

TESIS DE GRADO
LICENCIATURA EN BROMATOLOGÍA

**“TRANSFORMACIONES DE COMPUESTOS
ORGANOAZUFRADOS PRESENTES EN *Allium* sp.
SOMETIDOS A DIVERSAS CONDICIONES
EXPERIMENTALES. DESARROLLO Y VALIDACIÓN
DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA SU
DETERMINACIÓN”**



Analía Emilce Lucero

Directora de Tesis: Dra. Alejandra B. Camargo

Co-directora: Dra. Jorgelina C. Altamirano



Mendoza, 2012.

Trabajo subsidiado por Proyecto SECTyP, Universidad Nacional de Cuyo (2011- 2013), denominado:
“Principios bioactivos en alimentos: consecuencias de prácticas culinarias sobre la estabilidad
química y los efectos biológicos”.

TESIS DE GRADO
LICENCIATURA EN BROMATOLOGÍA

**“TRANSFORMACIONES DE COMPUESTOS
ORGANOAZUFRADOS PRESENTES EN *Allium* sp.
SOMETIDOS A DIVERSAS CONDICIONES
EXPERIMENTALES. DESARROLLO Y VALIDACIÓN
DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA SU
DETERMINACIÓN”**

Analía Emilce Lucero

Directora de Tesis: Dra. Alejandra B. Camargo

Co-directora: Dra. Jorgelina C. Altamirano

Comité Evaluador: Presidente: Lic. Quím. Rosa Medina de Días

Vocal: Ing. Quím. Armando Navarro

Vocal: Lic. Brom. Adriana Giménez

Suplente: Ing. Agr. Susana Campos

Universidad Nacional de Cuyo

Facultad de Ciencias Agrarias

Mendoza, 2012.

AGRADECIMIENTOS

A todas aquellas personas que hicieron posible realizar el presente trabajo:

- ❖ A mi familia, por su amor incondicional, confianza, y por brindarme la posibilidad de acceder al estudio y poder alcanzar los objetivos planteados en mi vida.
- ❖ A mi novio y amigos por sus sabios consejos e incansable apoyo y estímulo durante la realización de mi tesis.
- ❖ A mi directora de tesis, Dra. Alejandra B. Camargo, quien me otorgó la posibilidad de realización de este trabajo, siendo una guía durante el desarrollo del mismo, instruyéndome siempre que fue necesario y permitiéndome acceder al equipamiento del Laboratorio de Cromatografía para Agroalimentos.
- ❖ A mi co-directora, Dra. Jorgelina C. Altamirano, por su colaboración, orientación y permitirme desarrollar este trabajo en las instalaciones del Laboratorio de Investigaciones y Servicios Ambientales Mendoza (CCT CONICET-MENDOZA).
- ❖ A la Dra. Roxana González, por su gran colaboración y enseñanzas brindadas.
- ❖ A mis compañeras Lic. Daniela Locatelli, Lic. Cecilia Fusari y Brom. Natalia Vidoni, por su amistad, solidaridad, por todo el apoyo brindado y principalmente por estar siempre presentes durante el desarrollo de mi tesis.
- ❖ A la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cuyo por la formación profesional recibida.

Numerosas investigaciones científicas sugieren que las propiedades biológicas y medicinales del ajo son debidas a su alto contenido de compuestos organoazufrados. Los tiosulfatos que se forman cuando se machaca el ajo son muy reactivos y experimentan un gran número de transformaciones dependiendo de la temperatura, pH y condiciones de extracción. De todo lo expuesto es que surge la necesidad de encarar un estudio tendiente a evaluar las fuentes de variabilidad existentes durante el proceso analítico en orden a minimizarlas.

A modo de poner a punto una metodología que permita la detección y cuantificación de compuestos organoazufrados volátiles, se propone someter los analitos individuales a diversas condiciones presentes en el método analítico. Para ello se realizaron dos diseños experimentales factoriales: 1) con el objetivo de evaluar la estabilidad de cada uno de los analitos bajo diferentes temperaturas, tiempo y solventes y 2) para optimizar el proceso de extracción S-L de las muestras previo análisis por HPLC. Además se sintetizaron Vinilditiinas ya que no se comercializan en el mercado, y se evaluaron cifras de mérito analíticas para la validación del método.

En el estudio de estabilidad se encontró que para Alicina, la variable que más influyó en su concentración fue la temperatura. Para Dialil sulfuro y Dialil trisulfuro el factor solvente resultó ser el más significativo mientras que para Dialil disulfuro, ningún factor resultó significativo.

Para la extracción S-L se seleccionaron las variables tiempo de ultrasonido y volumen de acetonitrilo cuyos valores óptimos fueron 1 minuto y 1 mL respectivamente. Los resultados obtenidos en cuanto a la validación del método se encontraron dentro de los rangos establecidos para cada parámetro, lo cual indica que el método analítico es confiable.

Palabras claves: ajo, compuestos organoazufrados, estabilidad físico-química, extracción sólido-líquido, validación.

Capítulo I. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	1
I.1 ORIGEN E HISTORIA	2
I.2 <i>ALLIUM SP.</i> Y SUS ASPECTOS BENÉFICOS PARA LA SALUD	3
I.3 COMPOSICIÓN QUÍMICA Y COMPONENTES BIOACTIVOS	4
I.4. COMPUESTOS ORGANOAZUFRADOS.....	4
I.4.1. Captación, reducción y asimilación de compuestos organoazufrados.....	4
I.4.2. Compuestos organoazufrados precursores del flavor	5
I.4.3. Formación de tiosulfatos	6
I.4.3.1. Enzima Alinasa	7
I.4.4. Compuestos organoazufrados volátiles	7
I.4.4.1. Alil sulfuros	7
I.4.4.2. Vinilditiinas y (E) y (Z) Ajoeno	8
I.4.5. Compuestos organoazufrados solubles en agua	9
I.5 PROPIEDADES FUNCIONALES	10
I.5.1. Actividad antioxidante	10
I.5.2. Actividad anticancerígena y antimutagénica	11
I.5.3. Efectos cardioprotectores	12
I.5.3.1 Efectos sobre el metabolismo lipídico	12
I.5.3.2. Efecto antihipertensivo.....	13
I.5.3.3. Efecto antihiper glucémico o antidiabético	13
I.5.3.4. Efecto antiplaquetario o antitrombótico	13
I.5.3.5. Efecto sobre la hiperhomocisteinemia.....	14
I.5.3.6. Efecto inmunomodulador	14
I.6. PROPIEDADES BIOLÓGICAS.....	14
I.6.1. Actividad antimicrobiana	14
I.6.2. Actividad antiparasitaria.....	15
I.6.3. Actividad antifúngica.....	16
I.6.4. Actividad antiviral.....	16
I.7. ASPECTOS ANALÍTICOS INVOLUCRADOS EN LOS MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS COMPUESTOS ORGANOAZUFRADOS.....	16
I.7.1. Técnicas de preparación de muestras	17
I.7.1.1. Destilación	17
I.7.1.2. Extracción Líquido- Líquido o extracción con disolvente (LLE).....	17
I.7.1.3. Extracción sólido- líquido (SLE)	17
I.7.1.4. Extracción con fluido supercrítico (SFE).....	18
I.7.1.5. Microextracción en fase sólida (SPME).....	18
I.7.2. Técnicas de separación y cuantificación	18
I.7.2.1. Introducción a la cromatografía	18
I.7.2.2. Aplicaciones.....	19
I.7.2.3. Clasificación de métodos cromatográficos	19
I.7.2.3.1 <i>Cromatografía de gases (CG)</i>	19
I.7.2.3.2. <i>Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)</i>	20
I.7.2.3.3. <i>Comparación entre Cromatografía Gaseosa y Cromatografía Líquida de alta resolución para la determinación de compuestos organoazufrados en ajo</i>	21
I.8 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	22
I.9. HIPÓTESIS	24
I.10. OBJETIVOS	24

Capítulo II. ESTUDIO DE LAS TRANSFORMACIONES DE LOS COMPUESTOS ORGANOAZUFRADOS SOMETIDOS A DIVERSAS CONDICIONES EXPERIMENTALES	25
---	-----------

II.1.INTRODUCCIÓN.....	26
II.2.OBJETIVOS	27
II.3.MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
II.3.1. Reactivos.....	27
II.3.2. Material de laboratorio	27
II.3.3. Equipos.....	27
II.3.4. Metodología de trabajo	28
II.3.4.1. Diseño experimental	28
II.3.4.2. Preparación de soluciones madres	28
II.3.4.3. Tratamiento de soluciones madres	29
II.3.4.4. Preparación de muestras	29
II.3.4.5. Tratamiento de muestras	29
II.3.4.6. Evaluación de la estabilidad de los compuestos organoazufrados	30
II.3.4.7. Análisis estadístico de los datos.....	30
II.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
II.4.1. Alicina.....	30
II.4.2. Dialil sulfuro	33
II.4.3. Dialil disulfuro	36
II.4.4. Dialil trisulfuro	38
II. 5. CONCLUSIONES	41
Capítulo III. ESTUDIO Y OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE PREPARACIÓN DE MUESTRA....	42
(EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDO).....	42
III.1. INTRODUCCIÓN.....	43
III.2. OBJETIVO.....	44
III.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	44
III.3.1. Reactivos.....	44
III.3.2. Material de laboratorio	44
III.3.3. Equipos.....	44
III.3.4. Metodología de trabajo	45
III.3.4.1. Preparación de muestras para cada diseño experimental	45
III.3.4.2. Extracción de muestras.....	45
<i>III.3.4.2.1. 1° Diseño experimental..</i>	45
<i>III.3.4.2.2. 2° Diseño experimental</i>	46
III.3.4.3. Condiciones instrumentales operacionales	46
III.3.4.4. Análisis estadístico de los datos.....	46
III.4. RESULTADOS	46
III.4.1. 1° diseño experimental	46
III.4.2. 2° diseño experimental	53
III.5. CONCLUSIONES	54
Capítulo IV. SÍNTESIS Y PURIFICACIÓN DE VINILDITIINAS.....	55
IV.1. INTRODUCCIÓN	56
IV.2. OBJETIVOS.....	57
IV.3. ENSAYOS.....	57
IV.3.1. Síntesis de Vinilditiinas.....	57
IV.3.1.1. Materiales y métodos.....	57
<i>IV.3.1.1.1. Reactivos.....</i>	57
<i>IV.3.1.1.2. Material de laboratorio</i>	57
<i>IV.3.1.1.3. Equipos.....</i>	57
<i>IV.3.1.1.4. Metodología de trabajo</i>	58
IV.3.1.2. Resultados y discusión	58
IV. 3.2. Purificación de 2-vinil-4H-1,3-ditiina	59

IV.3.2.1. Materiales y métodos.....	59
IV.3.2.1.1. Reactivos.....	59
IV.3.2.1.2. Material de laboratorio	59
IV.3.2.1.3. Equipos.....	59
IV.3.2.1.4. Metodología de trabajo	59
IV.3.2.2. Resultados y discusión	60
IV. 3.3. Identificación de Vinilditiinas	61
IV.3.3.1. Materiales y métodos.....	61
IV.3.3.1.1. Reactivos.....	61
IV.3.3.1.2. Material de laboratorio	61
IV.3.3.1.3. Equipos.....	61
IV.3.3.1.4. Metodología de trabajo	61
IV.3.3.2. Resultados y discusión	61
IV.3.4. Determinación de la concentración de 2-vinil-4H-1,3-ditiina sintetizada.....	64
IV.3.4.1. Materiales y métodos.....	64
IV.3.4.1.1. Reactivos.....	64
IV.3.4.1.2. Material de laboratorio	64
IV.3.4.1.3. Equipos.....	64
IV.3.4.1.4. Metodología de trabajo	64
IV.3.4.2. Resultados y discusión	64
IV. 4. CONCLUSIONES.....	65
Capítulo V. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS ORGANOAZUFRADOS.....	66
V.1. INTRODUCCIÓN	67
V.2. OBJETIVOS.....	67
V.3. ENSAYOS.....	68
V.3.1. Determinación de la especificidad del método analítico.....	68
V.3.1.1. Introducción.....	68
V.3.1.2. Materiales y Métodos.....	68
V.3.1.3. Resultados y discusión	71
V.3.2. Determinación del rango lineal	77
V.3.2.1. Introducción.....	77
V.3.2.2. Materiales y Métodos.....	77
V.3.2.3. Resultados y discusión	80
V.3.3. Precisión de la técnica instrumental	82
V.3.3.1. Introducción.....	82
V.3.3.2. Materiales y Métodos.....	83
V.3.3.3. Resultados y discusión	84
V.3.4. Recuperación	84
V.3.4.1. Introducción.....	84
V.3.4.2. Materiales y Métodos.....	86
V.3.4.3. Resultados y discusión	87
V.3.5. Sensibilidad.....	89
V.3.5.1. Introducción.....	89
V.3.5.2. Materiales y Métodos.....	90
V.3.5.3. Resultados y discusión	90
V.3.6. Aplicación de la técnica validada para la determinación de compuestos organoazufrados en muestras problema	91
V.3.6.1 Materiales y Métodos.....	91
V.3.6.2. Resultados y discusión	92
V.4. CONCLUSIONES	93

Capítulo VI. CONCLUSIONES GENERALES	94
Capítulo VII	97
BIBLIOGRAFÍA	97
ANEXO	102

ÍNDICE DE TABLAS

Capítulo I. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Tabla I.1. Composición química del ajo	4
--	---

Capítulo II. ESTUDIO DE LAS TRANSFORMACIONES DE LOS COMPUESTOS ORGANOAZUFRADOS SOMETIDOS A DIVERSAS CONDICIONES EXPERIMENTALES

Tabla II.1. Diseño experimental factorial 2^k	28
Tabla II.2. Concentración final de las muestras preparadas a partir de las soluciones madres.....	29
Tabla II.3. ANOVA del diseño factorial para la respuesta Alicina.....	30
Tabla II.4. Valores de F crítico para los términos del diseño.....	30
Tabla II.5. ANOVA del diseño factorial para la respuesta Dialil sulfuro.....	33
Tabla II.6. ANOVA del diseño factorial para la respuesta Dialil disulfuro.....	36
Tabla II.7. ANOVA del diseño factorial para la respuesta Dialil trisulfuro.....	38

Capítulo III. ESTUDIO Y OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE PREPARACIÓN DE MUESTRA (EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDO)

Tabla III.1. 1° Diseño experimental para extracción sólido-líquido (SLE).....	45
Tabla III.2. 2° Diseño experimental para extracción sólido-líquido (SLE).....	46
Tabla III.3. ANOVA del diseño factorial para la respuesta Alicina.....	47
Tabla III.4. Valores de F crítico para los términos del diseño.....	47
Tabla III.5. ANOVA del diseño factorial para la respuesta Dialil sulfuro.....	49
Tabla III.6. ANOVA del diseño factorial para la respuesta Dialil disulfuro.....	50
Tabla III.7. ANOVA del diseño factorial para la respuesta Dialil trisulfuro.....	52

Capítulo IV. SÍNTESIS Y PURIFICACIÓN DE VINILDITIINAS

Tabla IV.1. Datos de absorbancia obtenidos luego de cada lectura.....	64
Tabla IV.2. Coeficiente de extinción ϵ de 2-vinil-4H-1,3-ditiina en fase móvil.....	64
Tabla IV.3. Concentración de 2-vinil-4H-1,3-ditiina a 202 y 254 nm.....	65

Capítulo V. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS ORGANOAZUFRADOS

Tabla V.1. Concentración de compuestos organoazufrados.....	70
Tabla V.2. Condiciones cromatográficas empleadas en el análisis de OSCs por HPLC.....	70
Tabla V.3. Condiciones cromatográficas empleadas en el análisis de OSCs por CG.....	71
Tabla V.4. Tiempo de retención y área de compuestos organoazufrados (OSCs).....	71
Tabla V.5. Áreas obtenidas para cada estándar en sus respectivas concentraciones en la mezcla de OSCs.....	79
Tabla V.6. Estimadores de regresión de cada analito.....	80
Tabla V.7. Coeficiente de extinción ϵ para OSCs.....	82
Tabla V.8. Criterios de aceptación.....	82
Tabla V.9. Concentración de estándares en la mezcla de compuestos organoazufrados.....	84
Tabla V.10. Resultado de las inyecciones de los estándares.....	84
Tabla V.11. Resultados del porcentaje de recuperación de cada analito.....	88
Tabla V.12. Límite de detección y cuantificación para OSCs.....	91
Tabla V.13. Concentración de compuestos organoazufrados (mg/g) en 3 cultivares de ajo.....	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo I. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Figura I.1. Estructura de alquenil-cisteín-sulfóxidos (ACSOs).....	5
Figura I.2. Formación de alquenil-cisteín-sulfóxidos a partir de γ -glutamil-péptidos.....	6
Figura I.3. Síntesis de Alicina a partir de Aliina.....	7
Figura I.4. Principales compuestos alil sulfuros encontrados en ajo.....	8
Figura I.5. Formación de Vinilditiinas.....	8
Figura I.6. Formación de Ajoeno a partir de Alicina.....	9
Figura I.7. Resumen de las transformaciones de compuestos organoazufrados durante maduración, corte y procesado de ajo.....	10

Capítulo II. ESTUDIO DE LAS TRANSFORMACIONES DE LOS COMPUESTOS ORGANOAZUFRADOS SOMETIDOS A DIVERSAS CONDICIONES EXPERIMENTALES

Figura II.1. Representación gráfica del efecto principal del factor temperatura sobre la estabilidad de la Alicina.....	31
Figura II.2. Representación gráfica del efecto principal del factor tiempo sobre la estabilidad de la Alicina.....	31
Figura II.3. Representación gráfica del efecto principal del factor temperatura sobre la estabilidad de la Alicina conservada en diferentes solventes.....	32
Figura II.4. Representación gráfica del efecto principal del factor temperatura sobre la estabilidad de la Alicina conservada en diferentes solventes.....	32
Figura II.5. Cromatograma de Alicina en metanol sometida a 45°C durante 21 días.....	33
Figura II.6. Representación gráfica del efecto principal del factor temperatura sobre la estabilidad de Dialil sulfuro.....	34
Figura II.7. Representación gráfica del efecto principal del factor tiempo sobre la estabilidad de Dialil sulfuro.....	34
Figura II.8. Representación gráfica del efecto de interacción entre los factores tiempo y temperatura sobre la estabilidad de Dialil sulfuro en cada uno de los cuatro solventes.....	35
Figura II.9. Representación gráfica del efecto principal del factor temperatura sobre la estabilidad de Dialil disulfuro.....	36
Figura II.10. Representación gráfica del efecto principal del factor tiempo sobre la estabilidad de Dialil disulfuro.....	37
Figura II.11. Representación gráfica del efecto de interacción entre los factores tiempo y temperatura sobre la estabilidad de Dialil disulfuro en cada uno de los cuatro solventes.....	38
Figura II.12. Representación gráfica del efecto principal del factor temperatura sobre la estabilidad de Dialil trisulfuro.....	39
Figura II.13. Representación gráfica del efecto principal del factor tiempo (días) sobre la estabilidad de Dialil trisulfuro.....	39

Capítulo III. ESTUDIO Y OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE PREPARACIÓN DE MUESTRA (EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDO)

Figura III.1. Representación gráfica del efecto principal del factor volumen de acetonitrilo en la concentración de Alicina.....	48
Figura III.2. Representación gráfica del efecto principal del factor tiempo de ultrasonido en la concentración de Alicina.....	48
Figura III.3. Representación gráfica del efecto principal del factor volumen de acetonitrilo en la concentración de Dialil sulfuro.....	49
Figura III.4. Representación gráfica del efecto principal del factor tiempo de ultrasonido en la concentración de Dialil sulfuro.....	50

Figura III.5.Representación gráfica del efecto principal del factor volumen de acetonitrilo en la concentración de Dialil disulfuro.	51
Figura III.6.Representación gráfica del efecto principal del factor tiempo de ultrasonido en la concentración de Dialil disulfuro.	51
Figura III.7.Representación gráfica del efecto principal del factor volumen de acetonitrilo en la concentración de Dialil trisulfuro (inversa de la respuesta).	52
Figura III.8.Representación gráfica del efecto principal del factor tiempo de ultrasonido en la concentración de Dialil trisulfuro (inversa de la respuesta).	53
Figura III.9.Gráfico de la función deseabilidad para volumen de acetonitrilo y tiempo de ultrasonido optimizados en el rango.	53
Figura III.10.Gráfico de deseabilidad en función del volumen de acetonitrilo optimizado y tiempo ultrasonido.....	54

Capítulo IV. SÍNTESIS Y PURIFICACIÓN DE VINILDITIINAS

Figura IV.1.Cromatograma de la síntesis de Vinilditiinas	58
Figura IV.2.Cromatograma de 2-vinil-4H-1,3-ditiina purificada.....	60
Figura IV.3.Espectro de absorción UV de la solución de 2-vinil-4H-1,3-ditiina en fase móvil acetoneitrilo:agua:metanol (50:41:9) (V/V).	62
Figura IV.4. Datos de los espectros CG-MS y UV para los dos isómeros de Vinilditiinas	62
Figura IV.5. Cromatograma de Vinilditiinas purificadas obtenido	63
Figura IV.6. Espectro de masa de 2-vinil-4H-1,3-ditiina	63
Figura IV.7. Espectro de masa de 3-vinil-4H-1,2 ditiina.	63

Capítulo V. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS ORGANOAZUFRADOS

Figura V.1.Cromatograma de muestra de ajo cocido contaminada con la mezcla de compuestos organoazufrados.	72
Figura V.2.Cromatograma obtenido del análisis por CG de Alicina	72
Figura V.3.Cromatograma resultante del análisis por CG de 2-vinil-4H-1,3-ditiina.....	73
Figura V.4.Cromatograma obtenido del análisis por CG de DAS.....	73
Figura V.5.Cromatograma obtenido del análisis por CG de DADS	74
Figura V.6.Cromatograma obtenido del análisis por CG de DATS	74
Figura V.7.Espectro de absorción UV de la solución de Alicina en agua	75
Figura V.8 Espectro de absorción UV de la solución en acetonitrilo de E- Ajoeno.....	75
Figura V.9.Espectro de absorción UV de la solución en acetonitrilo de Z- Ajoeno.	76
Figura V.10.Espectro de absorción UV de la solución de 2-vinil-4H-1,3-ditiina en fase móvil acetoneitrilo:agua:metanol (50:41:9) (V/V).	76
Figura V.11.Curvas de calibración de los compuestos organoazufrados.....	81
Figura V.12 Grupos funcionales afines de OSCs que determinan sensibilidad al detector UV.	81
Figura V.13.Cromatograma de la muestra testigo..	87

Capítulo I

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

I. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

I.1 ORIGEN E HISTORIA

El ajo, miembro de la familia *Alliaceae*, es una especie que ha sido utilizada tanto como alimento como planta medicinal por más de 4.000 años. Su nombre botánico es *Allium sativum*; el término *Allium* deriva de la palabra celta *all* que significa pungente. Se encuentra entre las plantas más antiguas cultivadas, siendo Asia Central probablemente su origen. El interés en los posibles beneficios del ajo tiene su origen en la antigüedad y es uno de los primeros ejemplos documentados de plantas utilizadas para el mantenimiento de la salud y el tratamiento de enfermedades (Block, 1985). Antecedentes históricos de diversas culturas dan cuenta de la importancia de esta especie.

En **Antiguo Egipto** las primeras referencias conocidas indicaban que el ajo formaba parte de la dieta diaria de muchos de sus habitantes. Registros jeroglíficos muestran que los trabajadores consumían grandes cantidades de ajo crudo mientras construían las pirámides, lo cual les permitía ganar fuerza, luchar contra la malaria y contra otras afecciones por bajas temperaturas (Kamel y Saleh, 2000).

El Código Ebers (1550 a.C) y papiros médicos egipcios incluyen más de 800 fórmulas terapéuticas, de las cuales 22 hacen referencia al ajo como un remedio efectivo para el tratamiento de una amplia variedad de dolencias entre las que se incluyen: dolores de cabeza, mordeduras, parásitos intestinales y tumores (Block, 1985).

En 1922 se encontraron dientes de ajo durante la excavación de la tumba del rey Tutankamón (1500 a.C). Si bien no se conoce el motivo por el cual el ajo se encontraba en la tumba, su presencia es una fuerte evidencia de que era utilizado en el momento.

En la **Antigua Grecia** durante las excavaciones de los templos y el palacio de Knossos (1400-1800 a.C), se encontraron ajos bien preservados. Al igual que en Egipto, el ajo fue asociado con la fuerza y la capacidad de trabajo. Aparentemente, era consumido principalmente por las clases más bajas. Durante las primeras Olimpiadas, era consumido por los atletas, como estimulante. Hipócrates, considerado por muchos como el padre de la medicina, convirtió al ajo en parte de su arsenal terapéutico, recomendando su uso para enfermedades pulmonares y para tumores abdominales, en especial en el útero.

En la **Antigua Roma** al igual que en Grecia, los romanos percibían al ajo como una ayuda a la fuerza y la resistencia por lo que era utilizado en la alimentación de soldados y marineros. Con el surgimiento de Roma como una potencia líder, poco a poco se trasladaron a ella la medicina griega y sus tradiciones.

Dioscórides, médico jefe de la armada romana en el siglo I d.C, prescribió al ajo como vermífugo o expulsor de parásitos internos. Él era el autor de un tratado de cinco volúmenes en donde se recomendaba al ajo por su acción de "limpiar las arterias." Cabe señalar que la circulación de la sangre no fue descubierta hasta cientos de años más tarde, y las creencias contemporáneas sostenían que las arterias transportaban aire a través del cuerpo, mientras que las venas transportaban sangre. Claramente, el concepto de que el estado cardiovascular se puede mejorar por el ajo, representa un tema de investigación actual y tiene sus orígenes en la antigüedad. También fue recomendado para los trastornos del tracto gastrointestinal, tratamiento de mordeduras de animales, enfermedad de las articulaciones y convulsiones.

En la **Antigua China y Japón**, el ajo fue prescripto para ayudar a la respiración y digestión, y utilizado contra diarreas e infecciones (Rivlin, 2001).

En la **Antigua India** era servido como una loción antiséptica para lavar heridas y úlceras (Block, 1985). El principal texto médico, *Charaka-Samhita*, recomendaba el ajo para el tratamiento de enfermedades del corazón y la artritis. En otro texto antiguo, *Manuscrito de Bower* (300 d.C), fue usado para infecciones, plagas y gusanos, debilidad y fatiga, y una variedad de trastornos digestivos (Banerjee y Maulik, 2002).

En la **Edad Media** el conocimiento del uso terapéutico de las plantas, especialmente el ajo, fue adquirido y transmitido a través de los monjes. El ajo se cultivaba en los monasterios. Se creía que aliviaba el estreñimiento cuando se consumía con bebidas. Además, se aconsejaba que los trabajadores al aire libre lo consumieran para prevenir el golpe de calor. Al igual que en otras culturas, las clases altas tendían a rechazarlo y no lo consideraban apto para su consumo.

Rupertsberg, una médica destacada durante la última parte del siglo XII le dio un papel destacado en sus escritos médicos. Curiosamente, llegó a la conclusión que el ajo crudo era más eficaz que el ajo cocido, tal vez porque este último tiene menos sabor picante a comparación del primero. En la Facultad de Medicina de Salerno, uno de los centros más influyentes de la educación médica en ese momento, la alimentación jugaba un papel importante en el tratamiento de enfermedades, así como en la preservación de buena salud. El ajo fue clasificado como una "comida caliente" para ser consumido durante el invierno y limitar el desarrollo de trastornos pulmonares o respiratorios (Rivlin, 2001).

Durante el Renacimiento, se prestó cada vez más atención en Europa a los usos medicinales de las plantas. Un médico destacado del siglo XVI, Pietro Mattiali de Siena, prescribió al ajo tanto como para desórdenes digestivos, infecciones con gusanos y desórdenes renales, como para ayudar a las madres durante el parto. En Inglaterra, fue utilizado para dolor de muelas, constipación, edemas y plagas (Banerjee y Maulik, 2002).

Los antecedentes denotan que si bien el ajo ha sido utilizado en la medicina tradicional desde hace varios años, la investigación científica sobre estas plantas se inició en la segunda mitad del siglo XIX, con la obra de Louis Pasteur, que en 1858 observó por primera vez las propiedades antibacterianas del ajo. Más tarde, en 1932 Albert Schweitzer trató la disentería amebiana en África (Block, 1985).

En la segunda guerra mundial, cobró relevancia su uso para el tratamiento de heridas de los soldados ya que era utilizado como antiséptico en la prevención de la gangrena (Amagase y col., 2001).

En la Actualidad, el ajo, se considera útil para el tratamiento o prevención de enfermedades tales como cáncer, enfermedades coronarias, obesidad, hipercolesterolemia, diabetes tipo 2, hipertensión, cataratas y alteraciones del tracto gastrointestinal. Por esta razón, los científicos tratan de validar muchas de las propiedades del ajo, sobre todo en términos de identificar los componentes activos, sus mecanismos de acción y explorar los potenciales beneficios del mismo como suplemento alimentario (Verma, 2008).

1.2 ALLIUM SP. Y SUS ASPECTOS BENÉFICOS PARA LA SALUD

Los factores dietéticos juegan un papel clave en el desarrollo de varias enfermedades humanas. El consumo regular de frutas y hortalizas se asocia con menores riesgos de cáncer, enfermedad cardiovascular, accidente cerebrovascular, enfermedad de Alzheimer, cataratas, y disminuciones funcionales asociadas al envejecimiento (Rui Hai Liu, 2003).

El descubrimiento de que determinados alimentos poseen compuestos biológicamente activos y beneficiosos para la salud, más allá de la nutrición básica, abrió una nueva etapa en la ciencia de la nutrición. Estos alimentos, conocidos como *alimentos funcionales*, son productos alimenticios de origen animal o vegetal, consumidos en la dieta diaria, que además de aportar nutrientes poseen componentes bioactivos (Drago y col., 2006). Estos compuestos, llamados *fitoquímicos*, son sustancias que se encuentran en cantidades muy pequeñas en frutas, hortalizas, granos y otros alimentos vegetales. Si bien no son nutrientes esenciales, tienen efectos positivos sobre la salud, ejerciendo un papel importante en la prevención y/o tratamiento de diversas enfermedades; y a pesar que constituyen un grupo de compuestos muy numerosos, hasta ahora sólo se han investigado las propiedades saludables de algunos de ellos (Bonafine, 2006).

I.3 COMPOSICIÓN QUÍMICA Y COMPONENTES BIOACTIVOS

La composición química del ajo puede observarse en la tabla I.1. Su principal componente es agua (62-68% de su peso), seguido por hidratos de carbono (26-30%). Los componentes bioactivos presentes en el ajo son compuestos organoazufrados (11-35 mg g⁻¹ de ajo fresco), ácido ascórbico (30mg/100g peso fresco), vitamina E (9,4 mg g⁻¹) y minerales como selenio (0.014 mg/100g) (Gómez, 2008).

Casi todos los compuestos presentes en el ajo son solubles en agua (97%) con una pequeña cantidad de compuestos solubles en aceite (0,15 a 0,7%) (Rahman, 2003).

Además pueden encontrarse polifenoles, flavonoides, antocianinas, flavonoles y taninos. La mayoría de los investigadores considera que los beneficios para la salud, residen en su alto contenido en compuestos azufrados. Aunque muchos alimentos también los poseen, el ajo, contiene tres veces más compuestos organoazufrados que cualquier otra hortaliza (García y col., 2000).

Cuando el ajo es aplastado, produce un número de compuestos que contienen azufre que le dan su sabor característico. Aunque los tiosulfatos, como Alicina, se han considerado compuestos activos durante mucho tiempo, otros compuestos tales como Ajoeno, S-allicisteína y Saponina pueden contribuir, sinérgicamente, a las actividades biológicas esenciales del ajo (Chen, 2009).

Tabla I.1. Composición química del ajo

Componentes	Cantidad (peso fresco %)
Agua	62-68
Carbohidratos	26-30
Proteínas	1,5-2,1
Aminoácidos esenciales	1-1,5
Aminoácidos: cisteína sulfóxidos	0,6-1,9
γ- Glutamilcisteína	0,5-1,6
Lípidos	0,1-0,2
Fibra	1,5
Compuestos azufrados totales*	1,1-3,5
Sulfuro	0,23-0,37
Nitrógeno	0,6-1,3
Minerales	0,7
Vitaminas	0,015
Saponinas	0,04-0,11
Compuestos liposolubles totales	0,15 (entero) 0,7 (cortado)
Compuestos hidrosolubles totales	97

*Excluyendo proteínas y sulfato inorgánico (0,5%).

Fuente: Rahman, 2003.

I.4. COMPUESTOS ORGANOAZUFRADOS

I.4.1. Captación, reducción y asimilación de compuestos organoazufrados

Los principales compuestos bioactivos, responsables de las funciones biológicas de las especies *Allium*, son compuestos organoazufrados. El azufre es absorbido por las raíces de las plantas como sulfato. La mayor parte del sulfato es reducido a sulfito y asimilado como cisteína. Ésta, da lugar a la formación de cisteína proteica, metionina, metionina proteica y glutatión. A partir de glutatión, se forman los γ-glutamil-péptidos, los cuales, mediante la intervención de enzimas tales como γ-glutamiltranspeptidasa y oxidasa, son biotransformados en alquenil-cisteín-sulfóxidos (ACSOs), también llamados compuestos precursores del flavor (Lancaster y Boland, 1990).

I.4.2. Compuestos organoazufrados precursores del flavor

Los principales compuestos organoazufrados del ajo fresco pertenecen al grupo de los alquenil-cisteín-sulfóxidos (ACSOs), cuyos miembros se diferencian en su estructura según el radical alquenil (Brewster, 1994), tal como puede apreciarse en la figura I.1.

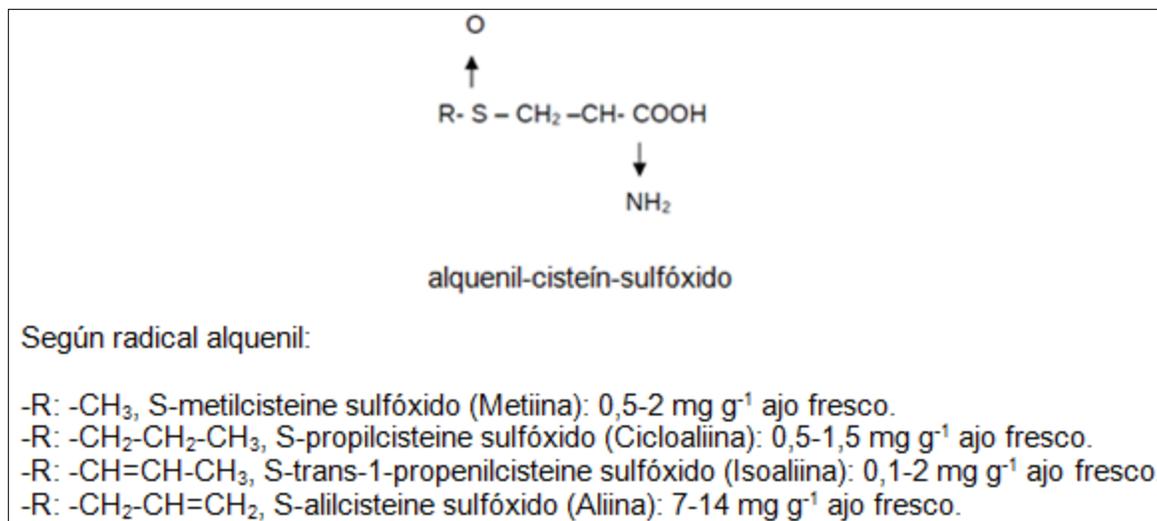


Figura I.1. Estructura de alquenil-cisteín-sulfóxidos (ACSOs).
(Fuente Brewster, 1994).

La Aliina, compuesto organoazufrado más abundante en ajo fresco, es inodora y estable. Está compuesta por un grupo alil, un grupo sulfóxido y cisteína.

Los alquenil-cisteín-sulfóxidos (ACSOs) o compuestos precursores del flavor, son aminoácidos no proteicos que se localizan en el citoplasma de células de tejidos intactos de ajo. Estos compuestos, tal como se muestra en la figura I.2 se generan durante la maduración del ajo, a medida que aumentan los niveles de γ -glutamiltanspeptidasa y oxidasas, a partir de γ -glutamil-péptidos o γ -glutamilcisteina (Gómez, 2008), tales como:

- S-trans-1-propenil- γ -glutamilcisteina (GSPC)
- S-trans-2-propenil- γ -glutamilcisteina (GSAC)
- S-metil- 1- γ -glutamilcisteina (GSMC)

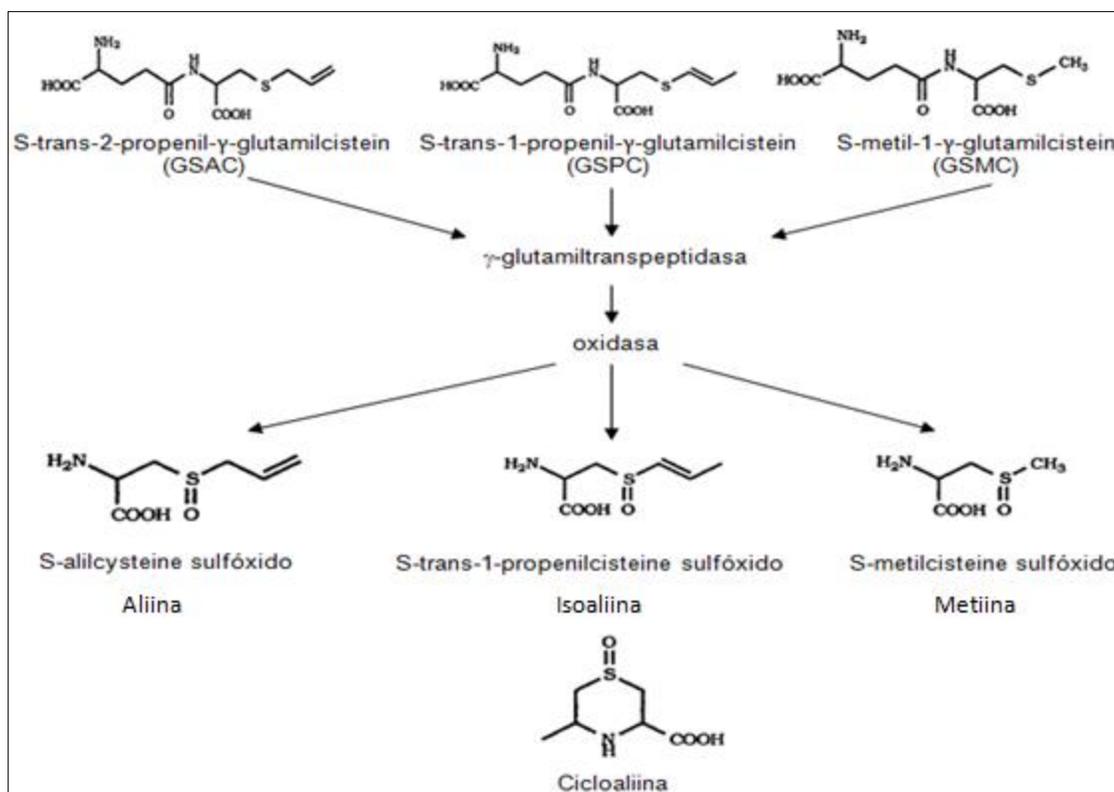


Figura I.2 Formación de alquenil-cisteín-sulfóxidos a partir de γ -glutamil-péptidos durante la maduración de bulbos intactos de ajo.

(Fuente Ichikawa y col., 2006).

Ilustración 2 Figural.2 Formación de alquenil-cisteín-sulfóxidos a partir de γ -glutamil-péptidos durante la maduración de bulbos intactos de ajo (Ichikawa y col., 2006).

I.4.3. Formación de tiosulfínatos

Cuando un diente de ajo es cortado, machacado o masticado, en presencia de agua, una enzima denominada "alinas", contenida en las vacuolas, actúa sobre S-alil cistein sulfóxido (Aliina), transformándolo en ácido alilsulfénico, ácido pirúvico y amoníaco. El ácido alilsulfénico, es un producto intermedio muy reactivo e inestable que rápidamente, por una reacción de condensación, da lugar a la formación de Dialil tiosulfínato (Alicina), compuesto organoazufrado responsable del fuerte olor a ajo. La formación de Alicina es muy rápida y se completa en menos de 0,5 minutos a pH 5-8 y 30-35 °C. Más de la mitad de la Aliina se convierte en Alicina en 6 segundos (Kamel y Saleh, 2000).

La Alicina, que representa el 80% de los tiosulfínatos, fue descubierta en 1944 por Chester J. Cavallito y sus colegas, los cuales la sintetizaron a partir de alcohol etílico y ajo a temperatura ambiente. El aceite obtenido (Alicina, Dialil tiosulfínato, o alil 2-propenietiosulfínato), fue descrito como un líquido químicamente inestable, incoloro, responsable del olor a ajo (Block, 1985).

Cavallito y col. (1947) encontraron que los tiosulfínatos son solubles en disolventes orgánicos tales como: alcoholes, cetonas, éter, hidrocarburos halogenados e hidrocarburos aromáticos, y que, al aumentar el tamaño de las cadenas de carbono, muestran un aumento de la solubilidad en hidrocarburos de petróleo y una disminución de la solubilidad en agua. En cuanto a su estabilidad térmica, se encontró que los tiosulfínatos saturados son relativamente estables a temperatura de hasta 40°C, pudiéndose mantener a temperatura ambiente durante varias semanas sin deterioro apreciable. En el caso de la Alicina, se encontró que es muy inestable en estado puro y se asoció tal inestabilidad a la presencia del doble enlace en su estructura.

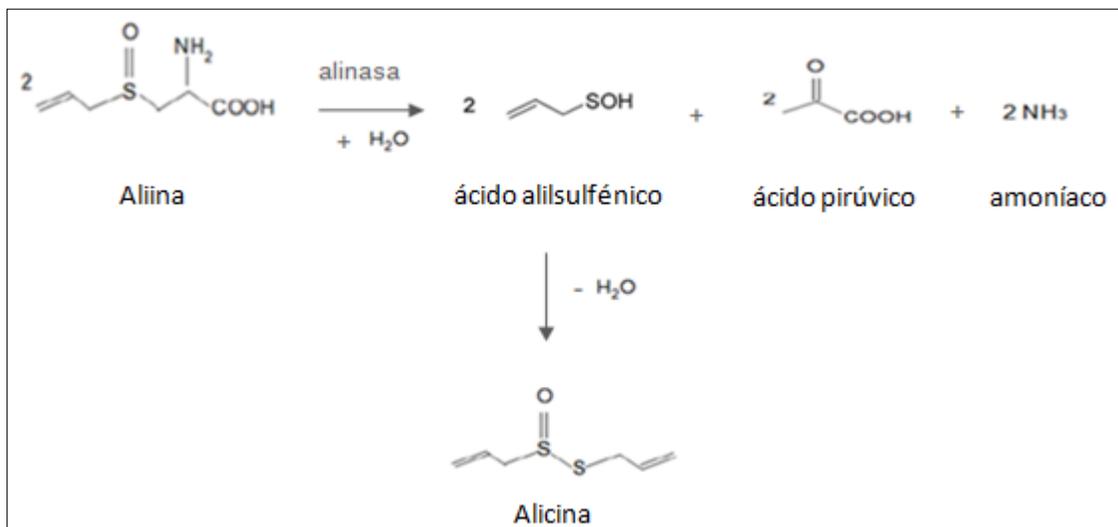


Figura I.3. Síntesis de Alicina a partir de Aliina.
(Fuente Lancaster y Boland, 1990).

I.4.3.1. Enzima Alinasa

La actividad de la enzima alinasa se ve influenciada por varios factores tales como: presencia de cofactores, pH y temperatura. Se ha encontrado que la presencia de un cofactor, fosfato de piridoxal, acelera la reacción de formación de Alicina a partir de Aliina. En cuanto al pH, la enzima se activa a pH 4.5-9, pero se inactiva rápidamente y de forma irreversible a pH 1.5-3 (Gómez, 2008). De esta manera la enzima alinasa es inhibida completamente e irreversiblemente bajo las condiciones ácidas en el estómago (Amagase, 2006).

En lo que respecta a la influencia de temperatura sobre la actividad de la enzima, en 1999, Krest y Keusgen, determinaron que la actividad enzimática decrece rápidamente a 42°C , indicando que la temperatura óptima de activación se encuentra entre $35\text{-}37^\circ\text{C}$ y la inactivación se da entre $42\text{-}60^\circ\text{C}$. A temperaturas mayores de 60°C la actividad enzimática se anula (Gómez, 2008).

I.4.4. Compuestos organoazufrados volátiles

La Alicina es muy inestable en presencia de calor y solventes orgánicos formando una gran variedad de compuestos volátiles de degradación, cuando el ajo es procesado. Estos compuestos son sulfuros (Dialil mono-, di-, y oligosulfuros); Vinilditiinas (2-vinil-4H-1.3-ditiina, 3-vinil-4H-1.2-ditiina) y Ajoenos (E y Z Ajoeno) (Lawson y col., 1991).

I.4.4.1. Alil sulfuros

Los estudios pioneros de Semmler (1892) establecieron la importancia de Dialil disulfuro y Dialil trisulfuro en el flavor de los destilados de ajo (Brodnitz y col., 1971).

Son compuestos organoazufrados estables, producto de la transformación de la Alicina. Estos compuestos se forman durante la cocción, destilación al vapor, almacenamiento de ajo machacado, o se encuentran en los extractos de ajo envejecido. Han demostrado tener potentes actividades quimiopreventivas en comparación con otros compuestos organoazufrados del ajo. Entre ellas se puede incluir: inhibición de cáncer de pulmón e hígado en ratones; inhibición de tumores en células del colon en humanos (únicamente DADS); efecto antimutagénico y antihepatotóxico; entre otros (Kamel y Saleh, 2000).

En aceite de ajo destilado y extracto oleoso de ajo se han identificado más de 20 sulfuros y muchos de ellos, especialmente aquellos que contienen un grupo alilo, son responsables del olor y sabor característicos del ajo después de ingerirlo. Dialil trisulfuro (DATS) es el compuesto más abundante en aceite de ajo fresco, pero en productos de aceite de ajo disponibles en el mercado, el compuesto más abundante es Dialil disulfuro (DADS). La cantidad de estos sulfuros varía según tiempo y temperatura de extracción (Amagase, 2006).

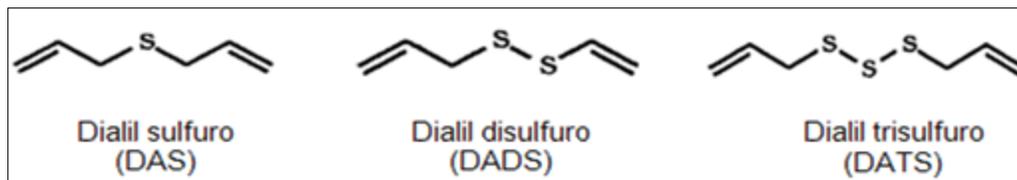


Figura I.4. Principales compuestos alil sulfuros encontrados en ajo.

I.4.4.2. Vinilditiinas y (E) y (Z) Ajoeno

Vinilditiinas y Ajoenos son considerados productos de degradación de la Alicina, cuya formación depende de la polaridad del medio, los solventes utilizados, y la presencia de altas temperaturas. Se encontró que en medios más polares se obtiene una mayor proporción de Ajoeno, mientras que en medios menos polares prevalece la formación de Vinilditiinas y una pequeña cantidad de Ajoeno (Iberl y col., 1990; Lawson y col., 1991).

La descomposición de la Alicina puede realizarse por varias vías. En 1985 Eric Block desarrolló las reacciones de formación de 2 isómeros de Vinilditiinas, 2-vinil-4H-1,3-ditiina y 3-vinil-4H-1,2-ditiina. Como puede observarse en la figura I.5, la Alicina se descompone a temperatura ambiente en ácido alil sulfénico y tioacroleína. Dos moléculas de tioacroleína pueden condensar y dar lugar a los isómeros de Vinilditiinas, mediante una reacción de Diels-Alder, en la cual reaccionan 2 compuestos con dobles enlaces conjugados (dieno) para la formación de ciclohexenos. Además, las Vinilditiinas, pueden formarse durante la cromatografía de gases como producto de la degradación térmica de la Alicina (Yu y col., 1989).

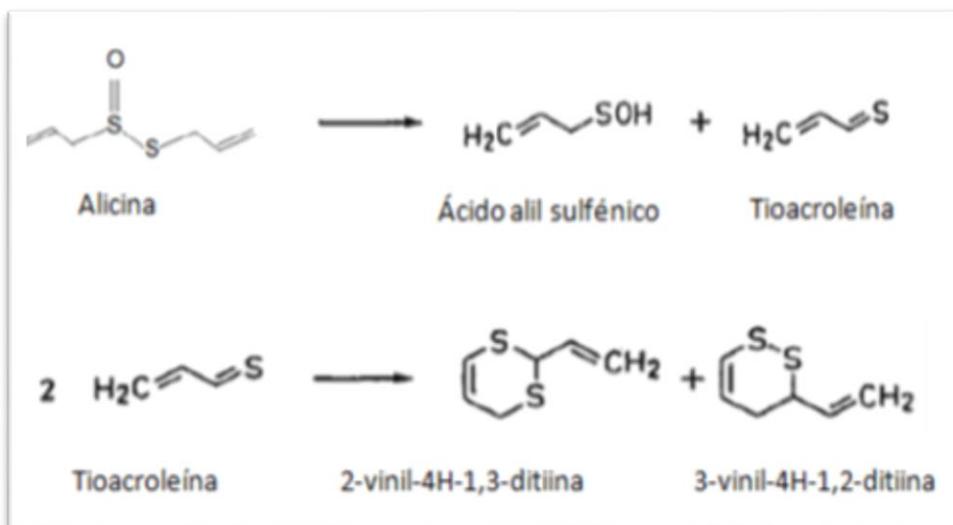


Figura I.5. Formación de Vinilditiinas.

Ajoeno es un compuesto sintetizado en 1986 cuyo nombre deriva de la palabra 'ajo', con la terminación 'ene' indicativa de la presencia de dobles enlaces (Ledezma y Apitz-Castro, 2006). Se ha encontrado que éste puede formarse por combinación de 3 moléculas de Alicina, obteniéndose dos moléculas de Ajoeno. Presenta dos isómeros geométricos: trans (isómero Z-) y cis (isómero E-). El interés por su estudio se debe a que evidencia un potente efecto antitrombótico tan activo como la aspirina en la prevención de la agregación de las plaquetas sanguíneas. Además se le atribuyen otras actividades biológicas tales como antimicrobiana e hipocolesterolemica (Soto y col., 2007).

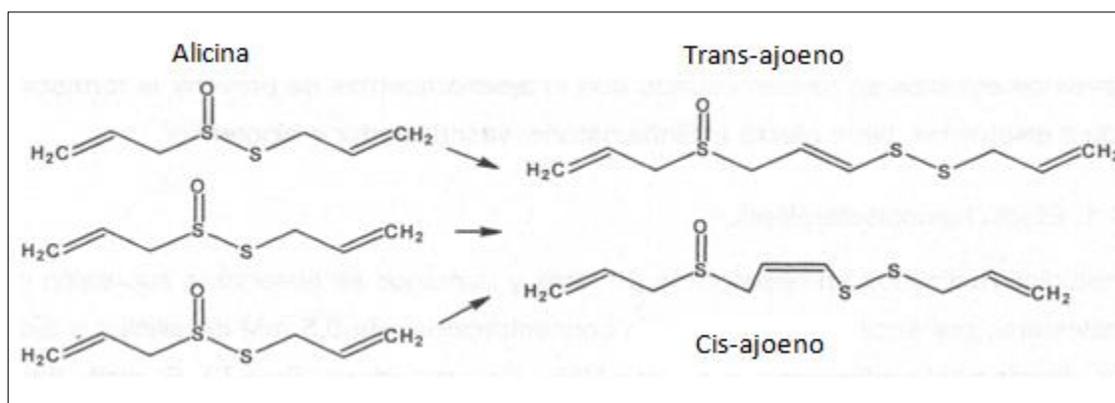


Figura I.6. Formación de Ajoeno a partir de Alicina.
(Fuente Block, 1985).

La degradación de E- y Z-Ajoeno depende del tiempo y temperatura de almacenamiento. Para determinar la estabilidad de Ajoeno durante el almacenamiento, Naznin y col., (2008) analizaron su concentración por HPLC en ajo japonés calentado a 80°C con aceite de soja mantenido a 20°C durante un periodo de 3, 6 y 9 meses. Se encontró que la concentración de Z-Ajoeno disminuye rápidamente durante el almacenamiento de 9 meses mientras que la de E-Ajoeno disminuye más lentamente. Este fenómeno sugiere que la isomerización y degradación de Z-Ajoeno para formar E-Ajoeno, se produce durante el periodo de almacenamiento. Para comprobar la estabilidad térmica, Ajoeno en acetato de etilo fue calentado a 30, 40, 60, 80 y 100 °C durante 3 días y analizado por HPLC. Después de la incubación a 100 °C durante 3 días, la concentración de Z-Ajoeno fue aproximadamente 0,5%, mientras que a 30 y 40 °C fue 41,2% y 30,1%, respectivamente. Durante el almacenamiento a la temperatura más alta, los isómeros E y Z se degradan gradualmente a otros componentes (Naznin y col., 2008).

I.4.5. Compuestos organoazufrados solubles en agua

En extractos de ajo envejecido (AGE) se pueden encontrar compuestos organoazufrados solubles en agua tales como:

- S-alilcisteína (SAC): derivado de S-alil γ-glutamilcisteína.
- Trans-1-propenil-cisteína
- S-metil-cisteína (SMC)

Estos derivados de cisteína son cristales incoloros, inodoros y estables en estado sólido o en solución acuosa bajo condiciones neutras o ligeramente ácidas. El SAC ofrece protección contra la oxidación, los radicales libres, el cáncer y las enfermedades cardiovasculares.

Además, en AGE también se encuentra S-alil mercapto-cisteína (SAMC) que presenta efecto hepatoprotector, anticancerígeno y antioxidante (Amagase, 2006).

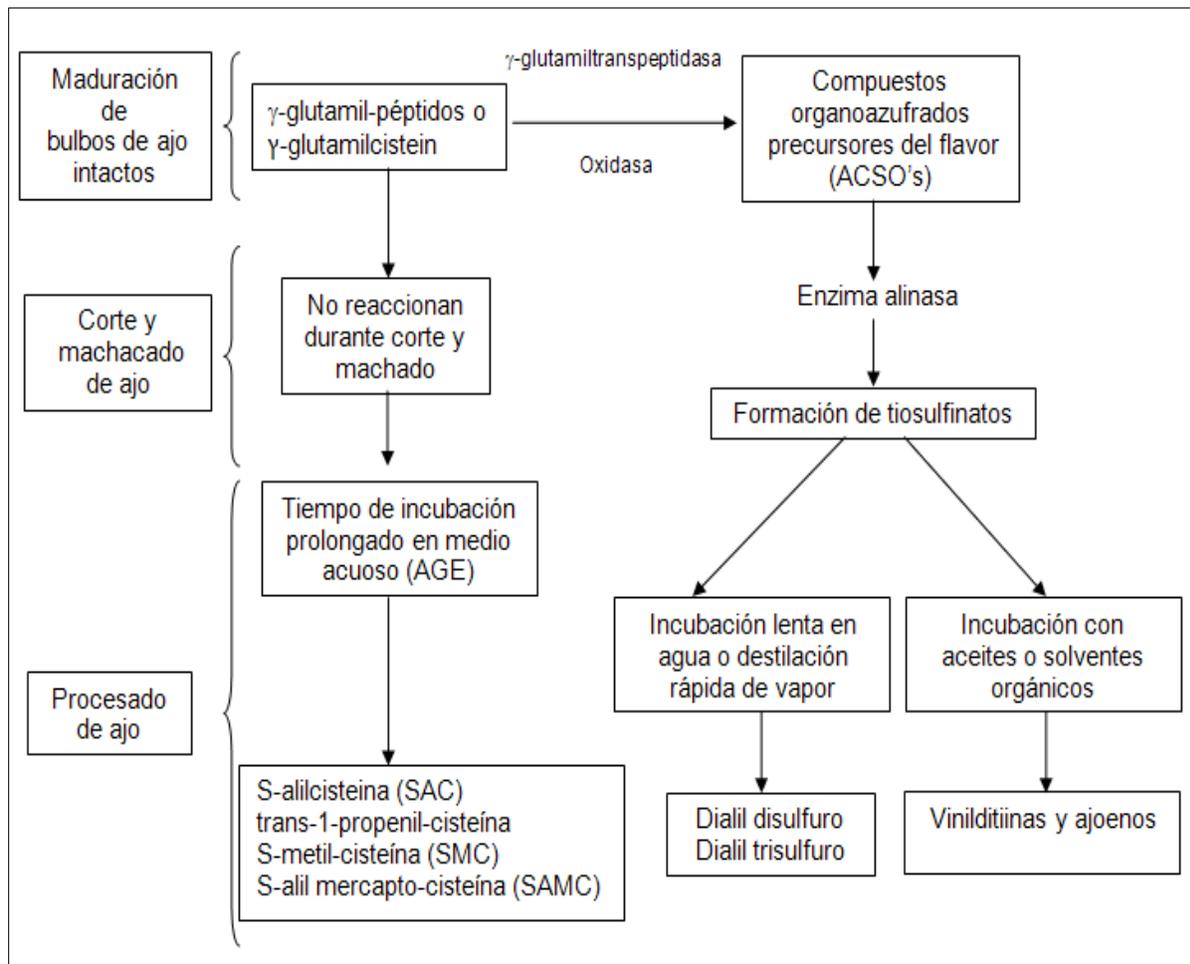


Figura I.7. Resumen de las transformaciones de compuestos organoazufrados durante maduración, corte y procesamiento de ajo. (Fuente Lawson, 1993).

I.5 PROPIEDADES FUNCIONALES

I.5.1. Actividad antioxidante

Especies de oxígeno reactivo (ROS) incluyen radicales libres y especies sin radicales. Los radicales libres llevan un electrón no apareado, son inestables y muy reactivos. Incluyen: radical superóxido (O_2^-), óxido nítrico ($NO\cdot$) e hidroxilo ($OH\cdot$), siendo este último el más reactivo y tóxico. Las especies sin radicales incluyen: peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singlete (1O_2) y ozono (O_3), que forman radicales libres en los tejidos a través de diversas reacciones químicas (Borek, 2001). Son responsables del daño celular a ácidos nucleicos, proteínas y lípidos y están implicados como causa de muchas enfermedades tales como cáncer, inflamación crónica, enfermedades cardiovasculares, entre otras. Los antioxidantes son moléculas capaces de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas causada por especies de oxígeno reactivo. Las reacciones de oxidación pueden producir radicales libres, que a su vez pueden iniciar reacciones en cadena que provocan daño celular. Los antioxidantes frenan estas reacciones en cadena por la eliminación de radicales libres intermedios, así como la inhibición de otras reacciones de oxidación, oxidándose ellos mismos (Block, 2010).

Para proteger a las moléculas contra los radicales libres tóxicos, las células desarrollan enzimas, entre las que se encuentran, superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión peroxidasa y pequeñas moléculas incluyendo glutatión.

Diversos estudios evidencian que dietas ricas en frutas y hortalizas, proporcionan una gran cantidad de fitoquímicos antioxidantes como vitaminas C y E, glutatión, compuestos fenólicos (flavonoides) y pigmentos vegetales, que ofrecen protección contra el daño celular.

Entre los productos derivados del ajo, el extracto de ajo envejecido (AGE) es la preparación con mayor actividad antioxidante, incluso más que el ajo fresco y otros suplementos de ajo comerciales (Corzo Martínez y col., 2007). Los extractos de ajo fresco, que se envejecen durante un período prolongado, dan lugar a extractos de ajo envejecido que contienen fitoquímicos antioxidantes que previenen el daño oxidativo. (Borek, 2001). Éstos incluyen compuestos organoazufrados solubles en agua tales como: S- alilcisteína (SAC) y S-alilmercaptocisteína (SACM) y solubles en lípidos: Alicina, Ajoeno, Dialil sulfuro (DAS), Dialil disulfuro (DADS) y Dialil trisulfuro (DATS). Estos compuestos organoazufrados antioxidantes inhiben el daño ocasionado por reacciones oxidativas generadas por la vejez o enfermedades, reducen los niveles sanguíneos de LDL, tienen un efecto anti-inflamatorio, antiatrogénico y antitrombótico. El consumo de extracto de ajo envejecido disminuye el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares, mutagénesis, cáncer y otros padecimientos crónico-degenerativos asociados a la vejez como la enfermedad de Alzheimer (Drago y col., 2006).

I.5.2. Actividad anticancerígena y antimutagénica

La era moderna de la utilización de ajo como agente anticanceroso comenzó en la década de 1950 cuando Weisberger y Pensky (1958) demostraron *in vitro* e *in vivo* que extractos de tiosulfatos de ajo inhibieron el crecimiento de células tumorales. A partir de estas investigaciones, se han desarrollado muchos estudios epidemiológicos y de laboratorio para evidenciar los efectos quimiopreventivos y anticancerígenos del ajo y otras especies de *Allium*. En particular, se han estudiado sus capacidades para inhibir el crecimiento tumoral y la proliferación celular (efecto antineoplásico). Estos estudios han reportado que la ingesta de ajo y la cebolla disminuye el riesgo de sarcoma y carcinoma en diversos tejidos y órganos, como estómago, colon, esófago, próstata, vejiga, hígado, pulmones, mamas, piel y cerebro. Estos efectos parecen estar mediados por mecanismos diferentes, que no se entienden completamente. Es posible afirmar que el ajo y la cebolla ejercen su acción anticancerígena de manera indirecta por diferentes mecanismos: alteración del metabolismo de los carcinógenos ya sea aumentando la actividad de los sistemas enzimáticos de desintoxicación o aumentando la polaridad del cancerígeno, lo cual facilita su excreción del cuerpo; inhibición de la activación de procarcinógenos por el efecto del ajo sobre el citocromo P450; inhibición del daño oxidativo debido a su acción antioxidante; inhibición de la proliferación celular mediante la inducción de la apoptosis y la inhibición de la división celular; prevención del daño cromosómico; e inhibición de las actividades de la lipoxigenasa y ciclooxigenasa (efecto antiinflamatorio).

La inhibición directa del crecimiento de células cancerosas en cultivos de diferentes tejidos cancerosos también se ha documentado. El mecanismo de la inhibición directa de las células tumorales todavía no ha sido determinado. No obstante, hasta la fecha, se cree que la acción directa anticarcinógena más importante del ajo es la potenciación del sistema inmune. Varias investigaciones han demostrado que los compuestos organoazufrados del ajo y la cebolla tanto solubles en agua como solubles en lípidos proporcionan efectos anticancerígenos. En ajo, Dialil sulfuro (DAS), Dialil sulfóxido (DASO), Dialil sulfona (DASO₂), Dialil disulfuro (DADS), Dialil trisulfuro (DATS), y S- alil cysteíne (SAC) pueden inhibir ambas etapas tempranas y tardías de la carcinogénesis.

Además de la actividad anticancerígena estudiada en ajo, un número de investigadores ha centrado sus investigaciones, observando la actividad antimutagénica de ciertos compuestos de azufre, como DAS, que tienen un efecto sobre los mecanismos de reparación del ADN, evitando mutaciones y previniendo, por lo tanto, el inicio de la carcinogénesis. Por lo tanto, es posible concluir que, aunque no está determinada la ingesta diaria mínima requerida para reducir el riesgo de cáncer, la ingesta de ajo y cebolla puede ofrecer protección contra el desarrollo del cáncer. De hecho, en el Instituto Nacional del Cáncer, en EE.UU concluyeron que el ajo puede ser el alimento más potente en relación a sus propiedades preventivas del cáncer (Corzo-Martínez y col., 2007).

I.5.3. Efectos cardioprotectores

Existen muchos factores asociados con la aparición de patologías como la arteriosclerosis y las enfermedades cardiovasculares, entre los que se pueden incluir: elevados niveles de colesterol y triglicéridos (incluyendo LDL); aumento de la actividad plaquetaria; elevados niveles de homocisteína; diabetes; hipertensión; y obesidad. Estos factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares, están determinados principalmente por causas incontrolables (herencia, sexo y edad) y otras relacionadas con el estilo de vida (tabaquismo, sedentarismo, estrés y dieta), las cuales son controlables. Por esta razón, un enfoque posible para la prevención y tratamiento de enfermedades cardiovasculares podría basarse en la dieta. (Corzo-Martínez y col., 2007).

I.5.3.1 Efectos sobre el metabolismo lipídico

La aterosclerosis es una enfermedad compleja, caracterizada por el engrosamiento de las paredes de las arterias de mediano y grueso calibre, llamado placa de ateroma, producto del depósito e infiltración de sustancias lipídicas. Provoca una reacción inflamatoria, la multiplicación y migración de células musculares lisas, monocitos, linfocitos T y plaquetas, las cuales causan estrechamientos de la luz arterial.

El efecto protector del ajo en la aterosclerosis se ha atribuido a su capacidad para actuar como antiaterogénico es decir previene la formación de placa de ateroma, y antiaterosclerótico, reduciendo el contenido de lípidos en la pared arterial (Banerjee y Maulik, 2002). Estudios con aceite esencial de ajo y ajo crudo realizados en ratas y conejos, han informado que, el consumo de ajo, disminuye significativamente el contenido de colesterol sérico total, lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y también aumenta significativamente el nivel de lipoproteínas de alta densidad (HDL). En otro estudio con conejos alimentados con colesterol, se ha demostrado que el extracto de ajo envejecido (AGE) reduce la acumulación de colesterol y el desarrollo de placas arterioscleróticas en la pared arterial. La Alicina y sus compuestos derivados son las principales sustancias activas responsables de los efectos hipolipemiente e hipocolesterolémico del ajo y la cebolla, tanto en humanos como en animales de experimentación. Algunos compuestos derivados de la Alicina que han demostrado poseer un efecto beneficioso sobre las variables cardiovasculares son Ajoeno, DAS, DATS, 2-vinil-4H-1,3-ditiin y SAC. Además, otros componentes no organoazufrados del ajo, tales como saponinas esteroides, también han demostrado ser capaces de reducir las concentraciones de colesterol sérico (Corzo-Martínez y col., 2007).

I.5.3.2. Efecto antihipertensivo

El ajo parece jugar un rol importante en la dieta sobre la prevención de la hipertensión. Estudios en animales han sugerido que el consumo de ajo es capaz de reducir la presión arterial. En ratas, se encontró que el ajo envejecido y su compuesto organoazufrado más abundante, S-alilcisteine (SAC), tenía actividad anti-hipertensiva y efecto protector del riñón. Del mismo modo, la Alicina presente en ajo, no sólo reduce la presión arterial, sino también el colesterol en sangre. Aparentemente, el extracto de ajo envejecido es más seguro que el ajo crudo ya que este último podría tener efectos dañinos que incluyen disminución de eritrocitos, aumento de reticulocitos (eritrocitos inmaduros no funcionales) y generación de papiloma en el estómago. El efecto antihipertensivo del ajo es mayor 2-6 horas después de la administración, pero el efecto residual puede durar hasta 24 horas.

Si bien estudios en animales han sugerido consistentemente que el ajo reduce la presión arterial, estudios en humanos han generado resultados mixtos (Chen, 2009). Varias investigaciones han permitido la determinación del mecanismo por el cual el ajo ejerce su acción antihipertensiva. Algunos estudios basados en el efecto del ajo sobre la contracción muscular *in vitro* han concluido que su acción hipotensora puede ser, al menos en parte, debido a un efecto relajante directo sobre los músculos lisos. Por otro lado, otros estudios han sugerido que el ajo también puede ejercer un efecto vasodilatador indirecto, induciendo la síntesis de óxido nítrico y sulfuro de hidrógeno, ambos potentes vasodilatadores (Corzo-Martínez y col., 2007).

I.5.3.3. Efecto antihiper glucémico o antidiabético

El efecto hipoglucémico del ajo se atribuye a la Alicina y compuestos relacionados que contienen disulfuro. Los compuestos con grupos S-H son antagónicos a la acción de la insulina. Se encontró que la suplementación de ajo en una dieta hipercolesterolémica dada a ratas, disminuyó el nivel de azúcar en sangre, aumentó significativamente el nivel de glucógeno en hígado y el de insulina en suero en comparación con los valores de control (Augusti, 1990).

En un estudio reciente sobre el uso de remedios naturales para el tratamiento de diabetes mellitus tipo II en un grupo de mujeres diabéticas de Estados Unidos, el ajo apareció entre los vegetales más utilizados. Sin embargo, los resultados de estudios *in vivo* e *in vitro* sobre el efecto del ajo en la glucosa sanguínea son controvertidos, ya que no se han encontrado pruebas de su eficacia en todos los casos. El uso del ajo se ha sugerido conjunto con medicamentos antidiabéticos para aumentar su potencial terapéutico y minimizar su dosificación oral. Los componentes bioactivos a partir de ajo y cebolla, ejercen su acción antidiabética, estimulando la producción y secreción de insulina por el páncreas, lo que interfiere con la absorción de glucosa de la dieta, favoreciendo el ahorro de la insulina (Corzo-Martínez y col., 2007).

I.5.3.4. Efecto antiplaquetario o antitrombótico

La principal función de las plaquetas de la sangre es la de mantener la integridad hemostática de los vasos sanguíneos y detener la hemorragia después de la lesión. Tanto el ajo como la cebolla inhiben la agregación plaquetaria *in vitro*. Varios inhibidores de plaquetas han sido aislados y caracterizados de estos vegetales. Extractos orgánicos y acuosos de ajo son capaces de inhibir la agregación plaquetaria inducida por colágeno y adrenalina, y la síntesis *in vivo* de tromboxanos por la inhibición de su precursor, el ácido araquidónico. Debido a las variaciones en los métodos de preparación, los diferentes productos de ajo disponibles en el mercado pueden mostrar distintos efectos inhibitorios sobre la agregación plaquetaria.

Varios estudios epidemiológicos han informado que la actividad antiagregante del ajo y la cebolla se atribuye a los compuestos organoazufrados (Corzo-Martínez y col., 2007).

I.5.3.5. Efecto sobre la hiperhomocisteinemia

La homocisteína es un aminoácido que contiene azufre formado durante el metabolismo de la metionina, aminoácido esencial derivado de la dieta. La determinación de la homocisteína plasmática total (HYC) se ha convertido en una herramienta muy útil ya que valores moderadamente elevados constituyen un importante factor de riesgo para el desarrollo y progreso de afecciones vasculares y cardiopatía isquémica en pacientes diabéticos.

Existen varios factores que causan aumento de HYC. La hiperhomocisteinemia puede ser congénita, debido a afecciones metabólicas hereditarias, o adquirida debido a la deficiencia de ácido fólico, vitamina B₆ y/o vitamina B₁₂ y al consumo de drogas que interfieren con el metabolismo de estas vitaminas.

Debido que el ajo contiene vitaminas B₆, B₁₂ y una gran cantidad de compuestos aminotiol, como SAMC, Dialil sulfuro (DAS), Dietil disulfuro (DEDS) y Dipropil disulfuro (DPDS), la ingesta de ajo puede ser una forma efectiva de reducir los niveles plasmáticos de homocisteína.

Si bien varios estudios han demostrado la eficacia del extracto de ajo envejecido para reducir la concentración plasmática de homocisteína en ratas con hiperhomocisteinemia inducida por la deficiencia severa de ácido fólico, el mecanismo de acción aún no se conoce con absoluta certeza (Corzo-Martínez y col., 2007).

I.5.3.6. Efecto inmunomodulador

Una gran variedad de efectos inmunomoduladores han sido estudiados en diferentes productos derivados de ajo, principalmente en extracto de ajo envejecido (AGE). Se ha demostrado que AGE ejerce un efecto anti-alérgico y antitumoral a través de la modificación directa y/o indirecta de la función inmune, estimulando la proliferación de linfocitos y anticuerpos, entre otros mecanismos. Varios estudios sugieren que el ajo puede ser eficaz para prevenir la inmunosupresión por diferentes agentes, tales como la quimioterapia, la radiación ultravioleta, el estrés psicológico y físico. También se ha demostrado que el ajo puede utilizarse de forma sinérgica en combinación con otros agentes antifúngicos, debido a su capacidad para mejorar la inmunidad celular del huésped. Los componentes del ajo responsables de la estimulación inmune no se conocen completamente (Corzo-Martínez y col., 2007).

I.6. PROPIEDADES BIOLÓGICAS

I.6.1. Actividad antimicrobiana

En la medicina popular, el ajo y la cebolla se han utilizado durante siglos en muchas sociedades contra enfermedades parasitarias, infecciones fúngicas, bacterianas y virales. La reciente caracterización química de los compuestos de azufre ha permitido afirmar que ellos son los principales agentes antimicrobianos activos (Corzo-Martínez y col., 2007). Los tiosulfatos (principalmente Alicina), fueron sometidos a extensas investigaciones, como resultado de las cuales se concluyó que la Alicina es el compuesto organoazufrado más importante del ajo y que la mayoría de las actividades biológicas conocidas se deben a ella. Se cree que la estructura tiosulfato de la Alicina (S(=O)S) es responsable de la actividad antibacteriana, ya que cuando ésta se transforma en Dialil disulfuro la actividad se suprime.

Los Ajoenos, que también contienen el grupo S=O, son casi tan activos como la Alicina, mientras que los otros alil sulfuros son mucho menos activos. Se ha sugerido que la Alicina inhibe enzimas de microorganismos que contienen el grupo SH por la rápida reacción de los tiosulfatos con los grupos SH. Otra explicación por la cual los tiosulfatos y los Ajoenos inhiben el crecimiento bacteriano puede deberse a la presencia del enlace disulfuro (S-S) el cual reacciona con la cisteína, reduciendo su disponibilidad (Kamel y Saleh, 2000).

Algunas proteínas, saponinas y compuestos fenólicos también pueden contribuir a esta actividad. Debido a la gran actividad antimicrobiana que el ajo y la cebolla poseen, ambos vegetales podrían ser utilizados como conservantes naturales, para controlar el crecimiento microbiano.

Se ha demostrado que el ajo inhibe el crecimiento de bacterias gram-positivas, gram-negativas y ligeramente acidófilas, así como la producción de toxinas. Las bacterias contra las que el ajo es eficaz incluyen cepas de *Pseudomonas*, *Proteus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Micrococcus*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium*, y *Clostridium*, algunos de los cuales son resistentes a la penicilina, estreptomycin, doxycilina y cefalexina, entre otros antibióticos.

El ajo también inhibe a la microflora intestinal beneficiosa, pero es más eficaz contra las enterobacterias potencialmente dañinas, probablemente debido a una mayor sensibilidad de las enterobacterias a la Alicina.

Recientemente, se ha informado que los extractos de ajo y cebolla ejercen efectos bactericidas contra *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* y *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia* (bacterias gram-positivas), consideradas como las principales bacterias responsables de la caries dentales y la periodontitis adulta, respectivamente.

En los vegetales, los principales componentes activos antibacterianos *in vivo* son los derivados de la Alicina, compuestos organoazufrados, tales como Dialil sulfuro (DAS), Dialil disulfuro (DADS) y Ajoeno, así como otros tiosulfatos aislados de aceite macerado de ajo. Estudios epidemiológicos han demostrado que el DAS y DADS pueden actuar contra la infección por *Helicobacter pylori* y, por tanto, reducir el riesgo de neoplasia gástrica, ya que *H. pylori* está profundamente involucrado en el desarrollo de cáncer de estómago (Corzo-Martínez y col., 2007).

I.6.2. Actividad antiparasitaria

Como se señaló anteriormente, los efectos antiparasitarios del ajo machacado eran conocidos por las culturas antiguas. Albert Schweitzer trataba con ajo a personas que sufrían de disentería o gusanos intestinales, en África (Block, 1985).

La diarrea por consumo de agua, representa un problema a nivel mundial y tiene como principal agente causal al protozoo parásito *Giardia lamblia*. El ajo entero y varios compuestos encontrados en preparados de ajo, inhiben el crecimiento de *Giardia lamblia* y *Giardia intestinalis*. Se han propuesto mecanismos para la actividad anti-giardiasis de los compuestos de ajo, incluyendo la sugerencia de que estimula la producción de óxido nítrico sintetasa, siendo el óxido nítrico, citotóxico para *Giardia intestinalis* (Block, 2010).

Debido a la aparición de efectos secundarios desagradables y al aumento de la resistencia a los fármacos sintéticos, recomendados para el tratamiento de la giardiasis, se ha producido un creciente interés en explorar alternativas naturales. La Alicina y Ajoeno y otros compuestos orgánicos sulfurados del ajo son eficaces antiprotozoarios (Corzo-Martínez y col., 2007).

Cada año, más de 1500000 personas mueren de malaria, una enfermedad infecciosa importante en todo el mundo. Cerca de la mitad de la población mundial vive en áreas endémicas de malaria, en riesgo de contraer la enfermedad. La infección se inicia cuando parásitos del género *Plasmodium* se inyectan en la piel de huéspedes vertebrados por un mosquito infectado.

La Alicina se ha utilizado como inhibidor de la proteasa cisteína encargada del procesamiento de la proteína *Plasmodium circumsporozoito* (CSP), y de esta manera previene la invasión de las células huésped *in vitro* e *in vivo* (Block, 2010).

I.6.3. Actividad antifúngica

La primera investigación fue realizada por Raghunandana y col. (1946). Más tarde, Yamada y Azuma (1977) informaron que la Alicina era eficaz *in vitro* frente a *Candida*, *Cryptococcus*, *Trichophyton*, *Epidermophyton* y *Microsporum*, sin embargo, se ha demostrado disminución de la actividad frente a *Aspergillus*. Estos autores observaron que la concentración mínima inhibitoria (CIM) de la Alicina era considerablemente afectada por el tiempo de incubación, tamaño del inóculo, tipo y pH del medio. Por ejemplo, la MIC (concentración mínima inhibitoria) de Alicina contra *Candida*, *Cryptococcus*, y *Aspergillus* se mantuvo constante después de más de 3 días, mientras que contra *Dermatophytes* se mantuvo constante durante los 10 días de incubación. La disminución del tamaño del inóculo aumenta la susceptibilidad a la Alicina.

Otra investigación confirmó la actividad antifúngica de los tiosulfatos. Nagawa et al. (1996) reportaron que el Ajoeno inhibe el crecimiento de levaduras en concentraciones inferiores a 20 mg mL⁻¹, y que *Saccharomyces cerevisiae* fue inhibida por 30 mg mL⁻¹ de Ajoeno después de 24 h de cultivo (Benkeblia y Lanzotti, 2007).

Los principales agentes activos antifúngicos a partir de extractos de ajo y cebolla son los productos de descomposición de la Alicina, incluyendo Dialil trisulfuro (DATS), Dialil disulfuro (DADS), Dialil sulfuro (DAS) y Ajoeno, que tienen mayor efecto antifúngico que la Alicina. Estos compuestos destruyen células fúngicas disminuyendo el consumo de oxígeno, reduciendo el crecimiento celular, inhibiendo la síntesis de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, cambiando el perfil de lípidos de la membrana celular e inhibiendo la síntesis de la pared celular fúngica (Corzo-Martínez y col., 2007).

I.6.4. Actividad antiviral

Se han estudiado las actividades antivirales de varios productos de ajo comerciales, incluyendo tabletas y cápsulas de ajo en polvo, ajo macerado en aceite, aceites de ajo destilados al vapor, ajo añejado en alcohol acuoso y aceite de ajo fermentado, contra virus herpes simplex tipos 1 y 2, virus influenza A y B, citomegalovirus humano, virus de la estomatitis vesicular, rinovirus, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), neumonía viral y rotavirus. Las actividades antivirales de estos productos comerciales parecen ser dependientes de su proceso de elaboración y, aquellos productos con mayores niveles de Alicina y otros organoazufrados tales como DADS, DATS y Ajoeno, tienen las mejores actividades antivirales (Corzo-Martínez y col., 2007).

I.7. ASPECTOS ANALÍTICOS INVOLUCRADOS EN LOS MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS COMPUESTOS ORGANOAZUFRADOS.

En los alimentos, los compuestos organoazufrados son difíciles de identificar, ya que co-existen, con compuestos que se encuentran en niveles más altos tales como carbohidratos, proteínas, lípidos, entre otros. Las técnicas de aislamiento y concentración deben ser optimizadas para cada matriz. Incluso, con los extensos procedimientos de separación, las fracciones que contienen azufre tienen una gran cantidad de otros componentes químicos que interfieren con métodos no específicos de análisis (concomitantes). Además, los compuestos de azufre son inestables y reactivos, se oxidan fácilmente, también sufren modificaciones durante los procesos térmicos. Por esta razón, la técnica analítica ideal de medición debería proporcionar información acerca de la identificación de compuestos, ser sensible, de costo moderado, y evitar transformaciones química y térmicas de los analitos de interés. Los compuestos que se generan como consecuencia del método analítico han sido denominados "artifacts" (Rouseff, 2002).

La determinación de Alicina es dificultosa dada su inestabilidad y su naturaleza reactiva. Su vida media puede variar dependiendo de la concentración, temperatura y solvente en el cual es almacenada. La descomposición de la Alicina puede producirse tras varias secuencias de reacciones que conducen a la formación de productos tales como polisulfuros, Vinilditiinas y Ajoenos (Rivlin, 2001).

Debido al gran número de compuestos organoazufrados presentes tanto en ajo fresco como en los distintos subproductos, se han desarrollado diversas metodologías para la cuantificación de los mismos. Las primeras determinaciones para evaluar el contenido de tiosulfatos totales, consistían en el dosaje de ácido pirúvico. El inconveniente de este método era que los niveles de ácido pirúvico se asocian al contenido total de tiosulfatos, por lo que no se lo puede correlacionar solamente con la cantidad de Alicina (Jansen y col., 1987).

Otra alternativa fue la cuantificación indirecta por conversión de la Alicina en Dialil disulfuro o Allil mercaptan mediante CG: este método fue muy útil para analizar homogenatos de ajo fresco, con el inconveniente de que no podía ser utilizado en preparaciones de ajo que contuvieran tanto Alicina como Dialil disulfuro (Lawson y col., 1991).

I.7.1. Técnicas de preparación de muestras

A continuación se especifican algunas técnicas de extracción que se emplean para el aislamiento de compuestos organoazufrados.

I.7.1.1. Destilación

La destilación es uno de los procedimientos más fáciles para separar compuestos azufrados volátiles a partir de las matrices de alimentos. Sin embargo, debido a que estos compuestos son altamente reactivos, se debe siempre considerar la posibilidad de una descomposición térmica. La destilación por alto vacío se ha empleado para reducir la formación potencial de "artifacts". Desafortunadamente, no es un método simple de preparación de muestras, ya que requiere equipamiento adecuado y tiempo prolongado (4-6 horas) para llevarse a cabo, por lo que no es muy adecuado para el análisis de rutina.

La extracción y destilación simultánea (SDE), se ha utilizado para aislar y concentrar volátiles de azufre. El procedimiento de Likens-Nickerson ha sido utilizado para el aislamiento de los volátiles del flavor de extractos de levadura comercial. Utilizando este procedimiento, se identificaron por primera vez 115 componentes azufrados del flavor (Rouseff, 2002).

I.7.1.2. Extracción Líquido- Líquido o extracción con disolvente (LLE)

Es un método de disolución selectiva en el que el analito es removido del disolvente original y posteriormente se disuelve en un disolvente diferente, mientras que la mayor parte del resto de la muestra permanece sin extraer, es decir, permanece en la solución original. La técnica implica obviamente dos fases líquidas, la solución original y el disolvente de extracción. Los criterios importantes para una separación exitosa del analito son que las fases líquidas sean inmiscibles y que el analito sea más soluble en el disolvente de extracción que en la solución original (Kenkel, 2003).

I.7.1.3. Extracción sólido- líquido (SLE)

En este método, el analito debe ser extraído de una muestra sólida mediante un disolvente que permite únicamente la disolución del mismo y no la de otros componentes de la muestra. La muestra sólida pesada, preferiblemente finamente dividida, se pone en contacto con un líquido de extracción en un recipiente adecuado y generalmente es mezclada o agitada durante un cierto período de tiempo, a veces a una temperatura elevada, de tal manera que el analito se extraiga de la muestra y se disuelva en el líquido. Después de la extracción, el material sólido no disuelto se filtra y se analiza el filtrado (Kenkel, 2003).

I.7.1.4. Extracción con fluido supercrítico (SFE)

Las extracciones de muestras sólidas también pueden realizarse con fluidos supercríticos. Un fluido supercrítico (FSC) es cualquier sustancia que se encuentra en condiciones de presión y temperatura superiores a su punto crítico y se comporta como “un híbrido entre un líquido y un gas”, es decir, puede difundir como un gas y disolver sustancias como un líquido. Debido a presentar buenas propiedades como disolventes y bajas viscosidades, los fluidos supercríticos pueden ser utilizados para la extracción eficiente de analitos de muestras sólidas. La muestra sólida se contiene en un tubo o cartucho y se hace fluir a través del mismo, el fluido supercrítico a la presión mínima requerida. Luego el líquido con el analito se hace pasar a través de una trampa con disolvente. El analito se disuelve en este disolvente y el fluido se vuelve a la fase gaseosa (Kenkel, 2003) reduciendo la presión y dejando que el fluido se evapore en las condiciones ambientales de laboratorio. Esta propiedad es particularmente importante en el caso de los analitos termolábiles. Otra ventaja de muchos fluidos supercríticos es que son baratos e inoocuos por lo que se pueden dejar evaporar libremente en la atmósfera sin efectos ambientales dañinos. El dióxido de carbono, fluido supercrítico comúnmente utilizado, es especialmente útil tanto para extracciones como para cromatografía. (Skoog y col., 2001).

I.7.1.5. Microextracción en fase sólida (SPME)

La SPME se basa en la extracción de los analitos volátiles o volatilizables de la matriz de la muestra. Se emplea una fibra de sílice fundida que está recubierta de una fase estacionaria (sorbente), la cual es expuesta en el espacio de cabeza generado en un vial donde se encuentra la muestra sólida o líquida en equilibrio con su fase gaseosa. El paso siguiente es la desorción de los analitos mediante temperatura o un disolvente orgánico. El pequeño tamaño de la fibra y su geometría cilíndrica permiten incorporarla en una jeringa. De esta forma, se facilita su manipulación y al mismo tiempo se protege la fibra cuando no se utiliza, ya que ésta permanece dentro de la aguja de la jeringa. Esta técnica presenta una serie de ventajas frente a las técnicas de preconcentración mencionadas anteriormente ya que es muy simple, presenta un bajo costo, puede ser automatizada, requiere pequeños volúmenes de muestra y generalmente no precisa del uso de disolventes orgánicos para llevar a cabo la preconcentración. Además, debido a su diseño, es fácilmente transportable por lo que la hace una técnica muy adecuada para realizar análisis de campo. Otra ventaja que presenta es la posibilidad de utilizarse con todos los tipos de muestras, ya sean gaseosas como por ejemplo aire o aliento, líquidas como aguas o bebidas, o sólidas como sedimentos, alimentos, etc. También, se puede aplicar a la determinación de compuestos de diferente volatilidad. Como inconveniente se puede mencionar que debido a la limitada capacidad de las fibras (la cantidad de recubrimiento es muy pequeña) en ocasiones no se obtienen unos límites de detección bajos, sobre todo si la SPME se utiliza combinada con la cromatografía de líquidos (Peñalver, 2002).

I.7.2. Técnicas de separación y cuantificación

I.7.2.1. Introducción a la cromatografía

La cromatografía es uno de los métodos físicos generales que más ampliamente se emplean para aislar los componentes de una mezcla dada. La separación de los mismos se basa en las diferencias que presentan sus respectivos coeficientes de distribución entre dos fases no miscibles:

- Fase móvil: fluye a través de la fase estacionaria. Puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico.
- Fase estacionaria: se mantiene fija en una columna o sobre una superficie sólida.

Las dos fases se elijen de forma tal que los componentes de la muestra se distribuyan de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria.

Aquellos componentes que son retenidos con fuerza por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario, los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria, se mueven con rapidez. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas que pueden analizarse cualitativa y/o cuantitativamente.

I.7.2.2. Aplicaciones

La cromatografía es el método principal para la separación de especies químicas y posterior identificación cuali-cuantitativa. Desde el punto de vista cualitativo, se emplea para identificar la presencia de componentes de interés en una muestra. Por ejemplo si en la muestra problema no aparece un pico de interés en el mismo tiempo de retención que el correspondiente estándar analítico en las mismas condiciones, se puede asumir que el compuesto en cuestión está ausente, o está presente en una concentración por debajo del límite de detección del procedimiento.

El análisis cuantitativo, se basa en la comparación de la altura o del área del pico del analito con la del estándar correspondiente.

I.7.2.3. Clasificación de métodos cromatográficos

- Según tipo de fase móvil y estacionaria
 - **Cromatografía gaseosa (CG)**
 - **Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)**

A continuación se detallan algunas técnicas para la separación y cuantificación de compuestos organoazufrados presentes en el ajo. Se comparan técnicas de separación por cromatografía gaseosa (CG) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en cuanto a poder de separación, capacidad de muestra y sensibilidad del detector.

I.7.2.3.1 Cromatografía de gases (CG)

I.7.2.3.1.1. Componentes

- **Fase móvil:** gas inerte portador (carrier) que circula a una temperatura adecuada para que las moléculas de la muestra fluyan por la columna en fase vapor. El gas, generalmente Helio (también puede utilizarse nitrógeno, argón e hidrógeno) debe ser inerte, es decir, no debe reaccionar ni con la muestra ni con la fase estacionaria, debe ser de alta pureza y sin absolutamente nada de agua ni oxígeno.
- **Muestras:** deben ser volátiles y termoresistentes de manera de pasar a través de la columna. Las muestras se inyectan mediante una microjeringa en una cámara caliente situada en la cabeza de la columna. La temperatura de la cámara es generalmente 50°C por encima del punto de ebullición del compuesto menos volátil de la muestra.
- **Columna:** la eficiencia de la columna requiere que la muestra sea de tamaño pequeño y que se introduzca como un “tapón de vapor”. Pueden ser empacadas o de relleno (admiten muestras grandes) o capilares de menor diámetro interno y más largas, que tienen mejor resolución. Estas últimas se caracterizan por ser muy flexibles y resistentes, pudiéndose doblarse en espirales. Pueden ser de acero inoxidable, vidrio o sílice fundida y su superficie interna está recubierta con una fina capa estacionaria líquida.

- **Horno termostático:** la columna enrollada se coloca dentro de él, permitiendo, de esta manera, poder controlar su temperatura y al realizar la corrida, obtener tiempos de retención reproducibles. La temperatura óptima depende del punto de ebullición de los componentes de la muestra, llegando en algunos casos a 450°C.
- **Detectores:** deben responder rápidamente a bajas concentraciones de soluto, respuesta lineal, estable, universal (para una gran variedad de compuestos químicos) o selectiva (para un grupo limitado de solutos). Los más utilizados son: el de ionización de llama (FID), captura de electrones (DCE) y el de conductividad térmica. La elección del detector debe realizarse en función de la naturaleza de los compuestos a determinar, gas portador y sensibilidad del análisis.

1.7.2.3.2. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

HPLC utiliza una columna rellena (fase estacionaria), una bomba que mueve el disolvente (fase móvil o eluyente) a través de la columna y un detector que muestra los tiempos de retención y la abundancia relativa de los compuestos separados que eluyen por la columna. Los tiempos de retención varían con la interacción de cada compuesto con las fases móvil y estacionaria (Block, 2010).

1.7.2.3.2.1. Componentes

- **Fase móvil:** es la solución que fluye sobre la fase estacionaria, la cual debe disolver la muestra, tener baja viscosidad, ser compatible con el tipo de detector utilizado, tener la polaridad adecuada para permitir una retención conveniente de la muestra en la columna, ser de alta pureza y de grado cromatográfico.
- **Recipiente de almacenamiento de fase móvil:** pueden ser de vidrio, acero inoxidable o plásticos inertes con capacidad de 1 a 3 litros.
- **Bombas:** generalmente de pistón, desplazan flujos de volumen constante en forma pulsante.
- **Válvulas de inyección de la muestra:** entre 2 y 1000 μL .
- **Columnas:** generalmente de acero inoxidable, de 30 cm de largo, rellenas de material inerte: gel de sílice, alúmina, celulosa o carbón activado (fase estacionaria). Pueden mantenerse a temperatura ambiente o, en equipos que lo dispongan, colocarse en un horno entre 30-100°C. Existen diversos tipos de fases estacionarias, que determinan diversas modalidades cromatográficas. Las que empleamos para el presente trabajo de tesis fueron:
 - **Fase Normal:** en donde la fase estacionaria se une más fuertemente a los compuestos polares, por lo que éstos eluyen más lentamente que los compuestos menos polares, y se utilizan solventes orgánicos como eluyentes.
 - **Fase Reversa:** en donde la fase estacionaria se une más fuertemente a los compuestos no polares, por lo que éstos eluyen más lentamente que los compuestos polares, y se utilizan solventes acuosos como eluyentes (Block, 2010).
- **Precolumna o guarda columna:** precede a la columna, tiene la misma fase estacionaria y se usa para preservar y prolongar la vida útil de la misma.
- **Detectores:** deben ser sensibles a bajas concentraciones del compuesto, estables ante los cambios de temperatura y de composición del solvente. Los más usados son: ultravioleta, índice de refracción, electroquímico, y de fluorescencia. La elección depende del compuesto a determinar, fase móvil y sensibilidad requerida para el análisis.

1.7.2.3.3. Comparación entre Cromatografía Gaseosa y Cromatografía Líquida de alta resolución para la determinación de compuestos organoazufrados en ajo.

La primera referencia del uso de Cromatografía Gaseosa en la investigación del ajo, fue en 1961 cuando Carson y Wong utilizaron esta técnica para separar alil di- y tri-sulfuros para su posterior identificación. Debido a la excelente resolución y la capacidad de identificación del método de Cromatografía Gaseosa (CG) y Cromatografía Gaseosa-Espectroscopia de Masa (CG-MS), estas técnicas se han utilizado para cuantificar compuestos volátiles de plantas del género *Allium* (Gómez, 2008).

La cromatografía gaseosa constituye un método de separación rápido y sensible que utiliza instrumental sencillo y menos costoso comparado con el método por HPLC.

En 1992, Block y col., reportaron algunos métodos cromatográficos para caracterizar y cuantificar tiosulfatos inestables, producidos en el ajo cortado. Observaron que la utilización de CG puede producir compuestos que no se encuentran en el ajo y que se producen en el puerto de inyección. Encontraron que incluso, al utilizar temperaturas bajas y condiciones suaves de inyección, el método de CG no es una técnica adecuada para el análisis de tiosulfatos debido a la inestabilidad térmica de los mismos, y que por el contrario, el método por HPLC es el más adecuado (Gómez, 2008).

Los compuestos formados por las altas temperaturas del inyector (200-250°C), comúnmente utilizado en cromatografía gaseosa, son conocidos como "artifacts" y constituyen un serio problema ya que a la hora de informar un resultado se debería poder discernir los compuestos presentes en la muestra original, de aquellos que son producto de la degradación por altas temperaturas. La separación por HPLC, al llevarse a cabo a temperatura ambiente, constituye una ventaja importante frente al CG, ya que se evita la formación de "artifacts" en la separación e identificación de compuestos organoazufrados térmicamente inestables (Rouseff, 2002).

A pesar de las ventajas que presenta el uso de HPLC, los estudios de Block y colaboradores, muestran factores que afectan la fiabilidad y reproducción de este método analítico. Uno de ellos es el tiempo desde la preparación de extractos homogéneos y el análisis de los mismos, ya que en el caso de la Alicina, el análisis se obtiene luego de 30 minutos de preparación del extracto. La Alicina, al ser menos estable en disolventes orgánicos a temperatura ambiente, se debe analizar inmediatamente. Otro inconveniente del método es la incompleta separación de algunos picos y sus compuestos (Gómez, 2008). Además los detectores de HPLC generalmente son menos sensibles y selectivos que los de CG (Rouseff, 2002).

Otra diferencia fundamental entre CG y HPLC es la influencia de la fase móvil en la separación. En CG la fase móvil es un simple transportador del soluto y prácticamente no influye en la separación. Por el contrario, en HPLC la fase móvil es el parámetro fundamental que gobierna la separación. En consecuencia en CG se necesitan muchas columnas para abarcar el rango de separaciones posibles, mientras que en HPLC con una sola columna es posible separar sustancias polares, iónicas y no polares simplemente modificando la composición de la fase móvil, que sí interactúa con la muestra para su separación.

I.8 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

El ajo ha sido ampliamente utilizado en todo el mundo como una importante hortaliza, especia y condimento. Además de consumirse en fresco, puede consumirse como ajo deshidratado, cocido, horneado, frito, entre otros. Los diferentes métodos de preparación, repercuten en el flavor dando lugar a distintas composiciones de compuestos organoazufrados (OSCs) (Yu y col., 1993).

Existen varios estudios que revelan que los compuestos organoazufrados son inestables química y térmicamente. Los tiosulfatos que se forman cuando se machaca el ajo son muy reactivos y experimentan un gran número de transformaciones dependiendo de la temperatura, pH y condiciones de extracción.

Lawson (1993), encontró que los alil tiosulfatos (Alicina, Alil-metil y Alil-trans-1-propenil) son los menos estables de todos los tiosulfatos del ajo porque forman Tioacroleína y Alilmercaptan como intermediarios para futuras reacciones (Gómez, 2008).

La Alicina, compuesto biológicamente activo más importante encontrado en ajo cortado, en presencia de altas temperaturas o solventes orgánicos, sufre una serie de transformaciones originando otras especies químicas (Lawson y col., 1991). Se descompone completamente en 144 horas cuando un jugo de ajo es mantenido a 40°C en un baño de agua; el análisis mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), evidencia que las concentraciones de Dialil trisulfuro y Dialil disulfuro aumentan, pero este último, luego de 64 horas disminuye debido a la volatilidad o descomposición del mismo (Yu y col., 1989). Por otro lado, Brodnitz y col., 1971, observaron que la Alicina se descompone completamente a 20°C después de 20 horas dando: Dialil disulfuro (66%), Dialil trisulfuro (9%), Dialil sulfuro (14%) y Dióxido de azufre. En base a estos dos resultados se concluyó que la Alicina es más estable en jugo de ajo que en estado puro (Yu y col., 1989).

También existe evidencia suficiente que da cuenta de las transformaciones que sufren los distintos compuestos en diversos solventes.

Los tiosulfatos son más estables en solventes polares. La vida promedio de la Alicina a temperatura ambiente es de 10 días en 1 mM de ácido cítrico (pH 3), 4 días en agua, 48 horas en metanol o cloroformo, 30 horas en diclorometano, 24 horas en etanol o acetonitrilo, 3 horas en éter, 2 horas en hexano y 16 horas en la ausencia de solventes (Lawson, 1993; Gómez, 2008). Los tiosulfatos al mezclarse con agua se transforman principalmente en Dialil trisulfuro, Dialil disulfuro y Alil metil trisulfuro. La velocidad de formación de los sulfuros incrementa considerablemente con el calentamiento del ajo, así como durante la destilación con vapor.

Al mezclarse la Alicina con solventes de baja polaridad (cloroformo, éter, hexano, aceites vegetales) o sin solvente, se produce principalmente 2-vinil-4H-1,3-ditiina (52%), 3-vinil-4H-1,2-ditiina (19%) y en menor cantidad Ajoenos (12%) y sulfuros (18%) (Lawson, 1993; Gómez, 2008). Cuando la Alicina es mantenida en aceite se obtienen concentraciones estables de los productos de transformación después de 24 horas. Tras un almacenamiento prolongado se observa una disminución, especialmente para las Vinilditiinas, ya que luego de 40 días de almacenamiento, disminuyó alrededor del 30% el contenido de 2-vinil-4H-1,3-ditiina (Iberl y col., 1990).

Cuando la Alicina se mezcla con etanol, se produce principalmente Dialil trisulfuro (73%) y Dialil disulfuro (8%) y Ajoeno (8%), sin embargo, cuando se utiliza Alicina pura, se obtiene Ajoeno (55%), Vinilditiinas (34%), y algunos sulfuros (0-11%).

Al mezclar Alicina con metanol, se produce principalmente Dialil trisulfuro (83%) y Dialil disulfuro (10%), pero pequeñas cantidades de Ajoeno (1%) y Vinilditiinas (1%) y 5% de compuestos no identificados (Lawson, 1993; Gómez, 2008).

Debido a la evidencia significativa de la formación de compuestos volátiles al someter al ajo a diferentes métodos de cocción, tratamientos térmicos o de preservación, en los últimos años las investigaciones científicas se han centrado en su estudio (Yu y col., 1993;).

Las metodologías analíticas incorporan fuentes de variabilidad que dificultan la precisión en el análisis químico cuali-cuantitativo de diversos derivados del género *Allium*. Existen varios antecedentes que revelan la composición de compuestos organoazufrados presentes en ajo sometido a diversos tratamientos térmicos, cuantificados mediante el empleo de cromatografía gaseosa- espectroscopía de masas (CG-MS). El análisis por CG-MS ha ocupado un lugar destacado en el esfuerzo por caracterizar volátiles de plantas del género *Allium* debido a su excelente resolución y la capacidad de identificación de masas (Block, 1992).

Por otro lado, también hay autores que critican estos resultados ya que han advertido que muchos de los compuestos identificados por CG son compuestos de degradación térmica de los analitos originales en las muestras llamados "artifacts".

Muchos de los compuestos organoazufrados encontrados en ajo y cebolla, son térmicamente inestables, incluso, en algunos casos, a temperatura ambiente. Por tanto, es sorprendente que existan muchos trabajos de investigación que extraen diversas conclusiones, acerca de los compuestos del flavor, a partir de extractos de especies de *Allium* sometidos a severas condiciones de CG-MS.

Al trabajar con muestras verdaderas y en paralelo con métodos de análisis no térmicos, por ejemplo, HPLC, las condiciones de separación por CG-MS pueden ser optimizadas (o de hecho consideradas inapropiadas) y de esta manera evitar la formación de artifacts. Dichos procedimientos deben ser utilizados rutinariamente en los casos donde se sospecha inestabilidad térmica de los componentes de la mezcla (Block, 1993; Rouseff, 2002).

De todo lo expuesto es que surge la necesidad de encarar un estudio tendiente a evaluar las fuentes de variabilidad existentes durante el proceso analítico en orden a minimizarlas. A modo de poner a punto una metodología que permita la detección y cuantificación de compuestos organoazufrados se propone someter los analitos individuales a diversas condiciones presentes en el método analítico. Las variables consideradas, dentro de las cuales se incluyen métodos de extracción, solventes, temperatura y tiempo, afectan la estabilidad de los compuestos de interés y a su vez podrían determinar interacciones entre los mismos.

Los resultados a obtener, serán de gran utilidad ya que permitirán contar con técnicas analíticas que no incorporen tratamientos térmicos a las muestras, específicamente el análisis mediante Cromatografía Líquida de Alta Performance, asegurando que los compuestos identificados correspondan a los que realmente están presentes en las mismas.

En resumen podemos decir que los OSCs son vulnerables a las variables involucradas en el método analítico por lo cual es imperante la necesidad de evaluar como los diferentes factores implicados podrían incorporar potencialmente variabilidad en los resultados analíticos.

Por otro lado, la mayoría de los métodos analíticos para OSCs se focalizan en la determinación de compuestos específicos relacionados químicamente entre sí. También en el presente trabajo se desea desarrollar un método analítico que se aplique al *screening* de los principales OSCs de interés funcional.

I.9. HIPÓTESIS

Lo descripto nos permite plantear la siguiente Hipótesis:

El conocimiento de la influencia de diversas variables sobre la estabilidad de los compuestos organoazufrados permitirá optimizar las condiciones experimentales para el desarrollo de las diversas metodologías analíticas.

I.10. OBJETIVOS

I.10.1. Objetivos Generales

- Estudiar la influencia de diferentes variables físico-químicas sobre la estabilidad de compuestos organoazufrados.
- Poner a punto y validar una técnica de extracción sólido-líquido de compuestos organoazufrados de muestras de ajo.
- Desarrollar y validar una metodología analítica para la determinación de múltiples compuestos organoazufrados de interés funcional en muestras de ajo.

I.10.2. Objetivos Específicos

- Estudiar la síntesis y purificación de Alicina y Ajoenos y lograr la síntesis y purificación de Vinilditiinas.
- Realizar la confirmación estructural de los compuestos sintetizados mediante Cromatografía Gaseosa con espectrometría de masas (GC-MS).
- Evaluar la estabilidad físico-química de los compuestos organoazufrados expuestos a condiciones normales de conservación.
- Optimizar el proceso de extracción Sólido-Líquido de los compuestos organoazufrados bajo estudio empleando HPLC para su evaluación.
- Caracterizar el método analítico desarrollado mediante la evaluación de cifras analíticas de mérito (precisión, recuperación, linealidad, límites de detección y cuantificación de los analitos bajo estudio).
- Aplicar la técnica validada para la determinación de compuestos organoazufrados en muestras problema.

Capítulo II

ESTUDIO DE LAS TRANSFORMACIONES DE LOS COMPUESTOS ORGANOAZUFRADOS SOMETIDOS A DIVERSAS CONDICIONES EXPERIMENTALES

II. ESTUDIO DE LAS TRANSFORMACIONES DE LOS COMPUESTOS ORGANOAZUFRADOS SOMETIDOS A DIVERSAS CONDICIONES EXPERIMENTALES

II.1. INTRODUCCIÓN

Tal como ha sido mencionado en el capítulo I, existen numerosas investigaciones que datan de la inestabilidad de los compuestos organoazufrados frente a diversas variables, como así también de los productos originados a partir sus precursores (Yu y Wu., 1989a; Iberl y col., 1990; Lawson, 1993).

El perfil de compuestos azufrados en el ajo varía de acuerdo al método en que éste ha sido procesado o preservado. De manera que cuando el ajo es cocinado, aplastado, ingerido o deshidratado dicha composición experimenta un cambio dando origen a nuevas especies químicas. Esto motiva a los científicos a interiorizarse en su estudio (Kamel y Saleh, 2000).

La estabilidad de la Alicina, principal tiosulfonato encontrado en ajo cortado, ha sido ampliamente estudiada. Dusica y col., 2012 realizaron un estudio basado en la influencia de ultrasonido, microondas, diferentes solventes (acetonitrilo, acetona, metanol y cloroformo) y temperaturas (temperatura ambiente, 45°C y 55°C) en las transformaciones de la Alicina sintética y pura. La degradación cinética de la Alicina fue monitoreada por HPLC y se encontró que tanto el incremento de temperatura como el uso del microondas, aceleran la velocidad de transformación de la misma. Además aseguraron que la concentración de Alicina fue mayor en cloroformo y disminuyó rápidamente en acetonitrilo para todas las temperaturas ensayadas.

Trabajos recientes realizados en el Laboratorio de Cromatografía para Agroalimentos de la Facultad de Ciencias Agrarias (Locatelli y col. 2010), se han focalizado en la optimización de metodologías analíticas para cuantificar compuestos organoazufrados empleando metodologías como GC y HPLC. Durante el desarrollo de las mismas se advirtió la inestabilidad tanto de analitos individuales como de las mezclas de los compuestos organoazufrados en diferentes condiciones experimentales. Esta situación ha motivado el interés en realizar un estudio de las transformaciones que se producen en los compuestos individuales cuando son sometidos al efecto de variables como luz, temperatura, tiempo, solventes, etc., las cuales podrían estar implicadas en diferentes metodologías de análisis e influir en los compuestos a detectar.

Para llevar a cabo el siguiente estudio es necesario el empleo de un diseño experimental factorial. El objetivo del mismo es estudiar el efecto individual y de interacción de varios factores sobre una o varias respuestas. Los *factores* pueden ser de tipo cualitativo (sus niveles toman valores discretos o de tipo nominal) o cuantitativos (cuando sus niveles toman cualquier valor dentro de cierto intervalo). Para estudiar la manera en que influye cada factor sobre la variable respuesta es necesario elegir al menos dos niveles de prueba para cada uno de ellos. Este tipo de diseño se conoce con el nombre de *diseño factorial* 2^k , siendo k el número de factores, todos con dos niveles de prueba indicando cada nivel con los códigos 1 y -1. Se denomina *matriz del diseño o arreglo factorial* al conjunto de puntos experimentales o tratamientos que pueden formarse al considerar todas las posibilidades de combinación de los niveles de los factores.

El *efecto de un factor* se define como el cambio observado en la variable respuesta debido a un cambio de nivel de tal factor. El *efecto principal de un factor* es el cambio en la media de la variable respuesta debido a la acción individual de cada factor. En términos matemáticos, el efecto *principal de un factor* es igual a la respuesta promedio observada en el nivel alto del factor menos la respuesta promedio en el nivel bajo.

Por otra parte, se dice que dos factores interactúan entre sí o tienen un *efecto de interacción* sobre la variable respuesta, cuando el efecto de un factor depende del nivel en que se encuentra el otro. Gráficamente la interacción entre dos factores se pone en evidencia cuando los segmentos que unen las respuestas para cada nivel de un factor se interceptan entre sí. Por el contrario, cuando éstas son paralelas se dice que no hay interacción entre los factores. (Gutiérrez Pulido y De la Vara Salazar, 2008).

II.2. OBJETIVOS

- Evaluar la estabilidad físico-química de los compuestos organoazufrados (Alicina, Dialil sulfuro, Dialil disulfuro, y Dialil trisulfuro) expuestos a diversas condiciones experimentales.
- Evaluar el efecto principal y de interacción entre los factores implicados en el estudio.

II.3. MATERIALES Y MÉTODOS

II.3.1. Reactivos

- Acetonitrilo, J.T Baker grado HPLC
- Agua miliQ
- Alicina sintetizada según González y col., 2007
- Cloroformo, Dalton grado HPLC.
- Dialil disulfuro (DADS) (Fluka, 80%).
- Dialil sulfuro (DAS) (Aldrich, 97%).
- Dialil trisulfuro (DATS) (LKT laboratorios, Inc., 98,1%)
- Gas inerte: Nitrógeno.
- Hexano, Dalton grado HPLC.
- Metanol, J.T Baker grado HPLC.

II.3.2. Material de laboratorio

- Jeringa de inyección de 100 μ L, HAMILTON.
- Matrices: 6 de capacidad de 50 mL
2 de capacidad de 25 mL
4 de capacidad de 10 mL
4 de capacidad de 5 mL
- Pipeta automática: volumen 100-1000 μ L, Nichipet EX
- Viales color caramelo de capacidad de 2 mL con tapa a rosca: 64

II.3.3. Equipos

- Baño ultrasónico TESLAB tb04.
- Balanza analítica DENVER APX-200.
- Cromatógrafo líquido KINK-500-A series KONIK instruments Acoplado a un detector UV-Vis. Columna octadecilsilano (WATERS).
- Estufa graduada a 45°C \pm 2, Dalvo Modelo CHR.
- Freezer a -10°C \pm 2, Bambi.

II.3.4. Metodología de trabajo

II.3.4.1. Diseño experimental

Con el uso del software Design Expert 8.0.7.1, se realizó un diseño experimental factorial de dos niveles con el cual fue posible estudiar el efecto principal y de interacción entre los distintos factores. El diseño factorial constó de 3 factores: temperatura (°C), tiempo (día) y solventes (metanol, acetonitrilo, hexano y cloroformo), en el cual los dos primeros factores presentaban dos niveles mientras que el último tenía 4 niveles por lo que se transformó en dos factores de dos niveles cada uno. Cabe destacar que al tratarse de un primer diseño exploratorio para evaluar estabilidad, se eligieron valores extremos de las variables de manera de poder estudiar en forma amplia el comportamiento de los estándares implicados en el estudio. En la tabla II.1 se muestra el diseño experimental desarrollado.

Tabla II.1. Diseño experimental factorial 2^k

N° tratamiento	Bloque	Factores			Respuestas			
		A: Temperatura (°C)	B: Tiempo (días)	C: Solvente	Alicina	DAS	DADS	DATS
1	Día 1	45	2	Metanol				
2	Día 1	45	2	Acetonitrilo				
3	Día 1	-10	2	Cloroformo				
4	Día 1	-10	2	Hexano				
5	Día 2	45	2	Cloroformo				
6	Día 2	-10	2	Metanol				
7	Día 2	-10	2	Acetonitrilo				
8	Día 2	45	2	Hexano				
9	Día 1	45	21	Metanol				
10	Día 1	45	21	Hexano				
11	Día 1	-10	21	Metanol				
12	Día 1	-10	21	Acetonitrilo				
13	Día 2	45	21	Cloroformo				
14	Día 2	-10	21	Hexano				
15	Día 2	45	21	Acetonitrilo				
16	Día 2	-10	21	Cloroformo				

II.3.4.2. Preparación de soluciones madres

Se prepararon soluciones madres de Alicina, Dialil sulfuro (DAS), Dialil disulfuro (DADS) y Dialil trisulfuro (DATS), en cada uno de los cuatro solventes: metanol, acetonitrilo, cloroformo y hexano, de acuerdo a la siguiente metodología:

- Se pesó una gota de cada uno de los estándares en matraces de capacidad conocida previamente tarados y luego fueron disueltos en cada uno de los solventes bajo estudio.
- Para el cálculo de la concentración de cada solución madre se aplicó la siguiente fórmula:

$$C = \frac{P_p (\mu\text{g}) \times \text{Pur}}{V_f (\text{mL}) \times 100}$$

Donde: C= conc. de la solución patrón expresada en ppm
 P_p = peso del patrón en μg
 Pur/ 100= pureza porcentual del patrón
 V_f = volumen final de la solución expresado en mL

II.3.4.3. Tratamiento de soluciones madres

Las soluciones madres fueron llevadas a baño ultrasónico durante 15 minutos con motivo de lograr una buena homogenización.

II.3.4.4. Preparación de muestras

Se prepararon en total 64 muestras de 1 mL de cada una de las soluciones individuales de los compuestos organoazufrados dispuestos en los solventes bajo estudio. La concentración de cada muestra se observa en la tabla II.2. Se emplearon viales color caramelo de 2 mL de capacidad utilizando una pipeta automática de volumen 100-1000 μL y en los casos en los que se requirió menor volumen se realizó con jeringa de capacidad de 100 μL .

- A partir de las soluciones madres se prepararon las muestras para un volumen final de 1 mL, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

Donde: C_1 = conc.de la solución madre (ppm)
 V_1 = volumen tomado de la solución madre (mL)
 C_2 = concentración de la solución final (ppm)
 V_2 = volumen final de la solución a preparar (mL)

Tabla II.2. Concentración final de las muestras preparadas a partir de las soluciones madres.

Solvente	Estándar	Conc. Sol.madre (ppm)	Volumen de sol.madre (μL)	Volumen de solvente (μL)	Volumen Final (μL)	Conc. Final (ppm)
Metanol	Alicina	1,38*	440	560	1000	0,6*
	DAS	1062	95	905	1000	100,89
	DADS	470	215	785	1000	101,5
	DATS	400	250	750	1000	100
Acetonitrilo	Alicina	1,74*	410	590	1000	0,71*
	DAS	528	190	810	1000	100,32
	DADS	664	150	850	1000	99,6
	DATS	400	250	750	1000	100
Cloroformo	Alicina	1,18*	560	440	1000	0,66*
	DAS	808	125	875	1000	101
	DADS	1558	65	935	1000	101,27
	DATS	400	250	750	1000	100
Hexano	Alicina	1,6*	355	645	1000	0,57*
	DAS	448	225	775	1000	100,8
	DADS	588	170	830	1000	99,96
	DATS	400	250	750	1000	100

*Alicina expresada en mg mL^{-1}

II.3.4.5. Tratamiento de muestras

Se sometió a cada una de las muestras a variables de tiempo (2 y 21 días) y temperatura (-10°C y 45°C) tal como indica el diseño experimental mencionado anteriormente.

II.3.4.6. Evaluación de la estabilidad de los compuestos organoazufrados

Se realizaron las mediciones en el equipo HPLC con una columna de fase reversa ODS C18 de 254 mm de longitud y 0,46 mm d.i. La fase móvil utilizada fue la misma establecida por Iberl y col., 1990, acetonitrilo:agua:metanol (50:41:9) (V/V), flujo 1mL min⁻¹, loop: 20µL, longitud de onda: 254nm, en el tiempo establecido en el diseño experimental. Cada una de las muestras fue inyectada por duplicado, de los cromatogramas obtenidos se consideraron las áreas de los compuestos de interés.

II.3.4.7. Análisis estadístico de los datos

Para el análisis de los resultados se tuvieron en cuenta los valores de área de cada analito en los cromatogramas. Con dichos valores y considerando su relación con la concentración de cada estándar, se realizó ANOVA multifactorial provisto por el software mencionado anteriormente.

II.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

II.4.1. Alicina

A continuación en la tabla II.3 se presenta el informe emitido por el software Design Expert 8.0.7.1 referido al análisis de la varianza multifactorial obtenida para el estándar Alicina.

Tabla II. 3. ANOVA del diseño factorial para la respuesta Alicina.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Estadígrafo F _m	Valor p
Bloque	1,36	1	1,36	-	-
Modelo	47,97	5	9,59	7,33	0,0053
A: Temperatura	42,44	1	42,44	32,44	0,0003
B: Tiempo	2,42	1	2,42	1,85	0,2073
C: Solvente	3,12	3	1,04	0,79	0,5274
Error Residual	11,78	9	1,31	-	-
Variabilidad total	61,11	15	-	-	-

Fuente: Design Expert 8.0.7.1

De la tabla de distribución F presentada en el anexo (página 104) se desprende lo siguiente:

Tabla II.4. Valores de F crítico para los términos del diseño, siendo α = nivel de significancia; v_1 = grados de libertad del tratamiento; v_2 = grados de libertad del error residual.

Fuente de variación	Valores de F crítico ($\alpha; v_1; v_2$)
Modelo	$F_{C(0.05;5;9)} = 3,482$
Temperatura	$F_{C(0.05;1;9)} = 5,117$
Tiempo	$F_{C(0.05;1;9)} = 5,117$
Solventes	$F_{C(0.05;3;9)} = 3,863$

A partir del análisis de los resultados estadísticos presentados, se puede interpretar que con un nivel de significancia de 0,05 tanto el modelo como el factor temperatura resultan significativos. Esto se pone en evidencia ya que ambos presentan un valor de F_m mayor al valor de F_C. Otro dato que reafirma esta conclusión es el valor p, el cual en ambos casos es menor al nivel de significancia " α ". Otro aspecto importante para analizar, recae en el valor del Cuadrado medio. Cuando el valor del cuadrado medio para un factor es 3 o 4 veces mayor al valor de Cuadrado medio del error residual, se considera que este factor tiene un gran efecto. En este caso se interpreta que la temperatura causa un gran efecto sobre la respuesta Alicina. Teniendo en cuenta que el valor de variabilidad total

es 61,11 y éste corresponde al 100%, podemos inferir que la variabilidad aportada por el factor temperatura es de 69,45%.

Cabe aclarar que no se tiene en cuenta el valor de R^2 debido a que al tratarse de un diseño factorial utilizado para identificar simplemente a los factores significativos, éstos pueden resultar significativos independientemente de que el modelo se halle ajustado.

En la figura II.1 puede observarse el efecto principal del factor temperatura sobre la estabilidad de la Alicina. En el eje de abscisas se ubican los niveles del factor mientras que en el eje de ordenadas la respuesta observada en los correspondientes niveles, señalando la respuesta promedio. Las respuestas expresadas en valores de área fueron transformadas a la escala "Ln (Alicina + 6811,64)" la cual fue sugerida por el software. Es necesario realizar este tipo de transformaciones en aquellos casos donde no se cumplen los supuestos de normalidad u homogeneidad de varianzas.

Cabe aclarar que si bien cada punto es unido mediante una línea recta, a fin de representar gráficamente el efecto del factor, esta línea no responde a ninguna función matemática.

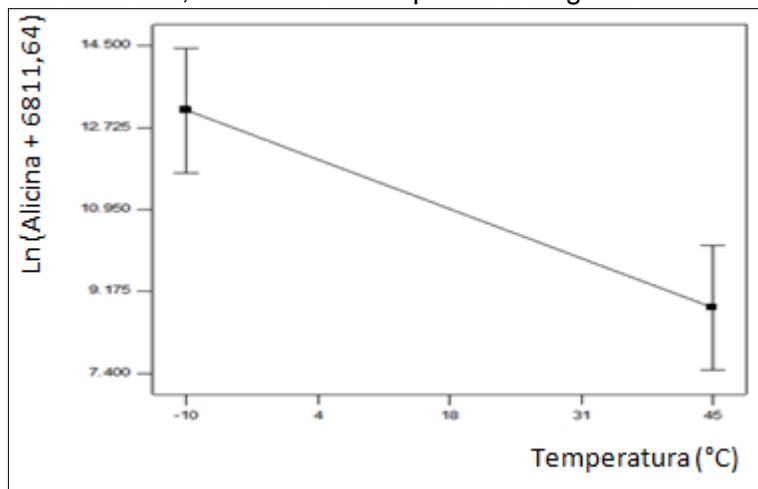


Figura II.1. Representación gráfica del efecto principal del factor temperatura (°C) sobre la estabilidad de la Alicina.

Como puede observarse en la figura II.2, no se registran cambios significativos en la concentración de este estándar cuando se evalúa el efecto principal que ejerce el factor tiempo.

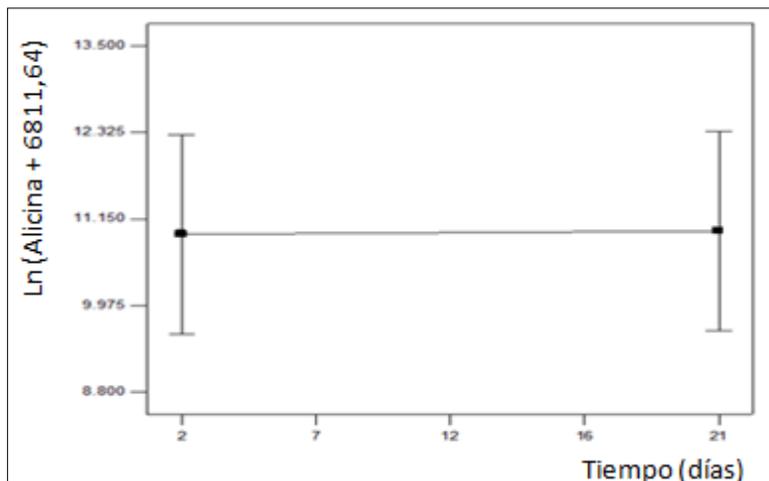


Figura II.2. Representación gráfica del efecto principal del factor tiempo (días) sobre la estabilidad de la Alicina.

En relación al factor “solventes” tampoco se observaron cambios significativos en la respuesta “Alicina”. Independientemente del solvente utilizado, el efecto de la temperatura sobre la respuesta Alicina fue el mismo (figura II.3 y II.4).

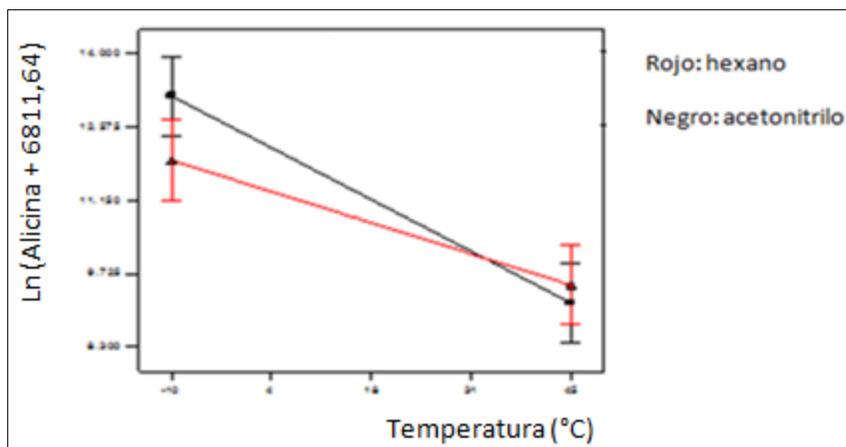


Figura II.3. Representación gráfica del efecto principal del factor temperatura (°C) sobre la estabilidad de la Alicina conservada en diferentes solventes: hexano (rojo); acetonitrilo (negro).

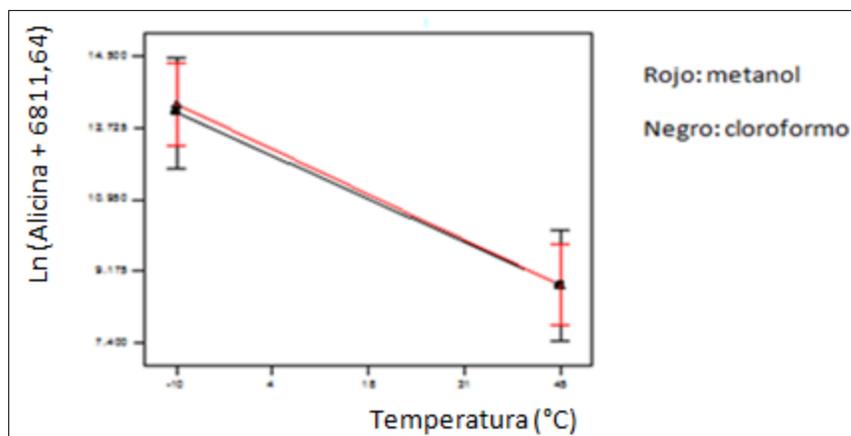


Figura II.4. Representación gráfica del efecto principal del factor temperatura (°C) sobre la estabilidad de la Alicina conservada en diferentes solventes: metanol (rojo); cloroformo (negro).

De esta manera queda confirmado que la estabilidad de la Alicina se haya sujeta principalmente a la temperatura, tal como fue establecido por Lawson y col., 1991; Dusica y col., 2012. Este resultado difiere de lo señalado por Iberl y col., 1990, quienes establecen que la transformación de la Alicina es influenciada en mayor medida por la polaridad de los solventes y menos por el tiempo de almacenamiento y T° de reacción.

La polaridad de los solventes es determinante en cuanto a la naturaleza del compuesto organoazufrado formado a partir de la Alicina. Sin embargo en cuanto a estabilidad de este estándar se puede decir que independiente del solvente en que se encuentre, ésta va a degradarse si se halla sometida a altas temperaturas.

A continuación se muestra un cromatograma que pone en evidencia la presencia de los productos de transformación de la Alicina, influenciada por la temperatura en metanol (figura II.5). En ella puede observarse que prácticamente toda la Alicina se degrada dando origen a otros compuestos. De los picos resueltos, pudieron identificarse aquellos que corresponden a Dialil sulfuro (DAS), Dialil disulfuro (DADS) y Dialil trisulfuro (DATS). Estos resultados son similares a los obtenidos por Yu y Wu, 1989 y Brodnitz y col., 1971.

Además puede notarse la presencia de los picos identificados como “1” y “2” los cuales fueron colectados para su posterior identificación mediante Cromatografía de gases capilar acoplada a espectrometría de masas (CG-MS) espectrofotometría UV.

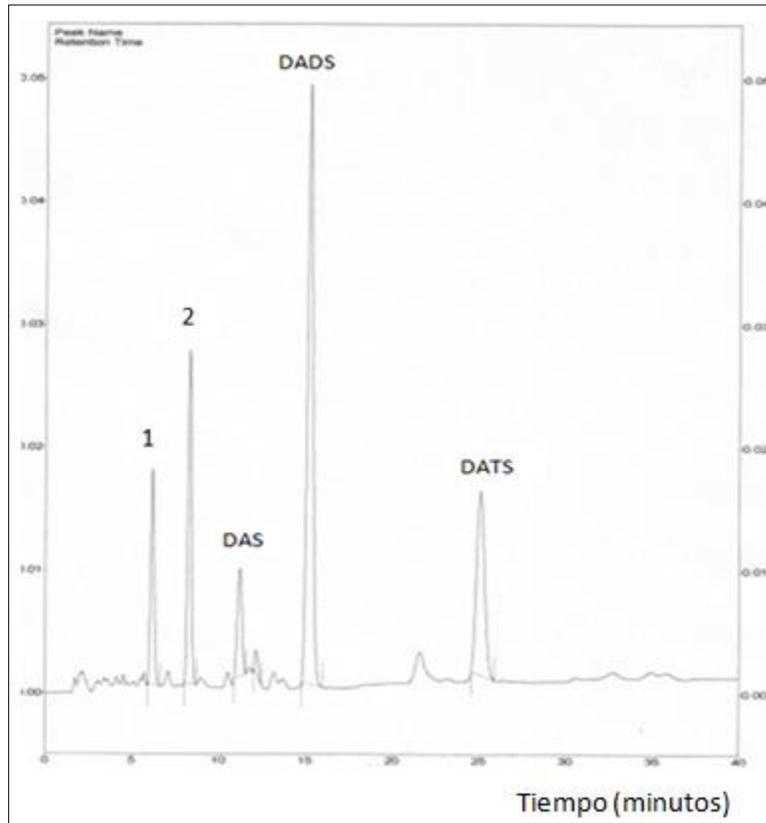


Figura II.5. Cromatograma de Alicina en metanol sometida a 45°C durante 21 días.

II.4.2. Dialil sulfuro

El análisis de la varianza de los datos de área obtenidos para el Dialil sulfuro arrojó los siguientes resultados (Tabla II.5):

Tabla II. 5. ANOVA del diseño factorial para la respuesta Dialil sulfuro.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Estadígrafo F_m	Valor p
Bloque	0,30	1	0,30	-	-
Modelo	12,42	5	2,48	12,16	0,0009
A: Temperatura	0,17	1	0,17	0,83	0,3866
B: Tiempo	0,20	1	0,20	0,98	0,3484
C: Solvente	12,05	3	4,02	19,67	0,0003
Error Residual	1,84	9	0,20	-	-
Variabilidad total	14,55	15	-	-	-

Fuente: Design Expert 8.0.7.1

Teniendo en cuenta los valores de F crítico presentados en la tabla II.4, se puede interpretar que con un nivel de confianza del 95% tanto el modelo como el factor solventes resultan significativos por presentar su valor de F_m mayor al F_c , y valores de p menores al nivel de significancia α de 0,05. Además se puede evidenciar que la variabilidad de los datos aportada por el factor solvente corresponde al 82,82%, dato que resulta considerando que 14,55 corresponde al 100% de variabilidad.

En la figura II.6 puede observarse que el factor temperatura no produce cambios significativos en la concentración de Dialil sulfuro. Las respuestas expresadas en valores de área fueron transformadas a la escala "Log 10 (DAS + 1108,25)" la cual fue sugerida por el software por no cumplirse los supuestos de normalidad u homogeneidad de varianzas.

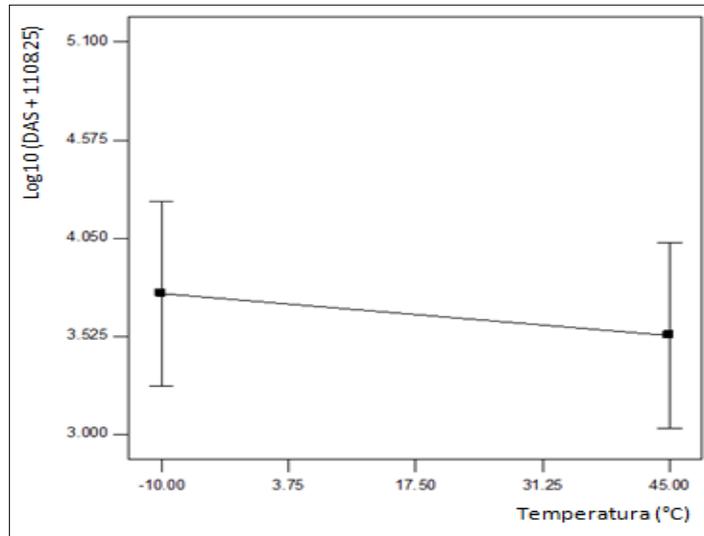


Figura II.6. Representación gráfica del efecto principal del factor temperatura (°C) sobre la estabilidad de Dialil sulfuro.

En cuanto a la estabilidad de este estándar con respecto al tiempo, puede notarse una pequeña disminución en su concentración a lo largo del periodo de estudio (figura II.7).

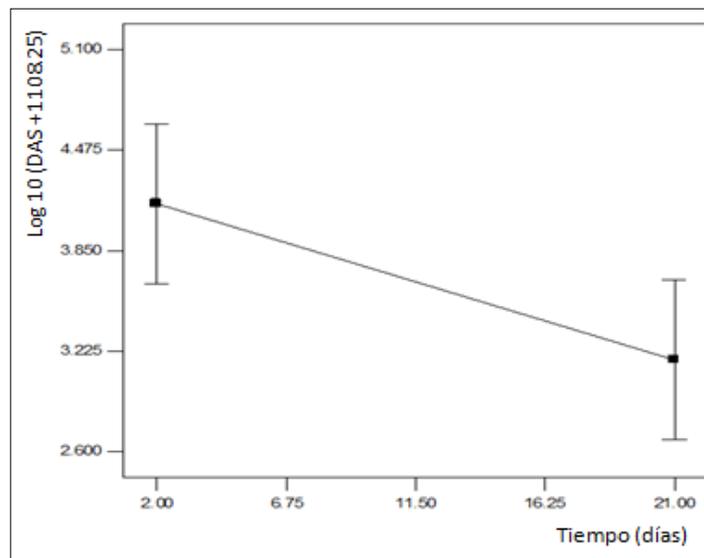


Figura II.7. Representación gráfica del efecto principal del factor tiempo (días) sobre la estabilidad de Dialil sulfuro.

A continuación se representan los gráficos de respuestas producto de la interacción tiempo vs temperatura en cada solvente para Dialil sulfuro. Tal como se ilustra en la figura II.8, para el caso de cloroformo y acetonitrilo se observa que los efectos de los factores tiempo y temperatura no son independientes, existiendo interacción entre los mismos. Puede notarse un incremento en la concentración de Dialil sulfuro a 45°C durante los dos primeros días. Esto puede deberse en primer término a una volatilización del solvente, pero al cabo de 21 días el estándar parece degradarse notándose una disminución en su concentración.

En el caso de metanol y hexano, por el contrario, se interpreta que existe independencia entre los factores tiempo y temperatura lo cual se pone de manifiesto a través del paralelismo de los segmentos que unen las respuestas para cada nivel del factor tiempo. De esta manera se puede interpretar que el factor de mayor influencia en la respuesta de Dialil disulfuro es el solvente ya que los factores tiempo y temperatura no provocan cambios significativos.

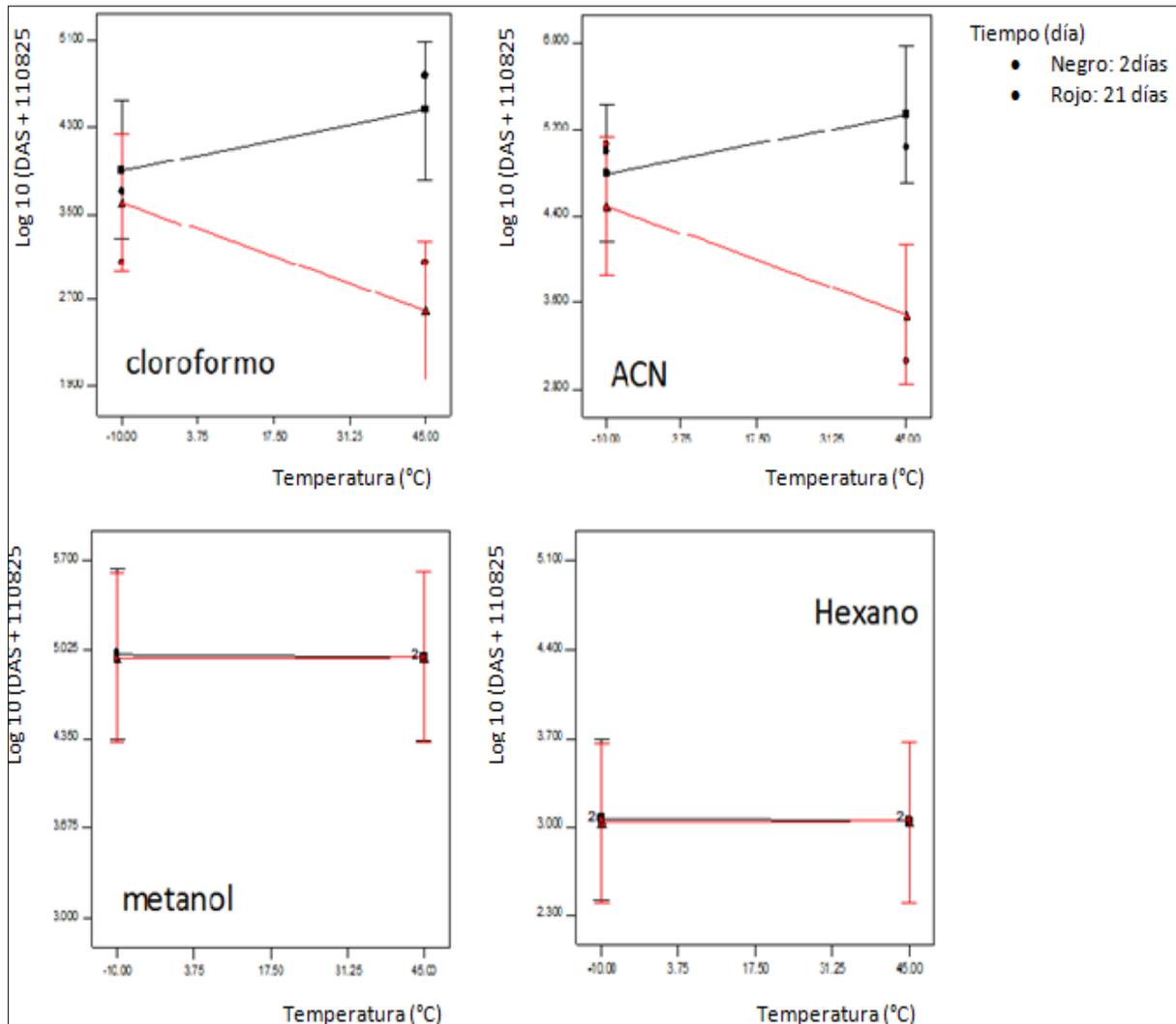


Figura II.8. Representación gráfica del efecto de interacción entre los factores tiempo (días) y temperatura (°C) sobre la estabilidad de Dialil sulfuro en cada uno de los cuatro solventes.

II.4.3. Dialil disulfuro

En la tabla II.5 se presenta el análisis de la varianza multifactorial obtenida para el estándar Dialil disulfuro.

Tabla II. 6. ANOVA del diseño factorial para la respuesta Dialil disulfuro.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Estadígrafo F_m	Valor p
Bloque	0,087	1	0,087	-	-
Modelo	1,81	5	0,36	1,80	0,2088
A: Temperatura	0,32	1	0,32	1,60	0,2381
B: Tiempo	0,061	1	0,061	0,30	0,5961
C: Solvente	1,43	3	0,48	2,37	0,1385
Error Residual	1,81	9	0,20	-	-
Variabilidad total	3,70	15	-	-	-

Fuente: Design Expert 8.0.7.1

En este caso se presenta una situación particular ya que al comparar los datos del estadígrafo F_m con los de F_c obtenidos de la tabla II.3 de distribución F, se observa que los valores de F_m son menores a los valores de F_c .

Esta situación implica que tanto el modelo como los factores bajo estudio no resultan significativos. Los valores de p al ser mayores al nivel de sigficancia de 0,05 reafirman esta interpretación.

En la figura II.9 se hace referencia al efecto principal del factor temperatura sobre la estabilidad de Dialil disulfuro, el cual no lo afecta significativamente.

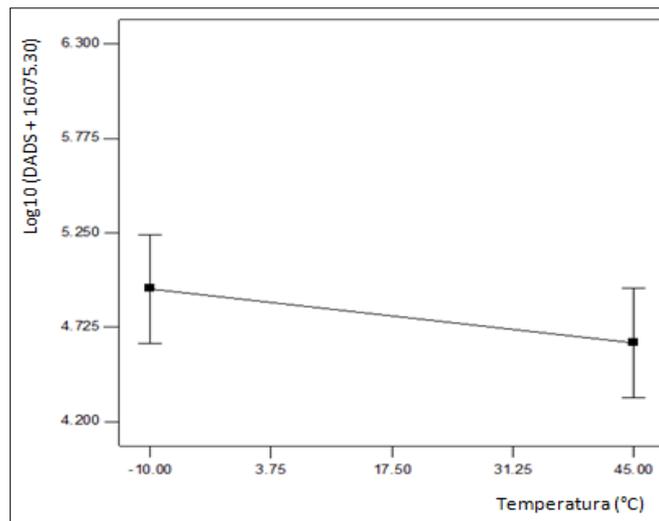


Figura II.9. Representación gráfica del efecto principal del factor temperatura (°C) sobre la estabilidad de Dialil disulfuro.

Al observar la influencia del tiempo sobre la conservación de este estándar, tampoco existen cambios significativos sobre su estabilidad (figura II.10).

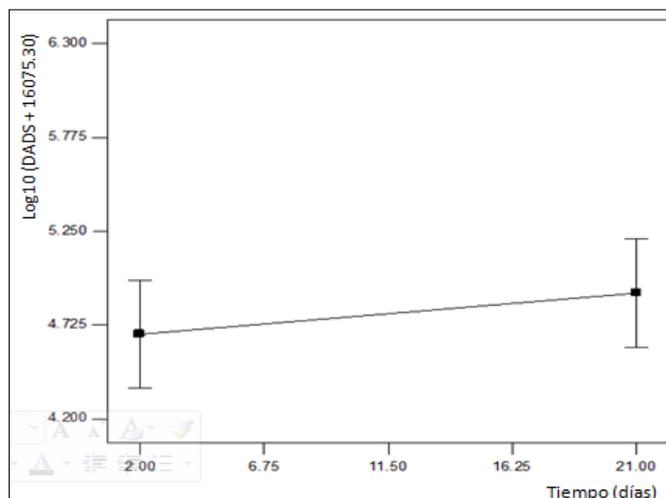


Figura II.10. Representación gráfica del efecto principal del factor tiempo (días) sobre la estabilidad de Dialil disulfuro.

Al evaluar los gráficos de interacción tiempo vs temperatura en cada solvente para Dialil disulfuro (figura II.11) puede observarse el mismo comportamiento explicado para el caso de Dialil sulfuro exceptuando que para este caso el factor solventes no resulta significativo.

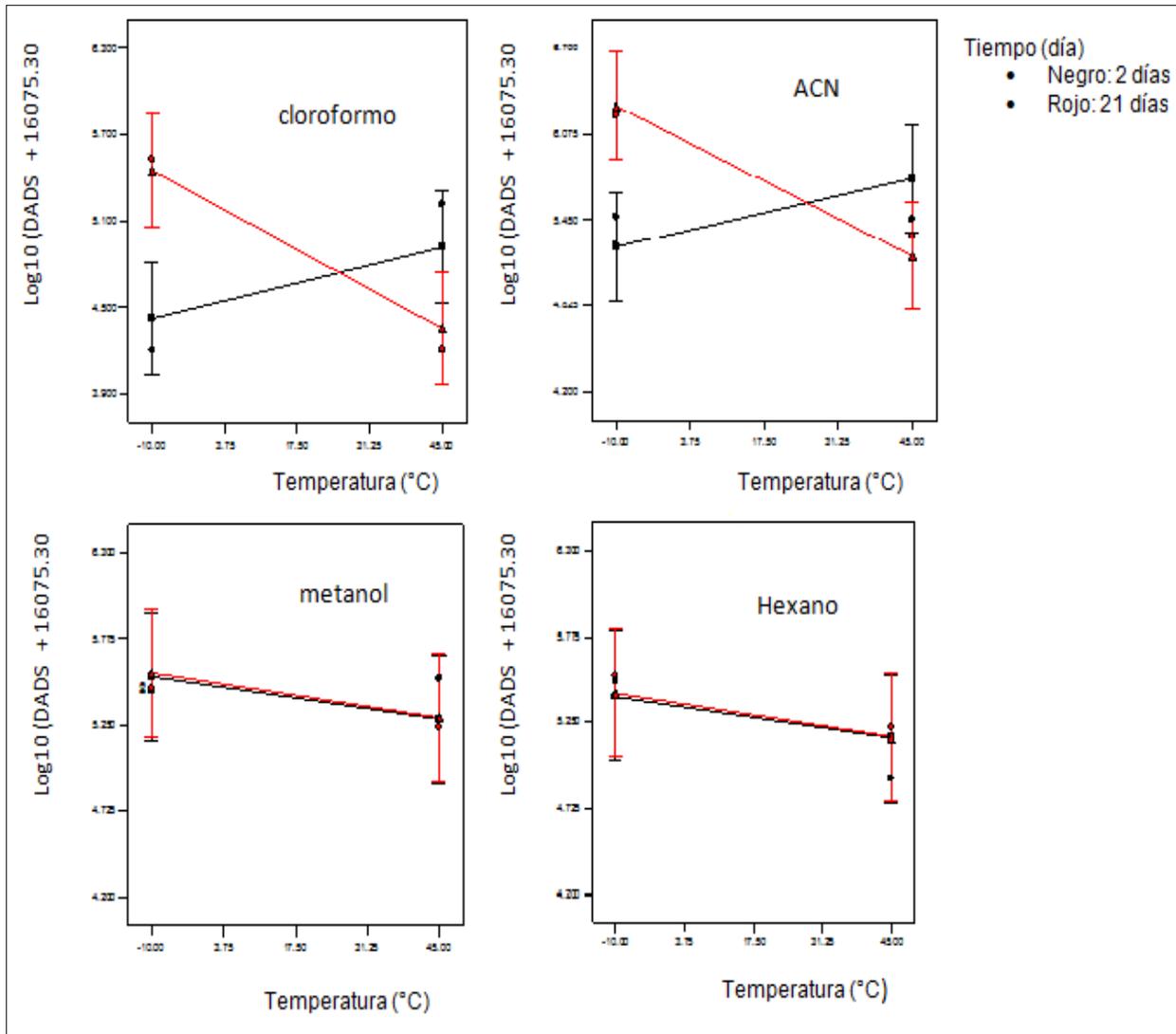


Figura II.11. Representación gráfica del efecto de interacción entre los factores tiempo (días) y temperatura (°C) sobre la estabilidad de Dialil disulfuro en cada uno de los cuatro solventes.

II.4.4. Dialil trisulfuro

A continuación en la tabla II.6 se presenta el análisis de la varianza multifactorial obtenida para el estándar Dialil trisulfuro.

Tabla II. 7. ANOVA del diseño factorial para la respuesta Dialil trisulfuro.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Estadístico F_m	Valor p
Bloque	$3,368 \cdot 10^8$	1	$3,368 \cdot 10^8$	-	-
Modelo	$2,743 \cdot 10^{10}$	5	$5,485 \cdot 10^9$	12,79	0,0007
A: Temperatura	$8,528 \cdot 10^8$	1	$8,528 \cdot 10^8$	1,99	0,1920
B: Tiempo	$4,154 \cdot 10^7$	1	$4,154 \cdot 10^7$	0,097	0,7627
C: Solvente	$2,653 \cdot 10^{10}$	3	$8,844 \cdot 10^9$	20,63	0,0002
Error Residual	$3,858 \cdot 10^9$	9	$4,287 \cdot 10^8$	-	-
Variabilidad total	$3,162 \cdot 10^{10}$	15	-	-	-

Fuente: Design Expert 8.0.7.1

A partir del análisis de la varianza para los datos de área de Dialil trisulfuro, se puede interpretar que con un nivel de confianza del 95%, tanto el modelo como el factor solventes resultan significativos ya que ambos presentan un valor de F_m mayor al valor de F_c presentado en la tabla II.4. Además el valor p , en ambos casos, es menor al nivel de significancia " α ".

Del ANOVA correspondiente a Dialil trisulfuro también se puede obtener la variabilidad de los datos conforme al efecto del factor solvente, la cual corresponde al 83,9%.

Como puede observarse en la figura II.12, no se registran cambios significativos en la concentración de este estándar cuando se evalúa el efecto principal que ejerce el factor temperatura.

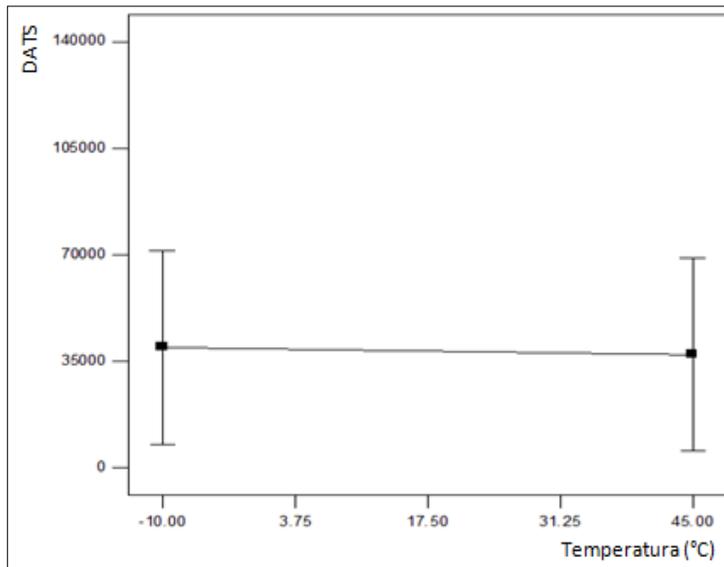


Figura II.12. Representación gráfica del efecto principal del factor temperatura (°C) sobre la estabilidad de Dialil trisulfuro.

Los cambios que provoca el factor tiempo sobre la conservación de Dialil trisulfuro son poco significativos (figura II.13).

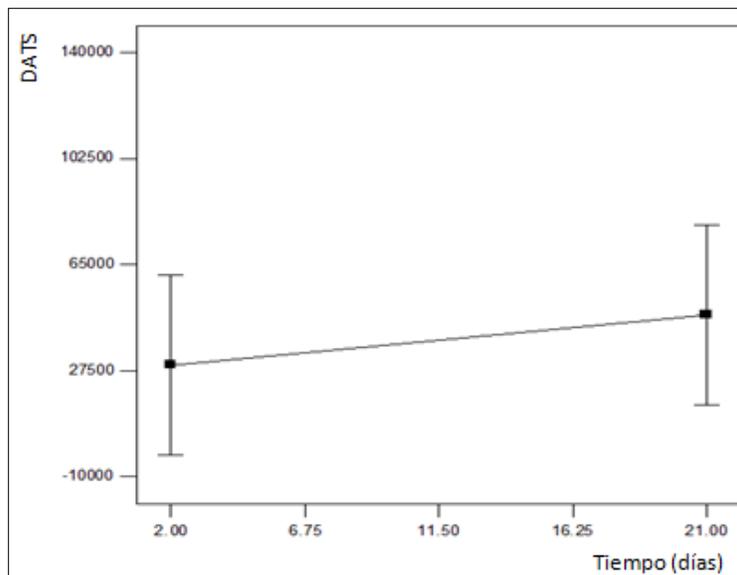


Figura II.13. Representación gráfica del efecto principal del factor tiempo (días) sobre la estabilidad de Dialil trisulfuro.

En la figura II.14 se ilustra las respuestas de Dialil trisulfuro producto de la interacción tiempo vs temperatura en cada solvente. Para todos los solventes se observa que existe interacción entre los efectos de los factores tiempo y temperatura.

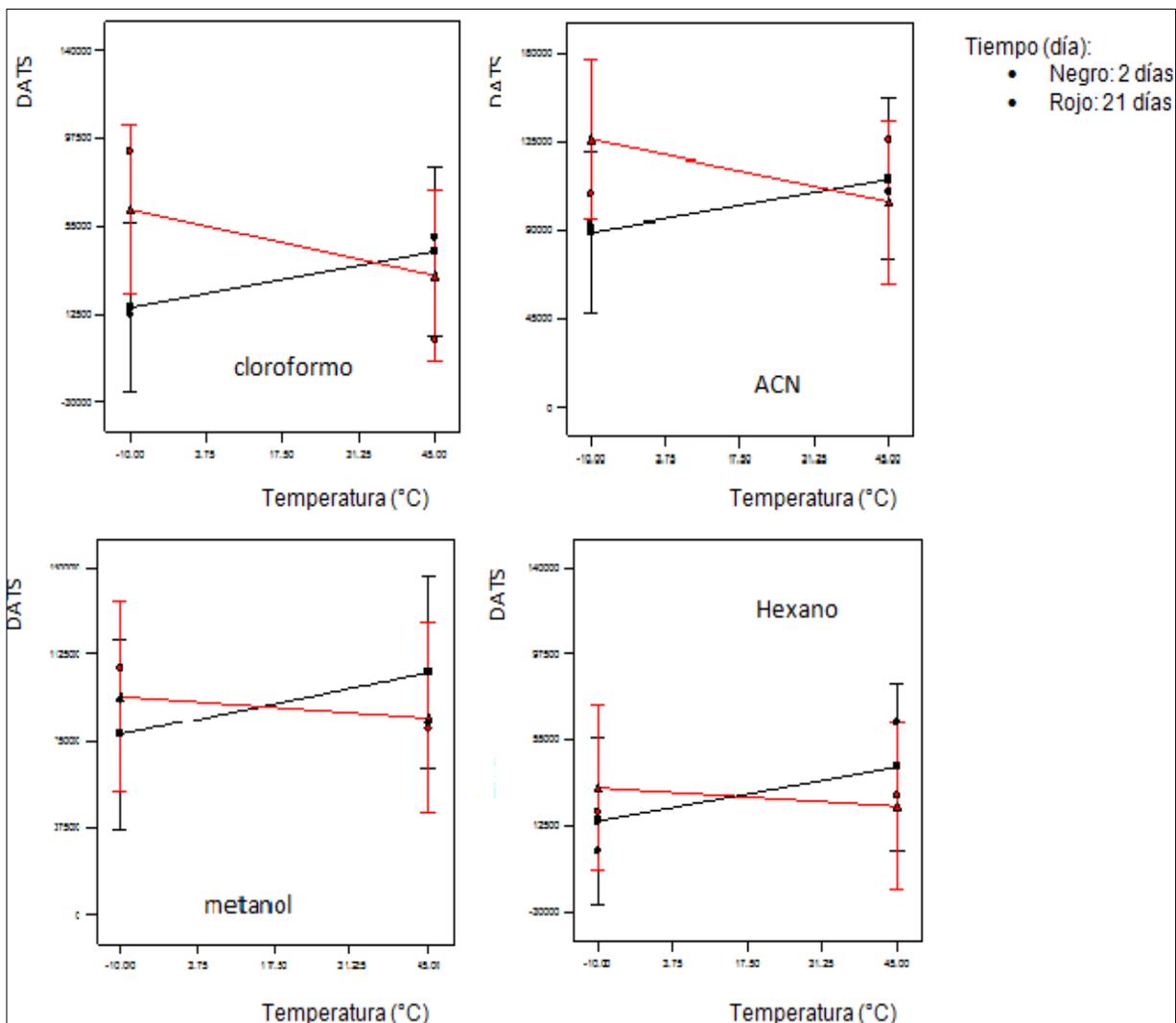


Figura II.14. Representación gráfica del efecto de interacción entre los factores tiempo (días) y temperatura (°C) sobre la estabilidad de Dialil trisulfuro en cada uno de los cuatro solventes.

En general, puede decirse que en el caso de Dialil sulfuro y Dialil trisulfuro el solvente es influyente en la conservación. Se obtuvieron mejores respuestas en el detector al utilizar acetonitrilo y metanol como solventes. Esto puede denotarse por los valores de áreas obtenidos los cuales son mayores respecto a los otros dos solventes utilizados.

No obstante, al emplear metanol, las respuestas no variaron en función de la temperatura y el tiempo; lo que sí sucede al usar acetonitrilo como solvente en el que se observó mayor amplitud de área del analito frente a estos dos factores.

Otro aspecto importante a considerar para Dialil sulfuro, Dialil disulfuro y Dialil trisulfuro es que al existir interacción entre tiempo y temperatura en algunos solventes, estos factores no pueden ser analizados por separados ya que el efecto de la temperatura depende del nivel en el que se encuentre el factor tiempo y viceversa.

II. 5. CONCLUSIONES

Fue posible evaluar la estabilidad físico-química de los compuestos organoazufrados sometidos a diversas condiciones experimentales como así también evaluar el efecto principal y de interacción entre los distintos factores.

Los resultados obtenidos permiten denotar que existe inestabilidad de los analitos frente a los distintos factores puestos en juego y que en determinados casos algunos factores influyen más que otros en la concentración de los compuestos organoazufrados.

En el caso de Alicina se comprobó que uno de los factores que más influía en su conservación era la temperatura. Al analizar los cromatogramas de Alicina en cada uno de los 4 solventes, sometida a temperatura de 45°C durante el periodo de estudio, se notó que prácticamente toda la Alicina se degrada dando origen a otros compuestos, de los cuales fue posible identificar únicamente a los estándares estudiados. De los compuestos originados a partir de Alicina, Dialil disulfuro resultó ser mayoritario. Además, se observó la formación de nuevas especies químicas que no pudieron ser identificadas.

Para Dialil sulfuro y Dialil trisulfuro el factor solvente resultó ser el más significativo en la conservación de los mismos. En cuanto a lo ocurrido para el Dialil disulfuro, debido a que ninguno de los factores evaluados resultó significativo, debería estudiarse su estabilidad química bajo la influencia de otros factores o, a lo sumo, evaluar otros niveles de los mismos factores implicados en este ensayo. Para estos 3 estándares existió interacción entre tiempo y temperatura, por lo que estos factores no pueden ser analizados por separado.

Si bien esta información obtenida es de utilidad para poder conocer el comportamiento en cuanto a la estabilidad química de estos compuestos, es necesario realizar otros estudios en el que se sometan los analitos a nuevos valores de temperatura y solvente ya que fueron las variables más influyentes en la conservación de los mismos. Estas investigaciones podrían ser útiles para identificar la naturaleza de nuevos compuestos generados a partir de los estándares en estudio, así como también permitirían determinar, en caso de que existan, posibles interacciones entre ellos.

Capítulo III

ESTUDIO Y OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE PREPARACIÓN DE MUESTRA (EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDO)

III. ESTUDIO Y OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE PREPARACIÓN DE MUESTRA (EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDO)

III.1. INTRODUCCIÓN

Se han utilizado varias técnicas de preparación de muestras de ajo para aislar e identificar sus principales componentes que consisten en compuestos organoazufrados. El desarrollo de una técnica de extracción permitiría identificar los compuestos bioactivos del ajo formados durante el procesamiento de las muestras.

Los métodos tradicionales para el aislamiento y purificación de los analitos de interés de los tejidos vegetales, presentan algunas desventajas, debido a que requieren largos tiempos de extracción, grandes cantidades de solventes, y algunas veces, son poco eficientes. Además muchos de los compuestos son térmicamente inestables y se degradan durante procedimientos de extracción térmica o destilación (KIMBARIS y col., 2006). Por consiguiente, existe una necesidad de utilizar nuevas técnicas de extracción. La extracción sólido-líquido (SLE) con un disolvente es una operación que aparece en muchos procesos industriales. En este tipo de extracciones suele utilizarse el ultrasonido el cual presenta un efecto benéfico sobre el rendimiento y la cinética de extracción, evitando condiciones experimentales drásticas como uso de altas temperaturas y presiones (Romdhane y Gourdon, 2002). Asimismo, al proporcionar un efecto mecánico, permite una mejor penetración del solvente dentro de los tejidos celulares, logrando una mayor lixiviación de los compuestos de interés (KIMBARIS y col., 2006).

Se ha comprobado mediante diversos estudios que la extracción asistida por ultrasonido es más eficiente que la extracción por técnicas tradicionales como lo son extracción con solvente, Soxhlet y destilación. El aumento de la eficiencia (cociente entre la masa obtenida del compuesto de interés y tiempo necesario para realizar la extracción) no solo depende de la técnica de extracción, sino, también de la matriz de la muestra, temperatura durante el procedimiento de extracción, solvente de extracción, efecto salino y tiempo de *sonicado*. La técnica de extracción asistida por ultrasonido, caracterizada por su eficiencia, bajo costo y capacidad de extracción a bajas temperaturas, podría convertirse en una herramienta aplicada en forma amplia tanto en la industria como en el laboratorio (Azuola y Vargas, 2007).

Por todas estas ventajas planteadas se consideraría el uso del ultrasonido a fin de incrementar la extracción de compuestos organoazufrados a partir de muestras de ajo cocido. Otra de las razones de su uso surgirían a partir de un estudio realizado por Wang y col., 2011, quienes comprobaron que el uso del ultrasonido de baja frecuencia e intensidad leve, incrementa la actividad de la enzima alinasa, presente en dientes de ajo, aproximadamente en un 47,1%, aumentando de esta manera el contenido de Alicina, lo cual resultaría favorable para el objetivo que se desea alcanzar en este estudio.

La cantidad de Alicina extraída a partir de ajo machacado también depende del solvente de extracción. Fujisawa y col., 2008, compararon la efectividad de soluciones acuosas, etanólicas, aceite vegetal y hexano para la extracción de Alicina. Como resultado obtuvieron que las soluciones etanólicas en concentraciones de 20-100% resultaron ser más eficaces que el agua. Por otro lado, tanto el aceite vegetal como el hexano fueron incompetentes para extraer Alicina. Las tasas de extracción extremadamente bajas obtenidas con el aceite vegetal y hexano podrían ser explicadas por la baja polaridad de los solventes. En trabajos recientes realizados en el Laboratorio de Cromatografía para Agroalimentos (Locatelli y col.; 2011) se ensayaron 3 solventes de extracción (agua, etanol y acetonitrilo) de los principios bioactivos formados en el ajo sometido a cocción al vapor. Se evaluó la extracción de Alicina, Dialil sulfuro, Dialil disulfuro y Dialil trisulfuro encontrándose mayores recuperaciones de los mismos con el uso de acetonitrilo.

En muchas técnicas analíticas la respuesta del sistema de medida depende de una variedad de factores experimentales bajo el control del operador, tales como temperatura, pH, concentración, entre otros. Antes de comenzar un proceso de optimización se determinaron los factores y las interacciones que afectan de manera importante a la respuesta (es también importante conocer qué factores tienen escaso o casi nulo efecto sobre la respuesta de manera de no perder tiempo, ni recursos en experimentos innecesarios). Para una aplicación concreta es importante establecer los niveles de estos factores. El proceso de búsqueda de los niveles óptimos del factor, se conoce como optimización. La elección exacta de los niveles se determina principalmente por la experiencia del operador, las respuestas analíticas resultantes y las características físico-químicas del sistema.

Un buen método de optimización tiene dos cualidades. Produce un conjunto de condiciones experimentales que proporciona la respuesta máxima, o al menos una respuesta que sea próxima al óptimo, y lo hace así con el número más pequeño posible de etapas experimentales de ensayo. En la práctica, la velocidad y la conveniencia del procedimiento de optimización resultan extremadamente importantes (Miller, 2002).

Si la optimización se realiza sólo para una característica o respuesta en particular, podrían resultar condiciones inadecuadas para las otras características o respuestas. Por ello es imprescindible contar con técnicas que sirvan para que, en la medida de lo posible, se optimicen simultáneamente todas las respuestas de interés. Para llevar a cabo una *optimización simultánea* puede emplearse el *método de la función de deseabilidad* la cual consiste en definir una función de factores que transforma los valores de los mismos a una escala [0,1] para indicar que tan deseables son (Gutiérrez Pulido y de la Vara Salazar, 2008).

III.2. OBJETIVO

- Optimizar el proceso de extracción Sólido-Líquido de los compuestos organoazufrados (Alicina, Dialil sulfuro, Dialil disulfuro y Dialil trisulfuro) en muestras de ajo cocido empleando HPLC para su evaluación.

III.3. MATERIALES Y MÉTODOS

III.3.1. Reactivos

- Acetonitrilo, J.T Baker grado HPLC.
- Agua miliQ.
- Metanol, J.T Baker grado HPLC.

III.3.2. Material de laboratorio

- Filtros de membrana de 0,45 μm ; 0,2 μm de diámetro de poro.
- Jeringa de inyección de 100 μL , HAMILTON.
- Pipetas automáticas: 100-1000 μL ; 5000 μL , Nichipet EX
- Pipetas de doble aforo de 5 y 15 mL
- Viales con tapa a rosca de 10 mL

III.3.3. Equipos

- Balanza analítica DENVER APX-200.
- Baño ultrasónico TESLAB tb04.
- Cromatógrafo líquido KINK-500-A series KONIK instruments Acoplado a un detector UV-Vis. Columna octadecilsilano (WATERS).
- Microondas ATMA easy cook
- Vórtex-mixer speed knob

III.3.4. Metodología de trabajo

Para la optimización del proceso de extracción sólido-líquido se desarrollaron dos diseños experimentales con el uso del software Design Expert 8.0.7.1. Ambas metodologías tienen en común la forma de preparación de muestra y se diferencian en la técnica de extracción aplicada.

III.3.4.1. Preparación de muestras para cada diseño experimental

Se pelaron y picaron 5 dientes de ajo y se los dejó reposar durante 15 minutos de manera de favorecer la formación de Alicina. Para cada muestra se pesó 1 gramo de ajo y se cocinó en viales sellados con teflón en microondas a máxima potencia durante 40 segundos. Se dejó atemperar durante 5 minutos. Se llevó a cabo la extracción de muestras según cada diseño experimental.

Cabe aclarar que la elección del solvente de extracción se basó en los resultados obtenidos en el capítulo II en donde el acetonitrilo fue el solvente que permitió obtener las máximas respuestas de los compuestos organoazufrados expresadas en términos de área de cada uno de los picos en los cromatogramas resultantes. Una vez preparadas las muestras se filtraron en primer término con filtro de 0,45 μ m para separar la matriz de la muestra del solvente de extracción y luego con filtro de 0,2 μ m previo a la inyección en HPLC de manera de evitar la introducción de pequeñas impurezas a la columna del equipo.

III.3.4.2. Extracción de muestras

Para la extracción de compuestos organoazufrados a partir de las muestras problema, las variables a tener en cuenta en la técnica empleada se muestran en cada diseño experimental planteado a continuación.

III.3.4.2.1. 1° Diseño experimental: Se realizó un diseño factorial de 4 factores con dos niveles cada uno. Los factores a considerar fueron: tiempo de ultrasonido (minutos), pausa o no pausa durante el sonicado (minutos), vórtex o no durante la pausa y volumen de acetonitrilo (mL). Debido al tiempo que implica realizar las mediciones en el HPLC, el diseño, como puede verse en la tabla III.1 fue planificado para llevarse a cabo en 2 días.

Tabla III.1. 1° Diseño experimental para extracción sólido-líquido (SLE).

Muestra	Bloques	Tiempo ultrasonido (minutos)	Pausa (minutos)	Vórtex	Volumen de acetonitrilo (mL)
1	Día 1	15	0	No	15
2	Día 1	15	1	Si	15
3	Día 1	5	0	No	5
4	Día 1	15	1	No	5
5	Día 1	5	1	Si	5
6	Día 1	5	1	No	15
7	Día 1	5	0	Si	15
8	Día 1	15	0	Si	5
9	Día 2	5	1	Si	15
10	Día 2	5	0	Si	5
11	Día 2	5	1	No	5
12	Día 2	15	1	No	15
13	Día 2	15	0	Si	15
14	Día 2	15	1	Si	5
15	Día 2	15	0	No	5
16	Día 2	5	0	No	15

III.3.4.2.2. 2° Diseño experimental: Para el segundo diseño experimental, el cual también fue llevado a cabo en 2 días, los factores a considerar fueron: tiempo de ultrasonido (minutos) y volumen de acetonitrilo (mL).

Tabla III.2. 2° Diseño experimental para extracción sólido-líquido (SLE).

Muestra	Bloques	Tiempo ultrasonido (minutos)	Volumen de acetonitrilo(mL)
1	Día 1	4,00	4,25
2	Día 1	1,88	6,90
3	Día 1	1,88	1,60
4	Día 1	6,12	1,60
5	Día 1	4,00	4,25
6	Día 1	4,00	4,25
7	Día 1	6,12	6,90
8	Día 2	4,00	4,25
9	Día 2	4,00	0,50
10	Día 2	7,00	4,25
11	Día 2	1,00	4,25
12	Día 2	4,00	4,25
13	Día 2	4,00	8,00
14	Día 2	4,00	4,25

NOTA: El tiempo de ultrasonido está expresado en minutos en base 100. Para 1,88 minutos correspondería 1,53 minutos y para 6,12 correspondería 6,07 minutos, expresados en base 60.

III.3.4.3. Condiciones instrumentales operacionales

Se realizaron las mediciones en el equipo HPLC con una columna de fase reversa ODS C18 de 254 mm de longitud y 0,46 mm d.i. La fase móvil: acetonitrilo:agua:metanol (50:41:9) (V/V) elegida según los estudios de Iberl y col.,1990, flujo: 1mL min⁻¹, loop: 20µL, longitud de onda: 254nm, en el tiempo establecido en el diseño experimental. Cada una de las muestras fue inyectada por duplicado. De los cromatogramas obtenidos se consideraron las áreas de los compuestos de interés, identificando a cada uno de los mismos por co-inyección de cada estándar.

III.3.4.4. Análisis estadístico de los datos

Se realizó ANOVA multifactorial, provisto por el software mencionado anteriormente, con los resultados obtenidos referidos a valores de área de cada analito en los cromatogramas..

III.4. RESULTADOS

III.4.1. 1° diseño experimental

Se evaluó el efecto de cada factor sobre la respuesta de los analitos Alicina, Dialil sulfuro, Dialil disulfuro y Dialil trisulfuro.

Debido a que las variables “pausa” y “vórtex” se condicionan una de la otra, éstas no pueden ser analizadas por separado. Los gráficos obtenidos bajo la influencia del uso o no de vórtex mostraron las mismas tendencias por lo que únicamente se hará hincapié en el efecto del tiempo de ultrasonido y volumen de acetonitrilo sobre cada analito.

III.4.1.1.Alicina

En la tabla III.3 se presenta el informe emitido por el software Design Expert 8.0.7.1 referido al análisis de la varianza multifactorial obtenida para el estándar Alicina.

Tabla III. 3. ANOVA del diseño factorial para la respuesta Alicina.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Estadígrafo F_m	Valor p
Bloque	$2,045.10^9$	1	$2,045.10^9$	-	-
Modelo	$1,298.10^{12}$	4	$3,245.10^{11}$	49,82	<0,0001
A: Ultrasonido	$2,442.10^{10}$	1	$2,442.10^{10}$	3,75	0,0815
B: Pausa	$2,836.10^8$	1	$2,836.10^8$	0,044	0,8389
C: Vórtex	$2,989.10^9$	1	$2,989.10^9$	0,46	0,5135
D: Volumen Acetonitrilo	$1,270.10^{12}$	1	$1,270.10^{12}$	195,04	<0,0001
Error Residual	$6,513.10^{10}$	10	$6,513.10^9$		
Variabilidad total	$1,365.10^{12}$	15			

Fuente: Design Expert 8.0.7.1

Para una mejor interpretación de los datos, se presenta en la tabla III.4 los valores de la distribución F a fin de ser comparados con los valores del Estadígrafo F muestral y de acuerdo a ello tomar la decisión correspondiente conforme a la aceptación o rechazo de la hipótesis nula en la que se plantea que no hay diferencias entre los efectos de los factores.

Tabla III.4. Valores de F crítico para los términos del diseño, siendo α = nivel de significancia; v_1 = grados de libertad del tratamiento; v_2 = grados de libertad del error residual.

Fuente de variación	Valores de F crítico ($\alpha; v_1; v_2$)
Modelo	$F_{C(0.05;4;10)} = 3,478$
A: Ultrasonido	$F_{C(0.05;1;10)} = 4,965$
B: Pausa	
C: Vórtex	
D: Volumen Acetonitrilo	

Por la evidencia de los datos, se puede interpretar que con un nivel de significancia de 0,05 tanto el modelo como el factor "volumen de acetonitrilo" resultaron significativos para este caso. Ambos presentan un valor de F_m mayor al valor de F_C y además sus valores de p son menores al nivel de significancia " α ".

Asimismo puede indicarse que el factor "volumen de acetonitrilo" causa un gran efecto en la respuesta "Alicina" aportando el 93,04% de la variabilidad total, dato que resulta considerando a $1,365.10^{12}$ el 100% de la variabilidad. En el caso del ultrasonido la variabilidad aportada es de 1,79%. En la figura III.1 queda demostrado dicho efecto. En ella puede observarse que un volumen mayor de acetonitrilo, disminuye significativamente la respuesta de Alicina

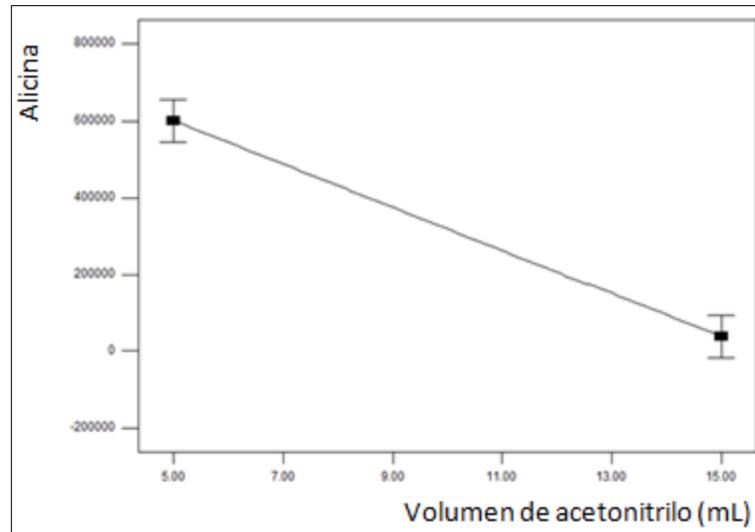


Figura III.1. Representación gráfica del efecto principal del factor volumen de acetonitrilo (mL) en la concentración de Alicina.

Por su parte, si bien al aumentar el tiempo de ultrasonido se extrae mayor concentración de Alicina, el efecto que tiene sobre la misma no es significativo como puede observarse en la figura III.2.

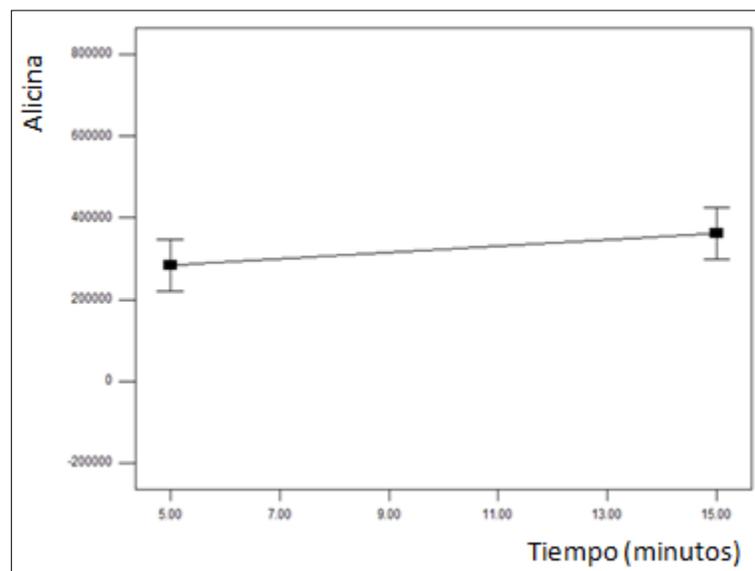


Figura III.2. Representación gráfica del efecto principal del factor tiempo de ultrasonido (minutos) en la concentración de Alicina.

III.4.1.2. Dialil sulfuro

En la tabla III.5 se muestra el análisis de la varianza multifactorial para Dialil sulfuro.

Tabla III.5. ANOVA del diseño factorial para la respuesta Dialil sulfuro.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Estadígrafo F_m	Valor p
Bloque	$4,819 \cdot 10^3$	1	$4,819 \cdot 10^3$	-	-
Modelo	20,07	4	5,02	19,43	0,0001
A: Ultrasonido	0,13	1	0,13	0,49	0,5018
B: Pausa	0,52	1	0,52	2,02	0,1857
C: Vórtex	0,34	1	0,34	1,32	0,2772
D: Volumen Acetonitrilo	19,08	1	19,08	73,89	<0,0001
Error Residual	2,58	10	0,26		
Variabilidad total	22,66	15			

Fuente: Design Expert 8.0.7.1

Se puede interpretar que con un nivel de confianza del 95% tanto el modelo como el factor “volumen de acetonitrilo” resultan significativos. Esto se pone en evidencia al comparar los valores del estadígrafo F muestral con los valores de F crítico presentados en la tabla III.4. Ambos presentan un valor de F_m mayor al valor de F_c y además sus valores de p son menores al nivel de significancia “ α ” de 0,05.

Además teniendo en cuenta que el valor de suma de cuadrados para la variabilidad total es de 22,66 y éste representa el 100% de la variabilidad, se procede a calcular la variabilidad aportada por el volumen de acetonitrilo la cual representa el 84,20%.

A continuación se muestran los gráficos del cambio de respuesta correspondiente al área de Dialil sulfuro, transformada en la escala Log 10 (DAS + 34,45), en función del volumen de acetonitrilo (figura III.3) y en función del tiempo de ultrasonido (figura III.4). Como se ilustra en la figura III.3 a mayor volumen de acetonitrilo menor extracción del estándar.

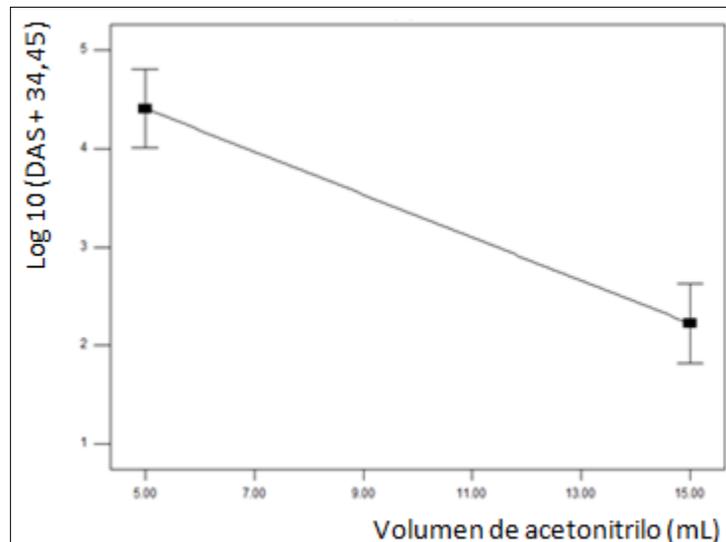


Figura III.3. Representación gráfica del efecto principal del factor volumen de acetonitrilo (mL) en la concentración de Dialil sulfuro.

Por su parte el tiempo de ultrasonido no provoca cambios significativos (figura III.4).

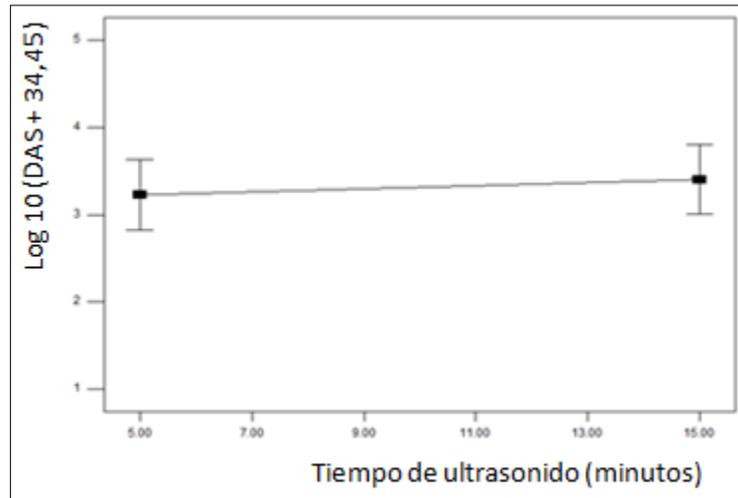


Figura III.4. Representación gráfica del efecto principal del factor tiempo de ultrasonido (minutos) en la concentración de Dialil sulfuro.

III.4.1.3. Dialil disulfuro

En la tabla III.6 se presenta el análisis de la varianza multifactorial para el estándar Dialil disulfuro.

Tabla III. 6. ANOVA del diseño factorial para la respuesta Dialil disulfuro.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Estadígrafo F_m	Valor p
Bloque	$1,167 \cdot 10^7$	1	$1,167 \cdot 10^7$	-	-
Modelo	$9,354 \cdot 10^8$	4	$2,339 \cdot 10^8$	80,59	<0,0001
A: Ultrasonido	$1,647 \cdot 10^7$	1	$1,647 \cdot 10^7$	5,68	0,0384
B: Pausa	$1,864 \cdot 10^5$	1	$1,864 \cdot 10^5$	0,064	0,8051
C: Vórtex	$2,984 \cdot 10^5$	1	$2,984 \cdot 10^5$	0,10	0,7551
D: Volumen Acetonitrilo	$9,185 \cdot 10^8$	1	$9,185 \cdot 10^8$	316,52	<0,0001
Error Residual	$2,909 \cdot 10^7$	10	$2,909 \cdot 10^6$		
Variabilidad total	$9,761 \cdot 10^8$	15			

Fuente: Design Expert 8.0.7.1

Con un nivel de confianza del 95% puede afirmarse que el modelo y los factores “ultrasonido” y “volumen de acetonitrilo” resultaron significativos para este estándar. Sin embargo considerando al valor $9,761 \cdot 10^8$ como el 100% de la variabilidad total y calculando la variabilidad aportada por cada factor se encuentra que el uso del ultrasonido aporta 1,69% de la variabilidad, mientras que el volumen de acetonitrilo el 94,10%, resultando ser más significativo.

En la figura III.5 se ilustra el cambio de respuesta del analito en función del volumen de acetonitrilo.

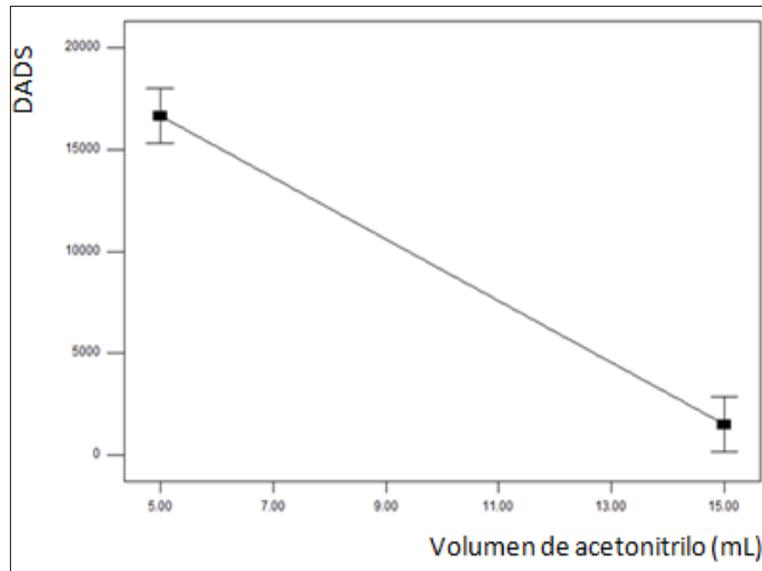


Figura III.5. Representación gráfica del efecto principal del factor volumen de acetonitrilo (mL) en la concentración de Dialil disulfuro.

Tal como se ilustra en la figura III.6 el uso del ultrasonido no impacta en forma significativa en la concentración de este estándar.

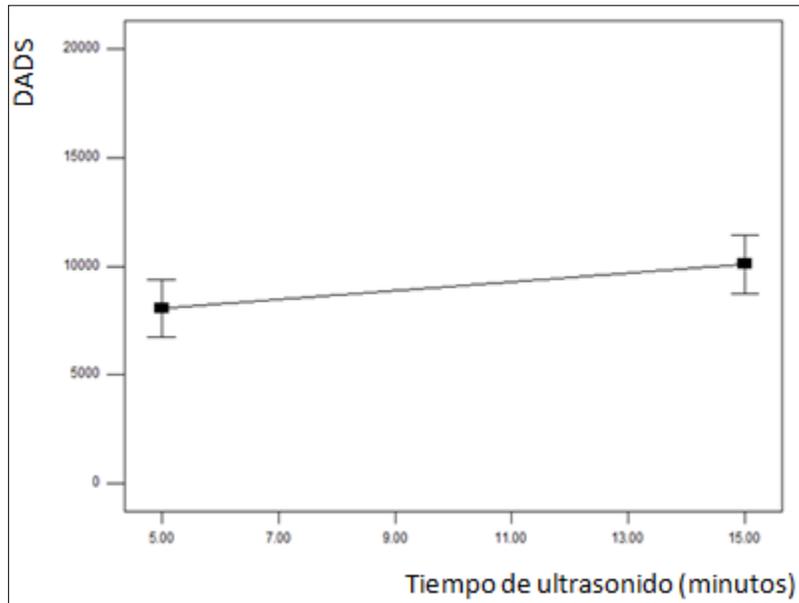


Figura III.6. Representación gráfica del efecto principal del factor tiempo de ultrasonido (minutos) en la concentración de Dialil disulfuro.

III.4.1.4. Dialil trisulfuro

En la tabla III.7 se presenta el análisis de la varianza multifactorial para el estándar Dialil trisulfuro.

Tabla III. 7. ANOVA del diseño factorial para la respuesta Dialil trisulfuro.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Estadígrafo F_m	Valor p
Bloque	$2,448.10^9$	1	$2,448.10^9$	-	-
Modelo	$1,365.10^7$	4	$3,413.10^8$	11,30	0,0010
A: Ultrasonido	$3,159.10^9$	1	$3,159.10^9$	1,05	0,3305
B: Pausa	$3,325.10^9$	1	$3,325.10^9$	1,10	0,3187
C: Vórtex	$6,547.10^9$	1	$6,547.10^9$	0,10	0,7551
D: Volumen Acetonitrilo	$1,235.10^7$	1	$1,235.10^7$	40,89	<0,0001
Error Residual	$3,020.10^8$	10	$3,020.10^9$		
Variabilidad total	$1,692.10^7$	15			

Fuente: Design Expert 8.0.7.1

Comparando los valores de F_m con los de F_c presentados en la tabla III.4, se pone en evidencia que el factor “volumen de acetonitrilo” influye significativamente en el cambio de respuesta para el Dialil trisulfuro. Interpretación que se puede afirmar con un nivel de significancia de 0,05 y valores de p del modelo y de dicho factor menores a este nivel.

El porcentaje de variabilidad aportada por el factor volumen de acetonitrilo es de 72,99%, mientras que en el caso del ultrasonido, ésta es de 1,87%.

Una disminución en el volumen de acetonitrilo aumenta la señal de Dialil trisulfuro. Para realizar el análisis, el software recomienda una transformación de los datos de área del estándar de manera de obtener una respuesta lineal de los mismos en función del volumen de acetonitrilo y del tiempo de ultrasonido. De esta manera en la figura III.7 y III.8 los datos de área en el eje de ordenadas, se indican como “1/ área de Dialil trisulfuro” siendo ésta la inversa de la respuesta.

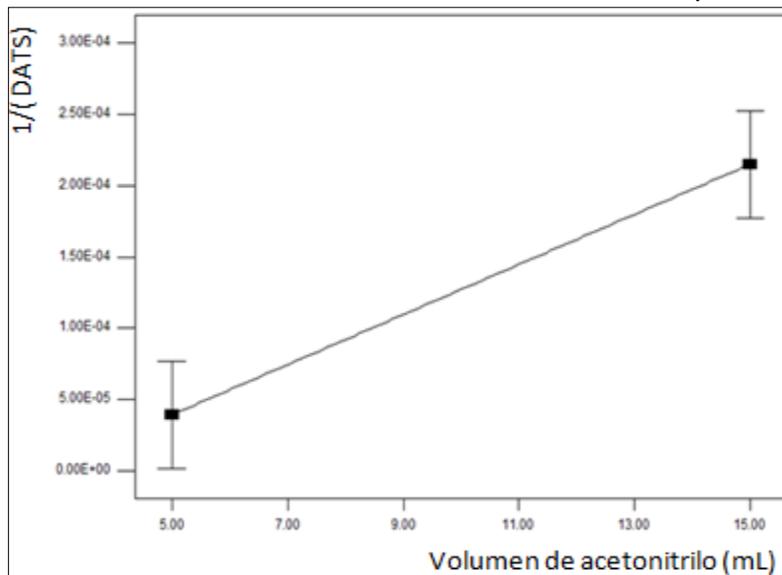


Figura III.7. Representación gráfica del efecto principal del factor volumen de acetonitrilo (mL) en la concentración de Dialil trisulfuro (inversa de la respuesta).

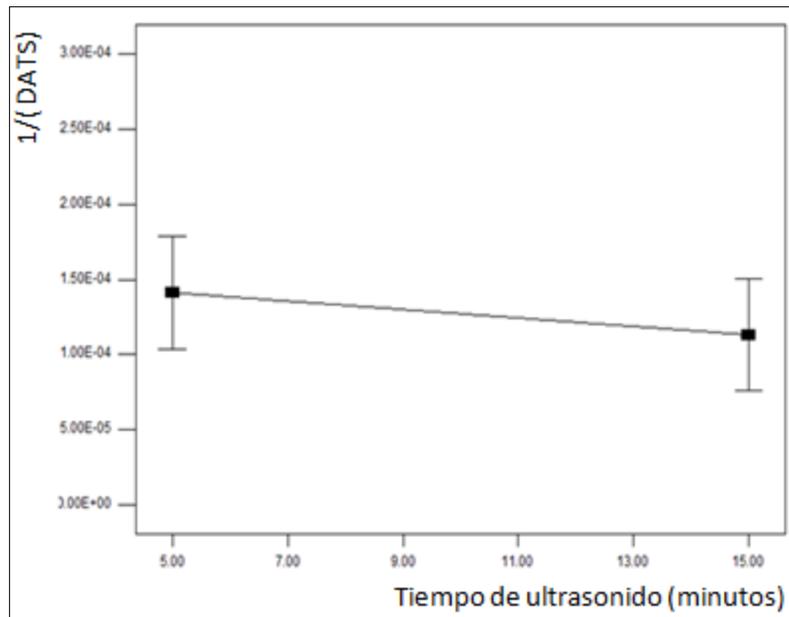


Figura III.8. Representación gráfica del efecto principal del factor tiempo de ultrasonido (minutos) en la concentración de Dialil trisulfuro (inversa de la respuesta).

III.4.2. 2° diseño experimental

Para la optimización, se usó la función deseabilidad, que permite combinar las opciones individuales y obtener así la combinación de valores óptimos de las variables para conseguir las máximas respuestas de los analitos.

Cabe destacar que los datos referidos al Dialil sulfuro no fueron tenidos en cuenta, ya que los resultados obtenidos en el 2° diseño experimental indicaron valores que no eran reproducibles. Esto puede deberse a que se trata de un analito inestable cuya presencia es inherente a las características de la matriz. Por esta razón se decidió descartarlo para la optimización de la metodología. De esta manera se aplicó la función deseabilidad para los datos referidos a áreas de Alicina, Dialil disulfuro y Dialil trisulfuro. Se obtuvo un gráfico en función del volumen de acetonitrilo (mL) y del tiempo de extracción por ultrasonido cuando ambas variables son optimizadas en el rango (figura III.9)

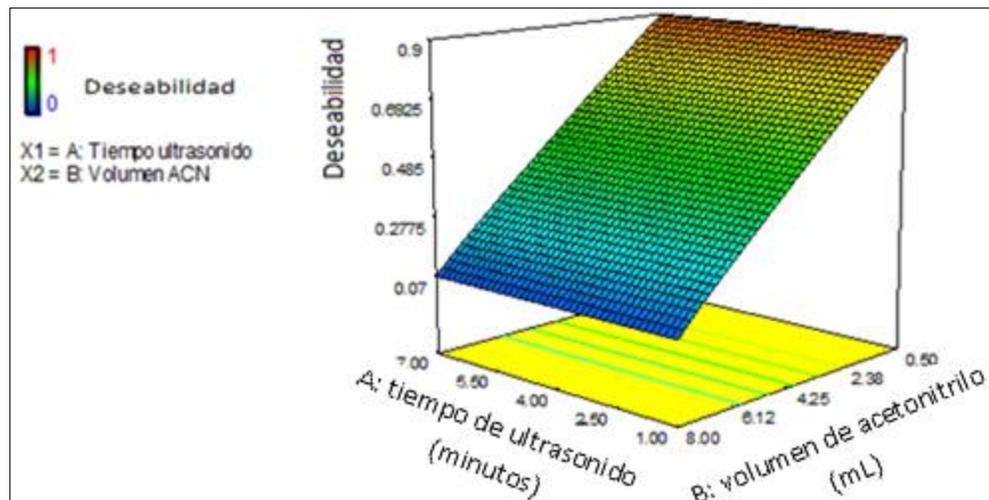


Figura III.9. Gráfico de la función deseabilidad para volumen de acetonitrilo (mL) y tiempo de ultrasonido (minutos) optimizados en el rango.

Debido a que el tiempo de ultrasonido no resulta significativo en el rango utilizado se decidió minimizarlo a 1 minuto y optimizar la variable volumen de acetonitrilo. De esta manera se obtiene el siguiente gráfico de la función deseabilidad (Figura III.10).

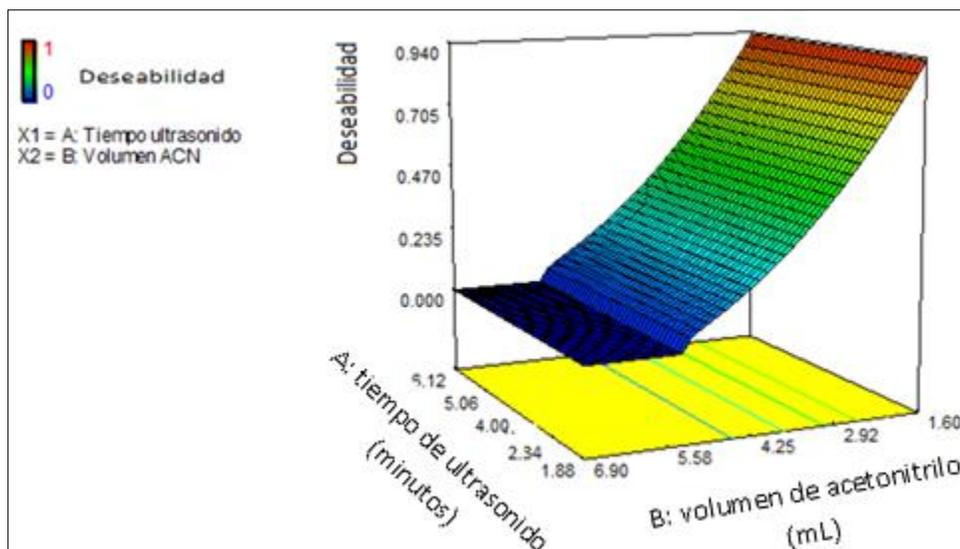


Figura III.10. Gráfico de deseabilidad en función del volumen de acetonitrilo (mL) optimizado y tiempo de ultrasonido (minutos).

Tal como puede apreciarse en el gráfico, el tiempo de ultrasonido no influye en la respuesta de los estándares, mientras que el volumen de acetonitrilo sí lo hace y en forma significativa. Si bien el volumen óptimo de acetonitrilo para lograr la mayor extracción de los compuestos organoazufrados es de 0,5 mL, en la práctica resulta dificultoso utilizar volúmenes muy pequeños ya que al filtrar la muestra se pierde gran parte del solvente. Por esta razón se decidió utilizar 1 mL de acetonitrilo, lo cual si bien disminuye un poco la sensibilidad de la extracción permite minimizar los errores cometidos empíricamente.

De esta manera, los **valores óptimos** de las variables serían:

- Tiempo de ultrasonido: 1 minuto
- Volumen de acetonitrilo: 1 mL

III.5. CONCLUSIONES

Para el desarrollo de los diseños experimentales, la elección de los factores a evaluar se basó en la bibliografía consultada y en los resultados obtenidos a partir de los ensayos de estabilidad realizados en el capítulo II.

Los resultados obtenidos a partir del primer diseño experimental permitieron poner en evidencia que el volumen de acetonitrilo resultó ser significativo en la respuesta de todos los estándares. El proceso de extracción sólido-líquido de los compuestos organoazufrados evaluados, fue favorecido con un menor volumen de acetonitrilo, ya que permitió extraer mayores concentraciones de dichos analitos.

Una vez realizado el segundo diseño, se evidenció que el tiempo de ultrasonido no tiene efectos significativos, en el rango utilizado, para ninguna de las respuestas optimizadas. No obstante, al calcular la variabilidad aportada por dicho factor pudo evidenciarse que su uso contribuye, aunque en menor medida, a incrementar la extracción de los compuestos organoazufrados. Por lo tanto, se seleccionó el tiempo mínimo evaluado, para que la extracción sea rápida.

En cuanto al volumen de solvente los resultados coincidieron con el primer diseño en el cual pudo denotarse que éste influye significativamente en las respuestas de los estándares, y que a menor volumen la extracción es más efectiva.

Capítulo IV

SÍNTESIS Y PURIFICACIÓN DE VINILDITIINAS

IV. SÍNTESIS Y PURIFICACIÓN DE VINILDITIINAS

IV.1. INTRODUCCIÓN

Del estudio de estabilidad físico-química de compuestos organoazufrados realizado en el capítulo II, pudo evidenciarse la formación de otras especies químicas además de los estándares bajo estudio. Según la bibliografía consultada puede suponerse que dichos compuestos correspondan a Ajoenos y Vinilditiinas. Por esta razón surgió la inquietud de estudiar su síntesis para evaluarlos conjunto a los estándares ya analizados. Una vez obtenidos, éstos serían incluidos en la validación del método analítico para la cuantificación de OSCs desarrollada en el capítulo V. Si bien los estudios de estabilidad físico-química y extracción sólido-líquido, desarrollados en los capítulos II y III respectivamente, no se realizaron conforme a ellos, a partir de su síntesis podrían incluirse en futuros estudios.

Al igual que otros compuestos organoazufrados encontrados en ajo, las Vinilditiinas, exhiben propiedades benéficas para la salud. Han sido investigadas como compuestos preventivos de enfermedades cardiovasculares y como antioxidantes. Al incubarlas en sangre mantenida a 37°C, se ha encontrado que para 3-vinil-4H-1,2-ditiina su vida media es de 15 minutos, mientras que para 2-vinil-4H-1,3-ditiina no se ha encontrado ninguna disminución al cabo de 2 horas (Lawson, 1993). Se ha informado que tanto 2-vinil-4H-1,3-ditiina como Ajoeno, son potentes agentes antitrombóticos derivados del extracto de ajo. Reducen en forma significativa la incidencia de agregación plaquetaria, siendo benéficos para prevenir infartos de miocardio o accidentes cerebrovasculares (Kamel y Saleh, 2000). Además se ha evidenciado que las Vinilditiinas regulan la presión sanguínea e inhiben la enzima lipooxigenasa (Dusica y col., 2012).

Estos compuestos, tal como ha sido mencionado en el capítulo I, son productos de degradación de la Alicina, ya sea por altas temperaturas o por presencia de disolventes no polares (Rybak y col., 2004). Se encuentran presentes en extractos oleosos de ajo, disponibles comercialmente, los cuales contienen en mayor medida 2-vinil-4H-1,3-ditiina, Dialil trisulfuro y pequeñas cantidades de Ajoeno (Sendl, 1995).

En cuanto a su estabilidad, Lawson y col., 1990, encontraron que en productos de ajo macerados en aceite y mantenidos durante 6 meses a temperatura ambiente, el contenido de Ajoeno disminuyó un 50% mientras que el de Vinilditiinas se mantuvo estable. Estos resultados coinciden con los indicados por Kamel y Saleh, 2000, quienes reportan que las Vinilditiinas son consideradas más estables que los Ajoenos ya que su concentración se mantiene constante en el aceite durante al menos por 3 años.

Los isómeros de Vinilditiinas no se encuentran disponibles en el mercado como estándares de cuantificación, es por ello que se debe proceder a su síntesis y purificación.

La síntesis de las mismas se ha llevado a cabo por varios métodos. Iberl y col. 1990, sintetizaron estos compuestos a partir de Alicina cruda calentada en una mezcla de acetona:metanol y luego extraída con pentano. Lawson y col., 1991, las sintetizaron mediante la incubación de Alicina pura en hexano durante 1,5 horas a 45°C. Más tarde, Lawson y Wang, 2005, lograron su síntesis a partir de la incubación de Alicina pura en aceite de soja durante 4 días a temperatura ambiente.

En el presente trabajo, la metodología utilizada para proceder a la síntesis de Vinilditiinas se basó en el método planteado por Iberl y col., 1990, por considerarse una técnica sencilla y que además no requiere partir de Alicina purificada. No obstante se realizaron algunas modificaciones de esta técnica que involucraron aumentos de temperatura durante el desarrollo de la misma, a fin de asegurar la descomposición de la Alicina y por ende lograr una síntesis exitosa de Vinilditiinas.

Una vez sintetizadas, se procede a su purificación mediante HPLC, colectando manualmente las fracciones directamente del equipo. La confirmación de su síntesis se realiza por espectrofotometría UV con la obtención de un espectro característico del compuesto en estudio. También se identifican por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas, técnica que permite analizar con gran precisión la composición de diferentes elementos químicos, separando los núcleos atómicos o iones en función de su relación masa-carga (m/z).

IV. 2. OBJETIVOS

- Lograr la síntesis y purificación de Vinilditiinas.
- Confirmar los compuestos sintetizados mediante espectrofotometría UV y CG-MS.

IV.3. ENSAYOS

IV.3.1. Síntesis de Vinilditiinas

IV.3.1.1. Materiales y métodos

IV.3.1.1.1. Reactivos

- Acetona, Omnisolv 99,98% pureza
- Acetonitrilo, J.T Baker grado HPLC.
- Agua destilada
- Alicina cruda, sintetizada según González y col., 2007
- Gas inerte: Nitrógeno.
- Metanol, J.T Baker grado HPLC.
- Pentano, Omnisolv 99,8% pureza.
- Sulfato de sodio anhidro Biochem.

IV.3.1.1.2. Material de laboratorio

- Ampolla de decantación de 50 mL
- Erlenmeyer de 250 mL con cuello esmerilado
- Pipeta de doble aforo de 5 mL
- Probetas de 10 mL: 2
- Reflujo
- Vasos de precipitado de 50 mL : 2
- Embudo y papel de filtro 0,22 μm

IV.3.1.1.3. Equipos

- Balanza analítica DENVER APX-200.
- Baño termostático Decalab

IV.3.1.1.4. Metodología de trabajo

En base a la bibliografía consultada, se llevó a cabo la síntesis de Vinilditiinas propuesta por Iberl y col., 1990 con una ligera modificación. Alicina cruda fue pesada (0,32g) y disuelta en 10mL de solución acetona: metanol (6:4). Fue calentada en baño termostático a 63°C durante 2,5 horas y luego a 80°C durante 40 minutos con reflujo para evitar pérdida del disolvente y mantener constante el volumen de reacción. Se agregó 10 mL de H₂O destilada y se realizaron 3 extracciones con 5 mL de pentano cada una. El extracto pentanoso fue secado con Na₂SO₄ anhidro y filtrado. Finalmente se concentró con N₂ gaseoso.

IV.3.1.2. Resultados y discusión

Se logró la síntesis de Vinilditiinas lo cual se puso de manifiesto por la obtención de un líquido aceitoso de color amarillo y de olor característico, tal como fue reportado por Iberl y col., 1990. A continuación se muestra el cromatograma obtenido del producto de la síntesis de Vinilditiinas (figura IV.1). En él puede observarse que la fracción de 2-vinil-4H-1,3-ditiina es mayoritaria y presenta mejor resolución que su isómero. Por esta razón se decidió purificar sólo el isómero mayoritario. Además puede observarse picos correspondientes a Dialil disulfuro (DADS) y Dialil trisulfuro (DATS) generados a partir de la Alicina utilizada en la síntesis.

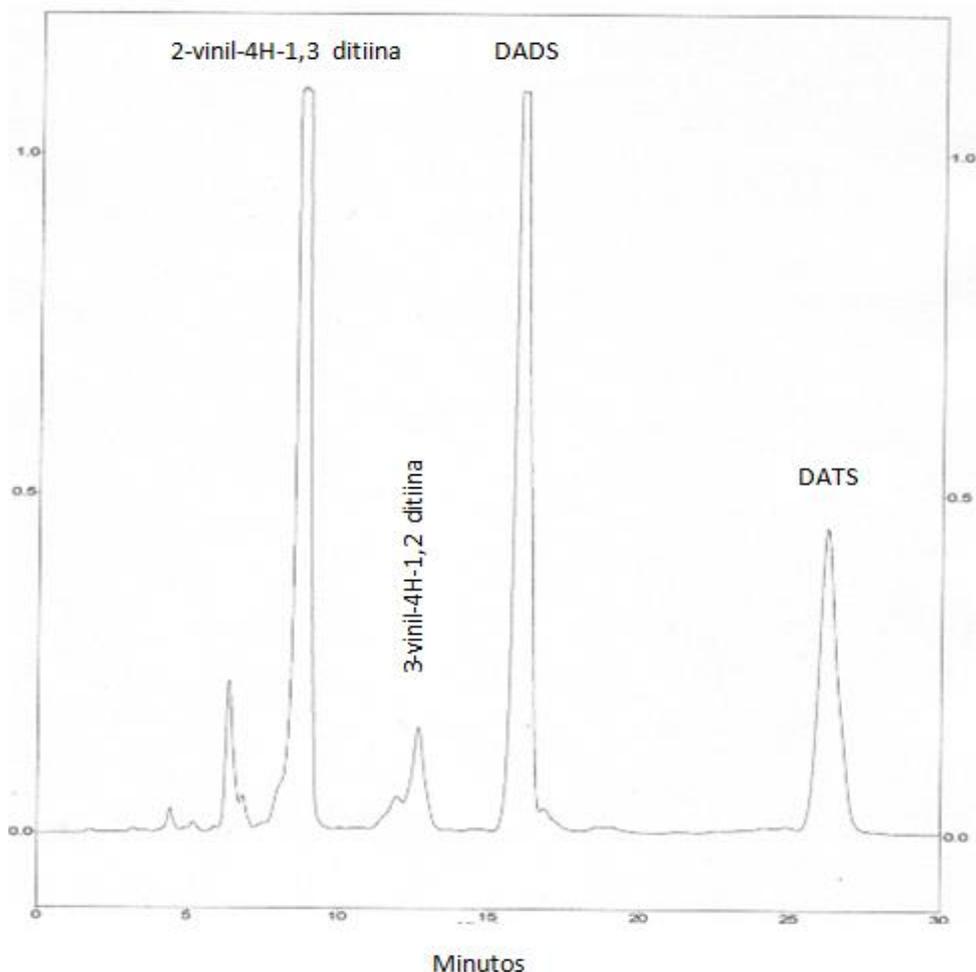


Figura IV.1. Cromatograma de la síntesis de Vinilditiinas. HPLC-RP, acetonitrilo:agua:metanol (50:41:9) (V/V), flujo 1mL min⁻¹, loop: 100µL y longitud de onda: 254nm.

IV. 3.2. Purificación de 2-vinil-4H-1,3-ditiina

IV.3.2.1. Materiales y métodos

IV.3.2.1.1. Reactivos

- Acetonitrilo, J.T Baker grado HPLC.
- Agua miliQ.
- Gas inerte: Nitrógeno.
- Metanol, J.T Baker grado HPLC.
- Pentano, Omnisolv 99,8% pureza.
- Sulfato de sodio anhidro Biochem.

IV.3.2.1.2. Material de laboratorio

- Ampolla de decantación de 50 mL
- Jeringa de inyección de 100 μ L, HAMILTON
- Pipeta de doble aforo de 2 mL
- Pipeta automática: volumen 100-1000 μ L, Nichipet EX
- Tubo de ensayo graduado de 10 mL
- Vasos de precipitado de 50 mL : 2
- Embudo chico y papel de filtro 0,22 μ m

IV.3.2.1.3. Equipos

- Balanza analítica DENVER APX-200.
- Cromatógrafo Gaseoso-Masa, Perkin Elmer precisely Clarus 500.
- Cromatógrafo líquido KINK-500-A series KONIK instruments Acoplado a un detector UV-Vis. Columna octadecilsilano (WATERS).
- Espectrofotómetro UV-Visible, Cary 50 Conc.
- Freezer a -20°C, Bambi.

IV.3.2.1.4. Metodología de trabajo

La purificación de 2-vinil-4H-1,3-ditiina fue realizada por medio de la colección de fracciones directamente del HPLC. Se trabajó con una columna de fase reversa ODS C18 de 254 mm de longitud y 0,46 mm d.i., la fase móvil empleada fue: acetonitrilo:agua:metanol (50:41:9) (V/V), flujo 1 mL min⁻¹, loop: 100 μ L y longitud de onda: 254nm.

Las Vinilditiinas sintetizadas fueron disueltas en 500 μ l de acetonitrilo. Con estas condiciones se colectó la fracción de 2-vinil-4H-1,3-ditiina cuyo tiempo de retención fue de aproximadamente 8,8 minutos. Para evaluar la calidad de la purificación, se inyectó la fracción colectada al HPLC. Una vez colectadas las fracciones de 2-vinil-4H-1,3-ditiina, se realizaron 5 extracciones con 2 mL de pentano cada una. Se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y por último se concentró con N₂ gaseoso y se conservó en freezer a -20°C.

IV.3.2.2. Resultados y discusión

Las Vinilditiinas obtenidas tras la síntesis fueron disueltas en acetonitrilo e inyectadas al HPLC. Las sucesivas fracciones de 2-vinil-4H-1,3-ditiina fueron reunidas, extraídas con pentano y concentradas con nitrógeno gaseoso.

Para determinar la calidad de la purificación, se inyectó la fracción colectada al HPLC y se obtuvo el siguiente cromatograma (figura IV.2):

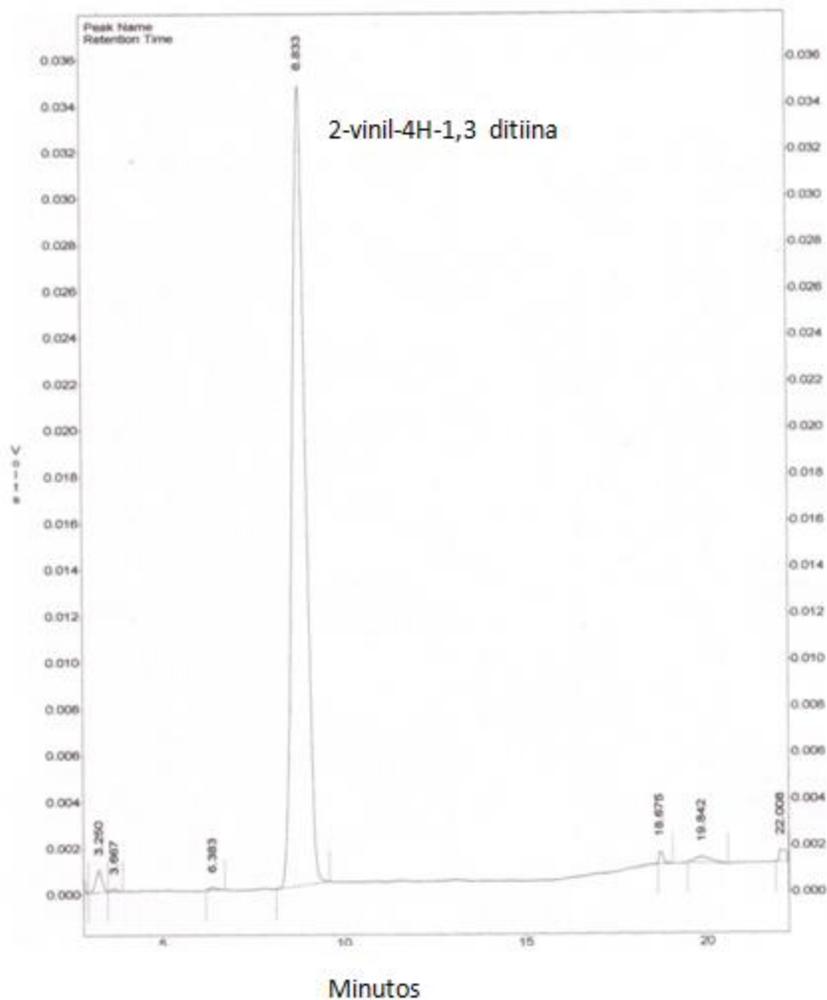


Figura IV.2. Cromatograma de 2-vinil-4H-1,3-ditiina purificada. HPLC-RP, acetonitrilo:agua:metanol (50:41:9) (V/V), flujo 1 mL min^{-1} , loop: $100\mu\text{L}$ y longitud de onda: 254 nm .

Tal como puede apreciarse en la figura IV.2, se observa un único pico cuyo tiempo de retención es 8,63 lo cual pone en evidencia una purificación satisfactoria.

IV. 3.3. Identificación de Vinilditiinas

IV.3.3.1. Materiales y métodos

IV.3.3.1.1. Reactivos

- Acetonitrilo, J.T Baker grado HPLC.
- Agua miliQ.
- Metanol, J.T Baker grado HPLC.
- Vinilditiinas sintetizadas

IV.3.3.1.2. Material de laboratorio

- Jeringa de inyección de 10 μ L, HAMILTON
- Cubeta de cuarzo

IV.3.3.1.3. Equipos

- Cromatógrafo Gaseoso-Masa, Perkin Elmer precisely Clarus 500.
- Espectrofotómetro UV-Visible, Cary 50 Conc.

IV.3.3.1.4. Metodología de trabajo

IV.3.3.1.4.1. Barrido espectral UV de 2-vinil-4H-1,3-ditiina purificada: para confirmar la síntesis y purificación de Vinilditiinas, la fracción colectada fue disuelta en fase móvil acetonitrilo:agua:metanol (50:41:9) (V/V), y colocada en cubeta de cuarzo para realizar un barrido espectral (UV) desde los 190 a los 290 nm.

IV.3.3.1.4.2. Determinación del espectro de masas mediante Cromatografía de gases capilar acoplada a espectrometría de masas (CG-MS): se llevó a cabo la identificación de los dos isómeros de Vinilditiinas mediante la inyección 2 μ L de las mismas al CG-MS. Se trabajó con una columna HP5- MS de 30 m de longitud; 0,32 mm d.i y 0,25 μ m de espesor de film; gas portador helio, flujo 2 mL min^{-1} ; temperatura del detector 250°C; programa de temperatura: 35°C (1 minuto), 10°C minuto^{-1} , 75°C (1 minuto), 2°C minuto^{-1} , 100°C (0 minuto), 10°C minuto^{-1} , 280°C (5 minutos); detector MS; voltaje de ionización 70 mV, temperatura de ionización 150°C y rango 30-250 m/z.

IV.3.3.2. Resultados y discusión

IV.3.3.2.1. Espectro UV de 2-vinil-4H-1,3-ditiina purificada: el espectro obtenido fue comparado con el que figura en el estudio de Iberl y col., 1990. En la figura IV.3 se muestra el espectro de absorbancia de 2-vinil-4H-1,3-ditiina donde se pone de manifiesto un hombro característico a los 220nm el cual coincide con lo citado en la bibliografía consultada.

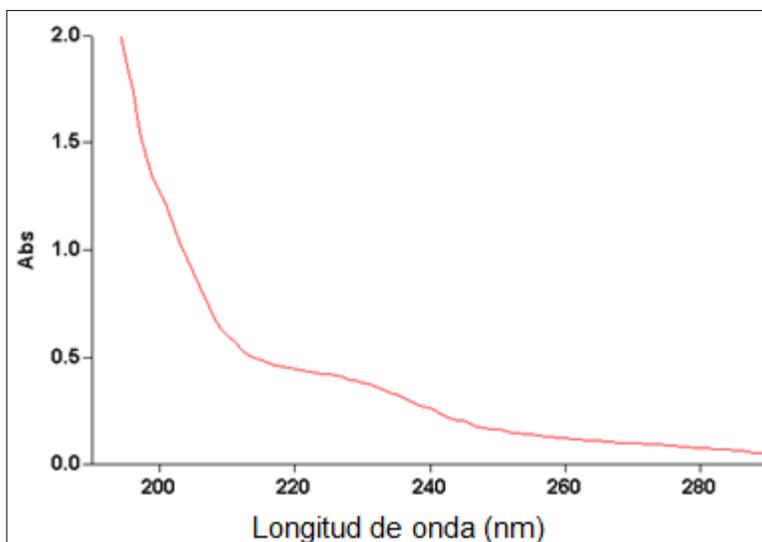


Figura IV.3. Espectro de absorción UV de la solución de 2-vinil-4H-1,3-ditiina en fase móvil acetonitrilo:agua:metanol (50:41:9) (V/V).

IV.3.3.2.2. Cromatografía de gases capilar acoplada a espectrometría de masas (CG-MS): Los espectros de masas obtenidos fueron comparados con los datos publicados por Yu y col., 1989a; Dusica y col. 2012 (Figura IV.4).

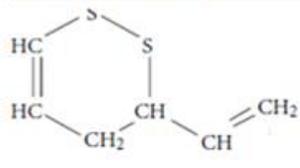
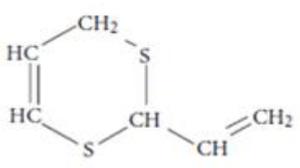
Nombre y estructura	MS (m/z)	UV (nm)
 3-vinil-4H-1,2 ditiina	144 (49), 111 (75), 103 (31), 97 (48), 72 (25), 71 (60), 45 (100), 39 (20)	227
 2-vinil-4H-1,3 ditiina	144 (35), 111 (34), 103 (31), 72 (100), 71 (25), 45 (60), 39 (43)	232

Figura IV.4. Datos de los espectros CG-MS y UV para los dos isómeros de Vinilditiinas. Los números entre paréntesis expresan % de abundancia de cada uno de los iones moleculares identificados en los espectros. Fuente Dusica y col., 2012.

En la figura IV. 5 se observa el cromatograma obtenido a partir de la inyección de 2-vinil-4H-1,3-ditiina. A partir del mismo se obtuvieron los espectros de masa correspondientes a cada isómero (figura IV.6 y figura IV.7)

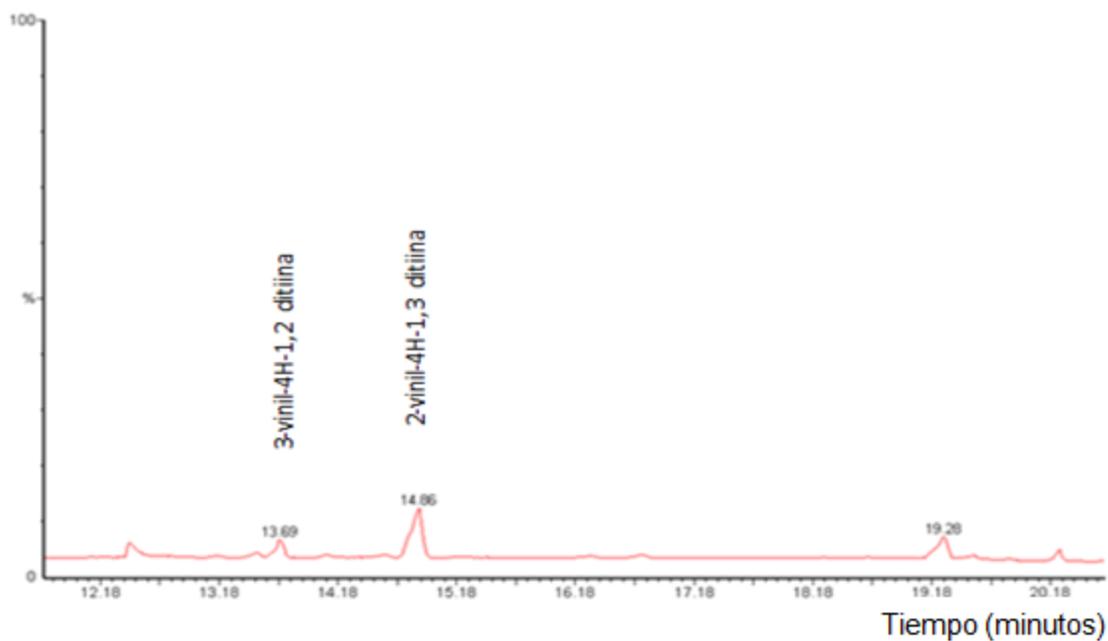


Figura IV.5. Cromatograma de Vinilditiinas purificadas obtenido de CG.

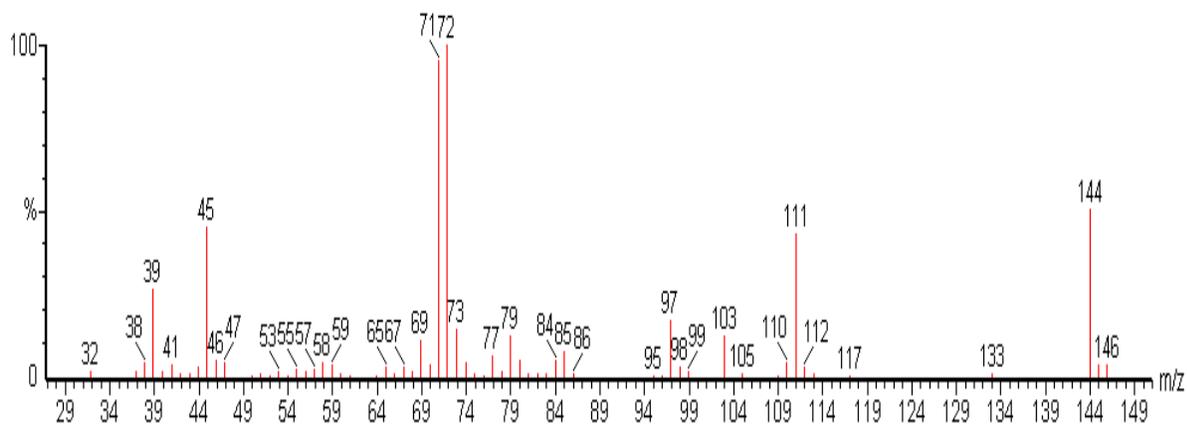


Figura IV. 6. Espectro de masa de 2-vinil-4H-1,3-ditiina

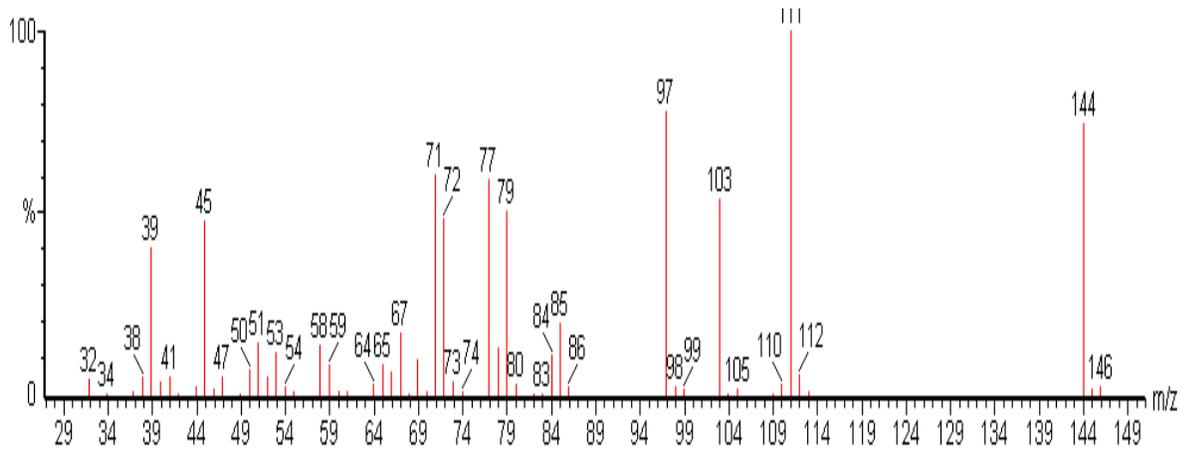


Figura IV. 7. Espectro de masa de 3-vinil-4H-1,2 ditiina.

IV.3.4. Determinación de la concentración de 2-vinil-4H-1,3-ditiina sintetizada

IV.3.4.1. Materiales y métodos

IV.3.4.1.1. Reactivos

- Acetonitrilo, J.T Baker grado HPLC.
- Agua miliQ.
- Metanol, J.T Baker grado HPLC.

IV.3.4.1.2. Material de laboratorio

- Cubeta de cuarzo

IV.3.4.1.3. Equipos

- Espectrofotómetro UV-Visible, Cary 50 Conc.

IV.3.4.1.4. Metodología de trabajo

Se realizó leyendo las absorbancias a 202 y 254 nm de la solución de 2-vinil-4H-1,3-ditiina en fase móvil: acetonitrilo:agua:metanol (50:41:9) (V/V). Para el cálculo de la concentración se empleó la relación de Lambert y Beer y se tuvo en cuenta los coeficientes de extinción citados en el estudio de Iberl y col., 1990.

IV.3.4.2. Resultados y discusión

Los resultados obtenidos en base a las 3 lecturas de absorbancia leídas a 202 nm y 254nm se detallan en la tabla IV.1. Previamente se realizó la lectura de un blanco.

Tabla IV.1. Datos de absorbancia obtenidos luego de cada lectura.

Lectura	Longitud de onda λ (nm)	
	202	254
1	0,8775	0,1323
2	0,8762	0,1320
3	0,8785	0,1318

El coeficiente de extinción “ ϵ ” expresado en mL $\text{mg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y correspondiente a la fase móvil y longitudes de onda anteriormente dichas, se muestra en la siguiente tabla:

Tabla IV.2. Coeficiente de extinción ϵ de 2-vinil-4H-1,3-ditiina en fase móvil

Acetonitrilo: agua: metanol (50:41:9)(V/V)		
Longitud de onda λ (nm)	202	254
Coeficiente de extinción ϵ (mL $\text{mg}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	11,18	3,53

Fuente: Iberl y col., 1990.

Para el cálculo de la concentración de 2-vinil-4H-1,3-ditiina, se aplicó la siguiente fórmula conforme a la ley de Lambert y Beer:

$$A = \epsilon \cdot b \cdot C$$

Donde:

A=absorbancia medida a 202 y 254 nm

ϵ =absortividad molar o coeficiente de extinción expresado en mL mg⁻¹ cm⁻¹

b= longitud de paso óptico (cm)

C=concentración en ppm

Reemplazando en la fórmula los valores anteriormente obtenidos, se calculó la concentración de 2-vinil-4H-1,3-ditiina la cual se observa en la tabla IV.3.

Tabla IV.3. Concentración de 2-vinil-4H-1,3-ditiina a 202 y 254 nm.

Longitud de onda λ (nm)	Concentración de 2-vinil-4H-1,3-ditiina (ppm)
202	78,5
254	37,4

IV. 4. CONCLUSIONES

Se obtuvieron resultados muy satisfactorios en cuanto a la síntesis de este estándar, logrando los objetivos planteados en el presente capítulo. La importancia de dicho logro radica en que estos isómeros no se comercializan en el mercado y por ende su adquisición sólo resulta de la síntesis de los mismos. Además su purificación y cuantificación permite su uso como estándar para estudios posteriores.

Las condiciones operacionales utilizadas en el equipo HPLC permitieron lograr la separación de los dos isómeros. Coincidiendo con los resultados planteados por la bibliografía consultada, el isómero de 2-vinil-4H-1,3-ditiina fue distinguido de su congénere, 3-vinil-4H-1,2 ditiina debido a la predominancia del primero. En cuanto a la purificación de los mismos, si bien sólo se purificó el isómero de 2-vinil-4H-1,3-ditiina por presentar mejor resolución, ambos pudieron ser identificados por GC-MS.

Capítulo V

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS ORGANOAZUFRADOS

V. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS ORGANOAZUFRADOS

V.1. INTRODUCCIÓN

Una vez desarrollado un método de análisis por HPLC, al igual que toda técnica analítica, deberá validarse, es decir, se debe confirmar y documentar que los resultados producidos por él, son confiables (Quatrochi y col., 1992).

La Norma ISO/IEC 17025: 2005 “Requisitos generales para la competencia de laboratorios de ensayo y calibración”, es una norma publicada por la Organización Internacional de estandarización “ISO” y la Comisión Electrotécnica Internacional “IEC”, ambos organismos internacionales de normalización altamente reconocidos y prestigiados a nivel mundial. Dicha norma define la validación de un método analítico como la confirmación, mediante el examen y el aporte de evidencias objetivas de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto (Álvarez, 2009).

La validación de un método de ensayo es un requisito primordial para obtener resultados técnicamente válidos, exactos y confiables. Es necesaria ya que permite conocer los parámetros de desempeño del método y proporciona un alto grado de confianza y seguridad en él y en los resultados que se obtienen al aplicarlo. Los estudios para determinar los parámetros de desempeño del método, deben ser llevados a cabo por analistas competentes con el conocimiento suficiente en el campo de trabajo y mediante la utilización de equipos que trabajen dentro de su especificación y adecuadamente calibrados. (ISO 17025).

Existen diferentes tipos de validación. Entre ellos se encuentran la *validación retrospectiva*, *validación prospectiva* y *revalidación*. La *validación retrospectiva* es una combinación de nuevos criterios de validación con la experiencia ya adquirida. Por su parte la *validación prospectiva* se aplica cuando se elabora un nuevo método analítico. Es típico en los laboratorios de investigación y desarrollo, y se realiza de acuerdo con un protocolo perfectamente planificado. Comprende el estudio de todos los criterios necesarios para demostrar el buen funcionamiento del método. Por último la *revalidación* se realiza cuando se introduce un cambio que pueda afectar la idoneidad del método analítico y exija una nueva validación, total o parcial de dicho método analítico (Quatrochi y col., 1992).

Los parámetros típicos de validación son: selectividad (especificidad), linealidad, precisión, recuperación, límite de detección y límite de cuantificación. Cuando los resultados obtenidos se adecuan a los valores preestablecidos por dichos parámetros se puede afirmar que la técnica analítica es confiable.

V.2. OBJETIVOS

- Caracterizar el método analítico desarrollado mediante la evaluación de cifras analíticas de mérito (especificidad, linealidad, precisión, recuperación, límites de detección y cuantificación de los analitos bajo estudio).
- Aplicar el método validado para la determinación y cuantificación de compuestos organoazufrados en muestras problema.

V.3. ENSAYOS

V.3.1. Determinación de la especificidad del método analítico

V.3.1.1. Introducción

La especificidad es la propiedad del método de producir una señal medible debida sólo a la presencia del analito, libre de interferencia de otros componentes en la matriz de la muestra (Quatrochi y col., 1992).

Para determinar si un método analítico es específico, se tienen en cuenta los siguientes parámetros:

- **Tiempo de retención:** tiempo medido entre la inyección y la elución de la concentración máxima del soluto enésimo (máxima señal). Sirve para la identificación del pico. En el caso de disponer de estándares, puede realizarse una co-cromatografía adicionando una cantidad medida del estándar a la muestra y posterior inyección en HPLC. De esta manera, si al comparar los cromatogramas obtenidos se observa un incremento en el área del pico correspondiente al estándar, confirmaría la identidad del analito.
- **Área bajo la curva:** proporciona una medida cuantitativa de la cantidad de cada componente. Los instrumentos cromatográficos están equipados con computadoras las cuales permiten un cálculo preciso del área del pico.
- **Caracterización espectral:** se realiza un barrido espectrofotométrico el cual pone de manifiesto la presencia de ciertos grupos funcionales de la molécula del analito.

V.3.1.2. Materiales y Métodos

V.3.1.2.1. Reactivos

- Acetonitrilo, J.T Baker grado HPLC.
- Agua miliQ.
- Ajoeno sintetizado según Soto y col., 2007.
- Alicina sintetizada según González y col., 2007.
- Dialil disulfuro (DADS) (Fluka, 80%).
- Dialil sulfuro (DAS) (Aldrich, 97%).
- Dialil trisulfuro (DATS).
- Diclorometano Omnisolv 99,98% pureza.
- Etil disulfuro (EDS) (Aldrich, 99%).
- Fenil sulfuro (FS) (Fluka, 95%).
- Gas inerte: Nitrógeno.
- Metanol, J.T Baker grado HPLC.
- Pentano, Omnisolv 99,8% pureza.
- Sulfato de sodio anhidro Biochem.
- Vinilditiinas sintetizadas (metodología de síntesis y purificación, capítulo IV).

V.3.1.2.2. Material de laboratorio

- Ampolla de decantación de 50 mL
- Cubeta de cuarzo.
- Embudo.

- Filtros de membrana de 0,45 µm; 0,2 µm de diámetro de poro.
- Jeringas de inyección de 10 µL; 100 µL, HAMILTON.
- Matraces: capacidad 50 mL (8); 5 mL (1).
- Pipeta automática: 100-1000 µL, Nichipet EX.
- Pipetas de doble aforo de 2 mL; 5 mL
- Vasos de precipitado de 50 mL (2).
- Viales con tapa a rosca de 10 mL

V.3.1.2.3. Equipos

- Balanza analítica DENVER APX-200.
- Baño ultrasónico TESLAB tb04.
- Cromatógrafo Gaseoso HP 5890 serie II, acoplado a un detector Fotométrico de llama (FPD).
- Cromatógrafo líquido KINK-500-A series KONIK instruments acoplado a un detector UV-Vis. Columna octadecilsilano (WATERS).
- Espectrofotómetro UV-Visible, Cary 50 Conc.
- Microondas, 800W, ATMA easy cook, modelo MR806.

V.3.1.2.4. Metodología de trabajo

V.3.1.2.3.1. Preparación de solución inicial o madre de patrones

- Se pesó una gota de cada uno de los estándares en matraces de capacidad conocida previamente tarados y luego fueron disueltos en acetonitrilo:agua:metanol (50:41:9) (V/V).
- Para el cálculo de la concentración de cada solución madre se aplicó la siguiente fórmula:

$$C = \frac{P_p (\mu\text{g}) \times \text{Pur}}{V_f (\text{mL}) \times 100}$$

Donde: C= conc. de la solución patrón expresada en ppm.
 P_p = peso del patrón en µg
 Pur/ 100= pureza porcentual del patrón
 V_f = volumen final de la solución expresado en mL.

En el caso de Alicina, Vinilditiinas, y Ajoeno, al haber sido sintetizados en el laboratorio, su concentración se determinó por espectrofotometría UV.

V.3.1.2.3.2. Preparación de mezcla de compuestos organoazufrados

A partir de las soluciones madres de cada uno de los estándares, se preparó una mezcla de estos compuestos en un matraz de 5 mL llevado a volumen con fase móvil acetonitrilo:agua:metanol (50:41:9) (V/V). La preparación de la mezcla se realizó de manera que todos los compuestos tuvieran semejante respuesta al detector. Para ello se tuvieron en cuenta los factores respuesta expresados como área de cada estándar en sus respectivas soluciones madres, y en base a estas áreas se calculó la concentración de cada analito en la mezcla. Las concentraciones de las soluciones madres de cada uno de los estándares y de la concentración de los mismos en la mezcla, son mostradas en la tabla V.1. Cabe aclarar que el estándar Dialil trisulfuro, fue obtenido durante la purificación de la Alicina pero no se determinó su concentración. Sin embargo fue agregado a la mezcla de compuestos organoazufrados ya que al conocer su tiempo de retención, podía ser perfectamente identificado y permitir, de ser posible, evaluar su comportamiento frente a los demás estándares.

Tabla V.1. Concentración de compuestos organoazufrados.

Compuestos organoazufrados	Concentración de la solución madre (ppm)	Concentración en la mezcla (ppm)
Alicina	425	15,3
Ajoeno	168,9	14,15
Dialil sulfuro	1620	155,52
Dialil disulfuro	940	69,56
Etil disulfuro (estándar interno)	880	73,92
Fenil sulfuro (estándar interno)	820	4,1
2-vinil-4H-1,3-ditiina	115,9	50,99
Dialil trisulfuro	-	-

Para evaluar la especificidad del método, la mezcla de OSCs fue inyectada por triplicado al Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) que presentaba las siguientes características (tabla V.2):

Tabla V.2. Condiciones cromatográficas empleadas en el análisis de OSCs por HPLC.

Variables	Condiciones
Modalidad	Fase reversa ODS C18 de 254 mm de longitud y 0,46 mm d.i
Fase móvil	acetonitrilo:agua:metanol (50:41:9) (V/V)
Flujo	1mL min ⁻¹
Volumen de inyección	20µL
Longitud de onda	254nm
Tiempo de corrida	40 minutos

V.3.1.2.3.3. Preparación de muestras

Se prepararon dos muestras de ajo cocido. Para ello se pelaron y picaron 2 dientes de ajo y se los dejó reposar durante 15 minutos. Para cada muestra, se pesó 1 gramo de ajo, se cocinó en viales sellados con cinta de teflón en microondas a máxima potencia durante 40 segundos y se dejó atemperar durante 5 minutos. Una de las muestras fue adicionada con 500 µL de la mezcla de compuestos organoazufrados de manera de poder observar el incremento en las áreas correspondientes a los picos de interés. A ambas muestras se les agregó 1 mL de acetonitrilo y se sonicaron durante 1 minuto para favorecer la extracción de los compuestos. Se filtraron con un filtro de 0,45µm y luego con filtro de 0,2 µm y se inyectaron por triplicado en el HPLC en las condiciones operacionales ya descriptas.

V.3.1.2.3.4. Confirmación de pureza u homogeneidad de analitos en el sistema cromatográfico

Para corroborar la pureza de cada analito, en el sistema cromatográfico de la muestra de ajo cocido contaminada con la mezcla de OSCs inyectada al HPLC, se realizaron colecciones de fracciones correspondientes a cada estándar.

Las fracciones colectadas de 2-vinil-4H-1,3-ditiina, DAS, DADS y DATS fueron extraídas 5 veces con 2 mL de pentano, secadas con Na₂SO₄ anhidro, filtradas, concentradas con N₂ gaseoso, redisueltas en diclorometano e inyectadas en el Cromatógrafo Gaseoso, bajo las condiciones operacionales presentadas en la tabla V.3. El mismo procedimiento se realizó para la fracción de Alicina, que si bien se trata de un compuesto termolábil, conforme a la bibliografía consultada, se sabe que se descompone dando lugar a los 2 isómeros de Vinilditiinas, lo cual permite su identificación.

Tabla V.3. Condiciones cromatográficas empleadas en el análisis de OSCs por CG.

Variables	Condiciones
Gas portador	Nitrógeno (2mL min ⁻¹)
Gas auxiliar	Nitrógeno (20mL min ⁻¹)
Flujo de aire	100 mL min ⁻¹
Flujo de hidrógeno	75mL min ⁻¹
Temperatura del inyector	250°C
Columna	HP5
Detector	FPD
Temperatura del detector	250°C
Programa de temperatura	35°C (1 minuto) 10°C/minuto; 75°C (1 minuto); 2°C/minuto 100°C (0 minutos); 10°C/minuto 280°C (5 minutos)

Por otro lado, para el caso de Alicina, Ajoeno y 2-vinil-4H-1,3-ditiina, la confirmación de la pureza de las fracciones colectadas, se realizó mediante espectrofotometría UV debido a la inestabilidad térmica de los 2 primeros compuestos.

V.3.1.3. Resultados y discusión

Los parámetros cromatográficos correspondientes a las áreas y tiempos de retención de cada uno de los estándares inyectados al HPLC fueron los siguientes (tabla V.4):

Tabla V.4. Tiempo de retención y área de compuestos organoazufrados (OSCs)

Compuesto organoazufrado	Tiempo de retención (minutos)	Área
Alicina	4,33	164710
Ajoeno	6,08	126850
2-vinil-4H-1,3-ditiina	8,35	57529
Dialil sulfuro	10,42	177016
Etil Disulfuro	13,47	191081
Dialil disulfuro	15,03	167034
Dialil trisulfuro	24,47	51030
Fenil Sulfuro	26,79	164699

En la figura V.1 se presenta el cromatograma obtenido, correspondiente a la muestra de ajo cocido contaminada con la mezcla de compuestos organoazufrados inyectada en el HPLC.

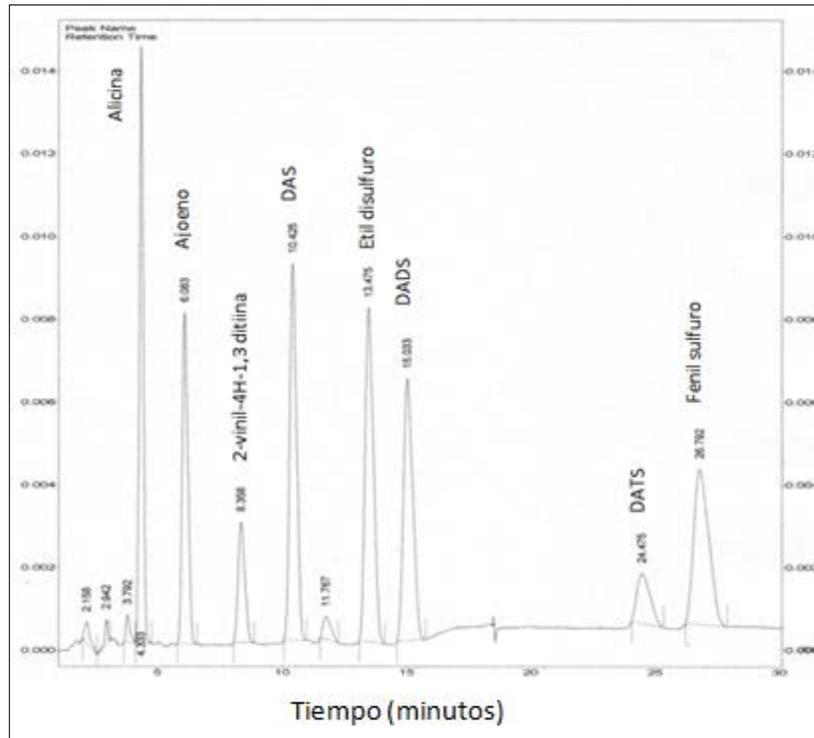


Figura V.1. Cromatograma de muestra de ajo cocido contaminada con la mezcla de compuestos organoazufrados.

Alicina, Ajoeno, 2-vinil-4H-1,3-ditiina, Dialil sulfuro, Etil disulfuro (estándar interno), Dialil disulfuro, Dialil trisulfuro y Fenil sulfuro (estándar interno). Condiciones cromatográficas especificadas en tabla V.2.

A continuación se presentan los cromatogramas obtenidos a partir de la inyección en el Cromatógrafo gaseoso de las fracciones de Alicina (figura V.2); 2-vinil-4H-1,3-ditiina (figura V.3); DAS (figura V.4); DADS (figura V.5); y DATS (figura V.6).

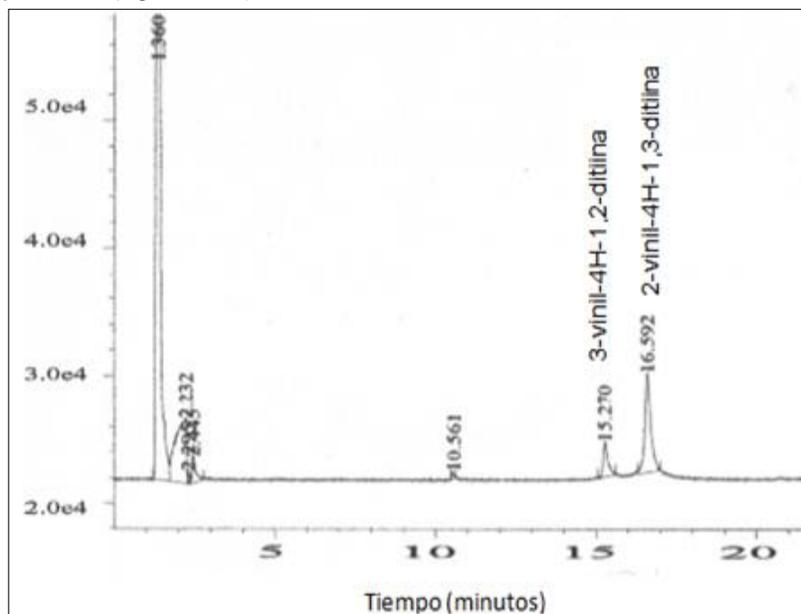


Figura V.2. Cromatograma obtenido del análisis por CG de Alicina. En coincidencia con lo citado por Yu y Wu, 1989a, se observan los dos isómeros de Vinilditiinas como principales compuestos volátiles producto de la degradación térmica de Alicina.

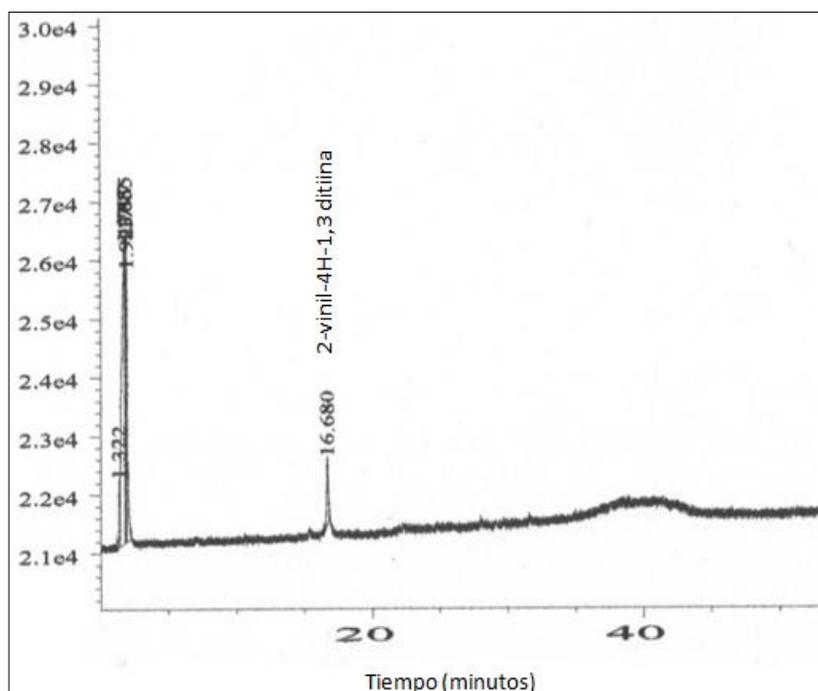


Figura V.3. Cromatograma resultante del análisis por CG de 2-vinil-4H-1,3-ditiina

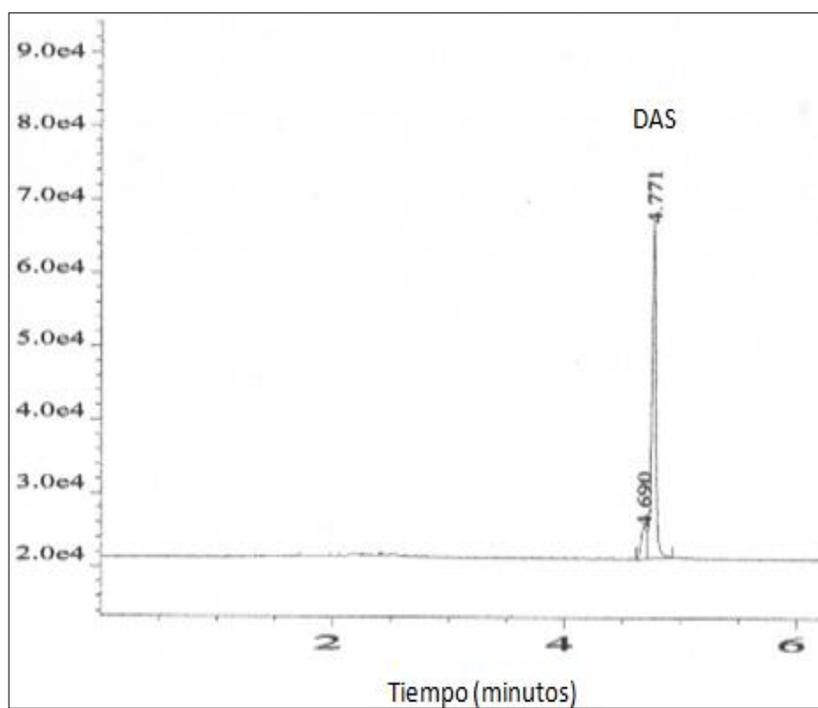


Figura V.4. Cromatograma obtenido del análisis por CG de DAS.

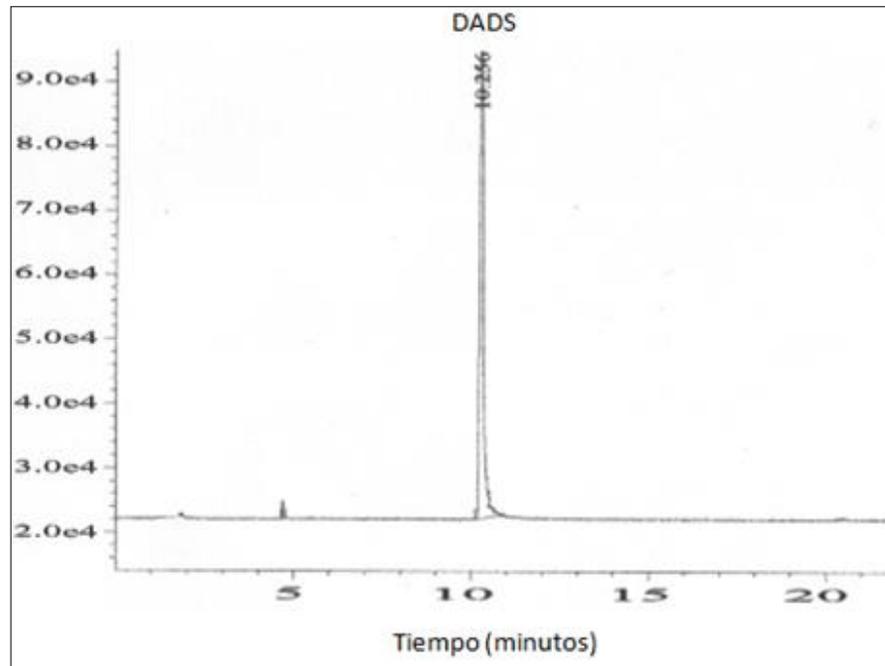


Figura V.5. Cromatograma obtenido del análisis por CG de DADS.

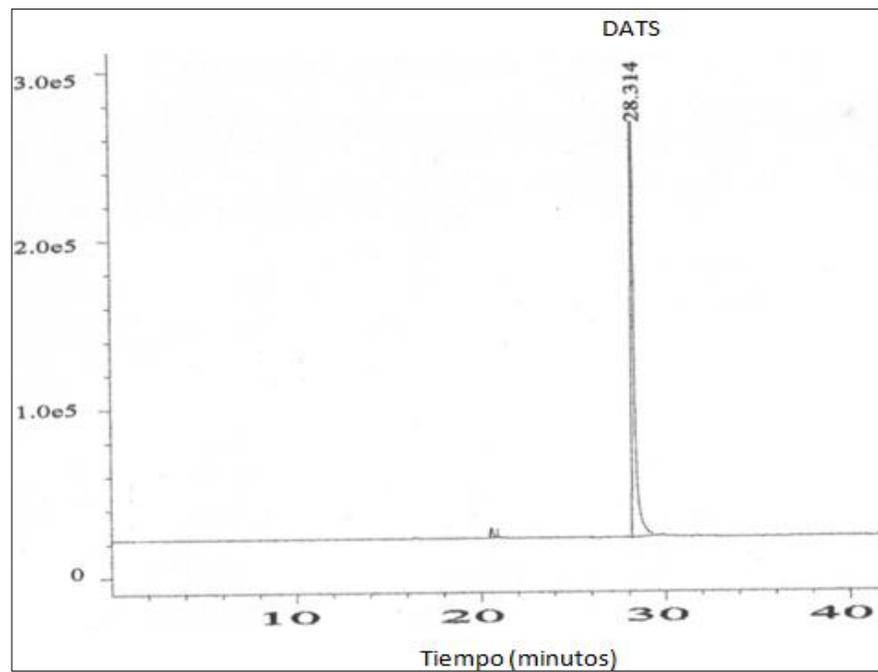


Figura V.6. Cromatograma obtenido del análisis por CG de DATS.

En cuanto a la caracterización espectral, se realizó el espectro de absorbancia UV desde 290 a 190 nm para la Alicina (figura V.7); (E) y (Z) Ajoeno (figuras V.8 y V.9 respectivamente) y 2-vinil-4H-1,3-ditiina (figura V.10).

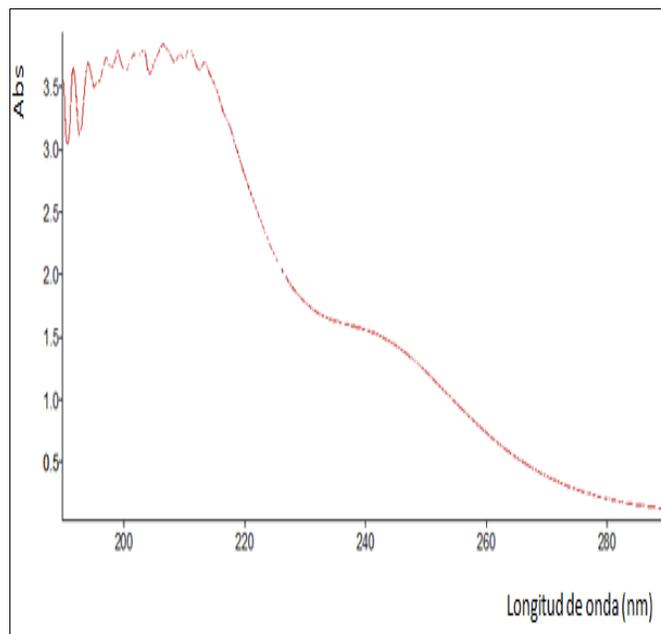


Figura V.7. Espectro de absorción UV de la solución de Alicina en agua. En coincidencia con lo citado por González y col., 2007, puede observarse un hombro característico a los 240nm.

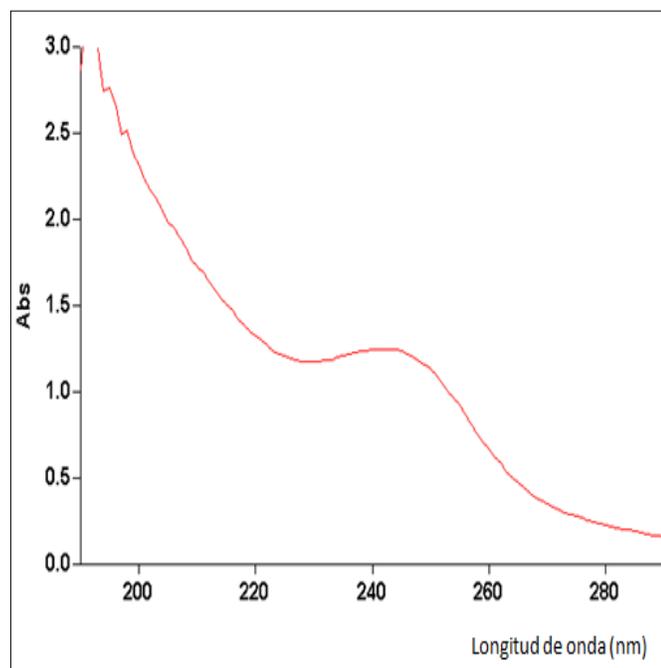


Figura V.8. Espectro de absorción UV de la solución en acetonitrilo de E- Ajoeno. En coincidencia con lo citado por Lawson y col. 1991, puede observarse un hombro característico a los 244nm.

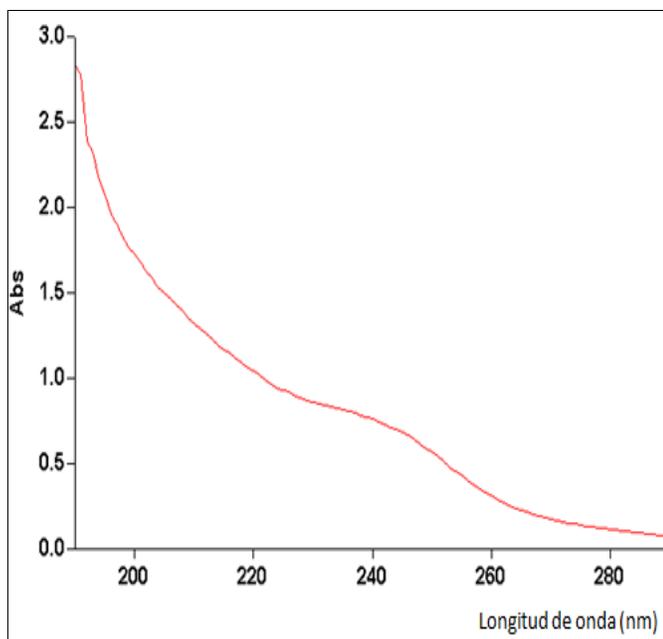


Figura V.9. Espectro de absorción UV de la solución en acetonitrilo de Z- Ajoeno. Puede observarse un hombro característico a los 235 nm, tal como fue informado por Lawson y col., 1991.

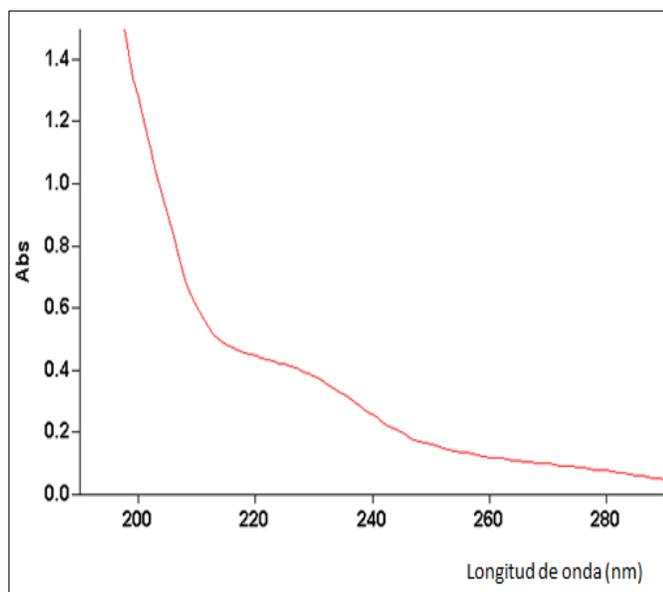


Figura V.10. Espectro de absorción UV de la solución de 2-vinil-4H-1,3-ditiina en fase móvil acetonitrilo:agua:metanol (50:41:9) (V/V). Puede observarse un hombro característico a los 220 nm, coincidiendo con los estudios de Iberl y col., 1990.

A partir del análisis de los datos obtenidos se puede concluir que el método analítico es específico, ya que no se observaron interferencias significativas en los cromatogramas resultantes y mediante el análisis por espectrofotometría UV pudo comprobarse que los espectros obtenidos corresponden a las estructuras químicas de los estándares bajo estudio

V.3.2. Determinación del rango lineal

V.3.2.1. Introducción

La linealidad de un método analítico se define como la capacidad de producir resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito presente en la muestra. Para medir esta capacidad es necesario determinar el rango lineal, es decir, el intervalo comprendido entre la concentración mínima y máxima de analito para el cual el método ha sido probado y dentro del cual se puede efectuar el dosaje por interpolación en una curva estándar. Para su determinación se prepara una serie de al menos cinco diluciones de un estándar. Estas soluciones se inyectan al menos por duplicado y se determina la curva de regresión $Y = aX + b$ sobre los puntos individuales sin promediar por el método de los mínimos cuadrados, y finalmente se grafica (Quatrochi y col., 1992).

V.3.2.2. Materiales y Métodos

V.3.2.2.1. Reactivos

- Acetonitrilo, J.T Baker grado HPLC
- Agua miliQ
- Ajoeno sintetizado según Soto y col., 2007
- Alicina sintetizada según González y col., 2007
- Dialil disulfuro (DADS) (Fluka, 80%).
- Dialil sulfuro (DAS) (Aldrich, 97%).
- Dialil trisulfuro
- Etil disulfuro (EDS) (Aldrich, 99%)
- Fenil sulfuro (FS) (Fluka, 95%)
- Metanol, J.T Baker grado HPLC.
- Vinilditiinas sintetizadas (metodología de síntesis y purificación, capítulo IV).

V.3.2.2.2. Material de laboratorio

- Jeringa de inyección de 100 μ L, HAMILTON.
- Matraces: capacidad 5 mL (4).
- Pipeta automática: 100-1000 μ L, Nichipet EX.
- Pipeta de doble aforo de 5 mL

V.3.2.2.3. Equipos

- Cromatógrafo líquido KINK-500-A series KONIK instruments Acoplado a un detector UV-Vis. Columna octadecilsilano (WATERS).

V.3.2.2.4. Metodología de trabajo

A partir de una mezcla de compuestos organoazufrados, se prepararon 4 diluciones cuyas concentraciones están comprendidas dentro del rango en el cual se desea trabajar. Para determinar la concentración de estas diluciones se aplicó la siguiente fórmula:

$$\boxed{C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2}$$

Donde: C_1 = concentración de la solución madre (ppm)
 V_1 = volumen tomado de la solución madre (mL)
 C_2 = concentración de la solución final (ppm)
 V_2 = volumen final de la solución a preparar (mL)

De esta manera, se inyectaron cinco niveles de concentraciones por triplicado, de las mezclas de Alicina, Ajoeno, 2-vinil-4H-1,3-ditiina, Dialil sulfuro, Etil disulfuro, Dialil disulfuro, Dialil trisulfuro y Fenil sulfuro, en las condiciones operaciones ya descritas. Las concentraciones de cada uno de los estándares junto con el área obtenida en cada inyección, son indicadas en la tabla V.5.

Tabla V.5. Áreas obtenidas para cada estándar en sus respectivas concentraciones en la mezcla de OSCs

Dilución	Alicina		Ajoeno		2-vinil-4H-1,3-dithiina		DAS	
	Área	Conc. (ppm)	Área	Conc. (ppm)	Área	Conc. (ppm)	Área	Conc. (ppm)
Dilución 0	164710	15,3	126850	14,15	57529	50,99	177016	155,52
	177527		135882		59355		185735	
	173972		147616		66195		205960	
Dilución 1	112077	10,2	92100	9,43	38995	33,99	129417	103,68
	110665		91977		36940		129279	
	116042		92432		36494		129583	
Dilución 2	72088	6,8	58800	6,29	26454	22,66	81701	69,12
	75487		58468		25601		81491	
	77872		68358		32551		87182	
Dilución 3	41630	3,825	33256	3,54	12790	12,75	45861	38,89
	38946		33460		11904		46879	
	38625		33450		11744		46175	
Dilución 4	19271	1,9125	17276	1,77	4065	6,375	22772	19,445
	19639		17546		3904		22784	
	19455		17411		3985		22778	
	EDS (E.I)*		DADS		DATS		FS (E.I)*	
Dilución	Área	Conc. (ppm)	Área	Conc. (ppm)	Área	Conc. (ppm)	Área	Conc. (ppm)
Dilución 0	191081	73,92	167034	69,56	51030	-	164699	4,1
	205988		176510		53908		171650	
	221935		189739		53430		172638	
Dilución 1	138904	49,28	123688	46,37	36945	-	119979	2,73
	146654		125472		-		-	
	138731		124602		35927		119618	
Dilución 2	87544	32,85	78631	30,92	23277	-	75419	1,82
	87478		78278		23147		75384	
	87662		79344		23284		75235	
Dilución 3	49126	18,48	47113	17,39	13004	-	40509	1,025
	49405		44797		12340		42720	
	49337		44329		12847		42402	
Dilución 4	23950	9,24	21169	8,695	-	-	21757	0,5125
	23323		22144		-		21826	
	23637		24157		-		21792	

*E.I: estándar interno

Una vez obtenidos los datos, se construyó la curva de regresión $y = ax + b$ sobre los puntos individuales sin promediar por el método de los mínimos cuadrados. En ordenadas se indica el área del pico (variable dependiente) mientras que en abscisas corresponde la concentración de cada estándar en ppm (variable independiente).

Se evaluaron los estimadores de regresión para un nivel de confianza de 95%, $\alpha = 0,05$:

- Coeficiente de regresión lineal (r): determina el grado de asociación entre las variables "x" e "y". $(r)^2 = R^2$.
- Coeficiente de determinación (R^2): juzga el grado de adecuación del modelo de regresión.
- Pendiente (a): se determina como parámetro indicativo de la sensibilidad del método o para evaluar la correlación de diferentes métodos.
- Ordenada al origen (b): se determina para evaluar la proporcionalidad de la función analítica, es decir, que la recta pase por el origen y que cualquier desviación pueda adjudicarse únicamente a un error aleatorio.

V.3.2.3. Resultados y discusión

A continuación se presenta la tabla V.6 donde se ponen de manifiesto los resultados obtenidos de las curvas de calibración de cada analito.

Tabla V. 6. Estimadores de regresión de cada analito

Analito	Ecuación de la recta	R^2
Alicina	$y = 10876x - 787,07$	0,9995
Ajoeno	$y = 9001,5x + 2321,5$	0,9957
2-vinil-4H-1,3-ditiina	$y = 1193,9x - 2303,1$	0,9966
Dialil sulfuro	$y = 1153,4x + 2161,9$	0,9946
Etil disulfuro	$y = 2625,6x + 1619,7$	0,9952
Dialil disulfuro	$y = 2402,9x + 4616,5$	0,9932
Fenil disulfuro	$y = 40851x + 1239,5$	0,9945

El análisis de los estimadores permite probar la linealidad del detector en el rango de concentración estudiado. Se puede interpretar que existe una fuerte asociación entre las variables área y concentración (ppm) para cada uno de los estándares. Teniendo en cuenta los límites de concentración empleados para cada estándar, existe la posibilidad de cuantificar e interpolar al trabajar con concentraciones inferiores a los mismos aplicando sus respectivas ecuaciones de la recta.

En la figura V.11 se muestran las curvas de calibración de todos los analitos. Una observación importante que surge de analizar dichas curvas, está relacionada con la sensibilidad al detector UV, acoplado al equipo HPLC para la detección de cada compuesto. En base a la misma y observando la pendiente de la curva (a) correspondiente a cada analito (tabla V.6), éstos podrían ser agrupados en 4 grupos considerando la similitud numérica de las pendientes, conformados por: Fenil sulfuro; Alicina y Ajoeno; Etil disulfuro y Dialil disulfuro; y por último Dialil sulfuro y 2-vinil-4H-1,3-ditiina.

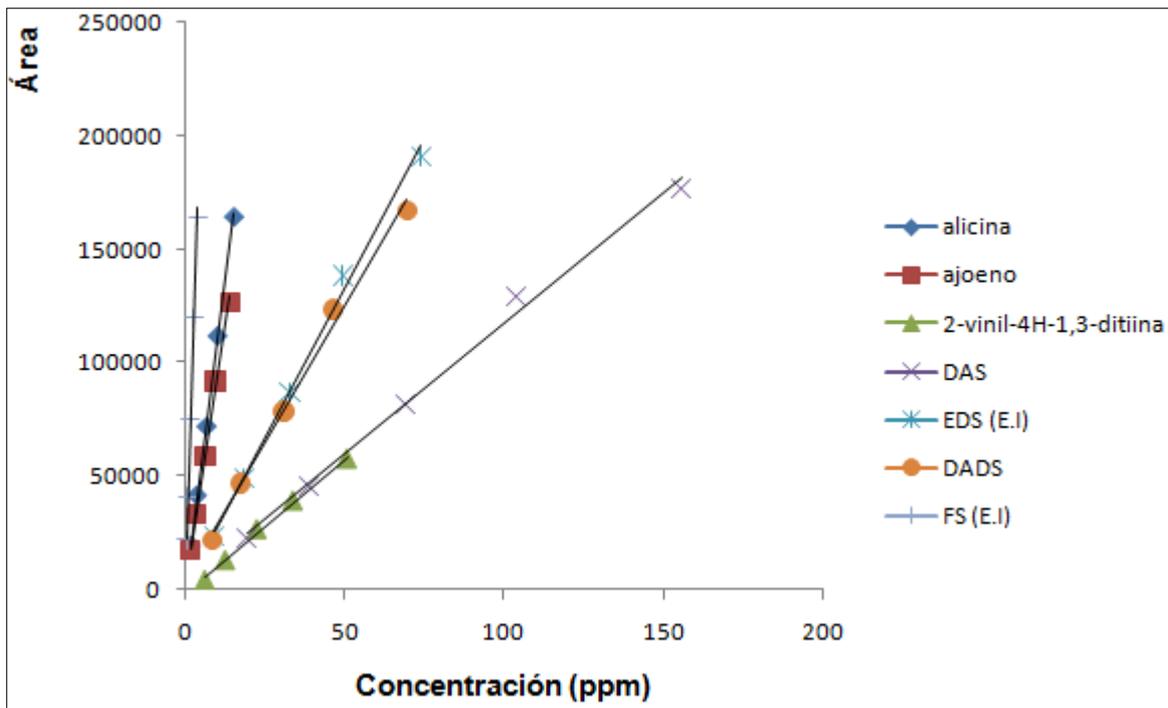


Figura V.11. Curvas de calibración de los compuestos organoazufrados

La sensibilidad al detector UV se halla influenciada principalmente por las características estructurales de las moléculas, especialmente relacionadas a la presencia de grupos cromóforos, como así también por las absorptividades molares o coeficientes de extinción “ ϵ ”. Así podría suponerse que aquellos compuestos que evidencian una sensibilidad similar al detector UV presentan características estructurales afines como por ejemplo mismo grupo funcional. En la figura V.12 se presentan agrupados los OSCs en base a su respuesta al detector y además se hallan señalados los grupos funcionales que posiblemente condicionen dichas respuestas. En primer lugar se encuentra Fenil sulfuro caracterizado por la presencia de un grupo aromático en su estructura; Alicina y Ajoeno tienen en común el grupo sulfóxido; Dialil disulfuro y Etil disulfuro coinciden con un enlace disulfuro; finalmente Dialil sulfuro y 2-vinil-4H-1,3-ditiina presentan en su estructura al menos un enlace monosulfuro.

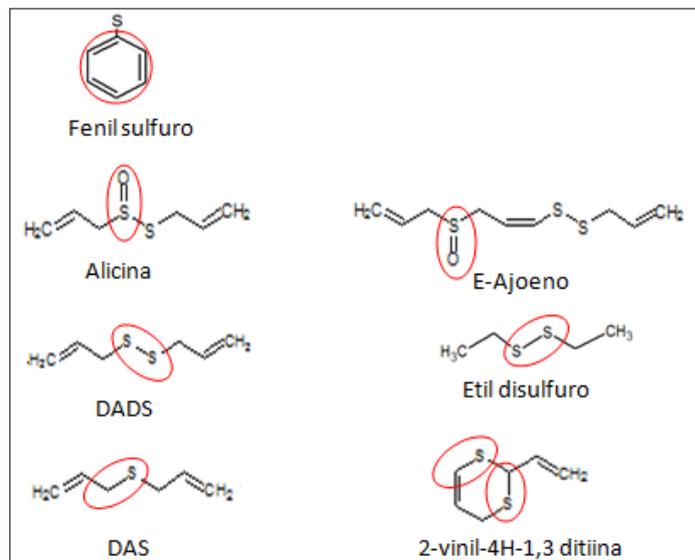


Figura V.12 Grupos funcionales afines de OSCs que determinan sensibilidad al detector UV.

Con respecto a las absorptividades molares (coeficiente de extinción), se sabe que a mayor magnitud de la misma, mayor es la sensibilidad al detector. Del estudio realizado por Iberl y col., 1990 se desprende lo siguiente (tabla V.7):

Tabla V.7. Coeficiente de extinción ϵ para OSCs.

Compuesto OSCs	Alicina	Ajoeno	2-vinil-4H-1,3-ditiina	Dialil disulfuro
Coeficiente de extinción ϵ (mL mg ⁻¹ cm ⁻¹)	2,85	4,71	3,53	0,72
Longitud de onda λ (nm)	254			
Solvente	Acetonitrilo:agua:metanol (50:41:9)(V/V)			

Fuente: Iberl y col., 1990

Coincidiendo con los resultados obtenidos, Alicina y Ajoeno presentan un coeficiente de extinción mayor al de Dialil disulfuro. Por el contrario el coeficiente para 2-vinil-4H-1,3-ditiina no coincide con lo observado en la figura V.11 en la que se evidencia que es el compuesto de menor sensibilidad al detector UV. Esto puede deberse a que los resultados del presente trabajo y los del paper de referencia fueron obtenidos bajo el empleo de diferentes condiciones instrumentales de medición.

V.3.3. Precisión de la técnica instrumental

V.3.3.1. Introducción

La precisión está relacionada con la dispersión de las medidas alrededor de su valor medio y corresponde al grado de concordancia entre los valores obtenidos de una serie repetida de ensayos efectuados sobre muestras homogéneas. Se expresa matemáticamente como la desviación estándar, " σ ", estimada analíticamente por "s" o más comúnmente como la desviación estándar relativa o coeficiente de variación (CV%).

Para evaluar la precisión de un sistema analítico, se determina la dispersión de al menos 6 inyecciones del estándar y se determina el coeficiente de variación porcentual (CV%) o desviación estándar relativa.

En la tabla V.8 puede observarse la relación del coeficiente de variación porcentual para una técnica analítica en función de los límites de aceptación y número de repeticiones.

Tabla V.8. Criterios de aceptación.

Límites de aceptación	Simple		Duplicado	
	CV% método	CV% sistema	CV% método	CV% sistema
98,5-101,5	0,6	0,4	0,8	0,6
97-103	1,2	0,8	1,6	1,2
95-105	1,9	1,4	2,7	1,9
93-107	2,7	2,7	3,8	2,7
90-110	3,9	2,8	5,5	3,9

Fuente: Quatrochi y col., 1992

Los estimadores que deben calcularse son los siguientes:

• Desviación estándar:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Donde:

- n= número de medidas
- x_i = valor medido en el ensayo i
- \bar{x} = valor promedio

- Desviación estándar relativa (%):

$$CV\% = \frac{S}{\bar{x}} \times 100$$

Donde:

- CV%= Coeficiente de variación porcentual o desviación estándar relativa.
- S= desviación estándar
- \bar{x} = valor promedio

V.3.3.2. Materiales y Métodos

V.3.3.2.1. Reactivos

- Acetonitrilo, J.T Baker grado HPLC
- Agua miliQ
- Ajoeno sintetizado según Soto y col., 2007
- Alicina sintetizada según González y col., 2007
- Dialil disulfuro (DADS) (Fluka, 80%).
- Dialil sulfuro (DAS) (Aldrich, 97%).
- Dialil trisulfuro (DATS)
- Etil disulfuro (EDS) (Aldrich, 99%)
- Fenil sulfuro (FS) (Fluka, 95%)
- Metanol, J.T Baker grado HPLC.
- Vinilditiinas sintetizadas (metodología de síntesis y purificación, capítulo IV).

V.3.3.2.2. Material de laboratorio

- Jeringa de inyección de 100 μ L, HAMILTON.

V.3.3.2.3. Equipos

- Cromatógrafo líquido KINK-500-A series KONIK instruments Acoplado a un detector UV-Vis. Columna octadecilsilano (WATERS).

V.3.3.2.4. Metodología de trabajo

Para determinar la precisión de la técnica instrumental, se realizaron 6 inyecciones de una mezcla de compuestos organoazufrados al equipo HPLC, cuyas condiciones operacionales fueron mencionadas en la tabla V.2. Las concentraciones de cada estándar en la mezcla de OSCs son mostradas en la tabla V.9.

Tabla V.9. Concentración de estándares en la mezcla de compuestos organoazufrados

Mezcla de OSCs	Concentración (ppm)
Alicina	6,8
Ajoeno	6,29
2-vinil-4H-1,3-ditiina	22,66
Dialil sulfuro	69,12
Etil sulfuro	32,85
Dialil disulfuro	30,92
Dialil trisulfuro	-
Fenil sulfuro	1,82

V.3.3.3. Resultados y discusión

Los resultados obtenidos del ensayo de precisión del sistema (n=6 inyecciones) de cada uno de los estándares se observan en la tabla V.10.

Tabla V.10. Resultado de las inyecciones de los estándares.

	Alicina	Ajoeno	2-vinil-4H-1,3 ditiina	DAS	EDS	DADS	DATS	FS
AREA 1	72088	58800	26454	81701	87544	78631	23277	75419
AREA 2	75487	58468	25601	81491	87478	78278	23147	75384
AREA 3	70523	58561	24096	78798	87034	75768	22717	75763
AREA 4	70860	58570	24124	79625	87173	77810	22600	75208
AREA 5	70727	58698	23798	80120	87103	77949	23024	75146
AREA 6	69404	58986	23345	79965	86657	78448	22540	75794
media	71489,04	58680,25	24545,93	80276,87	87164,34	77808,05	22882,46	75451,92
s	1940,62	172,99	1090,34	1019,47	294,60	956,48	279,91	249,19
cv%	2,71	0,29	4,44	1,27	0,34	1,23	1,22	0,33
conc. ppm	6,8	6,29	22,66	69,12	32,85	30,92	-	1,82

Para un límite de aceptación de 90-110% y de acuerdo a los valores de variación porcentual obtenidos, podría decirse que la técnica analítica es precisa excepto para 2-vinil-4H-1,3-ditiina para la cual el valor resultante fue mayor a 2,8.

V.3.4. Recuperación

V.3.4.1. Introducción

El porcentaje de recuperación de un analito presente en la muestra resulta de la diferencia entre el valor obtenido y el valor verdadero. Estadísticamente se efectúa un test "t" de Student para ver si el valor hallado y el verdadero no difieren significativamente. Esta diferencia debe ser tan pequeña como sea posible, es decir la recuperación del analito debe tender a alcanzar al 100%. Se calcula el estadígrafo t_{exp} y se compara con el t de tablas para n-1 grados de libertad y para un nivel de significancia $\alpha=0,05$.

Procedimiento para cálculo de recuperación

1° Cálculo de la concentración de la muestra:

$$\text{Concentración de la muestra} = \frac{\text{PM}}{\text{Volumen. (ACN)}}$$

Donde:

- PM: peso de la muestra de ajo para análisis (g)
- Volumen de acetónitrilo que se agrega (mL)

2° Cálculo de Factor Respuesta (FR):

$$\text{FR} = \frac{\text{Área}}{\text{Concentración}}$$

Donde:

- FR: Factor respuesta
- Área: área de la concentración inyectada
- Concentración: concentración inyectada

3° Cálculo de Factor respuesta medio ($\overline{\text{FR}}$):

$$\overline{\text{FR}} = \frac{\sum \text{FR}}{n}$$

Donde:

- $\overline{\text{FR}}$: Factor respuesta promedio
- FR: Factor respuesta de cada inyección
- n: número de inyecciones

4° Cálculo de la concentración de estándares en la muestra:

$$\text{Concentración de estándar (ppm)} = \frac{\text{AM}}{\text{Concentración Muestra} \times \overline{\text{FR}}}$$

Donde:

- AM: área del pico del estándar en el cromatograma de la muestra
- $\overline{\text{FR}}$: Factor respuesta promedio
- Concentración muestra: concentración de la muestra inyectada

5° Cálculo del porcentaje de recuperación (%R):

$$\text{R} = \frac{x_i}{x} \times 100$$

Donde:

- R: recuperación
- x_i : valor obtenido
- x: valor verdadero

6° Cálculo de t experimental para la prueba de "t" de Student:

$$t_{\text{exp}} = \frac{(|100 - \bar{R}|) \times \sqrt{n}}{\text{CV}\%}$$

Donde:

- t_{exp} = valor de t experimental
- \bar{R} = media de recuperaciones
- n = total de repeticiones
- CV%: coeficiente de variación porcentual o desviación estándar relativa

V.3.4.2. Materiales y Métodos

V.3.4.2.1. Reactivos

- Acetonitrilo, J.T Baker grado HPLC
- Agua miliQ
- Ajoeno sintetizado según Soto y col., 2007
- Alicina sintetizada según González y col., 2007
- Dialil disulfuro (DADS) (Fluka, 80%).
- Dialil sulfuro (DAS) (Aldrich, 97%).
- Dialil trisulfuro (DATS)
- Etil disulfuro (EDS) (Aldrich, 99%)
- Fenil sulfuro (FS) (Fluka, 95%)
- Metanol, J.T Baker grado HPLC.
- Vinilditiinas sintetizadas (metodología de síntesis y purificación, capítulo IV).

V.3.4.2.2. Material de laboratorio

- Filtros de membrana de 0,2 μm de diámetro de poro.
- Jeringa de inyección de 100 μL , HAMILTON.
- Pipeta automática: 100-1000 μL , Nichipet EX.
- Viales con tapa a rosca de 10 mL

V.3.4.2.3. Equipos

- Balanza analítica DENVER APX-200.
- Baño ultrasónico TESLAB tb04.
- Cromatógrafo líquido KINK-500-A series KONIK instruments Acoplado a un detector UV-Vis. Columna octadecilsilano (WATERS).
- Microondas, 440W, ATMA easy cook, modelo MR806.

V.3.4.2.4. Metodología de trabajo

Para evaluar la recuperación de la técnica analítica, se contaminó muestras libres de compuestos organoazufrados (OSCs) con 3 niveles de concentración de los mismos y 3 repeticiones de cada una.

Además se preparó una muestra libre de OSCs la cual se utilizó como blanco o testigo. Para la preparación de la muestra testigo es necesario la inactivación de la enzima alinasa. Trabajos anteriores realizados en el Laboratorio de Cromatografía para Agroalimentos (Natale, 2003) indican que el tiempo mínimo eficiente para inactivar dicha enzima por microondas es de 4 minutos cada 100g de ajo a 1000W. Al ensayar estos valores de tiempo y potencia se encontró que las muestras de ajo estaban sujetas a una gran deshidratación posiblemente a que la cantidad de muestra era menor. Por esta razón se decidió someter a la muestra de ajo (5 dientes pelados, aproximadamente 25g) a cocción al microondas durante 2 minutos a potencia media, evitando de esta manera la deshidratación de la muestra.

Una vez inactivada la enzima, los dientes de ajo se molieron con un prensador de ajo. Para cada una de las 4 muestras se pesó un gramo de ajo; una de ellas correspondiente a la muestra testigo y las otras 3 muestras se fueron contaminadas con 200 μL , 600 μL y 900 μL de la solución madre de OSCs.

A continuación, a todas las muestras, se les agregó 1 mL de acetonitrilo y se sonicaron durante 1 minuto para favorecer la extracción de los compuestos. Finalmente se filtraron con un filtro de 0,2 μm y se inyectaron por triplicado en el HPLC en las condiciones operacionales ya descritas.

V.3.4.3. Resultados y discusión

En la figura V.13 se muestra el cromatograma obtenido a partir de la inyección de la muestra testigo en la cual, al inactivar la enzima alinasa, no se observa a simple vista, la presencia de compuestos organoazufrados.

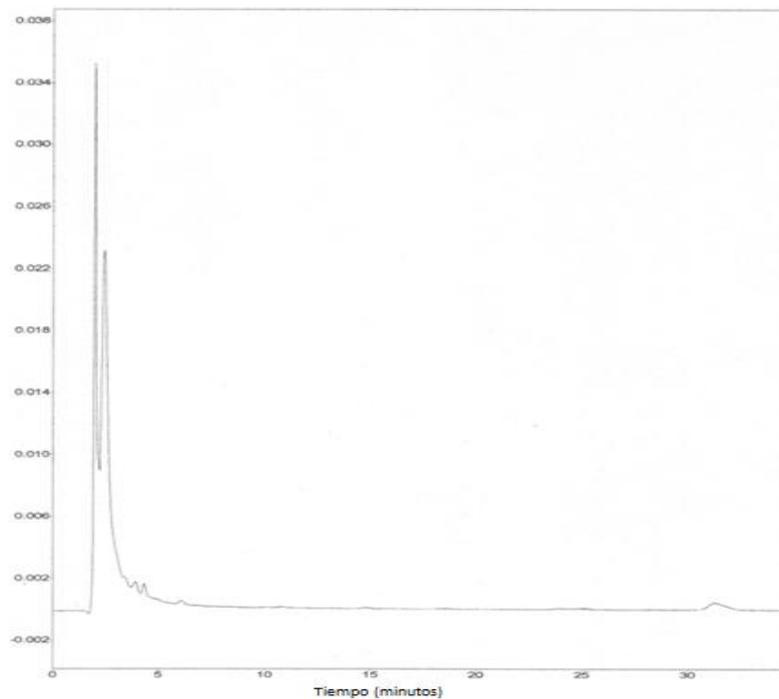


Figura V.13. Cromatograma de la muestra testigo. Condiciones cromatográficas especificadas en tabla V.2.

A continuación en la tabla V.11 se presentan los resultados conforme al porcentaje de recuperación luego de las adiciones realizadas de cada estándar en las muestras.

Tabla V. 11. Resultados del porcentaje de recuperación de cada analito.

Analito	Contaminación (ppm)	Resultado (ppm)	% Recuperación	\bar{R}	s	CV%	T _{exp}	T _{crit}
Alicina	2,35	1,985	84,47	102,80	7,47	7,26	1,16	
		2,454	104,43					
		2,443	103,95					
	7,65	8,226	107,53					
		7,986	104,39					
		8,503	111,16					
	11,475	12,095	105,40					
		11,652	101,54					
		12,011	104,67					
Ajoeno	2,18	1,989	91,22	102,93	5,40	5,25	1,67	
		2,162	99,16					
		2,234	102,47					
	7,07	7,588	107,33					
		7,607	107,60					
		7,646	108,15					
	10,61	11,126	104,87					
		10,740	101,22					
		11,197	105,53					
2-vinil-4H-1,3-ditiina	7,84	7,653	97,62	102,94	5,30	5,15	1,71	2,306
		7,653	97,62					
		7,653	97,62					
	25,49	26,684	104,68					
		28,379	111,33					
		27,290	107,06					
	38,24	41,132	107,56					
		37,626	98,39					
		40,404	105,66					
DAS	23,93	21,871	91,40	102,87	6,51	6,33	1,36	
		25,840	107,98					
		22,367	93,47					
	77,76	84,726	108,96					
		83,693	107,63					
		82,808	106,49					
	116,64	120,358	103,19					
		118,200	101,34					
		124,910	107,09					
DADS	10,7	9,347	87,36	101,26	8,96	8,85	0,43	
		9,809	91,67					
		10,785	100,80					
	34,78	37,526	107,89					
		37,484	107,77					
		37,358	107,41					
	52,17	52,073	99,81					
		50,189	96,20					
		60,307	115,60					

Analito	Contaminación (ppm)	Resultado (ppm)	% Recuperación	\bar{R}	s	CV%	T _{exp}	T _{crit}
ES	0,63	0,437	69,36	94,14	15,87	16,86	1,11	2,306
		0,476	75,51					
		0,499	79,25					
	2,05	2,213	107,93					
		2,203	107,46					
		2,208	107,69					
	3,075	3,232	105,11					
		3,110	101,15					
		3,240	105,36					
EDS	11,37	8,810	77,49	97,89	12,28	12,55	0,52	2,306
		11,067	97,34					
		8,893	78,21					
	36,96	40,358	109,19					
		39,909	107,98					
		39,143	105,91					
	55,44	58,000	104,62					
		56,449	101,82					
		58,310	105,18					

En base a los resultados obtenidos puede indicarse que el porcentaje de recuperación de los analitos bajo estudio osciló entre 94 -102% aproximadamente.

El valor de t crítico obtenido de tabla fue de 2,306 para $v=8$; $\alpha=0,05$. Los valores de t experimental se encontraron en todos los casos por debajo del valor de t crítico por lo que se puede concluir que no existe diferencia significativa entre la recuperación media y el 100% de recuperación.

V.3.5. Sensibilidad

V.3.5.1. Introducción

La sensibilidad de un método analítico corresponde a la mínima cantidad de analito que puede producir un resultado significativo. Los parámetros a definir al evaluar sensibilidad de un método son:

- **Límite de detección (LOD):** es la menor concentración de analito en una muestra que puede ser detectado, pero no necesariamente cuantificado, en las condiciones experimentales establecidas. Se expresa en unidades de concentración (% , ppm, ppb, etc).
- **Límite de cuantificación (LOQ):** es la menor concentración de analito en una muestra que puede ser determinada cuantitativamente con una adecuada precisión y exactitud bajo las condiciones experimentales establecidas. Se expresa en unidades de concentración (Quatrochi y col., 1992).

Si bien existen diferentes metodologías para calcular los límites de detección y cuantificación, la más utilizada es la siguiente:

- $LOD = 3S$
- $LOQ = 10S$

Siendo S = desviación estándar de un blanco o de una muestra fortificada a baja concentración

V.3.5.2. Materiales y Métodos

V.3.5.2.1. Reactivos

- Acetonitrilo, J.T Baker grado HPLC.
- Agua miliQ.
- Ajoeno sintetizado según Soto y col., 2007.
- Alicina sintetizada según González y col., 2007.
- Dialil disulfuro (DADS) (Fluka, 80%).
- Dialil sulfuro (DAS) (Aldrich, 97%).
- Dialil trisulfuro (DATS) (LKT laboratorios, Inc., 98,1%).
- Etil disulfuro (EDS) (Aldrich, 99%).
- Fenil sulfuro (FS) (Fluka, 95%) .
- Metanol, J.T Baker grado HPLC.
- Vinilditiinas sintetizadas (metodología de síntesis y purificación, capítulo IV).

V.3.5.2.2. Material de laboratorio

- Filtros de membrana de 0,2 μm
- Jeringa de inyección de 100 μL , HAMILTON.
- Pipeta automática: 100-1000 μL , Nichipet EX.
- Viales con tapa a rosca de 10 mL

V.3.5.2.3. Equipos

- Baño ultrasónico TESLAB tb04.
- Cromatógrafo líquido KINK-500-A series KONIK instruments Acoplado a un detector UV-Vis. Columna octadecilsilano (WATERS).
- Microondas, 440W, ATMA easy cook, modelo MR806.

V.3.5.2.4. Metodología de trabajo

La determinación de los límites de detección y cuantificación se realizó con una muestra de ajo libre de OSCs la cual fue fortificada con una mezcla de estos estándares en baja concentración. Para la preparación de la muestra, se peló un diente de ajo y se cocinó en microondas durante 2 minutos a potencia media. Luego el ajo fue picado con un prensador de ajo y se pesó un gramo del mismo. A continuación se fortificó con 200 μL de una mezcla de OSCs y se extrajo según la metodología optimizada en el capítulo III. Una vez filtrada con un filtro de 0,2 μm , la muestra fue inyectada por triplicado en el HPLC.

Una vez obtenidos los datos de área para cada compuesto organoazufrado y calculado la desviación estándar de los mismos, se multiplica dicha desviación estándar por 3 y por 10 para la determinación de los límites de detección y cuantificación respectivamente. Estos nuevos valores de área son reemplazados en la ecuación de la recta resultante de la determinación del rango lineal de cada analito, y de esta forma se obtiene el valor de concentración de cada estándar conforme a dichos límites.

V.3.5.3. Resultados y discusión

En la tabla V.12 se muestran los límites de detección y cuantificación correspondientes a cada compuesto.

Tabla V.12. Límite de detección y cuantificación para OSCs.

Analito	Área	Conc. (ppm)	Desviación estándar (S)	LOD (3S)	LOQ (10S)	Ecuación recta	LOD (ppm)	LOQ (ppm)	ϵ^*
Alicina	39453	2,35	4755	14264	47547	$y = 10876,41x - 787,07$	1,38	4,44	2,85
	47787								
	47586								
Ajoeno	13852	2,18	791	2374	7915	$y = 9001,5x + 2321,5$	0,01	0,62	4,71
	14939								
	15392								
2 vinil-4H-1,3 ditiina	3532	7,84	489	1467	4891	$y = 1193,93x - 2.303,15$	3,16	6,03	3,53
	4303								
	4439								
DAS	16779	23,93	1496	4487	14957	$y = 1153,37x + 2.161,91$	2,02	11,09	-
	19524								
	17122								
EDS	17869	11,37	2299	6897	22990	$y = 2625,60x + 1.619,73$	2,01	8,14	-
	21923								
	18017								
DADS	21934	10,7	1546	4638	15460	$y = 2402,94x + 4.616,52$	0,01	4,51	0,72
	22906								
	24962								
FS	12526	0,63	788	2365	7882	$y = 40850,6x + 1239,5$	0,03	0,16	-
	13497								
	14087								

*Valores de coeficiente de extinción (ϵ) medidos en fase móvil: acetonitrilo:agua:metanol (50:41:9)(V/V) a 254 nm extraídos de Iberl y col., 1990.

En consideración a la sensibilidad del método, los límites de detección y de cuantificación obtenidos oscilaron entre 0,01-3,16 ppm y 0,05-11,09 ppm respectivamente.

La correspondencia que existe entre el coeficiente de extinción con los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) es que a mayor coeficiente de extinción mayor es la sensibilidad al detector, por lo que debería esperarse que estos límites sean menores. Al observar los valores obtenidos de coeficientes de extinción para cada OSCs, se encuentra que este concepto puede aplicarse a lo obtenido para Ajoeno.

V.3.6. Aplicación de la técnica validada para la determinación de compuestos organoazufrados en muestras problema

V.3.6.1 Materiales y Métodos

V.3.6.1.1. Muestras

Se analizaron 3 cultivares de ajo pertenecientes a INTA La Consulta, las cuales correspondieron a:

- Gostoso
- Gran Fuego
- Perla

V.3.6.1.2. Reactivos

- Acetonitrilo, J.T Baker grado HPLC
- Agua miliQ.
- Metanol, J.T Baker grado HPLC.

V.3.6.1.3. Material de laboratorio

- Filtros de membrana de 0,45 μm ; 0,2 μm
- Jeringa de inyección de 100 μL , HAMILTON.
- Pipeta automática: 100-1000 μL , Nichipet EX.
- Viales con tapa a rosca de 10 mL

V.3.6.1.4. Equipos

- Balanza analítica DENVER APX-200.
- Cromatógrafo líquido KINK-500-A series KONIK instruments Acoplado a un detector UV-Vis. Columna octadecilsilano (WATERS).
- Microondas, 800W, ATMA easy cook, modelo MR806.

V.3.6.1.5. Metodología de trabajo

Cada cultivar se trabajó por triplicado. Para ello, se pelaron y picaron 2 dientes de ajo de cada uno y se los dejó reposar durante 15 minutos de manera de favorecer la formación de Alicina. Para cada muestra se pesó 1 gramo de ajo y se cocinó en viales sellados con cinta de teflón en microondas a máxima potencia durante 40 segundos. Se dejó atemperar durante 5 minutos. Se llevó a cabo la extracción de muestras según el método optimizado en el capítulo III. Finalmente se filtraron con un filtro de 0,2 μm y se inyectaron por duplicado en el HPLC en las condiciones operacionales ya descriptas.

V.3.6.2. Resultados y discusión

La cantidad de cada uno de los compuestos organoazufrados en las 3 cultivares de ajo se muestra en la tabla V.13. Para la cuantificación de cada analito fue necesario realizar diluciones de las muestras a fin de obtener valores de áreas que se encontraran dentro del rango lineal probado para cada estándar para realizar la curva de calibración. Los resultados referidos a las áreas de cada analito fueron analizados estadísticamente con el uso del software Infostat a través de la prueba de diferencia honestamente significativa de Tukey para la comparación de medias.

Tabla V.13. Concentración de compuestos organoazufrados (mg/g) en 3 cultivares de ajo.

OSCs	Concentración (mg/g)*		
	Gostoso	Gran Fuego	Perla
Alicina	0,46 \pm 0,05 ^b	0,35 \pm 0,07 ^a	0,26 \pm 0,06 ^a
Ajoeno	0,03 \pm 0,001 ^a	0,03 \pm 0,01 ^a	0,02 \pm 0,007 ^a
DAS	0,02 \pm 0,002 ^a	0,04 \pm 0,02 ^a	Trazas
DADS	0,07 \pm 0,01 ^a	0,06 \pm 0,03 ^a	0,07 \pm 0,04 ^a
DATS	1,49 \pm 0,14 ^a	1,18 \pm 0,41 ^a	1,10 \pm 0,48 ^a

*Valores expresados como concentración promedio \pm desviación estándar para cada OSCs entre las cultivares de ajo. Valores asignados con la misma letra no son significativamente diferentes según la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

En coincidencia con lo citado por Burba 2002, donde se clasifica a las cultivares de ajo conforme a la concentración de Alicina, ésta se halla en mayor concentración en Gostoso en comparación con Perla. Sin embargo las cantidades encontradas son mucho menores a las citadas por Burba, 2002, ya que en este caso se trata de ajo cocido por microondas, acción que provoca la transformación de Alicina en los demás compuestos organoazufrados indicados en dicha tabla.

Cabe destacar que Dialil sulfuro en la cultivar Perla pudo ser detectado pero no cuantificado ya que los valores de áreas de los picos del cromatograma fueron menores a los hallados para realizar la curva de calibración necesaria para la cuantificación del estándar.

A partir de los resultados obtenidos estadísticamente presentados en el ANEXO (pág 105-106) pudo concluirse que con un nivel de significancia de 0,05 la concentración de Alicina no difiere significativamente en las cultivares Perla y Gran Fuego. Para el caso de Dialil sulfuro, se encontró que existe diferencia significativa entre la cultivar Gostoso y Gran Fuego. Finalmente, el contenido de Ajoeno no difiere significativamente para ningún cultivar.

V.4. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos puede concluirse que se logró una validación satisfactoria mediante la determinación de los diferentes parámetros establecidos. Además fue posible aplicar la técnica validada para la cuantificación de los compuestos organoazufrados en muestras reales. De esta manera se considera que el método analítico desarrollado para la determinación y cuantificación de compuestos organoazufrados, presentes en *Allium* sp., mediante cromatografía líquida de alta performance, es confiable.

Capítulo VI

CONCLUSIONES GENERALES

En vista de los resultados obtenidos y en correspondencia con los objetivos planteados para el presente trabajo de tesis, podemos concluir:

- Los resultados del diseño experimental realizado con la finalidad de estudiar la estabilidad físico-química de los compuestos organoazufrados bajo diversas condiciones experimentales, evidenciaron respuestas diferentes para cada analito. En el caso de Alicina se concluyó que el factor temperatura resultó ser el crítico. Para Dialil sulfuro y Dialil trisulfuro el factor significativo resultó ser el solvente. También se evidenciaron interacciones entre los factores tiempo y temperatura para estos analitos incluyendo a Dialil disulfuro.
- De los resultados obtenidos tras los diseños experimentales desarrollados para la optimización de la etapa de preparación de muestras mediante la técnica de extracción sólido-líquido de compuestos organoazufrados en ajo cocido, se puede concluir que empleando menores volúmenes de acetonitrilo se obtuvieron mejores recuperaciones de los analitos. En cuanto al empleo de ultrasonido se puede decir que si bien no contribuyó significativamente a la extracción de los analitos, su empleo permitió un sutil incremento en la extracción de los compuestos organoazufrados.
- Se logró resolver la incógnita planteada en el capítulo II, relacionada a la formación de compuestos desconocidos, tras someter los analitos a las diversas condiciones experimentales. Se lograron sintetizar los compuestos sospechosos y de esta manera se confirmó que se trataba de Ajoenos y Vinilditiinas.
- Se consiguió la síntesis de las Vinilditiinas, los resultados fueron muy satisfactorios ya que pudieron obtenerse ambos isómeros. Se pudo adecuar un protocolo a tal fin, mediante la incorporación de modificaciones a una técnica reportada previamente. La confirmación de la identidad de los compuestos sintetizados se realizó mediante purificación de fracciones colectadas del HPLC y posterior confirmación estructural por CG-MS. Este logro fue de gran importancia puesto que las Vinilditiinas son compuestos de interés funcional, presentes en numerosas preparaciones a base de ajo y su estándar analítico no se comercializa.
- Los resultados obtenidos en relación a la estabilidad físico-química de los compuestos organoazufrados, la optimización de su extracción previo análisis mediante HPLC y la síntesis de compuestos de interés funcional como Ajoenos y Vinilditiinas, constituyeron la información necesaria para el desarrollo de un método analítico confiable para la determinación de los analitos mencionados. Se obtuvo una herramienta analítica que fue validada realizando los ensayos tendientes a obtener las figuras de mérito analítico. Del estudio de especificidad del método, se puede decir que los resultados obtenidos fueron los deseados puesto que no se observaron interferencias significativas en los cromatogramas resultantes, luego de la comprobación mediante espectrofotometría UV, de cada uno de los picos de los analitos de interés, colectados. Se obtuvieron curvas de calibración para cada estándar en las cuales se pudo observar una fuerte asociación lineal entre las variables área y concentración. Esto hace posible cuantificar e interpolar al trabajar con concentraciones dentro del rango dinámico lineal obtenido para cada estándar. Del análisis de la comparación de las curvas de calibración para cada compuesto, fue posible hallar una asociación entre las pendientes de cada una y las estructuras químicas lo que permitió comprender las causas de la sensibilidad diferencial al detector UV de cada OSCs. Los resultados obtenidos del estudio de recuperación y precisión fueron satisfactorios encontrándose dentro de los valores establecidos por Quattrochi, 1992. Se obtuvieron límites de detección y cuantificación de los estándares analizados de mayor ocurrencia conforme lo indica la bibliografía.

En términos generales se obtuvo una herramienta analítica confiable y validada para la determinación de: Alicina, Ajoeno, Vinilditiinas, Dialil sulfuro, Dialil disulfuro y Dialil trisulfuro en muestras de ajo cocido. La cual pudo ser empleada para la cuantificación de los analitos mencionados en muestras de distintas cultivares de ajo cocido al microondas.

- Los ensayos propuestos permitieron cumplir con los objetivos iniciales y corroborar la hipótesis planteada: *“El conocimiento de la influencia de diversas variables sobre la estabilidad de los compuestos organoazufrados permitirá optimizar las condiciones experimentales para el desarrollo de las diversas metodologías analíticas”*.

Capítulo VII
BIBLIOGRAFÍA

- ÁLVAREZ, P. 2009. Requerimientos sobre validación de métodos en el marco de la acreditación de laboratorios según la Norma ISO 17025. Seminario Internacional: Validación de Métodos, Control de Calidad y estimación de la incertidumbre de medición aplicable al análisis multiresiduos de pesticidas. Instituto Nacional de Tecnología Industrial, Buenos Aires, Argentina.
- AMAGASE, H.; PETESCH, B.; MATSUURA, H.; KASUGA, S.; ITAKURA, Y. 2001. Intake of garlic and its bioactive components. *The Journal of Nutrition*, Vol. 131, p 955-962.
- AMAGASE, H. 2006. Clarifying the Real Bioactive Constituents of Garlic. *The Journal of Nutrition*, Vol. 136, p 716-725.
- AUGUSTI, T. 1990. Therapeutic and medicinal values of onions and garlic. En: *Onions and Allied crop Vol III*. Ed. Breswter, J.; Rabinowich, H. Ed. CRC. Press, Inc. Boca Raton, Florida. p 93-108.
- AZUOLA, R.; VARGAS, P. 2007. Extracción de sustancias asistida por ultrasonido. *Tecnología en Marcha*. Vol. 20-4, p 30-40.
- BANERJEE, S. K.; MAULIK, S.K. 2002. Effect of garlic on cardiovascular disorders: a review. *Nutrition Journal*, Vol.1, p 1-14.
- BENKEBLIA, N.; LANZOTTI, V. 2007. Allium Thiosulfinates: Chemistry, Biological Properties and their Potential Utilization in Food Preservation. *Food*, Vol. 1, No. 2, p 193-201.
- BONAFINE, O.; CAÑIZARES, A.; LAVERDE, D. 2006. Importancia de los fitoquímicos en la alimentación. *Nutrición humana*, p 8-12.
- BOREK, C. 2001. Antioxidant Health Effects of Aged Garlic Extract. *The Journal of Nutrition*, Vol. 131, p 1010-1015.
- BLOCK, E.; NAGANATHAN, S.; PUTMAN, D.; ZHAO, S. 1992. *Allium* Chemistry: HPLC Analysis of Thiosulfinates from Onion, Garlic, Wild Garlic (Ramsoms), Leek, Scallion, Shallot, Elephant (Great-Headed) Garlic, Chive, and Chinese Chive. Uniquely High Allyl to Methyl Ratios in Some Garlic Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 40, No 12, p 2418-2430.
- BLOCK, E. 1993. Flavor artifacts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 41, p 692.
- BLOCK, E. 2010. *Garlic and other Alliums: The Lore and the Science*. Ed. Royal Society of Chemistry Publishing. Cambridge, UK.
- BURBA, J.L. 2002. Comercio Mundial del ajo. Perspectivas desde la Argentina. INTA, Estación Experimental Agropecuaria La Consulta. (Proyecto/ Ajo INTA). Documento 066. 13 p.
- BREWSTER, J.1994. Onions and other Vegetable *Alliums*. The Biochemistry and Food Science characterization and their determination by HPLC. *Planta Med*. Vol. 56, p 02-211.
- BRODNITZ, M.; PASCALE, J.; DERSLICE, V. 1971. Flavor components of garlic extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol.19, No 2, p 273-275.
- CHEN, Z. Y.; PENG, C.; JIAO, R.; WONG, Y. M., YANG, N., HUANG, Y. 2009. Anti-hypertensive Nutraceuticals and Functional Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 57, No.11,p 4485-4499.
- CORZO-MARTÍNEZ, M.; NIEVES, C.; VILLAMIEL, M. 2007. Biological properties of onions and garlic. *Trends in Food Science and Technology*, Vol. 18, p 609-625.

DRAGO SERRANO, M.E.; LÓPEZ, M.; SAINZ ESPUÑES, T. 2006. Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas.*, Vol. 37, No. 4, p-58-68.

DUSICA, I.; VESNA, N.; MIHAJLO, S.; LJUBISA, N.; LJILJANA, S.; IVANA, M.; ANDRIJA, S. 2012. Transformation of synthetic allicin: the influence of ultrasound, microwaves, different solvents and temperatures, and the products isolation. *The Scientific World Journal*, p 1-7.

FUJISAWA, H; SUMA, K; ORIGUCHI, K; KUMAGAI, H; SEKI, T; ARIGA, T. 2008. Biological and chemical stability of garlic-derived allicin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 56, No. 11, p 4229-4235.

GARCIA GOMEZ, L. J.; SANCHEZ-MUNIZ, F. J. 2000. Revisión: Efectos cardiovasculares del ajo (*Allium sativum*). *ALAN*, Vol. 50, No.3, p.219-229.

GÓMEZ, N. 2008. Cinéticas de ácido pirúvico durante el proceso de secado constante y variable de ajo. Instituto Politécnico Nacional. Centro interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca. Juárez, México. 93 p.

GONZÁLEZ, R.; CAMARGO, A.; BURBA, J. 2007. Obtención de un estándar secundario de cuantificación para la síntesis y purificación de allicina. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*, Vol. 39, No. 2, p 61-70.

GUTIÉRREZ PULIDO, H.; DE LA VARA SALAZAR, R. 2008. Análisis y diseño de experimentos. Segunda Edición. Ed. McGraw-Hill Interamericana, México.

IBERL, B.; Georg, W.; Knobloch, K. 1990. Products of Allicin transformation: Ajoene and Dithiins, Characterization and their Determination by HPLC. En: *Planta Med.*, Vol. 56, p 202-211.

ICHIKAWA, M.; IDE, N.; ONO, K. 2006. Changes in Organosulfur Compounds in Garlic Cloves during Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 54, No. 13, 4849-4854.

JANSEN, H.; MÜLLER, B.; KNOBLOCH, K. 1987. Allicin Characterization and its Determination by HPLC. *Planta Med.*, Vol. 53, p 559-562.

KAMEL, A.; SALEH, M. 2000. Recent studies on the chemistry and biological activity of the organosulfur compounds of garlic (*Allium sativum*). *Studies in Natural Products Chemistry*, Vol. 23, p 455-485.

KENKEL, J. 2003. Analytical Chemistry for Technicians. Gas chromatography. Ed. CRC. Press, LLC. Boca raton, Florida, p 557.

KIMBARIS, A.; SIATIS, N.; DAFERERA, D.; TARANTILIS, P.; PAPPAS, C.; POLISSIOU, M. 2006. Comparison of distillation and ultrasound-assisted extraction methods for the isolation of sensitive aroma compounds from garlic (*Allium sativum*). *Ultrasonics Sonochemistry*, Vol. 13, p 54-60.

LANCASTER, J.; BOLAND, M. 1990. Flavor biochemistry. En: *Onions and Allied crop Vol III*. Ed. Breswter, J.; Rabinowich, H. Ed. CRC. Press, Inc. Boca Raton, Florida, p 33-72.

LAWSON, L; WANG, Z; HUGHES, B. 1991. Identification and HPLC quantitation of the sulfides and dialk(en)yl thiosulfinates in commercial garlic products. *Planta Med.*, Vol. 57, p 363-370.

LAWSON, L.; WOOD; S.; HUGHES, B. 1991. HPLC Analysis of Allicin and other thiosulfinates in garlic clove homogenates. *Planta Med.* Vol. 57, p. 263-270.

- LAWSON, L. 1993. Bioactive organosulfur compounds of garlic and garlic products: role in reducing blood lipids. In: human medicinal agents from plants. American Chemical Society, Washington, D.C., p. 303-330.
- LAWSON, L.; WANG, Z. J. 2005. Allicin and Allicin-Derived Garlic Compounds Increase Breath Acetone through Allyl Methyl Sulfide: Use in Measuring Allicin Bioavailability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 53, No. 6, p 1974-1983.
- LEDEZMA, E.; APITZ-CASTRO, R. 2006. Ajoene, el principal compuesto activo derivado del ajo (*Allium sativum*), un nuevo agente antifúngico. *Iberoamericana de Micología*, Vol. 23, p 75-80.
- LOCATELLI, D.; ALTAMIRANO, J.; GONZÁLEZ, R., CAMARGO, A. 2010. Desarrollo de una metodología analítica para la cuantificación de compuestos organoazufrados (OSCs) volátiles en ajo. XXXIII Reunión del capítulo argentino de la sociedad latinoamericana de nutrición (caslan). II Jornadas internacionales de actualización en nutrición y tecnología de alimentos. Córdoba, Argentina.
- LOCATELLI, D.; GÓNZALEZ, R.; FUSARI, C.; LUCERO, A.; ALTAMIRANO, J.; CAMARGO, A. 2011. "Transformaciones en la composición de principios bioactivos en ajo sometido a cocción al vapor". Presentado en Congreso argentino de Ciencias Y Tecnología de alimentos. Desarrollado del 19 al 21 de octubre. Modalidad de presentación: póster. Buenos Aires, Argentina.
- MILLER, J. N.; MILLER, J. C. 2002. Estadística y quimiometría para química analítica, 4º edición. Ed. Pearson Educación. S.A., Madrid, España.
- NATALE, P. 2003. Variabilidad de pungencia en distintas cultivares de ajo (*Allium sativum*). Tesis de grado de Licenciatura en Bromatología. Facultad de Ciencias Agrarias, UNCuyo.
- NAZNIN, M. T.; AKAGAWA, M.; OKUKAWA, K. MAEDA, T., MORITA, N. 2008 Characterization of E- and Z-ajoene obtained from different varieties of garlcs. *Food Chemistry*, Vol. 106, p 1113–1119.
- PEÑALVER HERNANDO, A. 2002. Aplicación de la microextracción en Fase sólida al análisis medioambiental. Universitat Rovira I Virgili, Tarragona, España.
- QUATROCHI, Oscar; ABELAIRA, Sara; LABA, Raúl. 1992. "Introducción a la HPLC" p 301-328.
- RAHMAN, K. 2003. Garlic and aging: new insigths into an old remedy. *Ageing Research Reviews*, Vol. 2, p.39-56.
- RYBAK, M.; CALVEY, E.; HARNLY, J. 2004. Quantitative Determination of Allicin in Garlic: Supercritical Fluid Extraction and Standard Addition of Alliin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 52, No. 4, p 682-687.
- RIVLIN, R. 2001. Historical perspective on the use of garlic. *The journal of nutrition*, Vol. 131, p 951-954.
- ROMDHANE, M.; GOURDON, C. 2002. Investigation in solid–liquid extraction: influence of ultrasound. *Chemical Engineering Journal*. Vol. 87, p 11–19.
- ROUSELF, R. 2002. Analytical Methods to Determine Volatile Sulfur Compounds in Foods and Beverages. American Chemical Society, p 1-24.
- RUI HAI LIU. 2003. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *American Journal of Clinical Nutrition*, Vol. 78, p 517S–520.
- SENDI, A. 1995. *Allium sativum* and *Allium ursinum*: Part 1. Chemistry, analysis, history, botany. *Phytomedicine*, Vol. 4, p 323-339.

SKOOG, D.; HOLLER, J.; NIEMAN, T. 2001. Principios de análisis instrumental. Quinta Edición. Ed. Concepción Fernández Madrid, España. 1024 p.

SMALL, L.; BAILEY, J.; CAVALLITO, C. 1947. Alkyl thiosulfinates. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 69, p 1710-1713.

SOTO, V.; CAMARGO, A.; GONZÁLEZ, R.; GALMARINI, C. 2007. Síntesis y purificación de Ajoeno y su cuantificación en aceites comerciales de ajo". *Rev. FCA UNCuyo*, Vol. 39, No. 1, p 93-100.

VERMA, S. K.; JAIN V.; VERMA D. 2008. Garlic "the spice of life": composition, cooking chemistry and preparations. *Journal of Herbal Medicine and Toxicology*, Vol. 2, No. 2, p 21-28.

YU, T.; WU, C. 1989a. Stability of allicin in garlic juice. *Journal of Food Science*, Vol. 54, No. 4, p 977-981.

YU, T.; WU, C.; CHEN, S. 1989. Effects of pH adjustment and heat treatment on the stability and formation of volatile compounds of garlic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 37, No. 3, p 730-734.

YU, T.; WU, C. and HO, C. 1993. Volatile compounds of deep-fried, microwave-heated, and oven-baked garlic slices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 41, No. 5, p 800-805.

WANG, J.; CAO, Y.; SUN, B.; WANG, C.; MO, Y. 2011. Effect of ultrasound on the activity of alliinase from fresh garlic. *Ultrasonics Sonochemistry*, Vol. 18, p 534-540.

ANEXO

Tabla. Distribución del estadígrafo F.

$1 - \alpha = 0.95$
 $1 - \alpha = P(F \leq f_{\alpha, v_1, v_2})$

v_1 = grados de libertad del numerador
 v_2 = grados de libertad del denominador

$v_2 \backslash v_1$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	161.446	199.499	215.707	224.583	230.160	233.988	236.767	238.884	240.543	241.882	242.981	243.905	244.690	245.363	245.949	246.466	246.917	247.324	247.688	248.016
2	18.513	19.000	19.164	19.247	19.296	19.329	19.353	19.371	19.385	19.396	19.405	19.412	19.419	19.424	19.429	19.433	19.437	19.440	19.443	19.446
3	10.128	9.552	9.277	9.117	9.013	8.941	8.887	8.845	8.812	8.785	8.763	8.745	8.729	8.715	8.703	8.692	8.683	8.675	8.667	8.660
4	7.709	6.944	6.591	6.388	6.256	6.163	6.094	6.041	5.999	5.964	5.936	5.912	5.891	5.873	5.858	5.844	5.832	5.821	5.811	5.803
5	6.608	5.786	5.409	5.192	5.050	4.950	4.876	4.818	4.772	4.735	4.704	4.678	4.655	4.636	4.619	4.604	4.590	4.579	4.568	4.558
6	5.987	5.143	4.757	4.534	4.387	4.284	4.207	4.147	4.099	4.060	4.027	4.000	3.976	3.956	3.938	3.922	3.908	3.896	3.884	3.874
7	5.591	4.737	4.347	4.120	3.972	3.866	3.787	3.726	3.677	3.637	3.603	3.575	3.550	3.529	3.511	3.494	3.480	3.467	3.455	3.445
8	5.318	4.459	4.066	3.838	3.688	3.581	3.500	3.438	3.388	3.347	3.313	3.284	3.259	3.237	3.218	3.202	3.187	3.173	3.161	3.150
9	5.117	4.256	3.863	3.633	3.482	3.374	3.293	3.230	3.179	3.137	3.102	3.073	3.048	3.025	3.006	2.989	2.974	2.960	2.948	2.936
10	4.965	4.103	3.708	3.478	3.326	3.217	3.135	3.072	3.020	2.978	2.943	2.913	2.887	2.865	2.845	2.828	2.812	2.798	2.785	2.774
11	4.844	3.982	3.587	3.357	3.204	3.095	3.012	2.948	2.896	2.854	2.818	2.788	2.761	2.739	2.719	2.701	2.685	2.671	2.658	2.646
12	4.747	3.885	3.490	3.259	3.106	2.996	2.913	2.849	2.796	2.753	2.717	2.687	2.660	2.637	2.617	2.599	2.583	2.568	2.555	2.544
13	4.667	3.806	3.411	3.179	3.025	2.915	2.832	2.767	2.714	2.671	2.635	2.604	2.577	2.554	2.533	2.515	2.499	2.484	2.471	2.459
14	4.600	3.739	3.344	3.112	2.958	2.848	2.764	2.699	2.646	2.602	2.565	2.534	2.507	2.484	2.463	2.445	2.428	2.413	2.400	2.388
15	4.543	3.682	3.287	3.056	2.901	2.790	2.707	2.641	2.588	2.544	2.507	2.475	2.448	2.424	2.403	2.385	2.368	2.353	2.340	2.328
16	4.494	3.634	3.239	3.007	2.852	2.741	2.657	2.591	2.538	2.494	2.456	2.425	2.397	2.373	2.352	2.333	2.317	2.302	2.288	2.276
17	4.451	3.592	3.197	2.965	2.810	2.699	2.614	2.548	2.494	2.450	2.413	2.381	2.353	2.329	2.308	2.289	2.272	2.257	2.243	2.230
18	4.414	3.555	3.160	2.928	2.773	2.661	2.577	2.510	2.456	2.412	2.374	2.342	2.314	2.290	2.269	2.250	2.233	2.217	2.203	2.191
19	4.381	3.522	3.127	2.895	2.740	2.628	2.544	2.477	2.423	2.378	2.340	2.308	2.280	2.256	2.234	2.215	2.198	2.182	2.168	2.155
20	4.351	3.493	3.098	2.866	2.711	2.599	2.514	2.447	2.393	2.348	2.310	2.278	2.250	2.225	2.203	2.184	2.167	2.151	2.137	2.124
21	4.325	3.467	3.072	2.840	2.685	2.573	2.488	2.420	2.366	2.321	2.283	2.250	2.222	2.197	2.176	2.156	2.139	2.123	2.109	2.096
22	4.301	3.443	3.049	2.817	2.661	2.549	2.464	2.397	2.342	2.297	2.259	2.226	2.198	2.173	2.151	2.131	2.114	2.098	2.084	2.071
23	4.279	3.422	3.028	2.796	2.640	2.528	2.442	2.375	2.320	2.275	2.236	2.204	2.175	2.150	2.128	2.109	2.091	2.075	2.061	2.048
24	4.260	3.403	3.009	2.776	2.621	2.508	2.423	2.355	2.300	2.255	2.216	2.183	2.155	2.130	2.108	2.088	2.070	2.054	2.040	2.027
25	4.242	3.385	2.991	2.759	2.603	2.490	2.405	2.337	2.282	2.236	2.198	2.165	2.136	2.111	2.089	2.069	2.051	2.035	2.021	2.007
26	4.225	3.369	2.975	2.743	2.587	2.474	2.388	2.321	2.265	2.220	2.181	2.148	2.119	2.094	2.072	2.052	2.034	2.018	2.003	1.990
27	4.210	3.354	2.960	2.728	2.572	2.459	2.373	2.305	2.250	2.204	2.166	2.132	2.103	2.078	2.056	2.036	2.018	2.002	1.987	1.974
28	4.196	3.340	2.947	2.714	2.558	2.445	2.359	2.291	2.236	2.190	2.151	2.118	2.089	2.064	2.041	2.021	2.003	1.987	1.972	1.959
29	4.183	3.328	2.934	2.701	2.545	2.432	2.346	2.278	2.223	2.177	2.138	2.104	2.075	2.050	2.027	2.007	1.989	1.973	1.958	1.945
30	4.171	3.316	2.922	2.690	2.534	2.421	2.334	2.266	2.211	2.165	2.126	2.092	2.063	2.037	2.015	1.995	1.976	1.960	1.945	1.932
40	4.085	3.232	2.839	2.606	2.449	2.336	2.249	2.180	2.124	2.077	2.038	2.003	1.974	1.948	1.924	1.904	1.885	1.868	1.853	1.839
50	4.034	3.183	2.790	2.557	2.400	2.288	2.199	2.130	2.073	2.026	1.986	1.952	1.921	1.895	1.871	1.850	1.831	1.814	1.798	1.784
60	4.001	3.150	2.758	2.525	2.368	2.254	2.167	2.097	2.040	1.993	1.952	1.917	1.887	1.860	1.836	1.815	1.796	1.778	1.763	1.748
70	3.978	3.128	2.736	2.503	2.346	2.231	2.143	2.074	2.017	1.969	1.928	1.893	1.863	1.836	1.812	1.790	1.771	1.753	1.737	1.722
80	3.960	3.111	2.719	2.486	2.329	2.214	2.126	2.056	1.999	1.951	1.910	1.875	1.845	1.817	1.793	1.772	1.752	1.734	1.718	1.703
90	3.947	3.098	2.706	2.473	2.316	2.201	2.113	2.043	1.986	1.938	1.897	1.861	1.830	1.803	1.779	1.757	1.737	1.720	1.703	1.688
100	3.936	3.087	2.696	2.463	2.305	2.191	2.103	2.032	1.975	1.927	1.886	1.850	1.819	1.792	1.768	1.746	1.726	1.708	1.691	1.676
200	3.888	3.041	2.650	2.417	2.259	2.144	2.056	1.985	1.927	1.878	1.837	1.801	1.769	1.742	1.717	1.694	1.674	1.656	1.639	1.623
500	3.860	3.014	2.623	2.390	2.232	2.117	2.028	1.957	1.899	1.850	1.808	1.772	1.740	1.712	1.686	1.664	1.643	1.625	1.607	1.592
1000	3.851	3.005	2.614	2.381	2.223	2.108	2.019	1.948	1.889	1.840	1.798	1.762	1.730	1.702	1.676	1.654	1.633	1.614	1.597	1.581

Elaborada por Irene Patricia Valdez y Alfaro.

ANEXO

Alicina

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
<u>Allic</u>	18	0,68	0,64	17,11

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	14680065423917,50	2	7340032711958,73	15,90	0,0002
Cultivares	14680065423917,50	2	7340032711958,73	15,90	0,0002
Error	6922534064374,82	15	461502270958,32		
Total	21602599488292,30	17			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1018771,69991

Error: 461502270958,3216 gl: 15

Cultivares	Medias	n	E.E.	
Perla	2912269,50	6	277339,22	A
Gran Fuego	3882574,00	6	277339,22	A
Gostoso	5119019,33	6	277339,22	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

Ajoeno

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
<u>Ajoeno</u>	18	0,15	0,04	20,13

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	7004864943,44	2	3502432471,72	1,36	0,2877
Cultivares	7004864943,44	2	3502432471,72	1,36	0,2877
Error	38763476313,50	15	2584231754,23		
Total	45768341256,94	17			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=76235,22395

Error: 2584231754,2333 gl: 15

Cultivares	Medias	n	E.E.	
Perla	226304,83	6	20753,44	A
Gran Fuego	257219,67	6	20753,44	A
Gostoso	273924,67	6	20753,44	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

Dialil sulfuro

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	Cultivares	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
RANG_DAS	Gostoso	6	10,50	1,87	10,50	10,84	0,0044
RANG_DAS	Gran Fuego	6	14,00	5,10	15,50		
RANG_DAS	Perla	6	4,00	2,37	4,00		

Trat.	Ranks
Perla	4,00 A
Gostoso	10,50 B
Gran Fuego	14,00 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Dialil disulfuro

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
DADS	18	0,03	0,00	39,98

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2782672664,33	2	1391336332,17	0,25	0,7791
Cultivares	2782672664,33	2	1391336332,17	0,25	0,7791
Error	82233319348,17	15	5482221289,88		
Total	85015992012,50	17			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=111037,13105

Error: 5482221289,8778 gl: 15

Cultivares	Medias	n	E.E.
Gran Fuego	172027,33	6	30227,53 A
Gostoso	181640,17	6	30227,53 A
Perla	201861,00	6	30227,53 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Dialil trisulfuro

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
DATS	18	0,14	0,02	28,16

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	126819695350,78	2	63409847675,39	1,18	0,3355
Cultivares	126819695350,78	2	63409847675,39	1,18	0,3355
Error	808952219184,17	15	53930147945,61		
Total	935771914534,94	17			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=348261,73314

Error: 53930147945,6111 gl: 15

Cultivares	Medias	n	E.E.
Perla	750141,50	6	94806,95 A
Gran Fuego	781749,67	6	94806,95 A
Gostoso	941887,67	6	94806,95 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

