido) en alicina (dialil tiosulfonato), la cual se descompone a otros compuestos odoríferos que se encuentran raramente en la naturaleza (Ver Figura No. II.4.1).⁽³⁶⁾

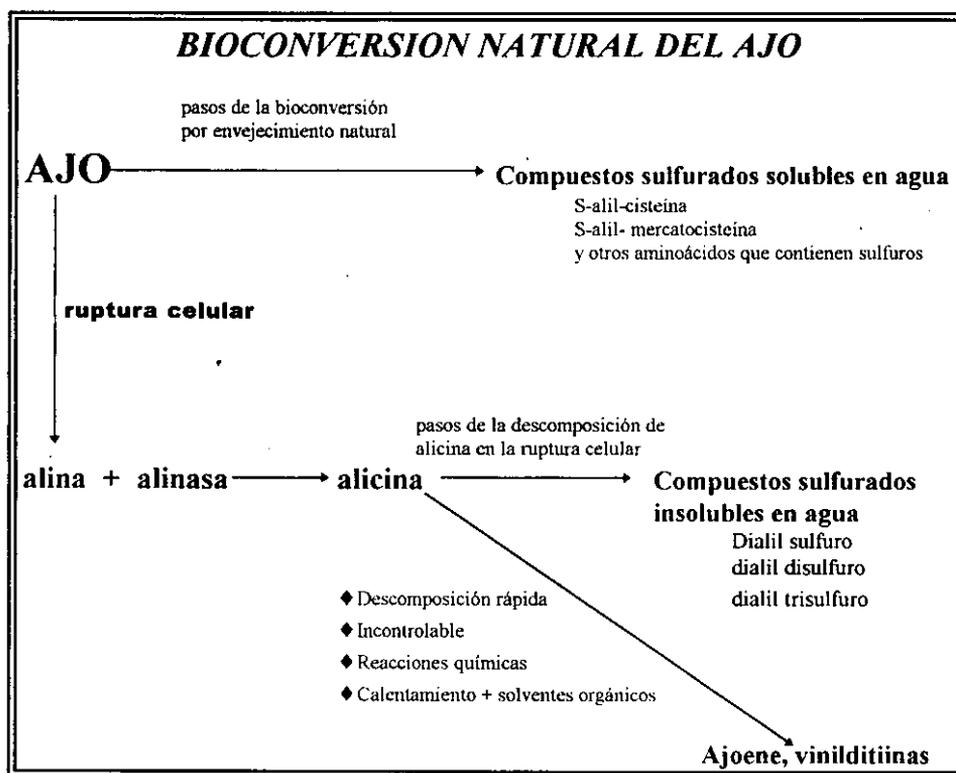


Fig. No. II.4.1. BIOCONVERSIÓN NATURAL DEL AJO. Secuencia de eventos bioquímicos al macerar los dientes del ajo.

Debido a la similitud estructural entre la alina y la cisteína, existen otras enzimas diferentes de la alinasa, que son capaces de producir la degradación enzimática de aminoácidos que contienen azufre, entre ellas se puede mencionar a la cisteinasa (que se encuentra en *Proteus vulgaris* y *Escherichia coli*); a la cistein-desulfhidrasa que está presente en el hígado, desdobla a la cisteína en ácido sulfhídrico, ácido pirúvico y amoníaco, un proceso similar al que presenta la alinasa sobre la alina. A continuación se muestran las estructuras químicas de reacciones que se llevan a cabo para formar el ácido pirúvico y el amoníaco a partir de la alina. (Figura No. II.4.2)⁽²⁶⁾.

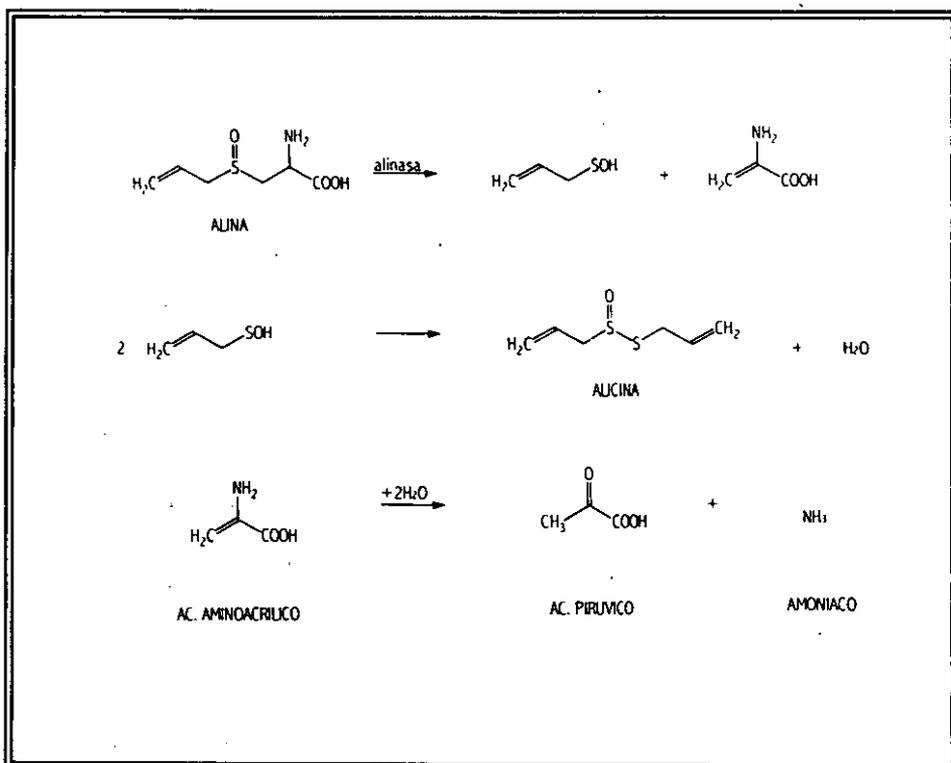


Figura No. II.4.2. La alicina se forma por el ataque al grupo sulfuro por otro grupo alilo y un átomo de oxígeno. Cuando la alinasa actúa sobre la alina para producir alicina, el ajo comienza a desprender su olor característico.

Otro de los principales componentes del ajo, con propiedades terapéuticas, es el ajoene⁽⁸⁾. En la Figura II.4.3, se describe un probable mecanismo de reacción para la conversión de ajoene a partir de alicina.

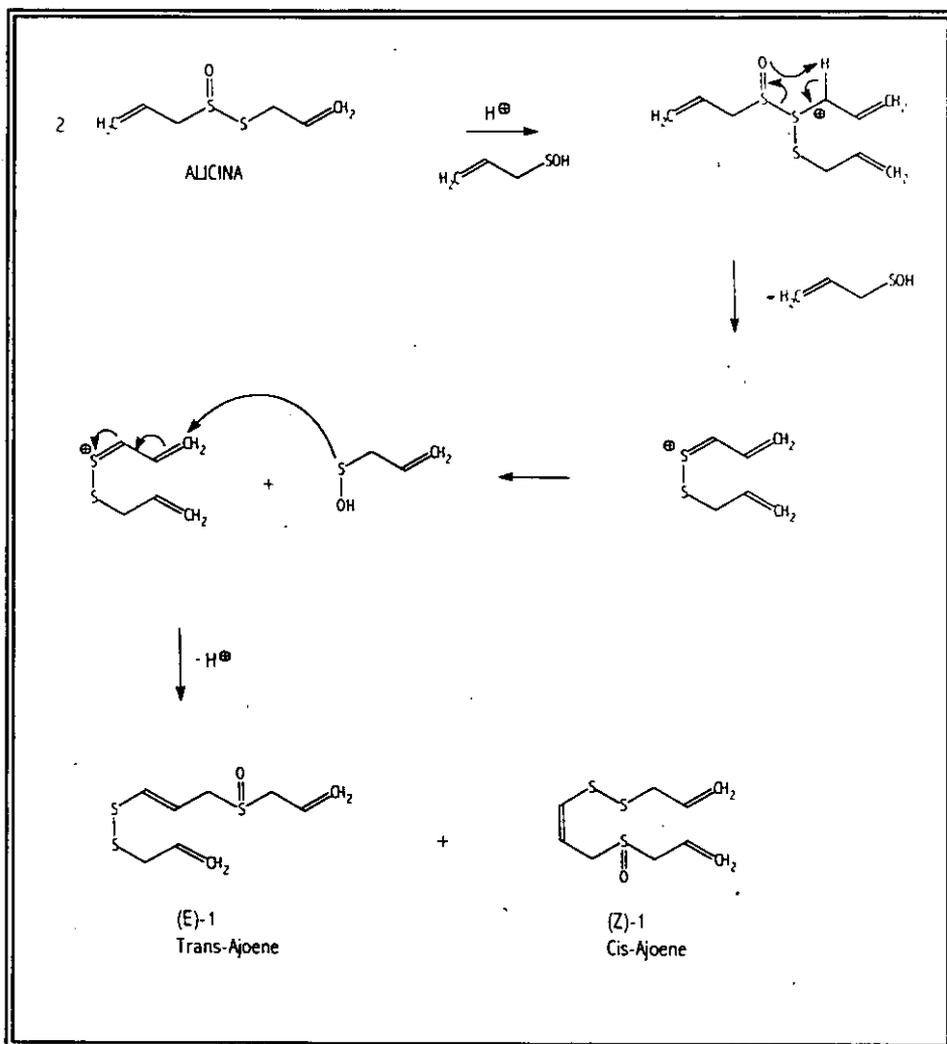


Figura II.4.3. Mecanismo de reacción sugerido para la obtención de ajoene, otro de los principales componentes del ajo.

Pero, ¿cómo se sintetiza la alina dentro de la célula?. Se han sugerido por lo menos dos pasos potenciales para la formación de la S-alil-L-cisteína libre. En una se plantea que la biosíntesis de alina ocurre por hidrólisis de la γ -glutamyl-S-alil-L-cisteína-sulfóxido, la cual es el producto de oxidación de la γ -glutamyl-S-alil-L-cisteína. La hidrólisis probablemente ocurre en el citoplasma, porque la actividad de la γ -glutamyltranspeptidasa no se localiza en los cloroplastos, donde la cisteína es γ -glutamilada y reciclada con el glutatión durante la biosíntesis de la γ -glutamyl-S-alil-L-cisteína. La γ -glutamyltranspeptidasa probablemente ataca a la γ -glutamyl-S-alenil-L-cisteína para producir a la S-alenil-L-cisteína libre, tal y como se encuentra en el bulbo del *A. sativum* L., de otra manera la cisteína sintetasa en las plantas puede catalizar la conversión de O-acetilserina con alilmercaptano a S-alil-L-cisteína.⁽³⁶⁾

La S-alil-L-cisteína libre es un precursor potencial de alina porque se forma por la oxidación de S-alil-L-cisteína en el cultivo de tejidos de *A. sativum* L.⁽¹¹⁾, lo cual ocurre cuantitativamente, mostrando la biotransformación de alina por una oxidasa específica. La oxidasa probablemente funciona *in vivo* como la oxidación de γ -glutamyl-S-alil-L-cisteína. Todavía no se sabe si S-alil-L-cisteína podría ser derivada de la formación de O-acetilserina y alilmercaptano por la acción de la cistein sintetasa o la degradación de la γ -glutamyl-S-alil-L-cisteína⁽⁹⁾.

II.5 PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE ALINA Y ALICINA

II.5.1 Propiedades de la alina.

La S-alil-L-cisteína sulfóxido tiene un peso molecular de 177.22 g/mol. En su forma monohidratada (195 g/mol) se presenta como cristales en forma de agujas, con punto de fusión 164-166° (efervescente). Muy soluble en agua, prácticamente insoluble en etanol absoluto, cloroformo, acetona, éter, benceno⁽³⁸⁾. Se inactiva la alinasa de los ajos frescos y los productos de ajo con agua hirviendo. Mochizuki *et al*⁽²⁾ estudiaron la

termoestabilidad de la alina a diferentes tiempos, siendo estable a 100°C: la cantidad de alina remanente fue de 94.7% después de 20 minutos de calentamiento, 88.3% después de 40 min. y 79.4% después de 60 min. La alina es una sustancia inodora y biológicamente inactiva.

II.5.2 *Propiedades de la alicina.*

Oxido de dialil disulfuro. Su peso molecular es de 162.28 g/mol. La alicina se aísla a partir de dientes de ajo y no se encuentra normalmente libre en la planta. Es un líquido amarillo que se descompone por destilación en seco; es soluble en agua a 10°C cerca de 2.5% peso/peso, etanol, éter etílico y benceno, pH aproximado de 6.5. Inestable en álcali caliente y estable en ácidos⁽³⁸⁾. Es ópticamente inactiva, posee el olor característico del ajo, es altamente inestable, reactiva y oxidativa. Irrita la piel⁽³⁴⁾.

II.6 DOSIFICACION DEL AJO

Murray *ibidem* ⁽⁵⁷⁾, menciona que los productos comerciales deberían proporcionar una dosis diaria de al menos 10 mg de alina o un total de 4 mg de alicina. Otro dato revisado en internet ⁽³⁶⁾ menciona que la dosis en promedio que se consume de las preparaciones de alina deben ser equivalentes de 4-12 mg por día (o bien 2-5 mg por día de alicina); agrega que el polvo de ajo completamente seco debe ser equivalente de 400-1200 mg por día, o bien el ajo fresco de 2-5 g por día.

En diversos estudios realizados *in vivo* para observar y demostrar la efectividad de las propiedades medicinales (tanto del ajo fresco como de los productos comerciales), en enfermedades como hipercolesterolemia, tumores cancerígenos, etc. se propusieron diferentes dosis, las cuales mencionaré en la *aplicación terapéutica* correspondiente y los resultados que obtuvieron.

II.7. TOXICIDAD DEL AJO

Murray ⁽⁵⁷⁾, menciona en su libro "*The Healing Power of Herbs*" que el ajo no es tóxico a dosis comúnmente usadas. Para algunos, puede causar irritación al tracto digestivo y colitis, por un decremento de la flora normal en el estómago y los intestinos, o bien dermatitis causada por una respuesta alérgica al alto contenido de sulfuros. "Experimentos en ratas demostraron que el consumo prolongado y en grandes cantidades de ajo fresco produce anemia, baja de peso y fallas en el crecimiento".

Hoffman ⁽²¹⁾, menciona que la alicina es fuertemente hepatotóxica cuando es administrada en dosis altas y en períodos largos, que las dosis analizadas fueron de 100 mg/Kg, equivalente a que una persona coma 1750 gramos o ¡¡500 dientes de ajo crudo por día!! Agrega que el consumo de 10 a 200 mg de aceite de ajo no afecta los eritrocitos en humanos, pero que en gatos causa serios problemas de anemia.

La compañía Pure Gar comenta en su Manual de Soporte Técnico ⁽³⁰⁾ que el ajo es consumido en todo el mundo y que en algunas sociedades se comen una cabeza de ajo al día, lo cual corresponde a 30 gramos de ajo fresco por día, sin provocar efectos dañinos, dice: "El ajo fresco puede causar náuseas temporales, sed, apetito en algunos casos; los efectos secundarios pueden ser síntomas gastrointestinales, cambios en la flora intestinal o reacciones alérgicas. En la literatura médica, no aparecen efectos adversos por el consumo de productos comerciales de ajo. No hay pruebas que la alicina sea tóxica a ciertas dosis, estudios realizados al respecto demuestran que los efectos que causa la alicina son irrelevantes". Reporta que la dosis letal en animales es de 6.6 lbs. (¡¡equivalente a comer varios kilogramos!!). No indica la vía de administración ni el tipo de animales en su estudio.

Según lo reporta el *Index Merck* ⁽³⁸⁾, la DL₅₀ de alicina es de 60 mg/Kg por vía intravenosa y 120 mg/Kg por vía subcutánea en ratas.

A pesar de que la toxicidad del ajo todavía no está bien definida en humanos⁽³¹⁾, los estudios acerca de los efectos colaterales son raros en las dosis recomendadas en las aplicaciones patológicas.

II.8 PROPIEDADES MICROBIOLÓGICAS DEL AJO

Hay cerca de 40 publicaciones que demuestran las actividades antibacterianas, antifúngicas, antivirales y antihelmínticas del ajo fresco, extractos que contienen ajo y la alicina pura o productos sulfurados no polares de descomposición de la alicina⁽³⁷⁾.

II.8.1 Actividad bactericida

Desde 1944, Cavallito *et al*⁽⁶⁰⁾ demostraron que el extracto de ajo y la alicina inhibía el crecimiento de *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Brucella* y algunas especies de *Vibrio* a concentraciones muy bajas. En más estudios⁽¹⁵⁾, se prepararon diluciones en serie de ajo fresco y extractos en polvo de ajo deshidratado y se confirmó su potencia al destruir bacterias infecciosas gram positivas y gram negativas. (Ver tabla No. II.8.1).

<i>Salmonella typhosa</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
<i>S. sonnei</i>	<i>Bacillus subtilis</i> ,
<i>S. faecalis</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Citrobacter sp</i>	<i>Pseudomonas pyocyaneus</i> ,
<i>Enterobacterias</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>L. plantarum</i>
<i>Escherichia coli</i> ,	<i>L. casei</i> .
<i>Streptococcus α y β hemolíticos</i>	

Tabla No. II.8.1. Bacterias susceptibles de ser destruidas por acción de ajo fresco y extractos de ajo en polvo.

Estos estudios se compararon con los efectos antimicrobianos que poseen los antibióticos más comúnmente usados (penicilina, estreptomycin, cloranfenicol, eritromicina y tetraciclinas), comprobándose la eficacia de esta liliácea al inhibir el crecimiento de algunas bacterias que se han vuelto resistentes a uno o más de estos antibióticos ⁽⁵⁷⁾.

II.8.2 Actividad antimicótica.

El ajo también tiene actividad antifúngica significativa demostrada en muchos estudios *in vitro* e *in vivo*. Desde la perspectiva clínica, el ajo mostró ser más potente que la nistatina, violeta de genciana y otros más a la inhibición de *Cándida albicans* (principal agente causal de vaginitis) ⁽⁵⁷⁾. Por otra parte, Karla *et al* ⁽¹⁵⁾ mencionan que el extracto de ajo posee efectos inhibitorios en el crecimiento micelial y la formación de aflatoxinas. Muños A.J. ⁽²⁶⁾, en su tesis “Evaluación del principio activo de *A. sativum* (alicina) contra dermatofitos *in vitro* e *in vivo* en el tratamiento de tiñas del cuerpo e inguinal” enlista varios hongos que son sensibles al extracto de ajo, de los cuales mencionaré algunos ejemplos (Ver tabla No. II.8.2).

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Absidia sp</i>
<i>Scopulariopsis sp</i>	<i>Alternaria sp</i>
<i>Trichoderma viridis</i>	<i>Cándida albicans</i>
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	<i>C. parapsilopsis</i>
<i>T. tonsurans</i>	<i>C. tropicalis</i>
<i>Trichosporon beigelii</i>	<i>Rhizopus sp</i>
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Rhodotorula rubra</i>
<i>P. citrinum</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
<i>Fusarium sp</i>	<i>Geotrichum candidum</i>
<i>Microsporium cannis</i>	<i>Penicilium sp</i>

Tabla No. II.8.2 Hongos sensibles a la acción del ajo fresco y del extracto de ajo en polvo.

II.8.3 Actividad antiviral

Weber *et al* ⁽¹⁰⁾ estudiaron *in vitro* los efectos del extracto de ajo y sus compuestos contra los siguientes virus: herpes simplex tipo 1 (HSV-1), herpes simplex tipo 2 (HSV-

2), parainfluenza tipo 3 (Para-3), vaccinia (VV), el virus de estomatitis vesicular (VSV) y el rinovirus humano tipo 2 (HRV-2). Los resultados experimentales sugirieron que el extracto de ajo y la alicina tienen actividad viral directa y citotoxicidad muy significativa a diferentes dosis para cada virus, pero no tienen propiedades antivíricas a nivel intracelular. Por mencionar algunos ejemplos, el extracto de ajo inhibió al HSV-1 a 31 mg/mL, al HSV-2 a 63 mg/mL, al VV a 100 mg/mL; la alicina inhibió al HSV-1 a 25 µg/mL, al HSV-2 a 150 µg/mL y al VSV a 25 µg/mL. La fracción polar, alicina, dialil disulfuro y dialil trisulfuro no tuvieron actividad viral en las dosis analizadas. En general, el orden de la actividad viral es el siguiente: ajoene > alicina > alil metil tiosulfinato.

La susceptibilidad puede depender más de la naturaleza del desarrollo del virus que del tipo del ácido nucleico. Los virus de DNA (HSV-1 ó 2) son más sensibles a la actividad de la alicina, sin embargo, VV, el cual es un virus de DNA pero más complejo, fue menos susceptible a la inactivación por alicina. Los resultados indicaron que el extracto de ajo y la alicina son altamente tóxicos a las células Vero y HeLa. Otros datos indicaron que el extracto de ajo mantuvo su actividad antiviral aún estando almacenado por más de un mes.

En información obtenida de internet ⁽³⁶⁾ se menciona que el ajo o sus componentes eliminan o inhiben también al citomegalovirus humano y al virus de la inmunodeficiencia humana.

II.8.4 *Actividad Antiparasitaria.*

El extracto de ajo ejerce actividad antihelmíntica contra los parásitos comunes del intestino, incluyendo *Ascaris lumbricoides* (lombrices) ⁽³⁷⁾. El ajo no sólo es efectivo contra la ameba que causa la disenteria, sino también contra otros organismos como *Toxoplasma gondii*, criptosporidios y pneumocystis que provocan enfermedades en el

hombre. Las infecciones causadas por criptosporidios y pneumocystis son un problema común en los pacientes con sida. El ajo puede ser un primer tratamiento adecuado para estas situaciones, ya que los medicamentos convencionales que se usan para tratarlas tienen efectos secundarios graves ⁽³⁶⁾.

II.8.5 Como Insecticida.

Varios investigadores han demostrado que el ajo posee acción larvicida contra varios insectos, tales como la *Musca domestica nebulosa*, *Trogoderma granarium*, *Spodoptera litura*, *Euproctis sp.* Reportaron que el aceite de ajo no afectó la fosforilación oxidativa o la actividad de la citocromo-c-oxidasa *in vivo* o *in vitro*, pero afectó a nivel de la acetil colinesterasa y/o acetilcolina; indicaron que esta puede ser una de las principales lesiones bioquímicas responsables de la muerte de insectos tratados con aceite de ajo ⁽¹⁵⁾.

II.9 PROPIEDADES INMUNOLOGICAS DEL AJO

Se ha reportado que el ajo aumenta la actividad de las células "Natural Killer" (NK) y que las fracciones polares y el tiosulfato del extracto acuoso del ajo incrementa un gran número de funciones en el sistema inmune del humano, por ejemplo, la fracción polar aumenta la producción de interleucina 1, mientras que la fracción del tiosulfato estimula la actividad de las NK. El extracto acuoso, la fracción polar y el tiosulfato también incrementan la producción de la interleucina 2 ⁽¹⁰⁾.

En otro estudio, realizado por Cheng-Tzu Liu y sus colaboradores ⁽²⁰⁾, demostraron que el aceite esencial de ajo actúa como un inmunomodulador en la vía de promoción de linfocitos T. Además, inhibe la actividad de delta-6-desaturasa y disminuye los niveles del ácido araquidónico en los fosfolípidos de la membrana hepática. En una información obtenida vía internet (Medicinal Characteristics of Garlic) ⁽³⁶⁾, Ouellette

R.H. escribe acerca de las investigaciones hechas por Lau, BH y Yamasaki, T. ("*Garlic compounds modulate macrophage and T-lymphocyte functions*". Mol. Bioter., 1991, 3,103-107) en donde afirma que el extracto de ajo, inoculado por vía intraperitoneal en ratas, estimula la actividad fagocítica de los macrófagos en bazo y nódulos linfáticos inguinales e incrementa la citotoxicidad de los linfocitos en la sangre periférica humana contra células tumorales gracias a los compuestos sulfurados, además de mitigar las enfermedades infecciosas a través del aumento en la respuesta del sistema inmune.

Como mencionaré más adelante acerca de las aplicaciones patológicas, estas propiedades inmunológicas están completamente relacionadas con la actividad anticancerígena que posee el ajo.

II.10 APLICACIONES PATOLÓGICAS DEL AJO.

II.10.1 Como Hipocolesterolémico.

Investigadores de la Universidad de Pensilvania ⁽⁶⁶⁾ encontraron siete compuestos del ajo solubles en agua, incluyendo a la S-alil cisteína y la S-alil mercaptocisteína, las cuales inhibieron la síntesis de colesterol en células cultivadas de hígado (32-84%), mientras que con la alina no observaron ningún efecto. El dialil disulfuro, compuesto insoluble en agua, deprimió la síntesis de colesterol de 20 a 100%. Mencionan que el dialil disulfuro es tres veces más tóxico de S-alil cisteína.

En una revisión realizada en internet ⁽³⁶⁾ y en un artículo escrito por Yu Yan Yeh ⁽¹⁹⁾ se menciona que el ajo inhibe la síntesis de ácidos grasos y del colesterol en hepatocitos en cultivo, reduciendo el colesterol total, los triglicéridos y los niveles de LDL-colesterol en humanos hiperlipidémicos, sin efectos sobre HDL-colesterol. También se menciona que las preparaciones del ajo han mostrado ejercer efectos hipocolesterolémicos en animales y en humanos.

Recientes investigaciones han revelado múltiples interacciones de los componentes del ajo con los pasos biosintéticos de colesterol en el hígado de las ratas, resultando en una moderada pero significativa inhibición. Usando hepatocitos de rata en cultivos primarios, pudieron demostrar, con la incorporación de acetato de carbono catorce a lípidos no saponificables, que el colesterol fue influenciado principalmente en dos niveles:

- i) a nivel de HMG Co-A reductasa.
- ii) a nivel de un paso tardío de la vía biosintética, particularmente a lanosterol 14 α -dimetilasa.

Con respecto a la primera influencia, se notó que por las bajas concentraciones de los componentes del ajo no ocurrió inhibición directa de HMG Co-A reductasa, pero la actividad fue inhibida vía varios mecanismos indirectos. Comentan que la interacción más importante pareciera ser la amplificación del AMP dependiente de la cinasa mediada por la fosforilación de HMG Co-A reductasa por compuestos organosulfurados derivados del ajo, particularmente de dialildisulfuro (DADS). Esta influencia fue detectable por DADS 1 μ M y apareció con cambios de AMP intracelular, como la palmitoil-CoA, estimulación inducida por la respectiva cinasa-cinasa. Así que, este mecanismo sensible, no solamente afecta la biosíntesis del colesterol enzimático sino además la biosíntesis de los ácidos grasos, vía la acetil-CoA carboxilasa, en una acción concertada.

Es concebible que un tipo similar de interacciones ocurra en otros tejidos, expresando una cinasa similar dependiente de AMP, tales como la glándula mamaria y tejido adiposo. Otros mecanismos de sensibilidad comparable fue la amplificación de la inhibición de adenosina, inducida por alicina a nivel del receptor de adenosina, cambiando Ca^{2+} intracelular más bien que AMPc.

Con respecto a los pasos tardíos de la biosíntesis de colesterol, la inhibición de lanosterol alfa-dimetilasa por alicina y ajoene fue el más importante adelanto para completar la inhibición a concentraciones abajo de 50 y 300 μM , respectivamente. A más bajas concentraciones la inhibición parcial de la enzima, que probablemente causa la acumulación de intermediarios de la síntesis de lanosterol, puede inhibir la HMG CoA reductasa.

Ventajas de los derivados del ajo, como inhibidores de la biosíntesis de colesterol:

1. Elevan de una manera sensible los mecanismos fisiológicos para reducir la biosíntesis de colesterol endógeno, resultando en una alta biocompatibilidad de sus efectos.
2. Ejercen múltiples acciones a una respuesta balanceada de las células y de todo el organismo.
3. Ejercen solamente inhibición parcial previniendo depleción de importantes intermediarios de terpenoides de la síntesis de colesterol.
4. Presumiblemente (debido a su modo de acción) no afectan la síntesis de colesterol en organismos que necesitan esta molécula para la producción de hormonas y otras funciones.
5. Parece que no producen efectos adversos durante largo tiempo de aplicación de preparaciones de ajo.

Estos resultados muestran que los diferentes compuestos de ajo, principalmente alicina, ajoene y dialil disulfuro (DADS), ejercen múltiples efectos en la biosíntesis de colesterol hepático, resultando en una modulación fina de la regulación fisiológica de este paso. La interacción altamente sensible de los compuestos órgano sulfurados derivados del ajo son pasos intracelulares que llevan a una influencia efectiva de varias funciones metabólicas de una manera fisiológica compatible. Estas características pueden contribuir a que el ajo fresco o las preparaciones de ajo, sean las únicas herramientas terapéuticas para el tratamiento de casos poco severos de hipercolesterolemia ⁽³⁹⁾.

Por lo que se refiere a los estudios clínicos realizados a personas con niveles elevados de colesterol, reportan diversas dosis administradas oralmente. Algunos sugieren de 5 a 40 g de ajo crudo macerado durante 7 días, 10 g de ajo durante 2 meses ⁽¹⁵⁾, otros mencionan que 10 mg de alina o un total de 4 mg de polvo de ajo de los productos comerciales puede disminuir el nivel de colesterol sérico total hasta en un 10-12% y LDL-colesterol hasta en un 15% y el aumento de HDL-colesterol hasta en un 10% ⁽⁷¹⁾. Yu Yan Yeh *et al* ⁽⁶⁴⁾ mencionan que quienes toman cápsulas de ajo deodorizado (con compuestos alil sulfurados) por 5 meses muestran hasta el 7% menos del total de colesterol sérico y 12% menos de LDL. Brian W. *et al* ⁽²⁷⁾ determinaron que la terapia con un producto comercial de extracto de ajo no resultó eficaz en niños con hipercolesterolemia, con la excepción de que tuvieron un pequeño incremento en los niveles de la apolipoproteína A-1; administraron 300 mg del extracto de ajo, tres veces al día durante 2 meses. Mader ⁽³⁹⁾ observó que el tratamiento con tabletas estandarizadas de ajo (1.3% de alina) administrando 800 mg diarios durante 4 meses resultó eficaz en el tratamiento de hiperlipidemia disminuyendo los valores de colesterol en un promedio de 12% y triacilglicéridos en un 17%. Así como éstos casos, hay muchísimos más que logran obtener buenos resultados ^(48,50) y en otros su tratamiento fue inefectivo ^(47,51), por lo que se sugiere que hay que tener cuidado con las interpretaciones de los resultados estadísticos en las investigaciones, por las limitaciones de la metodología de algunos de los experimentos ⁽⁵⁵⁾.

En cuanto a la susceptibilidad de la oxidación de las lipoproteínas, Phelps *et al* ⁽¹⁷⁾, mencionan que hay creciente evidencia de que las lipoproteínas de baja densidad (LDL) pueden desarrollar aterosclerosis. Agregan que existen tres nutrientes (ácido ascórbico, alfa-tocoferol y ácidos grasos monoinsaturados), un preservativo alimenticio (hidroxibutiltolueno) y un medicamento (probucof) que tienen la función de ser antioxidantes *in vivo*. Por su parte, el ajo produce efectos beneficiosos sobre los desórdenes fisiológicos que contribuyen al aumento de riesgo cardiovascular. Por ejemplo, eleva la presión sanguínea, retarda la fibrinólisis y la vasoconstricción, además

de actuar como antioxidante *in vitro*. Por estas razones, Phelps et al procedieron a ensayar en humanos para determinar los efectos de los suplementos del ajo sobre los niveles lipídicos del plasma y la susceptibilidad de oxidación de las lipoproteínas, a corto plazo. Su dosis fue de 6 tabletas de 100 mg/día de ajo en polvo, durante dos semanas observando que no hubo cambios de los niveles de colesterol, triglicéridos, LDL y HDL en el plasma, por lo que consideran que se requieren periodos más largos para observar cambios significativos en estos parámetros. En cuanto a la susceptibilidad de oxidación del contenido de Apo-B, observaron una reducción de un 34%. Mencionan que en otros estudios analizaron la capacidad del ajo en polvo y la alina en eliminar o barrer los radicales hidroxilo, logrando la efectividad del polvo a concentraciones entre 0.8 y 3.3 mM. Aclaran que la aplicación de estos resultados *in vivo* no fue claro, pues encontrar el antioxidante putativo *in vivo* puede ser difícil.

II.10.2 En la disminución de la agregación plaquetaria

Una menor cantidad de componentes de aceite de ajo inhiben la agregación plaquetaria, uno de ellos es el metil alil trisulfuro ⁽¹⁵⁾. La excesiva agregación plaquetaria está fuertemente unida a la aterosclerosis, enfermedades y ataques del corazón. Las preparaciones estandarizadas del contenido de alina, así como aceite de ajo, inhibe la agregación plaquetaria. En un estudio observaron que con una dosis de 900 mg/día de ajo deshidratado, durante 4 semanas, la agregación plaquetaria desapareció ⁽⁵⁷⁾.

Mayeux et al ⁽¹⁸⁾, observaron que la alicina pura inhibió la agregación plaquetaria en respuesta a tres agonistas, los cuales actúan por mecanismos diferentes, pero en combinación con la papaverina no altera los niveles de AMP en el plasma rico en plaquetas. Esto ha sido reportado para inhibir la movilización del calcio en tejido vascular independiente del AMP cíclico. La movilización del calcio es la etapa temprana en la secuencia de los eventos de la agregación de las plaquetas. Por lo tanto, estos investigadores sugieren que la alicina inhibe la agregación plaquetaria de una

manera similar a lo que ocurre en los productos de formación de ciclooxigenasa. La alicina también inhibió la enzima lisosomal de neutrófilos, procesos dependientes del calcio. Estos estudios sugieren que los componentes del ajo pueden tener un uso clínico en la prevención y manejo de hipertensión, enfermedades vasculares y ataques al corazón.

Actividad fibrinolítica ⁽⁵⁷⁾

Por otra parte, estudios epidemiológicos han sugerido que el fibrinógeno es el principal factor de riesgo de enfermedades cardiovasculares. El fibrinógeno es una proteína de “fase aguda” envuelta en el sistema de coagulación sanguínea. Sin embargo, juega muchos otros importantes roles, incluyendo su actividad como cofactor en la agregación plaquetaria, determinando la viscosidad de la sangre y estimulando la migración y proliferación de células del músculo liso en el interior del tejido de las paredes arteriales ⁽⁷¹⁾. Este artículo sugiere que el ajo y otras terapias naturales promueven la fibrinólisis y pueden ofrecer beneficios significantes en la prevención de ataques al corazón y otras causas de tromboembolias.

Stainer *et al* ⁽⁶⁶⁾, observaron en su estudio que el extracto de ajo mejora la circulación sanguínea reduciendo hasta en un 33% en tres meses y 43% en 6 meses la agregación plaquetaria y la habilidad de las plaquetas a agruparse y hacer coágulos. Además mencionan que la capacidad de las plaquetas en adherirse al fibrinógeno, un agente coagulante en la sangre, se redujo aproximadamente en un 30% en las personas que tomaron extracto de ajo.

Oxidación de LDL ⁽⁵⁷⁾

Hay evidencias de que la oxidación de LDL juega un papel significativo en el desarrollo de la aterosclerosis. La Vitamina E, la Vitamina C y el β -caroteno se ha demostrado ofrecen protección contra la oxidación de LDL y enfermedades del corazón, via sus

efectos antioxidantes. Hoy se sabe que el ajo tiene actividad antioxidante, pero no se sabe aún sus efectos en la oxidación de LDL.

II.10.3 Como anticancerígeno

Un estudio realizado por Lau *et al* ⁽⁷⁰⁾, sugirieron que el ajo previene el cáncer en tres diferentes formas:

1. Directamente inhibiendo el metabolismo de las células tumorales cuando el tamaño del tumor o el número de células tumorales son pequeñas.
2. Inhibiendo las fases de iniciación/promoción de la carcinogénesis.
3. Modulando la respuesta del sistema inmune, la cual es utilizada en todas las fases del control de cáncer.

Wargovich ^(43,36) reportó que las células cancerígenas de colon humano fueron transplantadas a los ratones, las cuales disminuyeron en un 60% cuando se trataron con dialildisulfuro. Las células tumorales transplantadas fueron tratadas tres veces durante una semana con 1 mg de DAS disuelto en aceite de maíz. Los tumores control que fueron tratados sólo con aceite de maíz continuaron creciendo. En la misma revisión se menciona que el ajo puede prevenir el cancer porque contiene vitaminas tales como las A, B y C, las cuales estimulan al sistema inmune para eliminar las toxinas y combatir la carcinogénesis. Por estas razones, se puede llegar a evaluar el tratamiento para el SIDA.

Las características anticancerígenas del ajo han sido mostradas por tener un efecto citotóxico directo en algunas células cancerígenas como las del estómago.

El selenio y el sulfuro encontrado en el ajo son probablemente los responsables de algunos de los efectos anticancerígenos. Estos compuestos están involucrados en la antioxidación, excreción carcinogénica y modulación del sistema inmune. Los

compuestos que contienen grupos alilo como la alicina, dialil disulfuro (DADS), alina, S-alil-cisteina (SAC) inhiben la formación de 1,2-dimetil-hidrazina (DMH) y la actividad de arilamina N-acetil transferasa (NAT), los cuales inducen tumores en colon de ratones. DADS también inhibe el desarrollo de tumores en ratas causados por nitrosometilbenzilamina (NMBA) un potente carcinógeno. En muchos estudios se comprobó que DADS y SAC son órgano-específicos y actúan dependiendo de la dosis y tiempo de exposición. Se requieren más dosis de SAC que de DADS para lograr la inhibición ^(36,53,54). Agregan que debe tenerse en mente que se puede demostrar la promoción del daño, dependiendo del órgano examinado.

Se cree que el ajo activa dos enzimas del hígado, las cuales probablemente son las responsables de la naturaleza anticarcinogénica: el primer sistema envuelve un tipo de citocromo P₄₅₀, el cual activa la carcinogénesis tal como DMH y NMBA, cuando son metabolizados, probando que DAS inhibe el sistema enzimático citocromo P₄₅₀. Segundo, DAS incrementa la actividad de glutatión S-transferasa, conjugándose con sustancias extrañas tales como DMH y NMBA. Los compuestos nuevamente formados son excretados por el hígado en la bilis.

El ajo contiene una serie de antioxidantes naturales que pueden ayudar a explicar su fuerte actividad anticancerígena y antitumoral: Los antioxidantes “desarman” reactivos químicos del cuerpo que pueden accionar el ataque del cáncer. Para inhibir la acción perjudicial del oxígeno (impactando la actividad de los radicales libres), el ajo posiblemente limita el daño a las membranas celulares, el cual es un mecanismo del proceso natural de envejecimiento.

Se ha reportado que el ajo inhibe el crecimiento de células cancerígenas de pecho humano, varias células del melanoma y células de neuroblastoma, cáncer de vejiga, cáncer de la piel, cáncer del colon, el desarrollo de tumores esofágicos, del estómago y

tumores del pulmón. ^(21, 41-45, 36) Además de que suprime células tumorales en crecimiento a través de la estimulación de células de la respuesta inmune.

Tang ⁽⁴⁰⁾ demostró por radioinmunoensayo la activación de las células NK, los linfocitos T y la interleucina 2 por la presencia del ajo para prevenir el precáncer oral inducido por 4-nitroquinolina 1-óxido.

Por otra parte, se reducen los efectos tales como fatiga y anorexia en pacientes con tumores en cabeza y cuello ⁽³⁶⁾

Sigounas *et al* ⁽⁶⁸⁾ demostraron que S-alil mercaptocisteína (SAMC) reduce el crecimiento de la línea celular de la eritroleucemia, por inducción de la apoptosis (La apoptosis es la fragmentación de células a partículas pequeñas que son englobadas y fagocitadas por las células del sistema inmunológico). Al incubar dos diferentes líneas celulares de eritroleucemia con SAMC se inhibió su crecimiento y la muerte de las células cancerígenas. Estos estudios se realizaron en ratones o ratas, las dosis fueron de 5 mg/animal durante 6 a 8 meses. No se reportan estudios en humanos.

II.10.4 *Otras aplicaciones*

Hoy, el ajo es requerido para curar una variedad de malestares incluyendo fiebre del heno, artritis, desórdenes del sueño, problemas de seno, del pulmón, tuberculosis, pie de atleta, desórdenes digestivos, estimula el funcionamiento de diversos órganos y glándulas: hígado, páncreas, tiroides, pituitaria y suprarrenales ^(36,37,59).

El extracto de ajo prolongó la supervivencia e incrementó la ramificación de las neuronas cultivadas (derivadas de embriones de hipocampo) sugiriendo un efecto neurotrópico. Se ha sugerido un decremento en la formación de nitrosaminas. Mejora la

memoria, previene la degeneración neuronal. Modula los niveles de receptores de serotonina. ⁽³⁶⁾

Se reportó ⁽¹⁵⁾ que el ajo posee efectos hipoglucémicos, lo cual está asociado con el incremento de los niveles de la insulina.

Algunos investigadores ⁽⁶⁴⁾ encontraron que el extracto de ajo contiene constituyentes cuya función es similar al fármaco antialérgico oxatomida, el cual inhibe la liberación de histamina hasta en un 90%. En otros experimentos mostraron los efectos antiinflamatorios en oídos, inducido por la administración tópica de un irritante de piel conocido como cloruro de picrilo y la administración intravenosa de un anticuerpo (anti-TNP IgE) reacción alérgica tipo I. También encontraron que el extracto de ajo inhibe la reacción alérgica tipo IV, siendo más efectivo cuatro horas después de la segunda exposición en comparación con la dexametasona. Sugieren que el extracto de ajo inhibe la producción o libera los mensajeros químicos del sistema inmunológico (Linfocitos T) importantes en las reacciones en cascada de las alergias.

Se ha demostrado que la S alil mercaptocisteína (SAMC) incrementa la actividad de una enzima en el hígado (el glutatión), el cual detoxifica muchos agentes causantes de cáncer, el cual es un potente “barredor” de radicales libres ⁽⁶⁴⁾. Por su parte, Wei *et al* ⁽⁶⁹⁾ encontraron que el extracto de ajo incrementa la actividad de tres enzimas en el cuerpo las cuales son “barredoras” de radicales libres:

1. Superóxido dismutasa (SOD).
2. Catalasa (CAT).
3. Glutatión.

Además, mencionan que una peroxidasa juega un papel importante en eliminar o barrer los oxidantes, los cuales pueden causar enfermedades al corazón y prevenir el daño celular. Estas enzimas suprimen la generación de los radicales libres del peróxido de

hidrógeno y el anión superóxido en las células endoteliales de la arteria pulmonar (línea celular del vaso sanguíneo de los pulmones) ⁽⁶⁹⁾.

Por último, Gary *et al* ⁽²³⁾ relacionaron el consumo del ajo en polvo con el mejoramiento del Síndrome Hepatopulmonar; sin embargo, no tuvieron éxito en sus resultados; al administrar dos cápsulas de ajo en polvo, 500 mg por cápsula, durante un intervalo de 8 a 36 meses. Un sólo paciente obtuvo buenos resultados en un periodo de un año, por lo cual no es significativo el estudio.

Estas aplicaciones no se han comprobado científicamente, por lo que aún es necesario realizar profundas investigaciones farmacológicas en el humano.

CAPÍTULO III

MÉTODOS ANALÍTICOS

Debido a la efectividad comprobada del ajo de aliviar algunas patologías muy comunes, las empresas farmacéuticas de medicina herbolaria desarrollaron productos de ajo que venden como suplementos alimenticios. Por ello, se planteó la necesidad de implementar un método rápido y reproducible, con el fin de identificar, evaluar y poder estandarizar el contenido de los marcadores terapéuticos del ajo deshidratado (en polvo) y del ajo fresco; por lo tanto, uno de los objetivos de este trabajo es analizar y discutir diferentes metodologías instrumentales para la determinación cuantitativa de alina y alicina, propuestos por algunos investigadores alemanes y japoneses.

III.1 ANTECEDENTES.

Las investigaciones científicas del ajo comenzaron en 1844 con el trabajo de Wertheim, quien examinó el aceite esencial del ajo y estableció el término "alil" para la configuración C_3H_5 . Su trabajo continuó con Semmler quien publicó más detalles sobre los componentes sulfurados de las diferentes fracciones destiladas del aceite de ajo ⁽¹⁾. Los primeros informes de las propiedades físicas y estructura química del componente odorífero del ajo macerado fue establecido por Cavallito y Bailey en 1944 ⁽⁶⁰⁾, e introdujeron el término alicina para este componente. Stoll y Seebeck ⁽¹⁾ reportaron que el tratamiento de alina con alinasa da como resultado alicina, ácido pirúvico y amoníaco, estos dos últimos compuestos en cantidades equimoleculares.

De 1955 a 1970, se publicaron diferentes determinaciones cuantitativas de alicina, dependiendo de las reacciones específicas que se llevan a cabo con el ácido pirúvico. Por mencionar algunos ejemplos de estas determinaciones, se menciona que el piruvato reacciona con 2,4-dinitrofenilhidracina (Jäger, H. en 1955), con nitroprusiato de sodio y yoduro de azida (Fujiwara, M. en 1955) o bien con N-etilmaleimida e Hidróxido de potasio en 2-propanol (Carson, J. en 1959; Schwimmer, S. en 1963; Watanabe, T. en 1966, Nakata, C. en 1970). Las desventajas de los métodos colorimétricos propuestos son: la inestabilidad de los compuestos coloridos, además de que el ácido pirúvico se forma por el desdoblamiento enzimático de todos los diferentes alquil cistein sulfóxidos presentes en el ajo ^(1,26).

Ya en la década de los 80's, se da un aumento exponencial de las disponibilidades instrumentales y, sobre todo, de la actividad en las investigaciones sobre cromatografía de gases y de líquidos y sus aplicaciones para solventar problemas analíticos ⁽⁶¹⁾.

Para la determinación cuantitativa de la alicina, se desarrollaron métodos analíticos por cromatografía de gases adaptándolo a un espectrómetro de masas, pero, debido a la inestabilidad térmica de la alicina ésta resultaba en sus productos de desintegración como di y trisulfuros. En 1985 y 1986, Miething y Voigt, independientemente, aplicaron el método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR, siglas en inglés HPLC) haciendo posible la determinación cuantitativa y cualitativa de la alicina y de otros componentes del ajo ⁽¹⁾. En años subsiguientes, publicaron artículos sobre CG y CLAR, éste último, para la separación, purificación, identificación y determinación de alicina, alicina y sus derivados ^(1,2,3,4,5,6,7,8,11), de los cuales he retomado los métodos analíticos, propuestos por esos investigadores, para discutirlos y resumir los parámetros de las técnicas en un cuadro-resumen, de tal forma que se visualicen y

se elijan aquellos que se puedan adaptar a la práctica analítica instrumental en productos herbolarios, específicamente del ajo fresco o bien del ajo en polvo.

Lawson *et al.*,⁽¹³⁾ realizaron un estudio para la identificación y cuantificación de los sulfuros y dialquenil tiosulfatos en productos comerciales del ajo mediante CLAR, mencionan que a pesar de que la alicina (dialil tiosulfato) es considerado el compuesto más importante por su actividad biológica, es inestable por calentamiento o por solventes orgánicos y forma una gran variedad de compuestos de degradación cuando el ajo es procesado. Todos esos compuestos son sulfuros e incluyen dialil mono-, di-, y oligosulfuros, vinilditiinas y ajoenes. Afirman que otros tiosulfatos se pueden encontrar en pequeñas cantidades en homogeneizados de ajo, incluyendo alil metil, metil alil, 1-propenil alil, alil 1-propenil, 1-propenil metil y dimetil tiosulfatos (el primer nombre se une al término tio y el segundo nombre del grupo se une al sulfato).

La 24a. edición de la United States Pharmacopoeia (USP)⁽⁶⁵⁾ describe en la Monografía Oficial del ajo, National Formulation 19, el método para la identificación y contenido de alicina por medio de cromatografía en capa fina y por cromatografía de líquidos de alta resolución, se tomará como sistema de comparación al método recomendado en este trabajo. Cabe señalar que la British Herbal Pharmacopoeia también contiene información para la identificación de compuestos sulfurados mediante Cromatografía en Capa Fina⁽³⁴⁾.

III.2. MÉTODOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES (CG).

III.2.1 DETERMINACION DE ALICINA EN AJO Y PRODUCTOS COMERCIALES DE AJO POR (CG) CON DETECTOR FOTOMÉTRICO DE FLAMA ⁽⁴⁾

Según Koichi *et al*, éste método de Cromatografía de Gases (CG) con detector de fotometría de flama es preferible a otros métodos, en base a su especificidad y sensibilidad, ya que la alicina es un compuesto orgánico volátil que contiene sulfuros. Durante el tratamiento de la cromatografía de gases, la alicina sufre una deshidratación formando dos disulfuros isoméricos (3-vinil-1,2-diti-5-ene y el 3-vinil-1,2-diti-4-ene, $C_6H_8S_2$). Afirman que la formación de estos disulfuros es proporcional al contenido de alicina. De esta manera, la alicina se puede determinar utilizando el disulfuro como un estándar.

En el estudio de estos investigadores se describe el desarrollo del método de CG para la determinación de alicina en productos de ajo.

1. **Equipo**
 - Sistema Shimadzu GC-7A con detector fotométrico de flama (CG-DFF)
 - Procesador de datos Shimadzu C-R3A.
 - Espectrómetro de masas acoplado al cromatógrafo de gases (CG-EM), Shimadzu QP-1000A.

2. Condiciones cromatográficas de operación.

Temperatura de la columna 100°C

Temperatura de inyección 140°C

Gas acarreador Nitrógeno a 40 mL/min.

Volumen de inyección 5 µL

Columnas de vidrio a) 2.1 m x 3.2 mm d.i. cubierta con OV-1 al 1% en una malla 80-100 Chromosorb WAW-DMCS

b) 1.5 m x 3 mm d.i. cubierta con DS 2% más H₃PO₄ al 0.5% en malla 80-100 Chromosorb WAW-DMCS.

3. Preparación de la solución estándar de alicina

- Disolvieron la alicina en dietil éter a una concentración de 10 mg/mL y de ésta se llevó a concentraciones apropiadas de trabajo.
- Almacenaron esta solución estándar en congelación a -20°C hasta su uso.

NOTA: El estándar de alicina fue suministrado por Wakunaga Pharmaceutical Co.

4. Preparación de la solución estándar de alina

- Disolvieron la alina en agua a una concentración de 10 mg/mL y de ésta se llevó a concentraciones apropiadas de trabajo.
- Prepararon 10 mg de alina por mL de solución acuosa.
- Diluyeron con agua a concentraciones apropiadas.

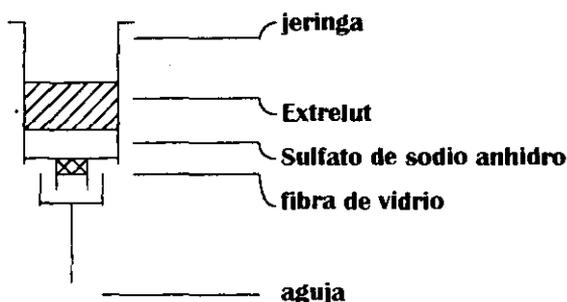
NOTA: El estándar de alina fue suministrado por Wakunaga Pharmaceutical Co.

5. Preparación de la solución de alinasa

- Prepararon 10 mL de la solución de la enzima a partir de 10 g de dientes de ajo, de acuerdo al procedimiento de Mochizuki *et al* ⁽²⁾.

6. Preparación de la jeringa para llevar a cabo la extracción.

- Taparon la jeringa con algodón.
- Colocaron 1 g de sulfato de sodio anhidro y 0.5 g de Extrelut (E. Merck) sucesivamente en la jeringa y la aguja apropiada, como se muestra en la siguiente figura:



7. Extracción y purificación de las muestras.

- Pesaron 0.5-1 g de muestra en un tubo de ensayo y agregaron 8 mL de agua.
- Homogeneizaron durante 1 minuto y diluyeron con 10 mL de agua.
- Centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos.
- Filtraron a través de un papel filtro No.5A.
- Colocaron 1 mL del filtrado en la columna Extrelut y dejaron que se empapara durante 10 minutos.
- Eluyeron la alicina en la columna con 6 mL de dietil éter.
- Colectaron los primeros 5 mL de la porción que eluye para su análisis.

8. Preparación de la curva estándar.

- Inyectaron 5 μL de la solución de alicina (0.2-2.0 $\mu\text{g/mL}$) en el sistema cromatográfico.

- Prepararon la curva de calibración analítica a diferentes concentraciones de alicina contra la altura de los picos observados en la gráfica.
- Inyectaron 5 μL de la muestra al sistema cromatográfico calcularon el contenido de alicina en la muestra mediante la curva de calibración.

9. Tratamiento enzimático.

- Mezclaron 1 mL de la solución de alicina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) con 1 mL de la solución de alinasa e incubaron la mezcla durante 15 minutos a 37°C.
- La mezcla la introdujeron en la columna Extrelut y continuaron con el procedimiento previamente descrito.
- Utilizaron 1 mL de agua como control en lugar de la solución de alinasa.

En sus resultados, los autores mencionan que en el paso de la extracción de alicina con dietil éter, se formaron emulsiones tanto con el extracto de ajo como con los productos comerciales del ajo. El patrón de elución con dietil éter lo estudiaron en la columna Extrelut con la solución de alicina acuosa (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Toda la alicina la encontraron en los 4 mL de elución, por eso escogieron 5 mL de dietil éter como eluyente.

Analizaron la máxima sensibilidad y reproducibilidad de varias columnas y encontraron que los picos patrón de alicina son similares a los obtenidos en cubiertas con sistemas no polares o ligeramente polares. Mencionan que la columna cubierta con OV-1 tiene mejor sensibilidad, por lo que la eligieron para la determinación cuantitativa y la otra columna (DS 2%) la utilizaron para pruebas cruzadas. Un cromatograma típico de CG de alicina se muestra en la figura III.2.1.1.

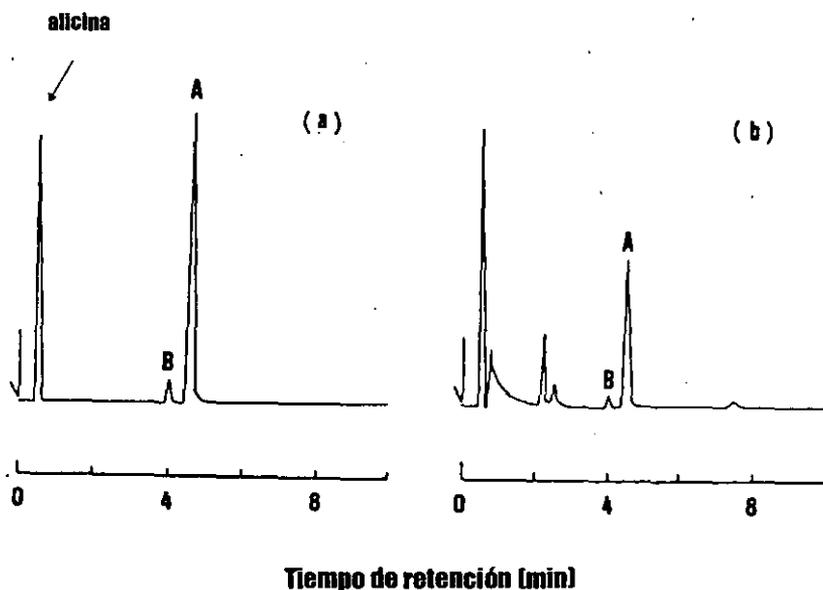


Fig. III.2.1.1 Cromatograma de gases típico del estándar de alicina (a) y del extracto de alicina de ajo fresco (b). Los picos A (3-vinil-1,2-diti-4-ene) y B (3-vinil-1,2-diti-5-ene) son disulfuros isoméricos derivados de alicina.

Aplicaron el método de Cromatografía de Gases para analizar y evaluar el contenido de alina y alicina en los productos comerciales del ajo, observando que los condimentos contienen alicina pero no alina; en cambio, los suplementos alimenticios contienen alina y no alicina.

Aseguran que, de acuerdo a sus resultados, los análisis cuantitativos de la alicina por el método de Cromatografía de Gases y la alina por el método de Cromatografía de Líquidos, que mencionaré con detalle más adelante, pueden ser evaluados en términos del aseguramiento de la calidad de los productos del ajo.

Los resultados que obtuvieron de la espectrometría de masas les indicó la deshidratación de las moléculas de alicina y la subsecuente formación de los dos disulfuros isoméricos. (Figura III.2.1.2)

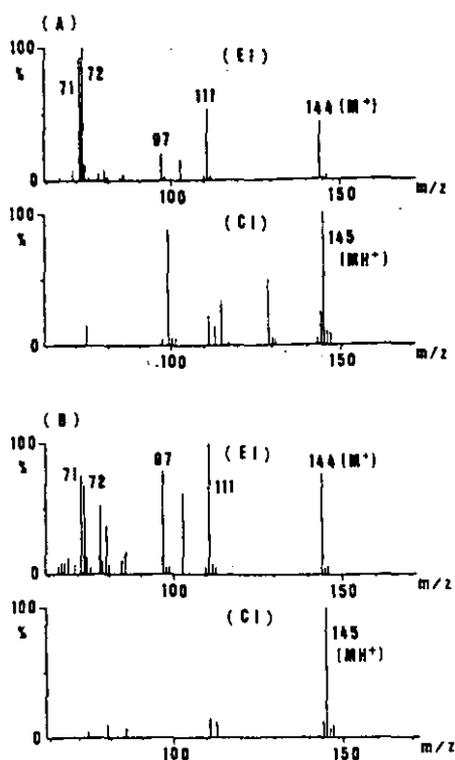


Fig. No. III.2.1.2. Espectro de masas de dos componentes. Los picos A y B son disulfuros isoméricos derivados de la alicina. EI y CI se refieren a las energías de ionización utilizadas en el espectrómetro a 70eV y 200 eV respectivamente. En el espectrograma se observan 4 picos de abundancia relativamente alta que son el pico de 144 que da la masa molecular de la especie, el pico 111 al que se le asigna la pérdida del ión molecular -HS, el pico 97 que podría corresponder a la fragmentación de -CH₂S.

Para confirmar la presencia de alicina, mediante tratamiento enzimático, mezclaron la alina con la alinasa, logrando obtener el pico correspondiente a la alicina, además de sus derivados isoméricos (Figura III.2.1.3). (Comparar con en el cromatograma de la figura III.2.1.1a, donde se observa el pico del estándar de alicina que sintetizaron).

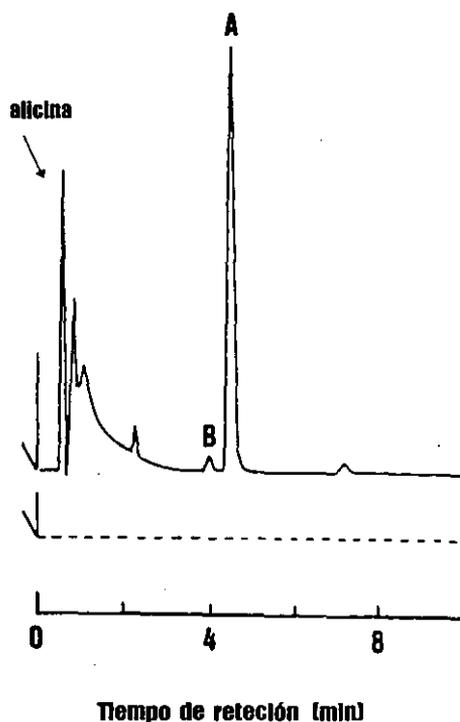


Fig. III.2.1.3. Cromatograma de gases de alina con tratamiento (---) o sin tratamiento (- - -) de alinasa. Los picos A y B son disulfuros isoméricos derivados de alicina. Las condiciones cromatográficas son las mismas a las indicadas en la pág. 39.

III.2.2 DETERMINACION DE ALINA EN CULTIVO DE CELULAS DE AJO MEDIANTE CG⁽¹¹⁾

Como muchos otros metabolitos que son producidos por cultivo celular de plantas superiores en niveles mucho más altos que los obtenidos en la planta intacta natural, los investigadores de este estudio lograron obtener alina en cultivos celulares de *A. sativum* in vitro⁽¹¹⁾, encontrando que la alina se forma sólo dentro del vástago y la raíz.

Hayashi, *et al*⁽¹¹⁾ se encargaron de analizar el contenido de alina en los cultivos celulares, mediante el método de Cromatografía de Gases (CG), además de otros aminoácidos sulfurados como la S-alil-L-cisteína (SAC), S-metil-L-cisteína sulfóxido (SMCS), S-metil-L-cisteína (SMC), Cisteína y metionina, éstos compuestos los separaron y detectaron su contenido de carbono y azufre utilizando un detector de ionización de flama (FID) y el detector fotométrico de flama (FPD), respectivamente. (Figura III.2.2.1)

El análisis de los aminoácidos sulfurados se realizó por trimetilsililación.

1. Equipo. Cromatógrafo Shimadzu GC-9A con FID y FPD.

2. Condiciones Cromatográficas de operación.

<i>Flujo</i>	10 mL/min
<i>Gas de arrastre</i>	Helio altamente puro.
<i>Temperatura del horno</i>	120°C.
<i>Temperatura del puerto de inyección</i>	140°C.
<i>Temperatura del detector</i>	150°C.

NOTA: Los aminoácidos son sililados rápidamente a 120°C por 10 minutos, pero la alina se descompone a más de 90°C. Así que la trimetilsililación de alina y otros aminoácidos se completó a los 70°C por 90 minutos.

3. Procedimiento

- Pesaron 1 mg de alina y la colocaron en un vial y 1 mg de serina en otro vial para utilizarlo como estándar interno.
- Los aminoácidos los sililaron con 50 μL de CH_3CN y 50 μL de bis-(trimetilsilil)fluoroacetamina (en viales de reacción con sellador).
- Los derivados de los aminoácidos los separaron en la columna capilar con las características anteriormente mencionadas.
- Compararon la sililación realizada en los aminoácidos con el estándar de serina, con las siguientes concentraciones: 2, 5, 10, 20 y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para analizar la relación entre los aminoácidos sulfurados y la respuesta del detector, cuyas áreas de los picos resultaron ser proporcionales a la concentración del analito (obtuvieron una gráfica lineal) con respecto a la cantidad de serina agregada, utilizando un detector de ionización de flama.
- Los extractos de alina procedentes del vástago de *A. sativum* los separaron adicionando cloroformo:agua.
- La fase acuosa la pusieron en una columna (del tipo H^+) Dowex 50W, 0.5 x 2.0 cm.
- La columna se lavó con 2 mL de agua y 1 mL de NH_4OH 1M y la eluyeron con 1 mL de NH_4OH 1M.

De estos procedimientos, obtuvieron de 20-40 $\mu\text{g}/\text{g}$ en peso seco de alina, lo cual fue mucho más bajo a lo obtenido en dientes de ajo intactos (1.0 mg/g en peso seco) y cantidades considerables de los derivados de sulfuro.

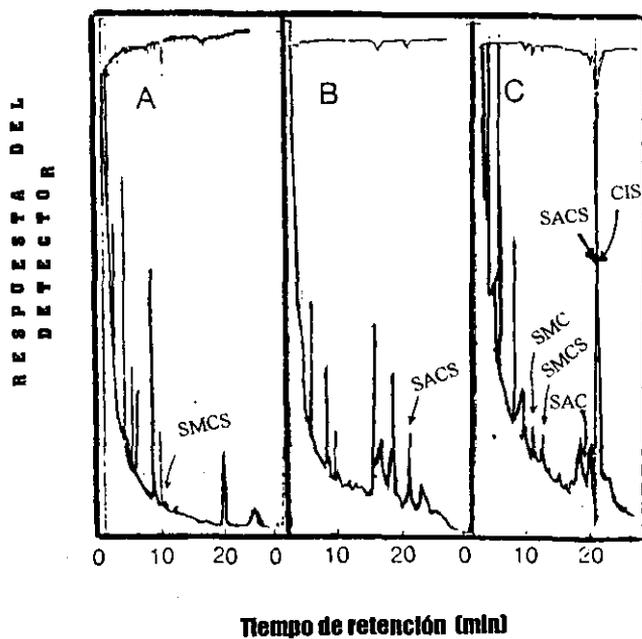


Figura III.2.2.1. Cromatograma de gases de aminoácidos de sulfuro. A) Indiferenciados y rápidamente formados.

B) De tejido cultivado. C) De *A. sativum*.

SMCS: S-metil-L-cisteína sulfóxido

SACS: S-alil-L-cisteína sulfóxido

SMC: S-metil-L-cisteína

SAC: S-alil-L-cisteína

CIS: Cisteína.

Las condiciones cromatográficas están descritas en la pág. 46.

III.3 METODO POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS PARA LA DETERMINACION DE ALINA EN AJO Y EN PRODUCTOS DE AJO ⁽²⁾

Mochizuki *et al*, mencionan que en años recientes el ajo y los productos comerciales del ajo son muy populares en Japón, por lo que se presentó la necesidad de evaluar la calidad de esos productos mediante un método rápido y sencillo. Afirman que siendo la alina una amina específica, puede ser utilizada como estándar. Agregan que un derivado fluoróforo con fluoroscamina también puede ser utilizado para la determinación de aminas primarias y reportaron su efectividad en la determinación de otros compuestos. Su trabajo de investigación se basó en la detección ultravioleta (UV) y fluorométrica (FL) mediante el método de cromatografía líquida.

1. Equipo Cromatógrafo de líquidos, modelo LC-2 (Shimadzu) equipado con un espectrofotómetro Shimadzu SPD-1 y un espectrofluorómetro Shimadzu RF-510 con $\lambda_{\text{excitación}}$ a 405 nm y $\lambda_{\text{emisión}}$ a 480 nm.

2. Condiciones cromatográficas de operación.

Para la detección UV

<i>Fase móvil</i>	Agua con elución isocrática
<i>Flujo</i>	0.5 mL/min.
<i>Presión</i>	No indicada.
<i>Longitud de onda</i>	210 nm
<i>Volumen de inyección</i>	10 μ L
<i>Columna</i>	Zorbax TMS 5 μ m, 250 mm x 4.6 mm d.i., DuPont, USA.
<i>Temperatura de la columna</i>	25°C a 55°C

Para la detección FL

<i>Fase móvil</i>	Acetato de sodio 0.03 M (pH 7.0)-acetonitrilo (66:34, v/v) con bromuro de tetra-n-butilamonio 5 mM.
<i>Flujo</i>	0.5 mL/min.
<i>Presión</i>	No indicada
<i>Longitud de onda</i>	$\lambda_{\text{Excitación}}$ 405 nm y la $\lambda_{\text{emisión}}$ a 480 nm.
<i>Volumen de inyección</i>	10 μ L
<i>Columna</i>	Nucleosil 5C ₁₈ , 5 μ m, 250 mm x 4 mm d.i. Macherey, FRG.
<i>Temperatura de la columna</i>	25°C a 55°C.

3. Preparación de la alinasa.

- Pesaron 10 g de ajo machacado, homogeneizaron con agua y diluyeron hasta un volumen de 100 mL.
- El homogeneizado lo centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos a 4°C.
- El sobrenadante lo ajustaron a un pH de 4.0 con ácido fosfórico y lo centrifugaron a 12 000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Descartaron el sobrenadante.
- Disolvieron el precipitado en agua, y lo ajustaron a un pH de 4.0 con ácido fosfórico y después de la centrifugación a 12 000 rpm, desecharon el sobrenadante.
- El precipitado lo disolvieron en 10 mL de buffer de disolución de fosfatos (pH de 6.4) y lo almacenaron en un refrigerador.

4. Preparación de la muestra.

- Pesaron una muestra de 10 g y le agregaron 40 mL de agua caliente.
- Después calentaron durante 15 minutos en agua hirviendo, el contenido fue enfriado a temperatura ambiente y homogeneizado durante 3 minutos.

- El homogeneizado lo transfirieron a un matraz volumétrico y lo diluyeron hasta un volumen de 100 mL con agua destilada.
- Centrifugaron a 12 000 rpm durante 10 min. a 4°C, el sobrenadante lo filtraron a través de un papel filtro Roshi No. 5A.
- Un mililitro del filtrado lo pasaron a través del cartucho Sep-Pak C₁₈ y lo eluyeron con 8 mL de agua destilada y lo llevaron a un volumen de 10.0 mL.
- El eluido lo analizaron directamente por cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta y un detector de fluorescencia.
- 10 µL de la solución la inyectaron al sistema de Cromatografía de Líquidos.

5. Confirmación de alina por Cromatografía de Capa Fina y tratamiento enzimático.

- La solución de la muestra, preparada a través del cartucho Sep-Pak C₁₈, la evaporaron al vacío, secándola a 45°C.
- El residuo lo disolvieron en 0.5 mL de agua y utilizaron placas recubiertas con sílica gel.
- Rociaron las placas con el reactivo de ninhidrina al 0.2% y la colocaron en un horno a 110°C durante 10 minutos.
- La alina la identificaron comparándola con el estándar en la misma placa de CCF.

En cuanto al tratamiento enzimático empleado para su confirmación, realizaron lo siguiente:

- Un mL de la solución de alinasa lo agregaron a un mL de la solución de la muestra, la cual analizaron previamente por CL.
- La muestra la incubaron a 37°C durante 15 minutos. El resultado lo confirmaron porque desapareció el pico de la alina en el cromatograma de líquidos.

6. Solución estándar.

- Pesaron 10 mg del estándar y aforaron con 10 mL de agua destilada.

NOTA: Utilizaron la alina como estándar, el cual fue donado por Wakunaga Pharmaceutical, Osaka, Japón.

Utilizaron una columna de trimetilsilil (TMS), dando picos similares con tiempos de retención razonables en comparación con otras columnas, utilizando agua como fase móvil. Basado en estudios preliminares de la separación cromatográfica, incluyendo la interferencia de los compuestos coexistentes, para una columna Zorbax TMS y fase móvil de agua, prefirieron utilizar el método UV. (Figura III.3.1).

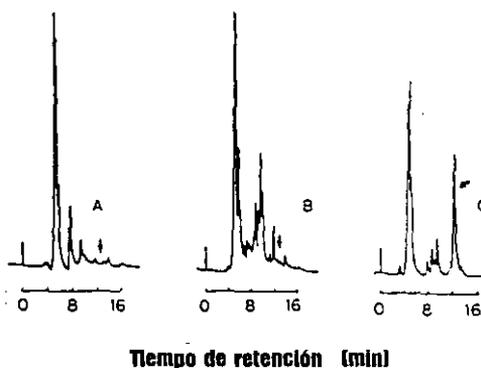


Figura III.3.1. Cromatograma de Líquidos de productos comerciales del ajo mediante detección ultravioleta. Las flechas indican el pico de alina. A) Dientes de ajo en miel. B) Formulación líquida. C) Polvo de ajo deshidratado. Las condiciones de análisis están descritas en la pág. 49.

Consideraron que hubo interferencias de algunas sustancias co-existentes en la detección UV en algunas preparaciones líquidas cuando utilizaron los derivados fluoróforos. Otro factor importante que mencionan, y con lo cual otros autores coinciden, es que las condiciones de operación de cromatografía líquida interfieren en los resultados, como por ejemplo la variación de las columnas, la temperatura de la columna y la composición de la fase móvil. Observaron que el uso de la columna en fase inversa C_{18} da una mejor resolución del complejo alina-fluoroscamina que las columnas RP-8 y TMS. Aunque no se menciona en el artículo por qué utilizaron la columna RP-8, ésta es de fase inversa y en teoría retiene mucho mejor los solutos no polares, tal es el caso de la alina, sin embargo, no tuvo buena resolución.

Afirman que la temperatura máxima para obtener un tiempo de retención razonable es de 50°C , ya que compararon los resultados utilizando temperaturas de 25 a 55°C .

La estabilidad de los derivados del fluoróforo de alina fue de 9 horas conservándolos a temperatura ambiente en un cuarto oscuro. Fue alta la correlación entre los dos métodos de detección, UV y FL, para rangos de concentración desde 10 a $60\ \mu\text{g/mL}$.

En cuanto a los efectos por calentamiento de alina, observaron que la alina se convierte a alicina, amonio y ácido pirúvico cuando se maceran los bulbos del ajo. Encontraron que tanto el ajo fresco como los productos de ajo al calentarse en agua hirviendo, inactiva a la enzima y se conservó estable hasta los 100°C .

El tratamiento enzimático de alina con alinasa resultó en la desaparición del pico establecido como alina. Mediante Cromatografía de Líquidos se comprobó la presencia de alina por el tratamiento enzimático. (Figuras III.3.2 y III.3.3).

Mencionan que la alina no se retuvo en el cartucho Sep-Pak C₁₈ con agua como eluyente y que una gran cantidad de alina (2.5 mg) se eluyó totalmente del cartucho en fase inversa, utilizando 6 mL de agua, mientras que el eluyente que contenía el derivado de tetra-n-butilamonio no separó completamente la alina de los coextractos de la muestra, por lo que escogieron el agua como eluyente para la purificación.

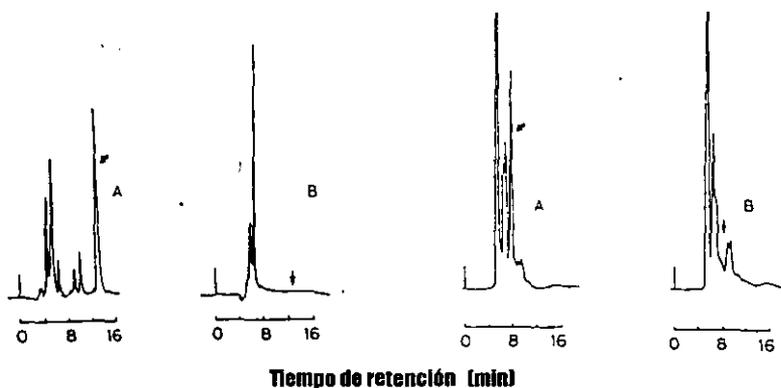


Fig. III.3.2. Desaparición del pico de alina en el extracto de ajo mediante tratamiento enzimático (Detección UV). A) Sin tratamiento. B) Con tratamiento.

Fig. III.3.3. Desaparición del pico de alina en un producto comercial del ajo bajo tratamiento enzimático (Detección FL). A) Sin tratamiento. B) Con tratamiento. Las flechas señalan el pico de alina. Las condiciones analíticas están descritas en la pág. 49.

De las muestras comerciales analizadas, encontraron que algunas contenían poco o nada de alina; en el ajo fresco encontraron de 4.5-6.2 mg/g de alina, utilizando UV y de 4.0-6.0 mg/g mediante FL (C.V. = 13.8%) y en polvo de ajo encontraron <0.5 mg/g (UV) y <0.05 mg/g (FL). Afirman que la detección por FL fue 10 veces más sensible y específica que UV. (Fig. III.3.4)

Según estos investigadores, concluyeron que su estudio por el método de cromatografía líquida para la determinación de alina fue sencillo, íntegro y preciso. La detección mediante ultravioleta permitió la determinación directa de alina, y el método de fluorescencia (basado en una derivatización fluorométrica), mostró gran especificidad y sensibilidad. Ambos métodos, comentan, son apropiados para asegurar la calidad del ajo y los productos del ajo; agregan que el método de CL puede ser aplicado a otras plantas que contengan alina de las especies *Allium*.

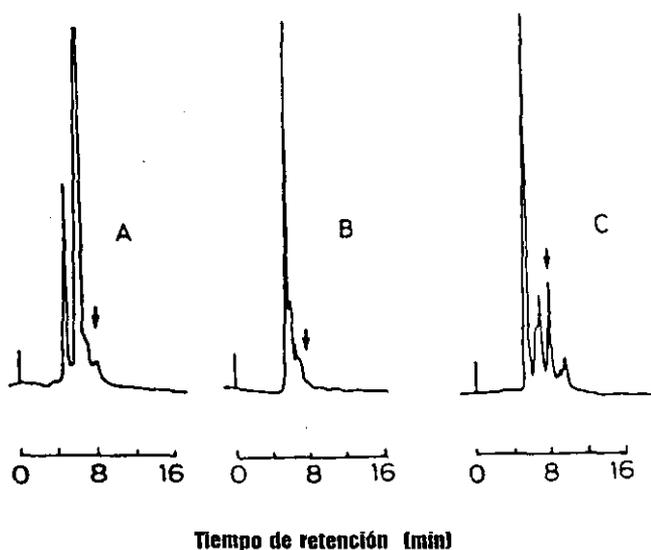


Fig. III.3.4. Cromatograma de líquidos de productos comerciales de ajo con detector fluorométrico (FL). Las flechas indican los picos de la alina. A) Formulación líquida. B) Polvo deshidratado. Las condiciones cromatográficas están descritas en la pág. 50.

III.4 MÉTODOS DE CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR)

III.4.1 DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE ALICINA POR CLAR ⁽¹⁾

Jansen *et al*, proponen un método por CLAR para la caracterización y determinación de alicina. Para 1987, aún utilizaban la alicina como estándar. Según estos investigadores, la determinación de alicina mediante Cromatografía de Gases no es conveniente utilizarla por su inestabilidad térmica, pues durante el proceso de análisis, la alicina resultaba en sus productos de desintegración como di y trisulfuros. Afirman que aplicando el método de CLAR es posible determinar directamente a la alicina tanto cualitativa como cuantitativamente.

Ellos incluyen en su estudio un nuevo método para la purificación de alicina, e introducen una metodología para obtener un estándar externo de alicina y para la determinación cuantitativa utilizaron un estándar interno que no mencionan (originalmente el método fue realizado por los alemanes Miething, H. y Voigt, M. en 1985 y 1986 respectivamente, según lo cita el propio Jansen). El polvo de ajo lo obtuvieron de Warstein Pharma, Niederbergheim y los reactivos de Fluka y Merck.

1. Equipo Sistema HPLC Kontron modelo T-414
 Monitor UV Uvicon 720 LC equipado con una celda de flujo de 8 μ L.
 Detector de diodos HP 1040A en combinación con un Workstation
 HP9133/HP 300. Un programador 205. Un integrador Shimadzu C-R3A

2. Condiciones cromatográficas de operación.

Fase móvil Metanol (60%) con ác. fórmico al 0.1% en agua (40%).
Flujo 0.8 mL/min.

<i>Presión</i>	15 Mpa
<i>Longitud de onda</i>	205 y 254 nm.
<i>Volumen de inyección</i>	No indicado.
<i>Columna</i>	Spherisorb ODS-2 (5 μ m) de 4.6 mm d.i. con una longitud de 40 mm y 250 mm para la columna analítica.

3. Síntesis y purificación de alicina

A. SINTESIS.

A.1. Disolvieron dialil disulfuro 0.01 molar en 100 mL de cloroformo y agregaron el ácido m-cloroperbenzoico 0.01 molar en 20 mL de cloroformo. Agitaron la solución a 0°C durante 20 minutos.

A.2. La mezcla la extrajeron después con una solución de bicarbonato de sodio al 5% en agua, la cantidad suficiente para neutralizar el ácido.

A.3. Extrajeron nuevamente con 20 mL de agua. (Cada fracción de agua se extrae con 15 mL de cloroformo).

A.4. Los extractos de cloroformo los secaron con sulfato de sodio y el cloroformo lo eliminaron usando el vacío a 20°C.

A.5. Los residuos oleosos los extrajeron 10 veces con 20 mL de agua.

A.6. Las fracciones combinadas de agua las extrajeron 5 veces con éter, las fracciones colectadas de éter las secaron con sulfato de sodio y al éter lo eliminaron a 20°C bajo presiones reducidas.

A.7. El residuo, la alicina sintetizada, lo purificaron como se indica a continuación.

B. PURIFICACION.

B.1. Equipo: El mismo utilizado en la determinación cuantitativa de las muestras de ajo fresco y deshidratado. Detector con LKB Unicord SII 2238 con monitor UV.

B.2. Condiciones de operación para la purificación de alicina:

<i>Fase móvil.</i>	Metanol (al 60% en agua) con ácido fórmico al 0.1%.
<i>Flujo</i>	0.8 mL/min.
<i>Presión</i>	15 MPa
<i>Longitud de onda:</i>	280 nm
<i>Volumen de inyección</i>	No indicado
<i>Columna:</i>	Sephadex LH-20 (26 x 580 mm)

B.3. Procedimiento.

- La alicina sintetizada la disolvieron en metanol (eluyente) a una concentración aproximada de 50 mg/mL de alicina.
- Eluyeron las sustancias en la columna indicada y llevaron a cabo la detección.
- Colectaron 40 fracciones de 3 mL y su contenido lo analizaron por medio de CLAR.
- Combinaron las fracciones que contenían más de 2 mg/mL de alicina y menos del 0.3% de subproductos.
- Agregaron agua, equivalente a $\frac{1}{4}$ del volumen final del eluido.
- Tres veces extrajeron la mezcla con 1 mL de éter por mL de solución.
- Secaron las fracciones combinadas de éter con sulfato de sodio en un papel filtro.
- La sílica gel la secaron a 150°C y la agregaron a la solución.
- Eliminaron los restos de éter al aire a temperatura ambiente.
- La alicina adsorbida en la sílica gel la secaron en un desecador, a peso constante, manteniéndola en refrigeración y almacenada bajo las mismas condiciones.

4. Preparación del estándar externo.

- Pesaron una porción de la alicina adsorbida en la sílica gel y la extrajeron con el eluyente descrito en la purificación de alicina. La concentración conseguida estuvo por debajo de 0.1%.

- La suspensión se centrifugó a 8000 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante lo utilizaron para la calibración del sistema CLAR.

5. Preparación de la muestra de ajo fresco.

- Utilizaron 5 g de dientes de ajo y homogeneizaron en una licuadora de alta velocidad con agua a un volumen de 30 mL.
- La suspensión la incubaron en un tubo cerrado a 30°C durante 20 minutos.
- Centrifugaron a 15 000 rpm durante 20 minutos.
- Agregaron 1.5 mL de metanol y 1 mL del sobrenadante.
- La suspensión la centrifugaron a 8 000 rpm durante 5 minutos.
- El sobrenadante se utiliza para la determinación por CLAR.

6. Preparación de la muestra de ajo deshidratado.

- Pesaron 10 a 20 mg de polvo de ajo deshidratado y le agregaron 1 mL de eluyente.
- Después de la incubación de 15 minutos, la suspensión la centrifugaron a 8000 x g durante 5 minutos.
- El sobrenadante lo utilizaron para la determinación por CLAR.
- Exceptuando el tiempo de incubación, todos los demás pasos los realizaron a 4°C.

ESPECTROS DE ALICINA

- El espectro UV fue monitoreado con un fotómetro Gilford 2600. Los datos del espectro son similares a lo registrado por la alicina disuelta en agua.
- El espectro IR, lo realizaron con un fotómetro Bruker IFS 48 FTIR colocando una muestra de alicina en KBr. (Figura III.6.2.1.)
- Cuantificaron la alicina mediante una técnica de reflexión por evaporación.
- La espectroscopia de masas la registraron en un espectrómetro de masas Varian MAT CH4, donde la alicina fue evaporada de la muestra adsorbida sobre el gel de

silíce y analizada directamente. Observaron picos del ión molecular en varios productos de desintegración de alicina.

La pureza de la alicina de las fracciones seleccionadas fue de 99%, determinada por CLAR. El contenido de alicina lo determinaron por la diferencia en peso seco antes y después de la adsorción de la alicina y la evaporación del éter. Almacenaron la preparación en un desecador a -24°C . Observaron que en un periodo de 3 meses no disminuyó el contenido y pureza del estándar de alicina.

Aconsejan que para obtener resultados confiables deben ser considerados el tipo de solventes para la extracción, ya que pueden afectar la actividad de la alinasa presente. Esta no se inactiva por el pentano, dietil éter o cloroformo, mientras que una mezcla de metanol/agua (8:2) inhibe la enzima. Confirmaron que tanto en el ajo fresco como en el ajo deshidratado en polvo se encuentra activado el sistema alina-alinasa y que la alicina no es estable a 4°C , que se descompone a diferentes productos, (por ejemplo ajoene y vinilditiinas). La inestabilidad de la alicina es especialmente remarcada en aceites, así lo comprueban estos investigadores y como lo reportan otros más ^(3,8,13,21,26,36). A partir del ajo fresco, estudiaron la conversión completa de alina y el tiempo de retención de alicina, así como el pico de la alicina a diferentes longitudes de onda. (Figura III.4.1.1.)

La combinación de la columna de 40 mm y la columna analítica de 250 mm, empacada con material en fase inversa (Spherisorb ODS-2, $5\ \mu\text{m}$) les permitió una excelente resolución en los picos de alicina. (Figura III.4.1.2). Confirmaron la pureza del producto eluido en diferentes formas, principalmente por un detector de diodos con el mismo tiempo de retención. Observaron más evidencias de la pureza del producto por la comparación del pico del espectro de la alicina con diferentes tiempos de retención y

los cromatogramas a diferentes longitudes de onda. (Figura III.4.1.1). Inyectaron 10 muestras de alicina pura, disuelta a concentraciones de 0.007 a 0.75 mg/mL de solución mostrando linealidad en la gráfica.

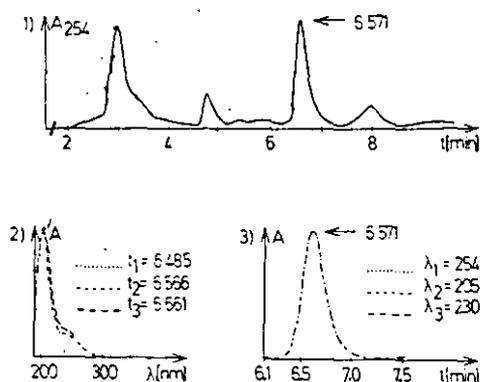


Fig. III.4.1.1. Análisis por CLAR del extracto de ajo, obtenido de ajo fresco en agua y llevando a cabo la completa conversión de la alicina. 1) Cromatograma de CLAR. El tiempo de retención de alicina fue de 6.57 minutos. 2) El espectro con los picos de alicina a diferentes tiempos de retención. 3) Cromatogramas de alicina a diferentes longitudes de onda.

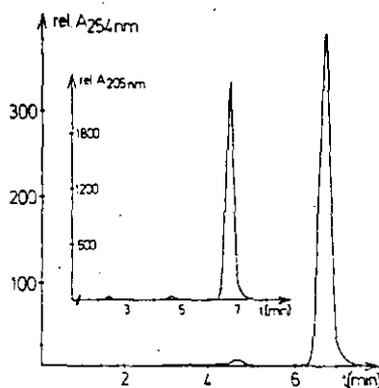


Fig. III.4.1.2. Cromatograma de CLAR de alicina sintética purificada. La detección se llevó a cabo 254 y 205 nm de longitud de onda.

Introdujeron el estándar externo para optimizar la precisión del método en la determinación cualitativa y cuantitativa de la alicina. Agregan que aplicando el método con un estándar interno, se requiere de una sustancia similar a la muestra, teniendo en cuenta la absorción molar y las características de extracción. Con estas afirmaciones, aseguran que a concentraciones diferentes del estándar interno se revelan diferentes cambios en la absorción, comparados en la misma muestra; consideran que estos problemas pueden resolverse haciendo uso de un estándar externo. Por esta razón, tuvieron que realizar los métodos publicados para la preparación de alicina pura. Observaron que en el procedimiento de purificación de la alicina sintetizada, así como el aislamiento natural, siempre contenían diferentes impurezas como lo indica CLAR. Mencionan que los preparativos por CLAR les permitió una excelente purificación, ya que obtuvieron una pureza cercana al 99%, pero la desventaja es que se necesitan grandes cantidades del producto y las ventajas son el bajo costo y el procedimiento simple. Otra desventaja que mencionan es que la alicina pura es un líquido oleoso de difícil tratamiento, por eso la hicieron adsorber en sílica gel y así poder obtenerla en polvo, el cual puede ser manejado fácilmente y permanecer estable a -24°C . Por estas razones, la determinación cuantitativa de alicina no es bien aceptada para la evaluación del ajo y los productos del ajo.

III.4.2. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE ALICINA Y ALINA MEDIANTE CLAR. ⁽⁶⁾

En el caso de Iberl *et al* también realizaron estudios por CLAR para la determinación cuantitativa de alicina incluyendo la cuantificación de alina, con el fin de comparar su contenido tanto en el ajo fresco como en el ajo en polvo, haciendo algunas modificaciones a los métodos propuestos por Ziegler y Sticher en la determinación de alina ^(1,7).

Iberl *et al*, se enfocaron en elaborar estos métodos para asegurar la estandarización de las preparaciones comerciales y corroborar si la alina y la alicina son los marcadores adecuados para evaluar el ajo y sus preparaciones. Para ello, realizaron los siguientes procedimientos.

A) DETERMINACIÓN DE ALICINA

- 1. Equipo** Sistema HPLC Kontron modelo T-414
 Monitor UV Uvicon 720 LC equipado con una celda de flujo de 8 μ L.
 Detector de diodos Merck-Hitachi L-3000 con un detector
 UV Knauer "chrom-a-scope"
 Un programador 205. Un integrador Shimadzu C-R3A

2. Condiciones cromatográficas de operación.

- Fase móvil* Se utilizaron tres diferentes eluyentes:
- Metanol:agua (conteniendo 0.1% de ácido fórmico) = 60: 40
 Flujo 0.8mL/min.
 - Acetonitrilo : agua : metanol = 50 : 41 : 9
 Flujo 1.0 mL/min
 - Metanol : agua : etilacetato = 60 : 30 : 10

	<i>Flujo</i>	1.0 mL/min
<i>Presión</i>	15 Mpa	
<i>Longitud de onda</i>	254 nm.	
<i>Volumen de inyección</i>	No indicado.	
<i>Columna</i>	Spherisorb ODS-2 (5µm) de 4.0 mm d.i. con una longitud de 40 mm y 250 mm para la columna analítica.	

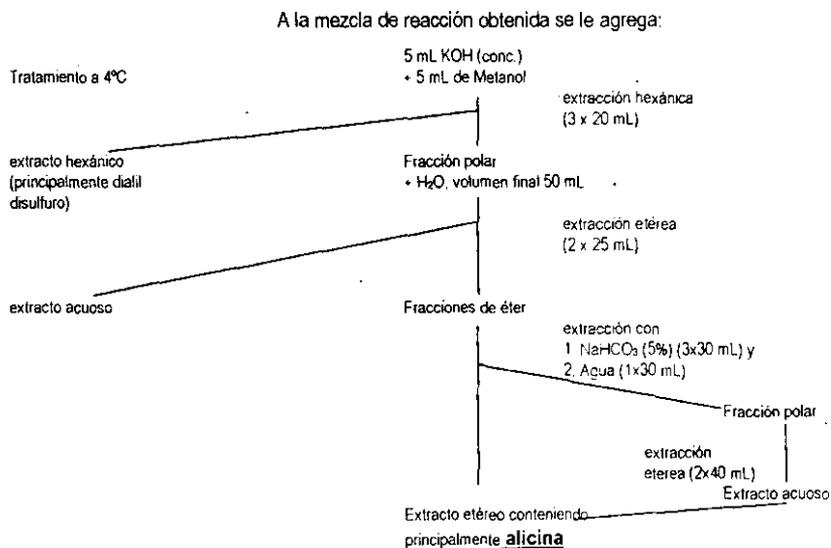
3. Síntesis y purificación de alicina

A. SINTESIS

A.1. Disolvieron dialil disulfuro 0.01 molar en 8.5 mL de ácido acético (99.5%).

A.2. Agregaron 1.2 mL de peróxido de hidrógeno (30%) en 8.8 mL de ácido acético, la reacción de oxidación se llevó a cabo en 30 minutos a temperatura ambiente.

A.3. Continuaron el procedimiento como se indica en el diagrama siguiente.



B. PURIFICACIÓN

Al producto obtenido de alicina sintetizada, la purificaron de igual manera, tal y como lo indica Jansen *et al*⁽¹⁾, adsorbiendo la alicina en sílica gel para usarlo como estándar externo para el análisis mediante CLAR.

4. Preparación de la muestra de ajo fresco y ajo en polvo.

- Pesaron 1 g de ajo en polvo ó 5 g de dientes de ajo pelados y agregaron agua llevando a un volumen final de 30 mL.
- Homogeneizaron con una licuadora de alta velocidad durante cinco minutos a 4°C y obtuvieron la pulpa del ajo o la suspensión del ajo en polvo.
- Incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. La suspensión debe contener alicina y, posiblemente, residuos de alina.
- Centrifugaron a 15000 rpm a 4°C, durante 20 minutos. (Al sobrenadante obtenido se le puede determinar los residuos de alina).
- Del sobrenadante, tomaron 400 µL y lo llevaron a un volumen final de 1 mL. Utilizaron los diferentes eluyentes para diluir cada una de las muestras.
- Centrifugaron a 8000 rpm durante 5 minutos a 4°C.
- El sobrenadante lo utilizaron para la determinación de alicina por CLAR.

B) DETERMINACIÓN DE ALINA

1. Equipo

Sistema HPLC Kontron modelo T-414.

Monitor UV Uvicon 720 LC equipado con una celda de flujo de 8 µL.

Detector de rearreglo de diodos Hewlett Packard 1040A en combinación con un Workstation HP9133/HP 300.

Un programador 205.

Un integrador Shimadzu C-R3A.

2. Condiciones cromatográficas de operación.

<i>Fase móvil</i>	Utilizaron como eluyente amortiguador de fosfatos 45 mM (pH de 7.15). 1,4-dioxano : acetonitrilo : tetrahidrofurano = 79:22.5:6:1.5.
<i>Flujo</i>	0.7 mL/min.
<i>Presión</i>	No indicada
<i>Longitud de onda</i>	337 nm.
<i>Volumen de inyección</i>	No indicado
<i>Columna</i>	Spherisorb ODS-2 (3 μ m) de 4.0 mm d.i. con una longitud de 40 mm y 125 mm para la columna analítica.

3. Síntesis y purificación de alina

A. SÍNTESIS.

Primeramente realizaron la síntesis del precursor de la alina, la S-alil-L-cisteína (también llamada L-deoxialina), como se describe a continuación:

A.1. La L-cisteína 0.25 molar la suspendieron en 750 mL de etanol.

A.2. Agregaron 0.875 mol de NaOH en solución acuosa 20 M a 0.275 mol de bromuro de alilo.

A.3. Después de dos minutos, la solución de deoxialina la acidificaron a un pH de 5.0-5.5 agregándole ácido acético glacial a una temperatura de 30°C.

A.4. Cristalizaron a 4°C y obtuvieron cristales amarillentos y los filtraron.

A.5. Lavaron dos veces con etanol, secaron a 50°C y recrystalizaron, con el fin de disolver la sustancia, tanto como fuera posible, en una pequeña porción de agua hirviendo con 1% de ác. acético glacial.

A.6. Vertieron esta solución en etanol hirviendo. (La solución debe ser 15 veces más a la cantidad de etanol utilizada). El solvente se tornó turbio inmediatamente, con la apariencia de pequeños platos de deoxialina.

A.7. Después de enfriar a temperatura ambiente, mantuvieron la solución a 4°C.

A.8. Filtraron y lavaron con etanol y secaron a 50°C. El producto obtenido lo utilizaron para sintetizar la L-(+)-alina (también llamada (+)-S-alil-L-cistein-sulfóxido).

B. PURIFICACION.

B.1. La L-deoxialina (0.05 mol) obtenida, la disolvieron en 65 mL de agua y peróxido de hidrógeno 0.1 molar. Mantuvieron la solución en agitación lenta y continua durante 24 horas.

B.2. Evaporaron el solvente a 60°C al vacío.

B.3. Ya seco, el residuo blanco lo disolvieron en una mezcla de acetona:agua:ácido acético glacial = 65:34:1 a temperatura ambiente. Mientras se enfriaba a temperatura ambiente, comenzaron a crecer los cristales blancos en forma de agujas.

B.4. Después de completar la precipitación del aminoácido oxidizado, mantuvieron la solución a 4°C.

B.5. Filtraron el precipitado y lavaron con el solvente arriba mencionado y recrystalizaron dos veces de la misma manera con una mezcla de acetona:agua:ácido acético glacial = 70:29:1.

B.6. Obteniendo así a la L-(+)-alina pura.

4. Preparación del estándar externo.

- Utilizaron la solución sintetizada y purificada de L-(+)-alina 1 mM como estándar externo.
- Aplicaron, al estándar externo, el mismo *procedimiento de derivatización* que a las muestras procesadas de ajo fresco y ajo en polvo para su determinación cuantitativa.

5. Preparación de la muestra de ajo fresco y ajo en polvo.

- Pesaron 200 a 800 mg de ajo en polvo o 5 g de dientes de ajo pelados.
- Agregaron 10 mL de metanol más 20 mL de ácido fórmico al 0.1% en agua.

- Agitaron vigorosamente durante 5 minutos a temperatura ambiente. La suspensión contiene alina.
- Centrifugaron a 15 000 rpm durante 20 minutos a 4°C.
- El sobrenadante de alina obtenido se agrega a la mezcla de derivatización, bajo las siguientes condiciones:

Mezcla de derivatización.

O-ftaldialdehído 0.14 M en metanol. (Recién preparado).

Tert.-butiltiol 1.11 M en metanol.

Ácido bórico 0.33 M, ajustado a pH 9.5 con Hidróxido de sodio 4 M.

Procedimiento de derivatización.

- Agregar 400 µL de o-ftaldialdehído en metanol,
 - más 100 µL de tert.-butiltiol en metanol,
 - más 100 µL de Buffer de boratos a pH 9.5
 - más 100 µL del sobrenadante de alina*.
- Agitaron la mezcla durante un minuto a temperatura ambiente y la filtraron.
- Esta solución de derivados de isoindoles la utilizaron para la determinación de alina por CLAR.

Los resultados que obtuvieron en la síntesis de alicina mediante el método que proponen es del 25%, 15% más comparado con lo que obtuvo Jansen *et al* ⁽¹⁾. Además, la pureza generada de alicina fue superior al 85%.

* En lugar de los 100µL del sobrenadante de alina, se puede utilizar el residuo de alina que se obtuvo en el preparación de la muestra de ajo fresco y en polvo, descrito en el punto 4 de la pág. 65.

Para la calibración del sistema de CLAR utilizaron a la alicina sintética como estándar externo y el resultado lo compararon con la alicina formada después de la completa conversión de la alina, utilizando a la proteína alinasa sintética purificada, observando resultados similares. (Para más información sobre esta investigación, Jansen refiere otro trabajo experimental que realizaron sobre la síntesis y purificación de la alinasa para la conversión de alina en alicina: Jansen *et al*, *Planta Med.* 1989. 55,434-439 e Iberl *et al* *Planta Med.* 1990. 56, 202.). También compararon los resultados obtenidos de la técnica realizada utilizando alicina adsorbida en sílica gel para el análisis rutinario y mencionan que puede ser aplicada confiablemente como estándar externo, siempre y cuando el estándar haya sido cuantificado por estos sistemas de calibración por CLAR.

Los autores aclaran que elaboraron diferentes sistemas de elución mediante CLAR para determinar el contenido de alicina en ajo fresco y el polvo de ajo procesado, lograron observar datos analíticos similares, los tiempos de retención de alicina se redujeron y se mantuvo una excelente resolución. Con las diferentes mezclas de eluyentes (acetonitrilo:agua:metanol y metanol:agua:etilacetato), obtuvieron datos similares con un tiempo de retención de 2.85 min para el pico de alicina.

La pureza e identidad de alina la corroboraron mediante CLAR, Cromatografía en Capa Fina (CCF) y enzimáticamente por la conversión completa a alicina. En la síntesis y purificación de la alina tuvieron dificultades porque el rendimiento fue menor al 4%. Por otra parte, mencionan que es posible utilizarlo como estándar externo, porque durante el periodo de almacenamiento de la L-(+)-alina en forma de cristales puros se mantiene bastante estable y es de fácil manipulación.

La determinación de alina en polvo de ajo por CLAR mostró un pico, asociado con el pico de L-(+)-alina, con un tiempo de retención de 13.6, rango < 0.3. Mientras que el cromatograma de CLAR de la alina sintetizada mostró un tiempo de retención de 10.2 para L-(-)-alina y 13.3 para L-(+)-alina. (Figura III.4.3.1).

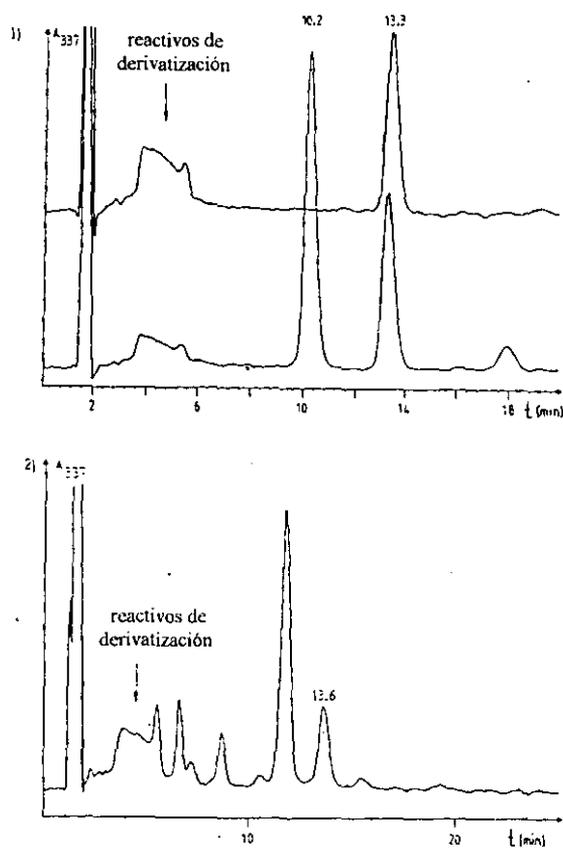


Fig. III.4.3.1. 1.- Cromatograma de CLAR de la alina sintética. Antes de la purificación (Gráfica inferior), L-(-)-alina (Rt 10.2) y L-(+)-alina (Rt 13.3). Después de la purificación (gráfica superior), el único pico representa la L-(+)-alina.

2.- Determinación por CLAR de ajo en polvo de alina. El pico está asociado con el pico de L-(+)-alina, Rt 13.6.

Afirman que para el análisis rutinario, la S-metil-L-cisteína puede ser utilizada como estándar externo ya que se encuentra disponible comercialmente.

Con respecto a la determinación cuantitativa de la muestra, observaron que en la extracción de la alina, el metanol al 50% no logra inactivar completamente a la alinasa presente en las diferentes muestras analizadas, por lo que buscaron un solvente adecuado que tuviera las siguientes características:

- 1) Que extraiga por completo a la alina.
- 2) Que inactive a la alinasa inmediata y completamente.

Así que decidieron aumentar la concentración del metanol al 60% para una mejor extracción de la alina y agregar ácido fórmico (5% al menos) para detener la actividad de la alinasa. Para evitar el problema de acidez, en el paso de derivatización de alina, donde se requieren condiciones alcalinas, desarrollaron el método de extracción que se describe en la *preparación de las muestras de ajo fresco y polvo de ajo deshidratado*, en este trabajo.

No observaron diferencias marcadas en el contenido de alina en el ajo fresco, pues más o menos osciló entre el 1% de las muestras analizadas.

También analizaron diferentes preparaciones comerciales del ajo en polvo, utilizando los sistemas de CLAR para alina y alicina respectivamente y encontraron valores muy similares. (Figura III.4.3.2). Las aberraciones encontradas se debieron, mencionan, a una conversión enzimática incompleta, como lo demuestran en la determinación de los residuos de alina, (ver el procedimiento de las muestras) ya que obtuvieron una cierta cantidad calculada de este compuesto. Esto demuestra que la determinación del contenido de alina es suficiente para caracterizar la capacidad del ajo en generar

alicina. Afirman que es necesario determinar adicionalmente las cantidades de alina, dejando para después el proceso enzimático, o simplemente realizar el método de cuantificación de alicina.

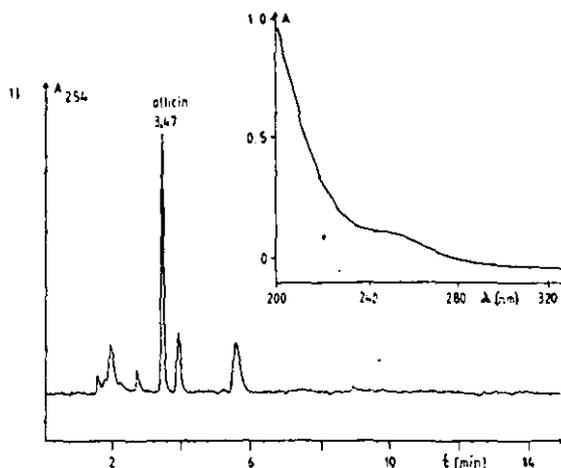


Figura III.4.3.2. Cromatograma de CLAR y el espectro de alicina de un extracto de ajo fresco.

Los aditivos lipofílicos tales como clorofilina, en algunas preparaciones, deterioran la resolución del pico de la alicina, pero no influyen en la determinación de alina, debido particularmente a las diferentes preparaciones de las muestras y a la más específica detección de la longitud de onda para la determinación de alina. Esto, dicen, tiene que ser tomado en cuenta, ya que el procedimiento de derivatización de alina causa desviaciones más altas.

El contenido de alina puede ser calculado como sigue:

$$(\%) \text{ alina} = (\%) \text{ alicina} \times 2.185$$

En conclusión, consideran que los sistemas presentados para la determinación de alina y alicina son adecuados para evaluar su contenido en ajo fresco y ajo en polvo deshidratado. Como estándar externo, la alina puede ser fácilmente manipulable si se compara con la alicina. De otra manera, la síntesis de las cantidades relativamente grandes de alicina parecen ser más fáciles de obtener que el procedimiento para obtener suficientes cantidades de L-(+)-alina. La determinación de alicina permite estimar la capacidad de generación del ajo, lo cual depende tanto de la alina como de la alinasa, así como la determinación cuantitativa de varios productos de transformación de alicina. (Figura III.4.3.3).

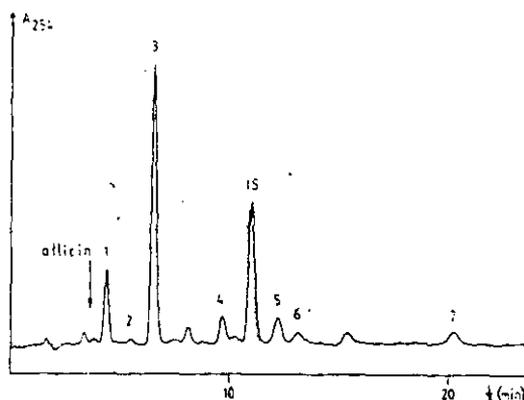


Fig. III.4.3.3. Análisis por CLAR de un producto comercial macerado, conteniendo dietil disulfuro como estándar interno.

1= ajoenes (Rt 4.41), 2=dimetil disulfuro (5.48), 3=2-vinil-(4H)-1,3 ditiina (6.59, 4=3-vinil-(4H)-1,2-ditiina (9.72), 1S=dietil disulfuro (11.08), 5=dialil disulfuro (12.29), 6=alil metil trisulfuro (13.20), 7=dialil trisulfuro (20.27). La fecha señala el tiempo de retención de la alicina (3.35) la cual todavía es detectable mientras ocurre la transformación de alicina.

III.4.3 .DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE ALINA POR CLAR ⁽⁷⁾

Ziegler y Sticher refieren que varios compuestos de S-alquenil-L-cisteínas y sus correspondientes (\pm)-sulfóxidos son constituyentes de varias especies de *Allium*, tales como el ajo y la cebolla. Los aminoácidos sulfurados son significativos por el sabor, la pungencia y las características lacrimógenas en estas plantas, además de ser precursores importantes de su actividad biológica. Agregan que han encontrado compuestos estructuralmente similares a la alina. Ver tabla No. III.4.3.1.

R	Abreviación y nombre	Abreviación y nombre
Metil	MCSO (S-metil-L-cisteín sulfóxido)	MCS (S-metil-L-cisteína)
Etil	ECSO (S-etil-L-cisteín sulfóxido)	ECS (S-etil-L-cisteína)
Alil	Alina (S-alil-L-cisteín sulfóxido)	ACS (S-alil-L-cisteína)
Propil	PCSO (S-propil-L-cisteín sulfóxido)	PCS (S-propil-L-cisteína)
Butil	BCSO (S-butil-L-cisteín sulfóxido)	BCS (S-butil-L-cisteína)
	$\begin{array}{c} \text{O} \qquad \text{NH}_3 \\ \qquad \\ \text{R}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COO}^- \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \qquad \text{NH}_3 \\ \qquad \\ \text{R}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COO}^- \end{array}$

Tabla III.4.3.1. Estructuras químicas de derivados de cisteína.

Continuando con los métodos por CLAR, Ziegler y Sticher mencionan que la determinación cualitativa y cuantitativa de estos compuestos sulfurados son de gran interés para el control de la calidad de los alimentos y para las preparaciones fitomedicinales en la industria farmacéutica, en particular los procesos de productos del ajo. Agregan que existen varios procedimientos propuestos para la determinación de alicina por CLAR para estandarizar las preparaciones del ajo; sin embargo, afirman que la determinación de los compuestos genuinos han sido ignorados y que algunos

autores han descrito métodos bastante complicados, usando una combinación de electroforesis, CCF bidimensional, y densitometría para el análisis cuantitativo de cebollas, por lo que estos investigadores desarrollaron un procedimiento para la separación de las S-alquencil-L-cisteínas y los correspondientes isómeros de (\pm)-sulfóxido, empleando CLAR en fase inversa y precolumnas de derivatización. Indican que se pueden usar varias técnicas de detección para realizar un monitoreo selectivo y sensible para separar los derivados. Con este estudio, se encargaron de demostrar la aplicación de estos métodos para el análisis de los componentes de ajo fresco y preparaciones de ajo, además de que presentan un nuevo enfoque para la determinación cuantitativa precisa y exacta de la alina, la cual representa el principal compuesto de interés general.

- 1. Equipo** Utilizaron tres diferentes sistemas con equipos de bombeo e inyección acoplados a varios detectores.
- a) Electroquímicos (ECD).
 - b) Fluorescencia (FLD).
 - c) Espectrofotométricos UV (UVD).
- Sistema de HPLC Knauer (Berlín, FRG)

2. Condiciones cromatográficas de operación.

<i>Fase móvil</i>	Ver la tabla No. III.4.3.2
<i>Flujo</i>	1.0 ó 1.2 mL/min.
<i>Presión</i>	No indicada.
<i>Longitud de onda</i>	Diferentes, dependiendo del detector utilizado (FLD ó UVD). Ver sus análisis de resultados.
<i>Volumen de inyección</i>	No indicado.

Columna Spherisorb ODS 2 (3 μ m), 100 x 4 mm d.i. ó con Permacoat-RP-12 (3 μ m) con Hiperchromo, 120 x 4.6 mm d.i. Las columnas (10 x 4 mm d.i.) las utilizaron ocasionalmente. Utilizaron SCX pero no indican sus características.

COMPOSICION OPTIMIZADA DE LA FASE MOVIL.

FASE ESTACIONARIA	Columna Permacoat-RP-12	Columna Spherisorb ODS 2
	THF : 1,4-dioxano : ACN : Buffer de fosfatos 0.045 M (%)	
Separación isocrática de los isómeros (\pm) sulfóxido	1.1 : 18.9 : 9.6 : 70.4 Ps 05-65-30, St 1.02	1.3 : 22.5 : 3.3 : 72.9 Ps 06-83-11, St 0.95
Sistemas de gradiente:		
<i>Punto inicial</i>	1.6 : 16.7 : 7.6 : 74.1 Ps 08-65-27, St 0.90	1.5 : 18.6 : 0.9 : 79.0 Ps 09-87-04, St 0.75
<i>Punto final</i>	2.0 : 47.8 : 0.0 : 50.2 Ps 05-95-00, St 1.76	2.9 : 50.2 : 0.0 : 46.9 Ps 07-93-00, St 1.89
<i>Tiempo del gradiente lineal</i>	30 min	32 min
Flujo	1.2 mL/min	1.2 mL/min

Tabla No.III.4.3.2. Composición optimizada de la fase móvil para las diferentes columnas Fase Inversa.

a. Separación de todos los derivados de cisteína por gradiente de elución selectivo multisolvente.

Ps: Punto de selectividad.

St: Fuerza o concentración del solvente.

3. Preparación de reactivos.

- Disolvieron 140 mg de α -faldialdehído (OPA) en 5 mL de metanol, después le adicionaron 100 μ L de tert.-butilol.

- Esta solución la diluyeron con 50 mL de fosfato de sodio 0.05 M (o bien Buffer de boratos, ambos a un pH de 9.5).

- El reactivo preparado lo almacenaron a temperatura ambiente durante algunas semanas, aunque tenían que agregar el tert.-butiltiol periódicamente para mantener su potencia. (Mencionan que ocasionalmente el reactivo llegó a opacarse durante la preparación).

Esta preparación de OPA/tert.butiltiol la utilizaron en la columna de derivatización para los derivados de la cisteína.

4. Síntesis y purificación de compuestos.

Ziegler *et al* ⁽⁷⁾, prepararon, bajo condiciones alcalinas, a la S-alquénil-L-cisteína como lo describió Theodoropoulos (Acta Chem. Scand. 1959, 13,383). Los isómeros de (±)-sulfóxido los obtuvieron por oxidación de los correspondientes tioéteres con peróxido de hidrógeno. Los diferentes compuestos los cristalizaron con mezclas de agua/acetona o agua/etanol. La (+)-alina pura ($C_6H_{11}NO_3S \cdot \frac{1}{2} H_2O$, 186.2) la obtuvieron por cristalización, siguiendo el método descrito por Stoll y Seebeck (Helv. Chim Acta. 1951.34,481).

5. Preparación del estándar

Para la evaluación de la derivatización y las condiciones cromatográficas para el análisis cuantitativo general, disolvieron los aminoácidos sulfurados, entre ellos la alina como estándar, en una mezcla metanol/agua al 50% para obtener una concentración final de 0.5-1 mg/mL. Para el análisis cuantitativo, prepararon la alina al momento de usarla.

Debido a las grandes diferencias en la sensibilidad del detector, los intervalos de concentración deben ser adaptados al detector empleado (ECD, FLD o UVD). Las soluciones fueron estables a temperatura ambiente pudiendo ser utilizadas por varias semanas.

6. Preparación de la muestra.

- Los dientes de ajo fresco, ya pelados, los cortaron rápidamente en trozos muy pequeños.
- Pesaron exactamente de 1 a 2 g.
- Extrajeron inmediatamente con 50.0 mL de la mezcla metanol/agua al 50%, durante aproximadamente 5 minutos.
- Después de la filtración, tomaron 5.0 mL del filtrado y lo pasaron a través de un cartucho C₁₈ o un SCX (pre tratamiento descrito por los proveedores para separar las bases orgánicas). Para asegurar la completa elución de todos los derivados de la cisteína, adicionaron 4 mL de la mezcla metanol-agua a través del cartucho.
- La solución obtenida se llevó a un volumen final con agua destilada de 10.0 mL en un matraz volumétrico.
- Las columnas SCX las lavaron varias veces con agua destilada y para eliminar todos los aminoácidos adsorbidos utilizaron 5.0 mL de una mezcla de Buffer de fosfatos, pH de 9.5, con metanol 80:20%.
- Los extractos solubles en agua los disolvieron en 10.0 mL de la mezcla metanol/agua al 50% para obtener la concentración deseada de alina.

Ziegler y Sticher comentan que la reacción entre las aminas primarias y el OPA en presencia de un alquiltiol (usualmente 2-mercaptoetanol) comúnmente se utiliza en la técnica de derivatización para el análisis de aminoácidos por cromatografía de líquidos. Al comparar con otros procedimientos de derivatización, afirman que su técnica tiene algunas ventajas, por ejemplo, que es de fácil manipulación, los reactivos son razonablemente estables, de reacción rápida y altos rendimientos. Sin embargo, reportan que la estabilidad de los derivados de isoindoles sulfuro-sustituídos es insuficiente. Para mejorar la estabilidad, y sólo en este caso, incorporaron un grupo voluminoso como el tert-butil. Ver la reacción en la figura III.4.3.1.

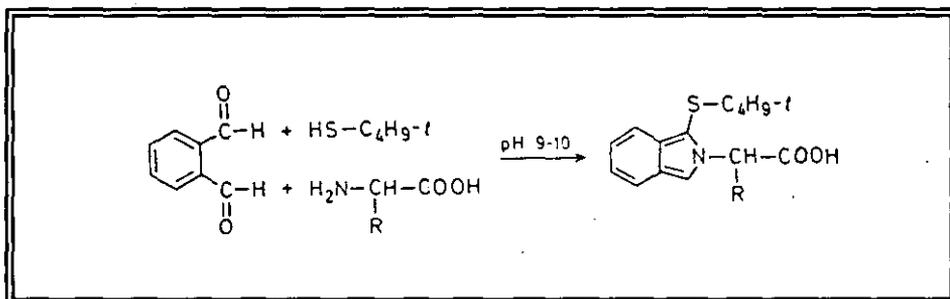


Figura III.4.3.1. Reacción entre un aminoácido, O-ftaldialdehído y tert.-butiltiol, obteniéndose un derivado isoindol N-sustituido.

Agregaron que no existen ventajas en el uso de la disolución de buffer de boratos o de fosfatos en las reacciones; por razones prácticas prefirieron utilizar el buffer de fosfatos para detectores en la técnica de fluorescencia. Además, mencionan que para obtener reproducibilidad en el paso de la derivatización, la cual es crítica para una completa precisión del método analítico, inyectaron por duplicado los estándares.

La desviación estándar de las áreas de los picos fue: 3.6%, 2.7% y 3.1% para (+)-alina, S-alil-cisteína (ACS) y S-metil-cisteína (MCS), respectivamente ($n = 7$). Los datos que obtuvieron de los corrimientos para la calibración o los análisis del ajo para la derivatización de alina fue de 4.1%.

En la separación isocrática de los homólogos de los tioéteres no presentaron ninguna dificultad y en la resolución de los isómeros de (\pm)-sulfuro sí tuvieron problemas, debido a que se traslaparon varios picos, lo cual dependió de la composición de la fase móvil. Obtuvieron resolución satisfactoria en el uso de los cuatro tipos de solventes. Lograron separar completamente a los aminoácidos utilizando el gradiente de elución

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

de multisolventes selectivos (SMGE), se obtuvieron dos picos de cada par de isómeros de sulfóxido. La cromatografía de los diastereoisómeros individuales de alina permitió la identificación de ambas formas y el pico con el menor tiempo de retención fue para (+)-alina. (Figura III.4.3.2).

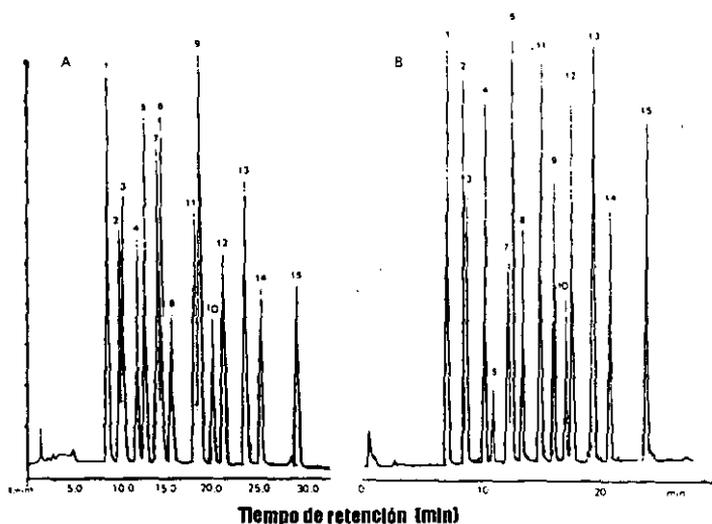


Fig. III.4.3.2. Cromatograma optimizado de la separación de 15 compuestos analizados con multisolventes selectivos de gradiente de elución mediante dos diferentes columnas de fase inversa. A. Pennacoat-RP-12 y B. Spherisorb ODSII.

La optimización de la fase móvil la lograron por la composición de los solventes utilizados para cada columna de fase inversa, asegurando una alta reproducibilidad. Comentan que la temperatura debe controlarse a 30°C, debido a la reducción de las altas presiones por la relativa viscosidad del 1,4-dioxano.

Afirman que el procedimiento de derivatización OPA/tert.-butiltiol es selectivo, porque solamente las aminas primarias están involucradas en la reacción y que las

condiciones óptimas para el sistema de detección electroquímico es a 750 mV vs. Ag/AgCl; siendo la $\lambda_{\text{excitación}}$ en fluorescencia de 230 nm, la $\lambda_{\text{emisión}}$ de 420 nm y el detector UV a una longitud de onda de 337 nm.

En cuanto a la extracción y pureza de las muestras, mencionan que la actividad enzimática se inhibió fuertemente en la mezcla metanol/agua, además de ser innecesario inactivar la alinasa por calentamiento. Afirman que el procedimiento (de intercambio catiónico) es más eficiente por la extracción de los aminoácidos iónicos de la matriz.

Después de utilizar el buffer de fosfatos, obtuvieron $102.2 \pm 3.2\%$ y $101.9 \pm 3.4\%$ para alina y MCS respectivamente ($n = 5$). Uno de los inconvenientes de este método es el alto costo para un análisis rutinario.

En la aplicación de la técnica descrita del gradiente de elución identificaron solamente dos sustancias: (+)-SMCO y (+)-alina, según las observaciones en los cromatogramas típicos obtenidos por FLD y ECD. Otros cistein-sulfóxidos o tioéteres no los detectaron bajo las condiciones cromatográficas estándar, indicando ausencia o por lo menos una cantidad mínima comparada con la alina. Les sorprendió que no hubiera (+)-PCSO, mientras que la presencia de (+)-ECSO y (+)-BCSO lo consideran controversial.

Mencionan que tanto el ajo fresco como los extractos examinados, exhibieron un perfil de elución similar en los picos, las diferencias relativas de las concentraciones de las sustancias de elución fueron significantes. (Figuras III.4.3.3 y III.4.3.4).

Como muchos métodos analíticos, la precisión dependió de la concentración, y en su caso observaron que los errores absolutos eran más grandes al incrementarse la concentración. Pudieron concluir que dos puntos de la calibración es suficiente para la cuantificación rutinaria de alina. Mencionan que de los cálculos estadísticos, en la regresión lineal, la línea pasó por el origen; sin embargo, sugieren que hay que tener cuidado en este procedimiento ya que puede ser peligroso y complicado en un sistema en el cual se realizó el paso de la derivatización. El procedimiento de la duplicación de la derivatización disminuye los riesgos.

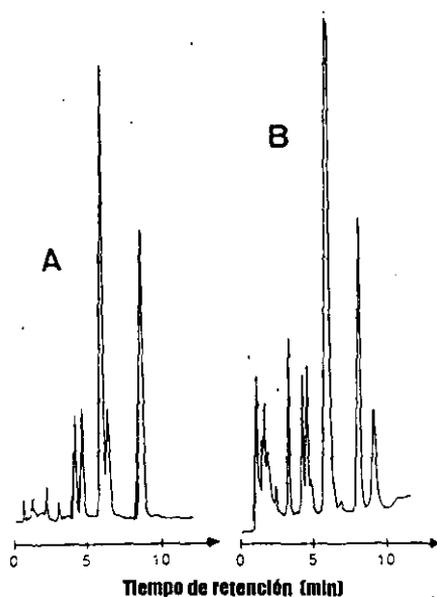


Fig. III.4.3.3. Análisis isocrático de diferentes muestras. A: ajo fresco. B. Casa comercial.

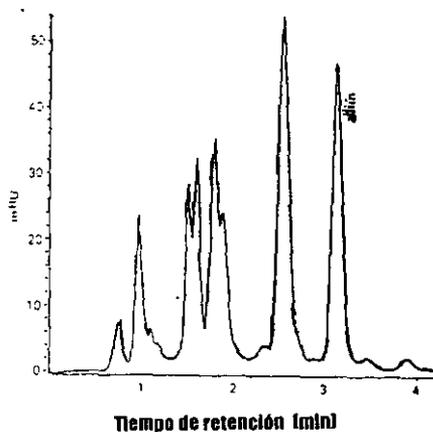


Fig. III.4.3.4. Separación rápida cromatográfica para el análisis del ajo.

Hicieron el análisis de las soluciones y encontraron que se pueden almacenar por varias horas sin disminuir las concentraciones de alina. Esto es importante saberlo, para preparar las muestras mediante la técnica de derivatización en pre-columna.

Mencionan que el método propuesto lo utilizaron para estudiar una gran variedad de muestras de ajo. Los resultados obtenidos les revelaron variabilidad significativa en el contenido de alina, por ejemplo, en el ajo fresco encontraron que contiene <0.1% y 1.15% de alina, asumiendo que tiene un contenido de agua del 64%, éstos presentan valores de más del 3.3% en muestra seca. Consideran que las cantidades de alina pueden depender no solamente de la variedad o las especies, sino también de la madurez, almacenaje, el medio ambiente y otros factores.

Para el análisis de muestras de ajo, incluyendo dientes de ajo fresco, extractos y preparaciones de ajo, aplicaron la fase inversa de CLAR seguida de la pre-columna de derivatización para derivados de cisteína con OPA/tert.-butiltiol.

Del método analítico propuesto concluyeron que es:

1. Un procedimiento simple para la extracción y purificación eficiente de la muestra.
2. Un procedimiento de derivatización con pre-columa y productos estables.
3. Rápida y reproducible.
4. De gran versatilidad por la sensibilidad, selectividad y detección de los isoindoles, mediante la utilización de detectores electroquímicos, de fluorescencia o ultravioleta.
5. Un método de respuesta lineal y de reacción reproducible del detector, permitiendo ser aplicado en el análisis rutinario.

III.4.4. DETERMINACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE TRANSFORMACIÓN DE LA ALICINA: ajoenes y ditiinas POR CLAR. ⁽⁵⁾

En otro trabajo realizado por Iberl *et al.*, se llevó a cabo el estudio de otros componentes del ajo, como productos de transformación de la alicina, los cuales fueron identificados por otros investigadores (Brodnitz, 1971; Block, 1986 y Vernin, 1986) y otros más, los estudiaron para observar el papel que desempeñan en el ajo como agentes medicinales ⁽⁵⁾.

Su trabajo se basó en caracterizar estos productos y determinar la concentración absoluta de las sustancias generadas, para utilizarlas como estándar externo, aplicando métodos de CLAR.

A partir de dialil disulfuro, sintetizaron y purificaron alicina y de ésta obtuvieron los productos de transformación, dependiendo de la polaridad de los solventes. (E)-ajoene, 2-vinil-(4H)-1,3-ditiina y 3-vinil-(4H)-1,2-ditiina también los purificaron bajo condiciones cromatográficas de operación específicas para cada uno de los productos. Confirmaron su pureza mediante un monitoreo espectrofotométrico UV e IR. La calibración del sistema CLAR lo realizaron utilizando estándares externos de alicina, tal y como se describe en ⁽¹⁾. Sintetizaron la alinasa y calcularon la cantidad de alicina generada con el fin de calibrar el sistema CLAR. La completa conversión enzimática de alina la monitorearon por CLAR para la determinación de los aminoácidos.

La generación de los productos de transformación, a partir de la alicina sintetizada y purificada en diferentes solventes, los analizaron después de 100 días de almacenamiento a temperatura ambiente. Los eluyentes los prepararon de acuerdo a la

polaridad de los compuestos. Después de 100 días, en todos los solventes, la alicina se transformó completamente.

- 1. Equipo** LKB Uvicord SII 2238, monitor UV.
 Sistema Kontron HPLC con bomba T-414 y monitor Uvikon 725, para el análisis utilizaron un detector de diodos Merck-Hitachi L-3000.
 Colector de fracciones LKB Ultrorac 7000.

2. Condiciones cromatográficas de operación.

- Fase móvil* Para la separación de alicina y los productos de transformación de alicina se utilizó acetoniitrilo:agua:metanol (50:41:9) y metanol:agua, etil acetato (6:3:1), respectivamente. El eluyente del ajoene fue hexano:2-propanol (92:8).
- Flujo* 1.0 mL/min.
- Presión* No indicada.
- Longitud de onda* 254 nm
- Volumen de inyección* 8 μ L
- Columna* Para la purificación de ajoene: Sephadex LH-20 (para saber las características de la columna ver el método III.4.1)
 Para la purificación de las vinil ditiinas: Sphèrisorb ODS-2 (5 μ m), 4.6 mm d.i. y una longitud de 250 mm.
 Para la separación de (E)- y (Z)-ajoen se utilizó Spherisorb Si (5 μ m), 4.0 mm d.i. con una longitud de 14 mm para guarda columna y 250 mm para la columna analítica.

El máximo rendimiento de la formación de ajoene (con sus respectivos isómeros) fue con el 2-propanol. Mientras que las ditiinas tuvieron el menor rendimiento con el 2-propanol por ser menos polar. (Fig. III.4.4.1)

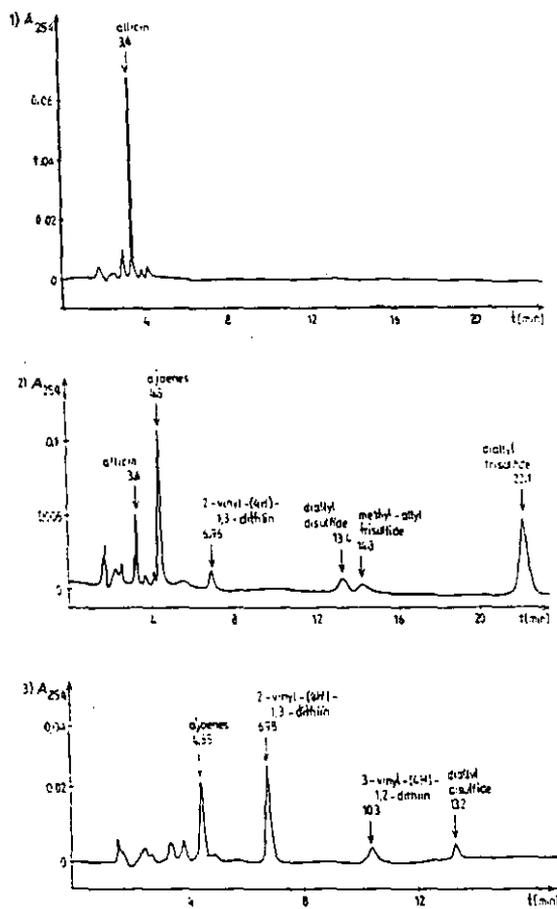


Figura III.4.4.1. Determinación de alicina y sus productos de transformación por CLAR. Los dientes de ajo fresco se maceraron e incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se extrajeron con 10 mL de etanol o aceite y se corrieron las muestras.

1) Cromatograma por CLAR de muestras tomadas directamente después de la extracción.

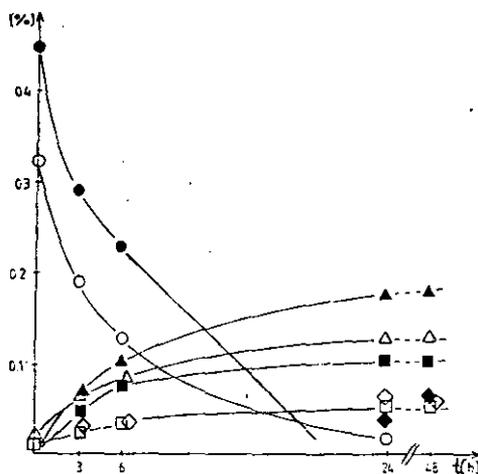
2) Cromatograma por CLAR de los dientes de ajo macerados y extraídos con etanol.

3) Extracto oleoso después de almacenarlo durante 9 días a temperatura ambiente.

Las condiciones cromatográficas son similares a las descritas en la pág. 85. ⁽⁵⁾

Estudiaron también la transformación de alicina, mediante el almacenamiento del ajo machacado, tratado y suspendido en etanol. En etanol y agua, la formación de alquil

sulfuros dominaron entre la formación del ajoene, mientras que la ditiinas y los ajoenes se generaron preferentemente en aceite. En las preparaciones frescas de extractos de aceite no encontraron trisulfuros en un periodo de 40 días. Ver la gráfica III.4.5.1.



Gráfica III.4.4.1. Rendimiento de alicina y productos de transformación de alicina: peso inicial de ajo fresco = 100%
Disminución del contenido de alicina (●/○) y generación de ajoene (■/□), 2 vinyl-(4H)-1,3-ditiina (▲/△) y dialil disulfuro (◆/◇) durante el almacenamiento a temperatura ambiente.

Este estudio les permitió obtener los productos de transformación de la alicina sin contener activo el sistema alina-alinasa y poder evaluar los productos del ajo. Comentan que este procedimiento causa la pérdida de grandes cantidades de solventes orgánicos y que no es sencilla la manipulación del ajoene y las ditiinas, pues son líquidos oleosos; en cambio, la alicina adsorbida en sílica gel es más manejable para utilizarla de rutina, teniendo una excelente resolución.

Terminan diciendo que es posible determinar la cantidad de alicina, originalmente presente, por los productos de transformación, proveyendo la información requerida para la evaluación de los respectivos productos del ajo.

III.5. IDENTIFICACION Y CUANTIFICACION DE ALINA UTILIZANDO EL METODO POR CLAR y CCF.⁽⁶⁵⁾

III.5.1 EN AJO FRESCO.

1 Equipo Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución.

2. Condiciones cromatográficas.

<i>Fase móvil</i>	Preparar una mezcla de buffer de fosfatos 0.045 M, acetonitrilo, 1,4-dioxano y tetrahidrofurano (69.9 : 25.0 : 2.9 : 2.2).
<i>Flujo</i>	1.0 mL/min.
<i>Presión</i>	No indicada
<i>Longitud de onda</i>	337 nm
<i>Volumen de inyección</i>	10 µL
<i>Columna</i>	4 mm x 10 cm.

3. Procedimiento para la identificación de alina.

A:

- Cortar la muestra de ajo deshidratado y congelado en pedazos pequeños.
- Transferir aproximadamente 1 g de la muestra a un extractor.
- Extraer con dos porciones de 20 mL de una mezcla de metanol y agua (1:1), combinando los extractos.
- Concentrar a un volumen pequeño (5 mL aproximadamente), usando un evaporador rotatorio. (Esta es la solución para analizar).
- Aplicar separadamente, "bandas" de 10-mm, 20 µL de cada una de las soluciones que contienen aproximadamente 0.5 mg de USP L-Metionina RS por mL (*Solución*

Estándar A), una solución de USP alina RS en una mezcla de metanol y agua (1:1) conteniendo 0.5 mg por mL (Esta es la *Solución Estándar B*), y la solución a analizar a un placa apropiada de Cromatografía de sílica gel en Capa Fina.

- Desarrollar las placas cromatográficas en una mezcla de alcohol butílico, alcohol propílico, ácido acético glacial y agua (3:1:1:1).
- Remover la placa de la cámara cromatográfica y dejar que se seque al aire.
- Rociar con una solución de ninhidrina 0.2% en una mezcla de alcohol butílico y ácido acético 2 N (95:5).
- Calentar de 100°C a 105°C por 10 minutos aproximadamente e inmediatamente examinar la placa.

La zona de color anaranjado rosáceo, justo debajo de la zona atribuida al estándar de la solución B, corresponde a la alina.

B:

- Transferir 10 g aproximadamente de dientes de ajo que hayan sido cortados en pedazos pequeños en un matraz apropiado.
- Agregar 10 mL de hidróxido de sodio 1 N y 10 mL de agua.
- Calentar el matraz hasta que hierva el agua durante 10 minutos, enfriar y filtrar.
- Agregar unas pocas gotas de solución de nitroferrocianuro TS recientemente preparado a 2 mL del filtrado: aparecerá un color rojo o rojo-anaranjado, lo cual indicará la presencia de compuestos sulfurados en el espécimen analizado.

C:

Una muestra que contenga alina, se inyecta al cromatógrafo y se identifica de acuerdo al tiempo de retención del pico mayor en el cromatograma de la solución analizada, correspondiente al cromatograma de la solución estándar, la cual se obtiene como se indica en el análisis para determinar el **contenido de alina**.

4. Procedimiento para determinar el contenido de alina.

Buffer de fosfatos 0.045 M.

- Disolver 1.24 g de fosfato de sodio monobásico en 100 mL de agua.
- Ajustar con hidróxido de sodio 0.2 M a un pH de 7.1.
- Diluir con agua a 200.0 mL y mezclar.

Buffer de fosfatos 0.05 M.

- Disolver 1.38 g de fosfato de sodio monobásico en 100 mL de agua.
- Ajustar con hidróxido de sodio 0.2 M a un pH de 9.5.
- Diluir con agua a 200.0 mL y mezclar.

Solución de Monoclorhidrato de Carboximetilamina.

- Disolver 109 mg de este compuesto en 100.0 mL de agua.

Reactivo de derivatización.

- Disolver 140 mg de o-ftaldialdehido en 5 mL de metanol en un matraz volumétrico de 50 mL.
- Agregar 100 μ L de t-butiltiol.
- Diluir con el buffer de fosfatos 0.05 M a volumen y mezclar.

Solución estándar.

- Disolver exactamente pesada la cantidad de Alina RS en una mezcla de metanol y agua (1:1).
- Diluir cuantitativa y cuidadosamente, con una mezcla de metanol y agua (1:1) hasta obtener una solución que tenga una concentración conocida de 0.05 mg por mL.
- Transferir 0.1 mL de esta solución a un vial septum.
- Agregar 0.5 mL del reactivo de derivatización y mezclar.
- Permitir un tiempo de reacción no menor de dos minutos antes de la inyección en el cromatógrafo.

La desviación estándar de las inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2.% para cada uno de los picos más altos.

Solución a analizar.

- Transferir, exactamente pesado, 10.0 g de dientes de ajo fresco y pelado, a un recipiente para homogeneizar 110 mL.
- Agregar 70.0 mL de la solución Monoclorhidrato de Carboximetoxilamina 0.01 M.
- Agitar a alta velocidad durante 30 segundos.
- Centrifugar y decantar el sobrenadante a un matraz volumétrico de 100 mL.
- Mezclar el sólido remanente en un recipiente con 20 mL de la solución de Monoclorhidrato de Carboximetoxilamina.
- Centrifugar y agregar el sobrenadante al matraz volumétrico anterior.
- Diluir el contenido del matraz con la solución de Monoclorhidrato de carboximetoxilamina al aforo y mezclar.
- Transferir 10.0 mL del sobrenadante homogeneizado a un matraz volumétrico de 100 mL y diluir con una mezcla de metanol y agua (1:1), llevar a la marca y homogeneizar.
- Agitar y transferir 0.1 mL de esta solución a un vial septum.
- Agregar 0.5 mL del reactivo de derivatización y mezclar.
- Permitir que se lleve a cabo la reacción en no menos de dos minutos antes de la inyección al cromatógrafo.

5. Cálculos.

- Calcular el porcentaje de alina en la porción del ajo tomada de la fórmula:

$$100(C/W)(r_U/r_S)$$

C: es la concentración en mg/mL de la solución estándar de Alina RS

W: es el peso, en gramos de los dientes de ajo pesados para la solución a analizar.

r_U y **r_S**: son las sumas de los picos correspondientes a los diastereómeros de alina obtenidos de la solución analizada y de la solución estándar, respectivamente.

No menos del 0.5% se debe encontrar, calculado en base seca.

II.5.2. IDENTIFICACION Y CUANTIFICACION DE ALINA EN AJO EN POLVO

La muestra de ajo en polvo, obtenida por deshidratación a temperatura menor de 65°C y su posterior liofilización, se almacena en contenedores apropiados y protegidos de la luz.

1. Contenido de alina.

Se utilizan los mismos reactivos que se mencionaron en el procedimiento del *contenido de alina* en ajo fresco (Buffer de fosfatos 0.045 M, buffer de fosfatos 0.05 M, Monoclorhidrato de carboximetoxilamina, reactivo de derivatización, la fase móvil, la solución estándar y el sistema cromatográfico).

Solución a analizar.

- Transferir aproximadamente 1.0 g de polvo de ajo, pesado con precisión, a un matraz.
- Agregar 30.0 mL de la solución de Monoclorhidrato de carboximetoxilamina y agitar vigorosamente hasta que el polvo se encuentre completamente disperso.
- Centrifugar hasta obtener una solución clara.
- Transferir 5.0 mL del sobrenadante a un matraz volumétrico de 10 mL.
- Diluir con Monoclorhidrato de carboximetoxilamina 0.01 M, llevarlo a la marca y mezclar.
- Utilizando una jeringa, transferir 0.1 mL de esta solución al vial septum.
- Agregar 0.5 mL del reactivo de derivatización y mezclar.
- Permitir que se lleve a cabo la reacción en no menos de dos minutos, antes de la inyección al cromatógrafo.
- Proceder como se indica en el análisis del contenido de alina del ajo fresco.

2. Cálculos.

Calcular el porcentaje de alina en la porción de ajo en polvo, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$6(C/W)(r_U/r_S)$$

C: es la concentración en mg por mL de la solución estándar de Alina RS.

W: es el peso, en g, de la muestra analizado de polvo de ajo.

r_U y **r_S** son las sumas de los picos correspondientes a los diasterómeros de la alina, obtenidos de la solución a analizar y la solución estándar, respectivamente.

Debe contener no menos del 0.3%, calculado en base seca.

III.6 MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

III.6.1. PARA LA DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE ALICINA Y TIOSULFINATOS TOTALES EN AJO POR ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA ⁽¹²⁾

La alicina (dialil tiosulfonato, $C_3H_5-S-S(O)-C_3H_5$) es el compuesto órganosulfurado más conocido que produce el ajo (*Allium sativum L.*) y como ya se ha mencionado, este compuesto no está presente en los dientes de ajo como tal, sino que es convertido inmediatamente a partir de su precursor, la alina (S-alil-L-cisteína sulfóxido) por la acción catalítica de la alinasa, cuando el ajo es machacado o macerado. Debido a su inestabilidad, la alicina no es producida comercialmente. Sin embargo, la alicina se puede sintetizar mediante la oxidación del dialil disulfuro con peróxido de hidrógeno en medio ácido y purificado utilizando Si-TLC. También la alicina se puede aislar por medio de extracciones del ajo homogeneizado con diclorometano mediante C_{18} -TLC.

Han y Lawson ⁽¹²⁾, pretenden con su estudio aplicar un método simple y sensible para la cuantificación de la alicina, comentan que aunque se han realizado estudios para la cuantificación de la alicina por la conversión indirecta de cualquiera de los dialil disulfuros o el alil mercaptano y analizado por Cromatografía de Gases, agregan que éste y los métodos por CLAR para la cuantificación de la alicina requieren de la alicina como estándar externo.

Por lo que en su trabajo describen un método espectrofotométrico para la determinación cuantitativa de alicina, donde una molécula de alicina reacciona rápidamente con dos moléculas de cisteína para formar dos moléculas de S-alil

mercaptocisteína (S-AMC, $C_3H_5-S-S-CH_2CH(NH)_2COOH$), así que este método no requiere de un estándar de alicina para cuantificar la alicina y aseguran que puede ser utilizado convenientemente para conocer la concentración total de los tiosulfinatos de los extractos de ajo.

1. Equipo. Espectrofotómetro Ultravioleta/Visible con celdas de cuarzo.

2. Condiciones espectrofotométricas de operación.

Longitud de onda 324 nm utilizando 4,4'-ditiodipiridina (DTDP) ó a
412 nm utilizando 2-nitro-5-tiobenzoato (NTB)

Coefficiente de extinción molar 19,800 utilizando DTDP
14,150 utilizando NTB

3. Preparación del ajo en polvo.

- El polvo de ajo se prepara cortando los dientes de ajo en rebanadas delgadas de 3 mm, secándolos a 50°C en un horno y pulverizándolas en un mortero.

El polvo, que aproximadamente conserva de 3-5% de humedad, se puede almacenar a temperatura ambiente hasta un año sin la pérdida de rendimiento de alicina.

El análisis de CLAR de la alicina y otros tiosulfinatos de los extractos de ajo se llevaron a cabo de acuerdo al procedimiento descrito por Lawson ⁽¹⁴⁾. Las principales variaciones, para la determinación cuantitativa de los tiosulfinatos, fueron menores al 7% en todos los casos.

Para obtener el coeficiente de extinción molar, la solución de cisteína la prepararon en fresco con buffer de Hepes 50 mM. La concentración de la cisteína la determinaron midiendo la cantidad de 2-nitro-5-tiobenzoato (NTB) formado después de la reacción

con DTNB, y el coeficiente de extinción molar (1 cm de paso de luz) fue de 14,150 a 412 nm por la liberación del anión NTB. Este valor del coeficiente de extinción molar lo utilizaron para realizar todos los cálculos.

Mencionan que su método propuesto es suficientemente sensible para cuantificar la concentración de la alicina en intervalos micromolares. Agregan que la sensibilidad de su análisis puede incrementarse cerca de 40% si se utiliza el 4,4'-ditiopiridina (DTDP) en lugar de DTNB, porque el producto reducido de DTDP, 4,4'-ditiopiridina, tiene una absorptividad de 19,800 a 324 nm, comparado con 14,150 de NTB a 412 nm.

Aseguran que los métodos de CG y CLAR son inseguros y que su método no requiere un estándar de alicina para la cuantificación de la alicina porque su método está basado en la cuantificación de la alicina utilizando un sistema muy estable: DTNB/NTB.

Comentan que el mecanismo de reacción de una molécula de alicina con dos moléculas de cisteína aún no es conocido. Pero que es posible que la alicina reaccione con la cisteína para formar S-AMC y ácido alil sulfínico (C_3H_5-S-OH), el cual reacciona con otra molécula de cisteína para formar una segunda molécula de S-AMC y agua. Agregan que también es posible que dos moléculas del ácido alil sulfénico dimerizado forme una molécula de alicina, la cual reacciona con otra molécula de cisteína.

Además de la alicina, el extracto de ajo contiene por lo menos otros siete tiosulfatos, los cuales constituyen del 20 al 40% del total de los tiosulfatos. Encontraron que todos los tiosulfatos del ajo son sulfhidrilos altamente reactivos y que como la alicina, una molécula de cualquier otro tiosulfato reacciona con dos moléculas de cisteína.

Comentan que las diferencias existentes en sus experimentos se deben a errores experimentales o por el hecho de que los coeficientes de extinción molar de tres de los tiosulfinatos menores no son conocidos exactamente, además de otros que no se han descubierto aún.

Agregan que la cantidad de tiosulfinatos también son un índice importante para la evaluación de la calidad de los productos del ajo, ya que también poseen actividades biológicas importantes.

Puntualizan que el extracto de ajo puede analizarse sin tiosulfinatos, preparándolo con carboximetoxilamina 10 mM, el cual es un potente inhibidor de la alinasa o bien con HCl 20 mM el cual inactiva irreversiblemente a la alinasa.

Ratifican que su método debería ser empleado para determinar la cantidad de alicina en extractos de ajo, pues constituye del 60-80% de los tiosulfinatos totales, o bien hacer una estimación de la concentración de alicina multiplicando el valor total de los tiosulfinatos por 0.7.

Agregan que puede ser utilizado su método para verificar la concentración del estándar de alicina para los métodos de CLAR Y CG.

III.6.2. DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE LOS COMPONENTES DEL AJO POR ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO⁽³⁵⁾

Se basa en la absorción de luz producida por la interacción de los grupos funcionales con energía radiante en el rango infrarrojo en función de la longitud de onda.

1. Equipo. El espectrofotómetro utilizado para registrar el espectro en la región del infrarrojo.
Celdas de material transparente al infrarrojo; como bromuro de potasio, cloruro de sodio (solubles en agua), cloruro de plata o bromuro de plata (insolubles en agua), y en superficies ópticamente planas. Las celdas de espesor fijo son apropiadas para análisis cualitativo.

2. Método para muestras sólidas.

a) Técnica de la pastilla de bromuro de potasio.

- Pulverizar en un mortero de ágata de 1.0 a 3.0 mg de la muestra.
- Agregar 300 mg a 400 mg de bromuro de potasio (previamente seco 5 horas a 105°C) u otro material transparente a la radiación infrarroja, moler y mezclar.
- Colocar correctamente el polvo homogéneo en una matriz cilíndrica de acero inoxidable y comprimir con la prensa hidráulica haciendo vacío durante 3 o 4 minutos. (La presión requerida normalmente para la preparación de la pastilla es de 1400 Kg/cm² a 1762 Kg/cm²).
- Secar durante 10 minutos a 15 minutos a 60°C. Al observar en forma visual la pastilla, debe ser transparente y uniforme.

3. Procedimiento.

- Ajustar el aparato con el blanco a cero de absorbancia o 100% de transmitancia antes de iniciar la determinación, así como el ajuste de ganancia y de las rejillas.
- Colocar la pastilla o celda que contiene la Solución de referencia en el soporte de la celda correspondiente al haz de la muestra colocando el blanco en el haz de referencia y proceder a registrar su espectro de absorción entre 4000 cm^{-1} y 670 cm^{-1} (2.5 micras a 15 micras).
- Posteriormente, registrar el espectro de absorción de la muestra, en las mismas condiciones de prueba.

Los siguientes espectrogramas se obtuvieron de la literatura revisada.

En el primer espectrograma (Fig. III.6.2.1) se muestran las bandas de la alicina, la cual fue obtenida a partir de la síntesis de dialil disulfuro, realizada por Jansen ⁽¹⁾.

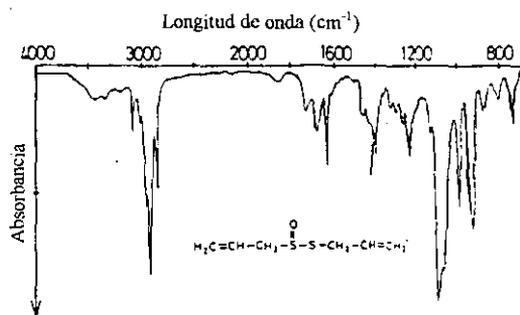


Fig. III.6.2.1. Espectro IR de alicina. El espectro de absorción fue tomado por un fotómetro (FT-IR). Una capa delgada de alicina pura sobre un "espejo de aluminio" fue analizada por la técnica de reflexión. El espectro muestra un pico a una longitud de 1090 cm^{-1} . (Este pico lo observaron después de la oxidación del dialil disulfuro).

En el segundo espectrograma se observan las bandas características de los grupos funcionales de la (+)-alina (S-alil-L-cisteína sulfóxido), la cual fue obtenida por Iberl *et al*⁽⁶⁾, a partir de la síntesis de S-alil-L-cisteína. (Fig. III.6.2.2)

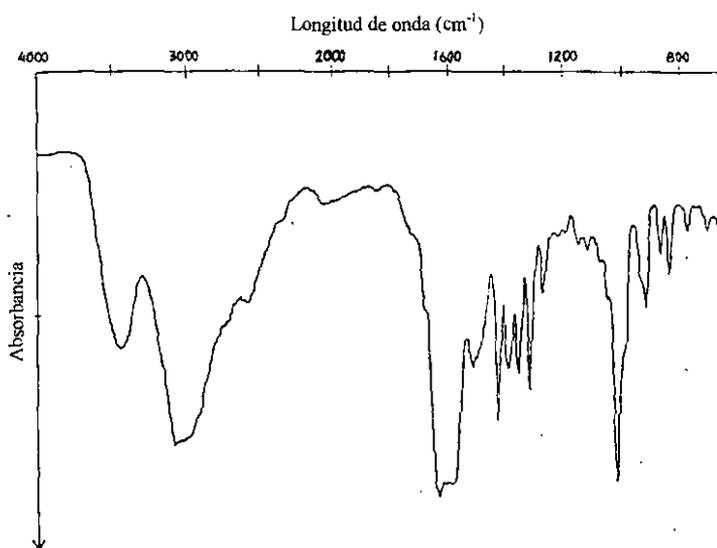


Fig. III.6.2.1. Espectro IR de L-(+)-alina, llevado a cabo en un espectrofotómetro IR Hitachi 260-10, en una técnica de transmisión. El contenido de alina fue de 0.5% con KBr. En el espectro se observa el pico de un grupo sulfóxido {C-S(O)-C} a 1020 cm^{-1} , además de las bandas características de un aminoácido a 1300 cm^{-1} ($-\text{NH}_3^+$) y alrededor de 1600 cm^{-1} están presentes los grupos ($-\text{COO}^-$, $-\text{NH}_3^+$).

En el tercer y cuarto espectrogramas (Figuras III.6.2.3 y III.6.2.4) se observan bandas muy similares a los anteriores espectrogramas. La muestra de ajo deodorizado, que no contiene aparentemente los componentes como la alicina y otros tiosulfatos, los

cuales son muy olorosos corresponde a la compañía Vernon Walden y la muestra de polvo de ajo con olor, corresponde a la compañía Pure Gar. Estos espectrogramas fueron proporcionados muy amablemente para este trabajo por "Gelcaps" de México.

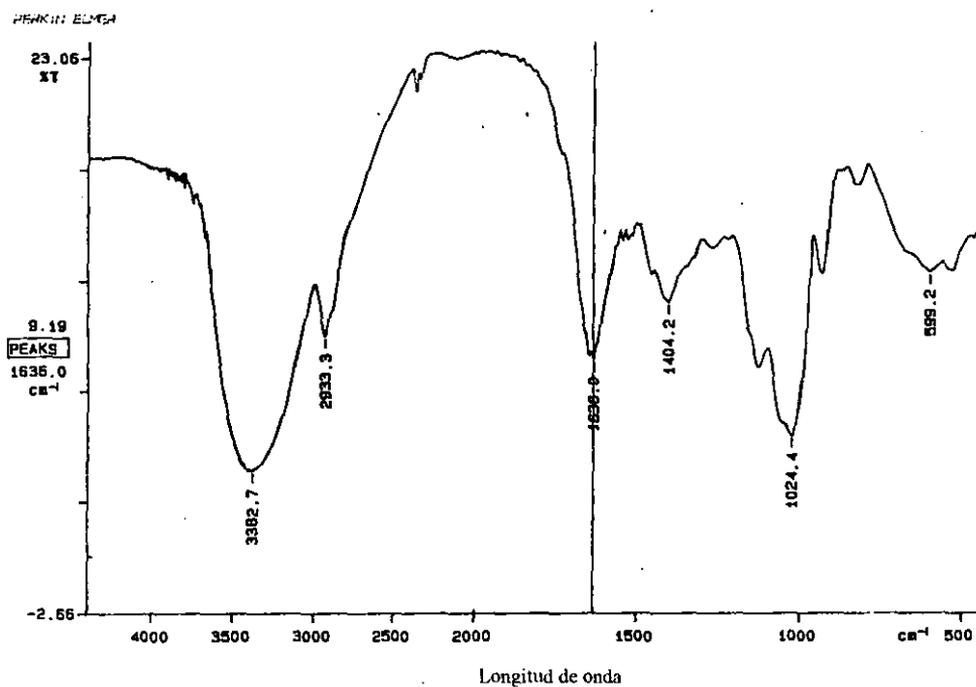
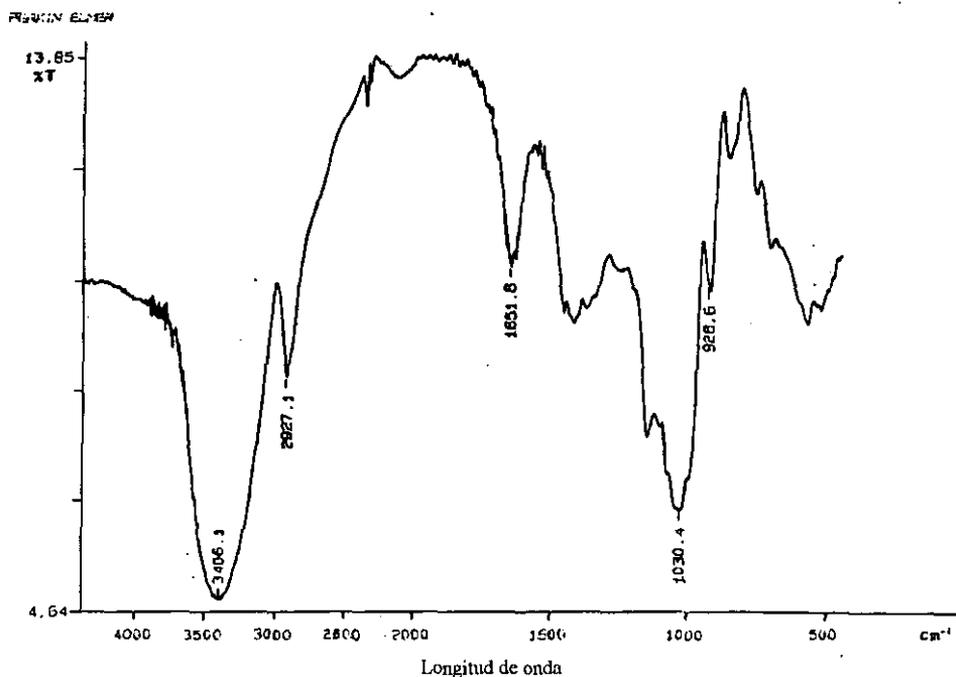


Fig. III.6.2.3. Espectro IR de Ajo en polvo, llevado a cabo en un espectrofotómetro mediante la técnica de transmisión (pastilla de KBr). En el espectro se observan las bandas características de un aminoácido en 3382.7 cm⁻¹ (-NH₃-) y a 1636 cm⁻¹ el grupo carboxilo (-COO-) y a 1024 cm⁻¹ el de sulfenidos.



99/06/15 07:55 Alicia H.
 λ: 4 scans, 16.0cm-1.
 Ajo deodorizado VM and 7224

Fig. III.6.2.4. Espectro IR de Ajo deodorizado, llevado a cabo en un espectrofotómetro mediante la técnica de transmisión. Se observan en el espectro bandas de aminoácidos a 3406.1 cm^{-1} , de los grupos carboxilo a 1651.8 cm^{-1} y de sulfóxidos a 1030.4 cm^{-1} .

A continuación, expongo un resumen en forma de cuadro, donde indico algunos datos que resalten las características, ventajas y desventajas de cada uno de los métodos descritos anteriormente, con el fin de compararlos y poder recomendar el que pudiera aplicarse en la práctica de algún laboratorio farmacéutico de medicina herbolaria. Quedando sobreentendido que faltaría hacer un estudio detallado sobre la validación del método sugerido.

CUADRO RESUMEN

M. A.	COMP.	F. MOVIL	FLUJO	P.	TEMP	λ	V.I.	COLUMNA (S)	T _R	E.R.	C.	VENTAJAS	DESVENTAJAS	OBSERVACIONES	REFERENCIA
Cromatografía de gases con detector de fotometría en flama	Alicina	---	Gas acarreador: Nitrogeno a 40 mL/min	No indicada	columna: 100°C De inyección: 140°C	No indicada	5 μ L	a) 2.1 m x 3.2 mm d.i. cubierta con OV-1 al 1% en una malla 80-100 Chromosorb WAW-DMCS b) 1.5 m x 3 mm d.i. cubierta con Advance DS 2% más H ₃ PO ₄ al 0.5%, malla 80-100 Chromosorb WAW-DMCS	4 y 4.2 min.	No lo menciona.	No lo menciona.	Excelente especificidad, resolución y sensibilidad utilizando la columna OV-1.	Se forman emulsiones en la extracción con dietil éter y el exacto de ajo con agua. Se forman disulfuros isoméricos por la deshidratación de la alicina.	Los condimentos analizados contienen alicina pero no alina. Los suplementos alimenticios contienen alina y no alicina. Los métodos propuestos pueden ser evaluados en términos del aseguramiento de la calidad de los productos del ajo.	(4) Koichi Saito y cols.
Cromatografía de gases con detector de ionización de flama y fotométrico	Alina	---	Gas acarreador: Helio. 10 mL/min.	No indicada	Horno 120°C Iny.: 140°C Detector: 150°C	---	---	Columna capilar SE-30, empacada con sílice 1.5 m x 0.24 cm d.i.	0.97 min.	No lo indica	No lo indica	Es un buen método de derivatización por sililación.	No es específico. Se requieren altas temperaturas, por lo que se descomponen fácilmente a la alicina.	Mediante trimetilsililación es posible detectar otros aminoácidos sulfurados como cisteína, metionina, etc.	(11) Hayashi y cols.
Cromatografía de Líquidos	Alina	a) Detector UV: Agua con elución isocrática b) Detector FL: Acetato de sodio 0.03 M (pH 7.0), acetonitrilo 66:34, v/v con bromuro de tetra-n-butilamonio 5 mM	a) Detector UV: 0.5 mL/min. b) detector or FL: 0.5 mL/min	---	---	a) UV: 210 nm b) FL: 405 nm y c) emisión a 480 nm	10 μ L para ambos detectores	a) Para la detección UV: Zorbax TMS 5 μ m, 250 mm x 4.6 mm d.i., DuPont, USA b) Para el detector FL: Nucleosil 5C18 5 μ m, 250 mm x 4 mm d.i. Macherey, FRG.	Sin diferencias significativas	No lo menciona	No lo menciona	La columna en fase reversa C18 da una mejor resolución Es sencillo y preciso. El método puede ser aplicado a otras plantas que contengan alina. Son estables los derivados de fluoróforo de alina. Trimetil silil (ODS)	Interferencia con los derivados de fluoróforo con fluroscamina. El uso de diferentes concentraciones de los eluyentes altera los resultados.	La temperatura, el tipo de columna y la composición de la fase móvil influyó en la cuantificación de alicina FL fue 10 veces más sensible y específica que UV. El método puede ser aplicado a otras plantas que contengan alina. No hay diferencias significativas entre los tiempos de retención y los picos observados en el intervalo de pH 2.5-8.0	(2) Emiko Mochizuki y cols.
Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. (CLAR)	Alicina	Metanol al 60 % en agua con ácido fórmico al 0.1%	0.8 mL/min	15 Mpa	---	205 y 254 nm	No indicada	Spherisorb ODS-2 5 μ m de 4.6 mm d.i. con una longitud de 40 mm y 250 mm para la columna analítica.	6.7 min	No lo menciona.	Bajo	La combinación de la columna de 40 mm y la de 250 mm en fase reversa dio excelente resolución. Obtuvieron una pureza del 99%. Mencionan que es un método simple. La alicina adsorbida en la sílica gel es de fácil manejo y más estable a -24°C.	Se requieren grandes del producto. La alicina pura es un líquido oleoso y de difícil tratamiento. Mencionan que la alicina no es un marcador apropiado para evaluar las preparaciones del ajo. Eluyentes tóxicos.	Afirman que se optimiza de la precisión usando do el estándar externo. Los solventes pueden afectar la actividad de la alinasa presente. La alicina no es estable a 4°C y se descompone en otros productos.	(1) Herwig Jansen.

MA.	COMP.	F. MOVIL	FLUJO	P.	TEMP	λ	V.I.	COLUMNA (S)	Tr	E.R.	C.	VENTAJAS	DESVENTAJAS	OBSERVACIONES	REFERENCIA
CLAR	Alicina	a) Metanol:agua (ác. fórmico 0.1%) (6:4) b) Acetonitrilo: agua:metano 1 = 50:41:9 c) Metanol:agua: etilacetato = 6:3:1	a) 0.8 ml/min b) 1.0 ml/min c) 1.0 ml/min	15 MPa	-----	254 nm	No indicado	Spherisorb ODS-2 (5 μ m) de 4.0 mm d.i. con una longitud de 40 mm y 250 mm para la columna analítica.	7.1 min. 3.47 min. 2.85 min.	No lo menciona	No lo menciona	Mencionan que se puede utilizar la alicina adsorbida en sílica gel como estándar externo confiablemente. Consideran que estos métodos son adecuados para la evaluación del ajo fresco y en polvo. Redujeron los tiempos de retención y una excelente resolución.	El procedimiento de derivatización causa mayores desviaciones.	Utilizaron la alicina sintetizada como estándar externo. Observaron datos analíticos similares determinando el contenido de alicina en diferentes muestras de ajo.	(6) Bernard Iberl
CLAR	Alina	Buffer de fosfatos 45 mM. 1,4-dioxano: acetonitrilo: tetrahidrofur an 79:22.5:6:1.5	0.7 ml/min	No indicada	-----	337 nm	No indicado	Spherisorb ODS-2 (3 μ m) de 4.0 mm d.i. con una longitud de 40 mm y 125 mm para la columna analítica.	13.3 min.	No lo menciona	No lo menciona	La alina en polvo es más estable que la alicina. La alina se puede adquirir comercialmente. Su determinación es suficiente para caracterizar la capacidad del ajo en generar alicina	El rendimiento de la alina fue menor del 4%. El metanol al 50% no logró inactivar a la alina.	Consideran que las aberraciones encontradas se debieron a una conversión enzimática incompleta. Es más fácil obtener alicina que alina en proporciones mayores.	(6) Bernard Iberl.
CLAR	Alina y derivados de S-alquenil-L-cisteína.	Utilizaron diferentes eluyentes, dependiendo del detector utilizado.	1.0 o 1.2 ml/min.	No indicada	-----	Diferentes, depende del detector.	No indicado	a) Spherisorb ODS 2 (3 μ m), 100 x 4 mm d.i. b) Parmacoat-RP-12 (3 μ m), con Hiperacromo, 120 x 4.6 mm d.i.	Diferente de los derivados de isoindoles	Muy estables, excepto los derivados de isoindoles	Alto	Sus reactivos son comúnmente utilizados en la derivatización. La técnica es de fácil manipulación. El proceso de derivatización es selectivo. La separación de los analitos es rápida y reproducible. El uso de electroactividad, fluorescencia y una alta absorbancia UV de los derivados de los isoindoles da una gran versatilidad en la detección selectiva y sensible. Da información adicional sobre los rangos completos de aminoácidos por el gradiente. El procedimiento de derivatización OPA/Tert.butilo es selectivo para las aminas primarias.	Los picos se traslaparon por la fase móvil utilizada. Sólo identificaron dos sustancias: alina y SMCO. No es sensible. Es muy costoso para análisis rutinario.	Se debe tener control de las temperaturas por la viscosidad del 1,4-dioxano. La precisión depende de la concentración. La determinación de alina es una buena alternativa para la evaluación del ajo y sus preparaciones. La alina es un buen estándar con respecto a la estabilidad. Los análisis por derivatización deben hacerse por duplicado para disminuir los errores. La cantidad de alina y alicina depende de las especies, la madurez, almacenamiento, medio ambiente, etc. del ajo.	(7) Ziegler y Sticher.

M.A.	COMP.	F. MOVIL	FLUJO	P.	TEMP	λ	V.I.	COLUMNA (S)	T _R	E.R.	C.	VENTAJAS	DESVENTAJAS	OBSERVACIONES	REFERENCIA
CLAR	ajoenes y ditiinas	acetonitrilo: agua: metanol. (50:41:9)	1.0 ml/min.	No indicada	----	254 nm	8 μ L	a) Para ajoene: Sephadex LH-20. b) Para vinilditiinas: Spherisorb ODS-2	Ajoene: 4.5 min.	No lo menciona	No lo menciona	Se pueden obtener los productos de transformación de la alicina sin contener activo el sistema alicina-alinasa para evaluar los productos del ajo. Es posible determinar la cantidad de alicina, conociendo los productos de transformación.	Pérdida de grandes cantidades de solventes orgánicos. Los productos de transformación de la alicina sintetizada son diferentes a los de la alicina natural El manejo de los ajoenes y ditiinas es difícil por ser compuestos oleosos.	La alicina sintética conservada en etanol o en aceite después de su transformación, reveló diferente composición al compararla con la generada en forma natural.	(5) Bernard Iberl.
CLAR Y CCF	Alina	Buffer de fosfatos 0.045 M, acetonitrilo, 1,4-dioxano y tetrahidrofurano (69.9:25.0:2.9)	1.0 ml/min	No indicada	----	337 nm	10 μ L	4 mm x 10 cm.	----	----	Bajo	La identificación es cualitativa, es sencilla. Los cálculos para la determinación cuantitativa es sencilla, tanto para el ajo fresco como para el ajo en polvo.	No incluye la cuantificación de los tiosulfatos totales.	En México aún no se ha aplicado esta metodología.	(65) USP 24
ESPECTROFOTOMETRICO. ULTRAVIOLETA	Alicina y tiosulfatos	No se utilizan en este método	No utilizado.	No utilizado	No utilizado	324 nm (DT DP) y 412 nm (NT B)	No utilizado	No utilizadas en este método.	No utilizado	Los reactivos son muy estables	No es costoso	El procedimiento para la extracción de ajo es muy sencillo. El método es sensible para la cuantificación de la alicina en rangos micromolares. No requiere std. externo. Los cálculos son sencillos.	Requiere temperaturas de -70°C. Se requiere de equipo de CLAR para la purificación de alicina sintética. No tiene el coeficiente molar de tres de los tiosulfatos menores.	La cantidad de tiosulfatos también es índice importante para evaluar la calidad de los productos del ajo: tienen actividad biológica. El método se puede utilizar para verificar la concentración del estándar de alicina para CLAR y CG.	(12) Han y Lawson
ESPECTROFOTOMETRICO. INFRARROJO	Alina	----	----	----	----	----	----	-----	----	Buena	No es costoso	Es sencillo de manejar.	Sólo sirve para identificar los grupos funcionales de los compuestos analizados.	----	(35) FEUM 6a. ed.

M.A.: Métodos Analíticos.

COMP.: Compuesto

F.: Móvil: Fase Móvil.

P.: Presión

TEMP: Temperatura

 λ : Longitud de onda.

V.I.: Volumen de Inyección.

E.R.: Estabilidad de reactivos

C.: Costo

CAPITULO IV

DISCUSION DE LOS METODOS ANALITICOS

El ajo es una planta muy conocida que ha trascendido en todos los continentes por poseer características medicinales, alimenticias (como condimento) e inclusive, dicen algunos, "facultades mágicas contra la maldad".

Después de miles de años de mantener al ajo en una posición mística, pasó a ser una de las más importantes plantas mejor conocida en la medicina herbolaria, pero ahora se le conoce con bases científicas comprobables, desde su aplicación terapéutica en el área de la clínica, hasta en su composición química mediante la determinación analítica por métodos instrumentales.

Los componentes activos del ajo son muchísimos, pero los más importantes son la alina, la alicina y sus derivados de sulfuro, pues todos ellos juegan un papel sobresaliente tanto en la salud de la gente como en el estudio químico analítico de productos farmacéuticos.

A pesar de que los estudios analíticos para la determinación de alicina y alina se ha venido dando desde hace tres décadas aproximadamente, es hasta 1999 ⁽⁶⁵⁾ que se publica oficialmente un método para la identificación y cuantificación de alina, mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR), como el mejor

marcador para evaluar, e incluso validar el equipo, los productos de ajo y el ajo fresco mismo.

Sin embargo, no se debe “echar en saco roto” las investigaciones que tan arduamente han realizado muchísimos investigadores al experimentar en sus laboratorios cuál es el mejor eluyente, la mejor columna, el mejor detector, el mejor gas acarreador, la mejor temperatura, en sí, las condiciones apropiadas que en este trabajo se presentan para los diversos métodos de separación, además de buscar el componente adecuado para la estandarización de los productos comerciales del ajo.

Ya se ha mencionado que la alina cumple con las mayores ventajas en comparación con la alicina, pues posee estabilidad, se puede almacenar a temperatura ambiente, el tiempo de vida media es largo, es de fácil manipulación, no es tóxica, es de fácil acceso comercial, independientemente de que pueda ser sintetizado en el propio laboratorio mediante reacciones y condiciones accesibles, sin grandes problemas, pero estas maravillosas propiedades sólo nos sirven para cuantificar y estandarizar productos comerciales, porque el hecho de que contengan alina, no se garantiza que el 100% de la materia prima lleve a cabo su completa biosíntesis natural en un organismo vivo (éste es un punto interesante para investigar).

Se deben destacar algunos aspectos importantes acerca de las ventajas de los métodos analíticos que describo en este trabajo, pues cada uno contiene características particulares que no se deben pasar por alto (aunque se pueden ver con detalle en el cuadro-resumen de los métodos analíticos para que el lector tome su propio juicio), las cuales pueden ser de gran utilidad al momento de hacer las determinaciones basadas en la monografía del ajo de la USP.

En uno de los métodos de Cromatografía de Gases (CG) se obtuvo buena especificidad y sensibilidad por la composición orgánica volátil de la alicina; sin embargo, la determinación no es directa, porque la alicina sufre una deshidratación formando disulfuros isoméricos. Aunque lograron obtener en el cromatograma los picos bien definidos de la alicina en los extractos de ajo, se considera que no es el mejor método para el análisis cuantitativo directo de la alicina. El otro método de CG ⁽¹¹⁾ que se reporta, lo realizaron específicamente para saber si podían obtener alicina a partir del cultivo celular, lo cual resultó positivo. Este método basado en derivatización por sililación lo realizaron con un estándar de serina, helio como gas de arrastre y altas temperaturas, lo cual lo hace no específico e inadecuado.

En los métodos de Cromatografía de Líquidos, utilizaron diferentes tipos de detectores (ultravioleta, fluorometría, electroquímicos, arreglo de diodos) y probaron con diferentes eluyentes como el agua, metanol:ácido fórmico, acetonitrilo:agua:metanol, metanol:agua:etilacetato, 1,4-dioxano:acetonitrilo:tetrahidrofurano con buffer de fosfatos a diferentes concentraciones cada uno; en este caso se debe tener particular cuidado con el uso del tipo de solvente en las muestras del ajo, pues ello afecta la actividad de la alicina, además se pueden traslapar varios picos por la composición de la fase móvil. También investigaron la longitud de onda y diferentes tipos de columnas observando diferencias marcadas en cada uno de estos parámetros cromatográficos, ya que los tiempos de retención varían mucho de una técnica a otra, pero siempre hay buena resolución. La cromatografía de líquidos resultó ser 10 veces más sensible y específica utilizando un detector de fluorescencia que el detector ultravioleta.

Todos los investigadores coinciden en que la cromatografía en fase inversa da mejores tiempos de retención y mejor resolución en sus picos.

En otro método propuesto, se separan los componentes del ajo fresco y preparaciones del ajo utilizando la técnica de derivatización para el análisis de aminoácidos (aminas primarias) llevándose a cabo la reacción entre éstas y el O-ftaldialdehído (OPA) en presencia de 2-mercaptoetanol (o cualquier alquiltiol). Esta técnica tiene las ventajas de que los reactivos son bastante estables, de reacción rápida y altos rendimientos, pero los derivados de isoindoles-sulfuro-sustituídos son un poco inestables; para solucionar este problema se debe incorporar un compuesto voluminoso.

Para lograr la reproducibilidad y precisión en el paso de la derivatización, se deben inyectar los estándares por duplicado. Para separar por completo los aminoácidos es bueno utilizar un gradiente de elución con multisolventes selectivos.

Se recomienda utilizar el procedimiento de derivatización OPA/tert-butilo debido a su selectividad, sólo las aminas primarias están involucradas en la reacción. La desventaja de este método propuesto es que no es específico, pues no es posible detectar todos los compuestos derivados de isoindoles. También es importante señalar que la precisión del método depende en gran manera de la concentración de las muestras y reactivos.

Como ya se ha mencionado, es necesario identificar los productos de transformación de alicina en preparaciones comerciales, especialmente los alquil sulfuros, así que para caracterizar y determinar su concentración, la alicina se obtiene dependiendo de la polaridad de los solventes, obteniendo cantidades relativamente grandes de los componentes sintetizados. Este procedimiento causa la pérdida de grandes cantidades de solventes orgánicos y es difícil la manipulación del ajoene y de las ditiinas, por sus

propiedades oleosas, por lo que no es suficientemente conveniente para evaluar los productos respectivos.

En cuanto al procedimiento establecido en la Monografía Oficial del ajo de la USP 24, para la identificación y cuantificación de alicina, éste es muy sencillo de realizar. De hecho, mucho de la metodología allí descrita, está basada en los estudios descritos en este trabajo monográfico.

Se sugiere, que además de la cuantificación de alicina en extractos de ajo en polvo, se debe realizar la identificación y determinación de alicina y los tiosulfatos totales mediante el método espectrofotométrico Ultravioleta/Visible, pues la alicina constituye del 60 al 80% de los tiosulfatos totales y permite estimar la capacidad de generación del ajo, lo cual depende del sistema alicina/alinasa. Las ventajas de este análisis son las siguientes:

1. El procedimiento es sencillo.
2. Los reactivos son fáciles de adquirir, no son tóxicos y son de fácil manejo.
3. El método es sensible y reproducible.
4. Los cálculos para la determinación de la concentración de alicina y los tiosulfatos, es muy sencilla.
5. Es accesible el método y el equipo.
6. El método analítico no es caro.

Aunque como todo, su gran inconveniente es que la alicina es muy inestable y es oleosa, se debe mantener en condiciones muy especiales, como son:

1. Temperaturas de -70°C .
2. Se debe preparar al momento pues tiene un tiempo de vida media muy corto.

3. Se debe almacenar en lugar oscuro.
4. Utilizar los solventes adecuados para evitar su degradación.

Sin embargo, estas desventajas se pueden prevenir si se poseen los medios para cumplir con las condiciones descritas y poder obtener resultados óptimos al aplicar esta sencilla metodología.

CONCLUSIONES

No cabe la menor duda la efectividad terapéutica que tiene el ajo fresco para prevenir diversas patologías muy comunes en nuestro medio, como son el cáncer y la hipercolesterolemia; también su capacidad para aliviar gripas comunes, incrementar la respuesta inmunológica del organismo, sus propiedades microbiológicas, etc. Estas se han atribuido a la alicina y sus derivados de sulfuro. Es por ello que esta liliacea ha sido tan famosa desde tiempos ancestrales.

Por las diversas investigaciones que se han realizado para conocer la cantidad mínima necesaria que se debe consumir de ajo fresco o extracto de polvo de ajo y lograr obtener los beneficios para la salud, la dosis diaria debe ser de 4 g de ajo fresco al día ó 1 g de extracto de ajo (equivalente al 2% del contenido de alicina).

En cuanto al método analítico que se debe utilizar para la identificación y cuantificación de alicina es en primer lugar el de CLAR y en segundo lugar es mediante

espectroscopía ultravioleta por su reproducibilidad, sensibilidad, accesibilidad y economía, aunque tenga la desventaja de no ser selectivo, ya que se cuantifican los tiosulfatos totales, incluyendo a la alicina.

El componente del ajo más apropiado para la evaluación, identificación y cuantificación de los productos del ajo y sus preparaciones (e inclusive calibración del equipo) es la alina. Es un buen estándar por su estabilidad tanto en la forma cristalina como en solución.

Es necesario llevar un control de calidad de todos los materiales y todos los pasos en la producción de las preparaciones fitoquímicas de la industria herbolaria, no se debe descartar la posibilidad de la variabilidad del contenido de la alina, pues si no está presente, probablemente se transformó completamente en alicina o bien durante el proceso de extracción del ajo se descompusieron estos principios activos, por lo que tendría que revisarse el proceso para la obtención de la materia prima. En estos pasos, la alicina representa el primer producto de degradación enzimática, ayudando a conocer mejor la conversión del sistema alina-alinasa-alicina.

Este trabajo de tesis queda abierto para ser adaptado y utilizado en la determinación de alina, alicina y sus derivados sulfurados, en cualquier forma farmacéutica de las diferentes preparaciones comerciales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Jansen, Herwig; Müller, Bernd; Knobloch Karl. ALLICIN CHARACTERIZATION AND ITS DETERMINATION BY HPLC. (1987) *Planta Médica*, Vol. 53, pp. 559-562.
2. Mochizuki, Emiko; Nakayama, Akira; Kitada, Yoshimi; Saito, Koichi. LIQUID CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF ALLIN IN GARLIC AND GARLIC PRODUCTS. (1988) *Journal of Chromatography*, 455, pp. 271-277.
3. Koch, Jürgen; Berger, Lutz; Viergge-Reiter, Christiane. ALLICIN IN KNOBLAUCH - *Allium sativum* L.- UND KNOBLAUCHPRÄPARATEN: GEHALTSBESTIMMUNG MITTELS HEADSPACE-GASCHROMATOGRAPHIE. (1989). *Panta Médica*, 55, pp.327-331.
4. Saito, Koichi; Horie, Masakazu; Hoshino, Youji; Mochizuki, Emiko. DETERMINATION OF ALLICIN IN GARLIC AND COMMERCIAL GARLIC PRODUCTS BY GAS CHROMATOGRAPHY WITH FLAME PHOTOMETRIC DETECTION. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* (1989), Vol. 72, No. 6. pp. 917-920.
5. Iberl, Bernhard; Winkler, Georg; Knobloch, Karl. PRODUCTS OF ALLICIN TRANSFORMATION: AJOENES AND DITHIINS, CHARACTERIZATION AND THEIR DETERMINATION BY HPLC (1990) *Planta Médica*, Vol. 56, pp. 202-211.
6. Iberl, Bernhard; Winkler, Georg; Knobloch, Karl. QUANTITATIVE DETERMINATION OF ALLICIN AND ALLIIN FORM GARLIC BY HPLC. (1990) *Planta Médica*, Vol. 56, pp. 320-326.
7. Ziegler, S.J.; Sticher, O. HPLC OF S-ALQ(EN)IL-L-CYSTEINE DERIVATIVES IN GARLIC INCLUDING QUANTITATIVE DETERMINATION OF (+)-S-ALLYL-L-CYSTEINE SULFOXIDE (ALLIIN). (1989), *Planta Médica*, Vol. 55, pp. 372-378.
8. Biani, Gabriele; Spangenberg, Bernd. ALLICIN-FREISETZUNG AUS GETROCHNETEM KNOBLAUCH (*Allium sativum*): EINE EINFACH DURCHZUFÜHRENDE HPTLC-SIMULTANBESTIMMUNG VON ALLICIN UND AJOEN IN KNOBLAUCHPULVER UND DARAUS HERGESTELLTEN FERTIGARZNEIMITTELN. (1991) *Planta Médica*, Vol. 57, pp. 371-375.
9. Ohsumi, Chieko; Hayashi, Takahisa; Sano, Konosuke. FORMATION OF ALLIIN IN THE CULTURE TISSUES OF ALLIUM SATIVUM. OXIDATION OF S-ALLYL-L-CYSTEINE. *Phytochemistry*, Vol. 33, No. 1. pp. 107-111.
10. Weber, Norber; Andersen, Douglas; North, James; Murray, Byron; Lawson, Larry. IN VITRO VIRUCIDAL EFFECTS OF *Allium sativum* (GARLIC) EXTRACT AND COMPOUNDS. (1992) *Planta Médica* Vol. 58, pp. 417-423.
11. Hayashi, Takahisa; Sano, Konosuke; Ohsumi, Chieko. GAS CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS OF ALLIIN IN THE CALLUS TISSUES OF *Allium sativum*. (1993) *Biosci, Biotech, Biochem*, Vol. 57 (1), pp. 162-163.
12. Han, Joan; Lawson, Larry; Han, Grace; Han, Peter. A SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF ALLICIN AND TOTAL GARLIC THIOSULFINATES. (1995) *Analytical Biochemistry* Vol. 225, pp. 157-160.

13. Lawson, Larry; Wang, Zhen-Yu; Hughes, Bronwyn. IDENTIFICATION AND HPLC QUANTITATION OF THE SULFIDES AND DIALK(EN)YL THIOSULFINATES IN COMMERCIAL GARLIC PRODUCTS. (1991) *Planta Médica*, Vol. 57, pp. 363-370.
14. Lawson, Larry; Wang, Zhen-Yu; Hughes, Bronwyn. γ -GLUTAMYL-S-ALKYL-CYSTEINES IN GARLIC AND OTHER ALLIUM SPP. PRECURSORS OF AGE-DEPENDENT TRANS-1-PROPENYL THIOSULFINATES. (1991). *Journal of Natural Products*. Vol. 54 No. 2 pp. 436-444.
15. Kalra, C.L. HARVESTING, HANDLING, STORAGE, CHEMISTRY, PHARMACOLOGICAL PROPERTIES AND TECHNOLOGY OF GARLIC (*Allium sativum* L) A review. (1987) *Indian Food Packer*, Vol. 47, No. 2, pp. 56-80.
16. Kiyoshi Kominato. THE WONDER OF GARLIC. *Historia de las investigaciones. Gelcaps*, 1999. pp. 1-11.
17. Phelps, Stacy; Harris, William. GARLIC SUPPLEMENTATION AND LIPOPROTEIN OXIDATION SUSCEPTIBILITY. (1993) *Lipids*. Vol. 28, No. 5, pp. 475-477.
18. Mayeux, P; Agrawal, K; Tou, J.S.; King, B; McNamara, D. THE PHARMACOLOGICAL EFFECTS OF ALLICIN, A CONSTITUENT OF GARLIC OIL. (1988) *Agents and Actions*, Vol. 25, 1/2, pp. 182-190.
19. Yeh, Yu-Yan; Yeh, Shaw-Mei. GARLIC REDUCES PLASMA LIPIDS BY INHIBITING HEPATIC CHOLESTEROL AND TRIACYLGLYCEROL SYNTHESIS. (1994) *Lipids*, Vol. 29, No. 3, pp. 189-193.
20. Cheng-Tzu Liu, Haw-Wen Chen, Lee-Yan Sheen, Yun-Lan Kung, Paul Chih-Hsueh Chen, Chong-Kuei Lii. EFFECT OF GARLIC OIL ON HEPATIC ARACHIDONIC ACID CONTENT AND IMMUNE RESPONSE IN RATS. (1998) *J. Agric. Food Chemm.* Vol. 46, pp. 4642-4647.
21. Hoffman, E.J. GARLIC AND ALLICIN AND OTHER SULFUR-CONTAINING COMPOUNDS AS ANTICANCER AGENTS. (January, 1999) *Townsend Letter for Doctors and Patients*. pp. 55-59.
22. Hervé Lot, Véronique Chovelon, Sylvie Souche, Brigitte Delecotte. EFFECTS OF ONION YELLOW DWARF AND LEEK YELLOW STRIPE VIRUSES ON SYMPTOMATOLOGY AND YIELD LOSS OF THREE FRENCH GARLIC CULTIVARS. (December, 1998) *Plant disease*. Vol. 82 No. 12, pp. 1381-1385.
23. Abrams, Gary A.; Fallon, Michael B. TREATMENT OF HEPATOPULMONARY SYNDROME WITH *Allium sativum*, L. (Garlic). (October, 1998) *J. Clinical Gastroenterology*. Vol. 27, No. 3, pp. 232-235.
24. Ahmed, R.S.; Sharma, S.B. BIOCHEMICAL STUDIES ON COMBINED EFFECTS OF GARLIC (*Allium sativum* Linn) AND GINGER (*Zingiber officinale* Rosc) IN ALBINO RATS. (August, 1997) *Indian Journal of Experimental Biology*. Vol. 35, pp. 841-843.
25. McCrindle, Brian W. Helden, Elizabeth; Conner, William T. GARLIC EXTRACT THERAPY IN CHILDREN WITH HYPERCHOLESTEROLEMIA. (November, 1998). Vol. 152. No. 11, pp. 1089-1093.
26. Muñoz Ayala, Ma. de Jesús. TESIS: EVALUACION DEL PRINCIPIO ACTIVO DEL *Allium sativum* (ALICINA) CONTRA DERMATOFITOS *in vitro* E *in vivo* EN EL TRATAMIENTO DE TIÑAS DEL CUERPO E INGUINAL. (1989) *Facultad de Química, UNAM*. pp. 9-24, 28-33.

27. Delgadillo Sánchez, Felipe. TESIS: "CONTROL INTEGRADO DE LA PUDRICIÓN BLANCA (*Sclerotium cepivorum* Berk) EN EL CULTIVO DE AJO (*Allium sativum* L.). Universidad de Chapingo, Montecillo Texcoco, Edo. de México. 1998. p.70-86.
28. Sánchez Sánchez, Ernesto. TESIS: "EVALUACION DEL EXTRACTO DE AJO COMO ESTIMULADOR DE LA BROTAACION DEL CIRUELO JAPONES (*Prunus salicina* L.) SANTA ROSA. Universidad de Chapingo, Montecillo Texcoco, Edo. de México, 1992. p. 28
29. Prihoda, Antonin. PLANTAS Y SALUD. Prihoda. Ed. Susaeta. 1a. ed. Artra, Praga. 1989. p. 28.
30. PURE-GAR. Phyto Nutrients. Product Specifications and Technical Support. Deodorized (Aged) Garlic Products versus Conventional Allicin Containing Garlic Products. 1999.
31. Blumenthal, Mark. THE COMPLETE GERMAN COMMISSION E MONOGRAPHS. Therapeutic Guide to Herbal Medicines. Ed. American Botanical Council, Austin, Texas. 1998. p.616.
32. FOOD CHEMICALS CODEX. Committee on Food Chemicals Codex, Fourth edition. Effective July 1, 1996, Washington, D.C. pp. 166.
33. Griffith, H. Winter. VITAMINS, HERBS, MINERALS AND SUPPLEMENTS. The Complete Guide. Ed. Fisher Books, Washington, D.C: 1988. pp. 213-215, 325.
34. BRITISH HERBAL PHARMACOPEIA (BP), 4a. ed., Gran Bretaña, 1996. pp. 85-87.
35. FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS (FEUM). 6a. ed., México, 1994. pp. 141, 143, 209.
36. INTERNET. Por error de omisión, no cuento con la dirección o referencia de donde se obtuvo la información.
37. Berger, Paul. EL PODER CURATIVO DEL AJO. 1a. ed. Ed. Selector, México, 1997. pp. 158.
38. THE MERCK INDEX. An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. Twelfth edition. Whitehouse Station, NJ, 1996. pp. 48, 49, 54.
39. Mader, F.H. TREATMENT OF HYPERLIPIDAEMIA. WITH GARLIC-POWDER TABLETS. EVIDENCE FROM THE GERMAN ASSOCIATION OF GENERAL PRACTITIONERS'. MULTICENTRIC PLACEBO-CONTROLLED DOUBLE BLIND STUDY. (October, 1990), Vol. 40. No. 10. pp. 1111-1116.
40. Tang Z., Sheng Z., Liu S., Jian X., Sun K., Yan M. THE PREVENTING FUNCTION OF GARLIC ON EXPERIMENTAL ORAL PRECANCER AND ITS EFFECT ON NATURAL KILLER CELLS, T-LYMPHOCYTES AND INTERLEUKIN-2. Human I Ko Ta Hsueh Hsueh Pao (1997); Vol. 22. No. 3, p. 246-248.
41. Singh A, Shukla Y. ANTITUMOR ACTIVITY OF DIALLYL SULFIDE IN TWO-STAGE MOUSE SKIN MODEL OF CARCINOGENESIS. Biomed Environ Sci, (September, 1998), Vol. 11 No. 3. p. 258-263.
42. Singh A, Shukla Y. ANTITUMOR ACTIVITY OF DIALLYL SULFIDE ON POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBON-INDUCED MOUSE SKIN CARCINOGENESIS. Cancer Lett. (September 25, 1998). Vol. 131 No. 2, p. 209-214.
43. Wargovich, MJ. DIALLYL SULFIDE, A FLAVOR COMPONENT OF GARLIC (*Allium sativum*), INHIBITS DIMETHYLHYDRAZINE-INDUCED COLON CANCER. Carcinogenesis. (Marzo, 1987), Vol. 8. No. 3, p. 487-489.

44. You W.C., Zhang L., Gail M.H., Ma J.L., Chang Y.S., Blot W.J., Li J.Y., Zhao C.L., Liu W.D., Li H.Q., Hu Y.R., Bravo J.C., Correa P., Wu G.W., Fraumeni J.F. Jr. *Helicobacter pylori* INFECTION, GARLIC INTAKE AND PRECANCEROUS LESIONS IN A CHINESE POPULATION AT LOW RISK OF GASTRIC CANCER. *Ing J. Epidemiol.* (December, 1998) Vol. 27, No. 6 p. 941-944.
45. Hu P.J., Wargovich M.J. EFFECT OF DIALLYL SULFIDE ON MNNG-INDUCED NUCLEAR ABERRATIONS AND ORNITHINE DECARBOXYLASE ACTIVITY IN THE GLANDULAR STOMACH MUCOSA OF THE WISTAR RAT. *Cancer Lett.* (September 15, 1989), Vol. 47. No. 1-2. p. 153-158.
46. Vorberg G, Schneider B. THERAPY WITH GARLIC: RESULTS OF A PLACEBO-CONTROLLED, DOUBLE-BLIND STUDY. *Br J. Clin Pract Suppl.* (August, 1990) Vol. 69. p. 7-11.
47. Auer W., Eiber A., Hertkorn E., Hoehfeld E., Koehrl U., Lorenz A., Mader F., Merx W., Otto G., Schmid-Otto B., et al. HYPERTENSION AND HYPERLIPIDAEMIA: GARLIC HELPS IN MILD CASES. *Br J Clin Pract Suppl.* (August, 1990), Vol. 69, p. 3-6.
48. Bordia A. EFFECT OF GARLIC ON BLOOD LIPIDS IN PATIENTS WITH CORONARY HEART DISEASE. *Am. J. Clin Nutr* (October, 1981). Vol. 34, No. 10 p. 2100-2103.
49. Klepser T.B., Klepser M.E. UNSAFE AND POTENTIALLY SAFE HERBAL THERAPIES. *Am J Health Syst Pharm* (January 15, 1999), Vol. 56, No. 2, p. 125-138.
50. Bordia A, Verma SK, Srivastava KC. EFFECT OF GARLIC (*Allium sativum*) ON BLOOD LIPIDS, BLOOD SUGAR, FIBRINOGEN AND FIBRINOLYTIC ACTIVITY IN PATIENTS WITH CORONARY ARTERY DISEASE. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, (April, 1998). Vol. 58, No. 4, p. 257, 263.
51. Isaacsohn J.L., Moser M., Stein E.A., Dudley K., Davey J.A., Liskov E., Black H.R. GARLIC POWDER AND PLASMA LIPIDS AND LIPOPROTEINS: A MULTICENTER, RANDOMIZED, PLACEBO-CONTROLLED TRIAL. *Arch Intern Med* (June 8, 1998) Vol. 158, No. 11, p. 1189-1194.
52. Challier B, Perarnau J.M., Viel J.F. GARLIC, ONION AND CEREAL FIBRE AS PROTECTIVE FACTORS FOR BREAST CANCER: A FRENCH CASE-CONTROL STUDY. *Eur J. Epidemiol* (December, 1998) Vol. 14, No 8, p. 737-747.
53. Fukushima S, Takada N, Hori T, Wanibuchi H. CANCER PREVENTION BY ORGANOSULFUR COMPOUNDS FROM GARLIC AND ONION. *J. Cell Biochem Suppl.* (1997), Vol. 27. p. 100-105.
54. Chen G.W., Chung J.G., Hsieh C.L., Lin J.G. EFFECTS OF THE GARLIC COMPONENTS DIALLYL SULFIDE AND DIALLYL DISULFIDE ON ARYLAMINE N-ACETYLTRANSFERASE ACTIVITY IN HUMAN COLON TUMOUR CELLS. *Food Chem Toxicol.* (Sep-Oct, 1998) Vol. 36, No. 9-10, p. 761-770.
55. Neil A, Silagy C. A META-ANALYSIS OF THE EFFECTS OF GARLIC ON BLOOD PRESSURE AND SERUM LIPIDS. <http://www.mistral.co.uk/garlic/metaanal.htm>.
56. GARLIC CLOVES, *Allium sativum*. <http://www.herbalgram.org/g.htm>.
57. Murray, Michael T. THE HEALING POWER HERBS, N.D. 2a. ed. EUA, 1995. pp. 121-131.

58. Heinerman, John. HEINERMAN'S ENCYCLOPEDIA OF HEALING HERBS & SPICES. Ed. Prentice Hall. New Jersey, 1996. pp. 244-250.
59. May, Ana. EL PODER CURATIVO DEL AJO. 1a. ed. Grupo Editorial Tomo, S.A. de C.V., México, 1998. p.110.
60. Cavallito, C.J. y Bailey J.H. J. THE ANTIBACTERIAL PRINCIPLE OF *Allium sativum*. (1945), Am. Chem. Soc. Vol.67, pp.1032-1033.
61. García de Marina, A., Del Castillo, B. CROMATOGRAFIA DE ALTA RESOLUCION. 1a. ed. Ed. Limusa, S.A. de C.V., México, 1988. p. 252.
62. Imada, O. TOXICITY ASPECT OF GARLIC. In abstract of the First World Congress on the Health Significance of Garlic and Garlic Constituents (1990). p. 47.
63. Block E. THE ORGANOSULFUR CHEMISTRY OF THE GENUS ALLIUM. IMPLICATIONS FOR THE ORGANIC CHEMISTRY OF SULFUR. (1992) Angew. Chem. Int Ed. Engl. Vol.31. pp. 1135-1178.
64. INTERNET. <http://www.Kyolic.com/news/ut.htm>. AGED GARLIC EXTRACT VS. ALLERGIES AND OTHER AILMENTS. July 7, 1998.
65. Unites States Pharmacopoeia (USP) 1999. Ed. 24 Convention Inc. Twin Brook Parkway, Rockville, MD. 20852. Official Monographs of Garlic. National Formulary 19. pp. 2455-2456.
66. Steiner, M. and Lin, R.I. CHANGES IN PLATELET FUNCTION AND SUSCEPTIBILITY OF LIPOPROTEINS TO OXIDATION ASSOCIATED WITH ADMINISTRATION OF AGED GARLIC EXTRACT. (1998). J. Cardiovascular Pharmacol. Vol. 31. pp. 904-908.
67. Liu, L. and Yeh, Y.Y. INHIBITION OF CHOLESTEROL BIOSYNTHESIS BY ORGANOSULFUR COMPOUNDS DERIVED FROM GARLIC. (1998) FASEB A 261. P. 1523.
68. Sigounas, G., Hooker, J., Anagnostou, A. and Steiner, M. S-ALLYLMERCAPTOCYSTEINE INHIBITS CELL PROLIFERATION AND REDUCES THE VIABILITY OF ERYTHROLEUKEMIA, BREAST AND PROSTATE CANCER CELL LINES. (1997). Nutr. Cancer Vol. 28. Nol. 2. pp. 153-159.
69. Wei, Z. and Lau, B.H.S. GARLIC INHIBITS FREE RADICAL GENERATION AND AUGMENTS ANTIOXIDANT ENZYME ACTIVITY IN VASCULAR ENDOTHELIAL CELLS. (1998). Nutr. Res. Vol. 18. No. 1, pp. 61-70.
70. Lau, B.H.S.; Yamasaki, T.; Gridley, D.S. GARLIC COMPOUND MODULATE MACROPHAGE AND T-LYMPHOCYTE FUNCTIONS. (1991) Mol. Biother. Vol. 3, pp. 103-107.
71. Agrawal, Renu; Mohanty, Bibhudatta; Singh Narendra, Patwardhan Madhav. PARAMETERS AFFECTING ALLICIN FORMATION AS A SECONDARY METABOLITE BY STATIC CULTURES OF *Allium sativum*. (1991) J. Sci. Food Agric. Vol. 57, pp. 155-162.
72. Pérez Mendoza, Joel. TESIS: CONTROL QUIMICO DE LA PALOMILLA DE LOS GRANEROS *Plodia interpunctella* (Huber) EN AJO ALMACENADO EN BODEGAS COMERCIALES DE GUANAJUATO. Informe de Investigación ciclo 1989-1990. SAHR. p. 25.