



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo
Integral Regional

Unidad Oaxaca

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE
LOS RECURSOS NATURALES
(INGENIERÍA DE PROCESOS)

**“Extracción y purificación de alicina a partir de ajo
(*Allium sativum* L.): Implicaciones analíticas”**

Tesis
Que para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

I.Q. Maria de los Ángeles Córdova Betancourt

Dirigida por:

Dra. Lilia Leticia Méndez Lagunas

Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca.

Junio de 2010



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
SECRETARIA DE INVESTIGACION Y POSGRADO

ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez siendo las 13:00 horas del día 21 del mes de mayo del 2010 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca (CIIDIR-OAXACA) para examinar la tesis de grado titulada: "Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.): Implicaciones analíticas"

Córdova <small>Apellido paterno</small>	Betancourt <small>materno</small>	María de los Ángeles <small>nombre(s)</small>
		Con registro: A 0 B 0 C 3 D 5 E 2

aspirante al grado de: **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA
Directora de tesis

Dra. Lilia Leticia Méndez Lagunas

Dr. Juan Rodríguez Ramirez

Dr. Sadotti Sandoval Torres

Dr. Pedro Albino Quintana Hernández

Dr. Hugo Jiménez Islas

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

Dr. Juan Rodríguez Ramirez



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez el día 21 del mes mayo del año 2010, el (a) que suscribe **Córdova Betancourt María de los Ángeles** alumno (a) del Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES con número de registro **A080352**, adscrito al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Lilia Leticia Méndez Lagunas y cede los derechos del trabajo titulado: "Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.): Implicaciones analíticas" al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **Calle Hornos 1003, Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca**, e-mail: posgradooax@ipn.mx ó lq_corhet83@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Córdova Betancourt María de los Ángeles



CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
C. I. D. I. R.
UNIDAD OAXACA
I. P. N.

RESUMEN

El creciente interés por el uso de sustancias nutracéuticas de origen natural sugiere un estudio sistemático sobre la extracción y caracterización de los principales componentes activos contenidos en las plantas. Entre los productos vegetales de gran interés en la medicina tradicional, el ajo (*Allium sativum* L.) es un producto natural empleado en la prevención y/o el tratamiento de una gran diversidad de enfermedades, desde la época de los egipcios. Entre los compuestos del ajo, la alicina ha ocupado el lugar más destacado por considerarse la sustancia con mayor actividad biológica, sin embargo en los últimos años, diversos estudios han demostrado que otros tiosulfinatos podrían ser quizás más activos (Alonso J., 2007). La formación de tiosulfinatos se da cuando el ajo se corta o tritura, es entonces que la aliína reacciona con la enzima aliinasa. Sin embargo, la mayor parte de estos compuestos son altamente inestables y termosensibles provocando su pérdida y/o degradación, lo que dificulta el estudio de sus propiedades.

Por esta razón, se propone un método de extracción sólido-líquido asistido con agitación por ultrasonido, rápido y eficiente para la obtención de los principales compuestos activos del ajo, siendo de gran utilidad para la diversificación en el uso de este recurso natural renovable.

Una parte importante para que el proceso de extracción sea óptimo, es el uso de solventes medianamente polares, como lo son el Cloroformo ($K= 4.8$) y el Acetato de etilo ($K= 6.0$), para la evaluación del efecto de la polaridad en el proceso de extracción de los compuestos sulfurados contenidos en el ajo fresco.

Los extractos obtenidos mediante este proceso de extracción fueron purificados a través de técnicas analíticas de separación como: Cromatografía en Capa Fina y Cromatografía en Columna.

Dichas fracciones fueron analizadas junto con los extractos orgánicos totales (EOT) por Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS), con el fin de determinar los compuestos sulfurados contenidos en los extractos de ajo.

De esta forma y en base a los resultados obtenidos, se concluyó que el método de extracción sólido-líquido propuesto para la realización de este trabajo, permitió la obtención de extractos orgánicos totales con un gran contenido de compuestos sulfurados de importancia y propiedades nutraceuticas.

Dirigida por:

Dra. Lilia Leticia Méndez Lagunas

ABSTRACT

The growing interest in the use of natural nutraceutical substances suggests a systematic study on the extraction and characterization of the major active components contained in the plants. Among the plant products of interest in traditional medicine, garlic (*Allium sativum* L.) is a natural product used in the prevention and / or treatment of a wide range of conditions from the time of the Egyptians. Among the compounds of garlic, allicin has occupied the most prominent identified as the most biologically active substance, however in recent years, studies have shown that other thiosulfinates could perhaps be more active (Alonso J, 2007). Thiosulfinates formation occurs when the garlic is cut or crushed, the alliin is then reacts with the enzyme aliinasa. However, most of these compounds are highly unstable and temperature sensitive causing the loss and / or degradation, making it difficult to study their properties.

For this reason, we propose a method of solid-liquid fast and efficient to obtain the main active compounds of garlic, being very useful for diversification in the use of this renewable natural resource.

An important part of the optimal extraction process is the use of moderately polar solvents, such as chloroform ($K = 4.8$) and ethyl acetate ($K = 6.0$), to evaluate the effect of polarity the extraction of sulfur compounds contained in fresh garlic.

The extracts obtained by this extraction process were purified through separation and analytical techniques: Thin Layer Chromatography and Column Chromatography.

These fractions were analyzed together with total organic extracts (EOT) by gas chromatography and mass spectrometry (GC-MS) to determine the sulfur compounds contained in extracts of garlic.

In this way, and based on the results, it was concluded that the method of solid-liquid extraction proposed for the realization of this project allowed us to obtain total organic extracts with a high content of sulfur compounds of great importance and nutraceutical properties .

Agradecimientos

A CONACYT, por el apoyo económico otorgado para la realización de mis estudios de maestría.

Al Centro Interdisciplinario para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR-IPN, Unidad Oaxaca), por abrirme sus puertas y permitir mi superación personal.

Al Instituto Politécnico Nacional, por el apoyo brindado para la realización de la presente tesis, por brindarme el apoyo económico y la infraestructura durante la realización de mis estudios, por medio del Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI) y la Comisión de Operación y Fomento de Actividades Académicas del IPN (COFAA).

A la Dra. Lilia Leticia Méndez Lagunas, directora de tesis, por su atención y apoyo.

Al Dr. Samuel Siles Alvarado, porque sin su guía en la realización de este trabajo hubiese estado perdida. Gracias por fortalecer con sus conocimientos y experiencia, mi formación profesional.

A la Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas en especial a la Academia de Química Analítica , al Dr. Roman Cabrera Sierra, a la M. en C. Ma. Elena Jiménez Vieyra y a la I.Q. Katia Deloya

Lagunas por gran el apoyo, la oportunidad de trabajar con ustedes y sobre todo la amistad que me brindaron, mil gracias.

A todos mis maestros del CIIDIR-IPN, Unidad Oaxaca por compartir sus conocimientos, su disposición y gran apoyo.

Dedicatorias

Con todo mi amor y respeto :

A mi padre Miguel Ángel Córdova Púlido, porque siendo pequeña me alzaste para que alcanzara las estrellas parada en tu mano, y hoy con tu incansable apoyo logramos alcanzar una meta más... gracias papo.

A mi madre Maria Luisa Betancourt Barbosa, porque a ti te debo gran parte de lo que soy, porque decidiste dejar a un lado tus sueños para ejercer la profesión más difícil de este mundo: la de ser mi mamá. Por ser mi incondicional, este es nuestro logro... gracias mami.

Gracias por amarme en todo momento y por ustedes va todo esto.

A mi hermana Michelle, porque eres mi mejor amiga, por la fortaleza que me diste en los momentos más difíciles, y porque es un honor ser tú hermana... gracias peke.

A mis abuelitos Arturo y Ángeles, por respaldar mi dirección con su amor y sabiduría.

A mis abuelitos Saturnino y Socorro, porque sé que en sus oraciones siempre piden por mi bienestar.

Por mis tias Lore y Yoli, mis rosas azules. Porque ellas iluminan hasta el peor de mis días con sólo una sonrisa y el brillo de sus ojos.

A cada uno de mis amigos, a los que considero mis hermanos, por todos los buenos momentos que hemos pasado juntos y porque sé que siempre estarán para mí.

A todas las personas que contribuyeron de forma directa o indirecta en la realización de este proyecto, ya que forman parte importante del mismo...

Gracias Totales ...

Tabla de contenido

Índice de cuadros	i
Índice de figuras.....	ii
Índice de ecuaciones	ii
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Problemática	1
1.2 Planteamiento del problema	2
1.3 Justificación	3
Capítulo 2. Marco teórico	4
2.1 Ajo (<i>Allium sativum</i> L.)	4
2.2 Composición general del ajo	5
2.3 Composición química del ajo	5
2.3.1 Compuestos sulfurados del ajo	6
2.3.2 Aliína	7
2.3.3 Enzima alinasa	7
2.3.4 Tiosulfinatos	8
2.3.4.1 Formación	8
2.3.4.2 Estabilidad	9
2.3.4.3 Transformación	10
2.3.5 Alicina	12
2.4. Métodos de extracción de productos naturales	13
2.4.1 Consideraciones iniciales	13
2.4.2 Variables del proceso extractivo	14
2.4.2.1 Estado de división	14
2.4.2.2 Agitación	14

2.4.2.3	Temperatura	15
2.4.2.4	pH	15
2.4.2.5	Naturaleza del solvente.....	15
2.4.2.6	Tiempo de extracción	15
2.4.3	Procesos de extracción	15
2.4.3.1	Extracción líquido-líquido	15
2.4.3.2	Extracción sólido-líquido	16
2.4.4	Métodos para optimizar el proceso.....	17
2.4.4.1	Extracción asistida por microondas.....	17
2.4.4.2	Extracción por agitación con ultrasonido.....	18
2.5	Métodos analíticos	20
2.5.1	Criterios de funcionamiento	20
2.6	Fundamentos de cromatografía	21
2.6.1	Tipos de separación cromatográfica	21
2.6.1.1	Cromatografía plana.....	24
2.6.1.2	Identificación de compuestos.....	26
2.6.1.3	Constantes R_f y R_x	26
2.6.2	Cromatografía en columna.....	28
2.6.2.1	Cromatografía de gases (GC).....	30
2.6.2.1.1	Componentes del equipo GC	30
2.6.2.1.1.1	Gas portador	30
2.6.2.1.1.2	Sistema de inyección de muestra ..	32
2.6.2.1.1.3	Columnas	32
2.6.2.1.1.3.1	Tipos de columnas.....	33
2.6.2.1.1.3.1.1	Columnas empacadas...	33
2.6.2.1.1.3.1.2	Columnas capilares	33
2.6.2.1.1.4	Tipos de fases estacionarias	34
2.6.2.1.1.5	Sistemas de control de temperatura	36
2.6.2.1.1.6	Detectores	36
2.6.2.1.2	Aplicaciones.....	37

2.7	Espectrometría de masas.....	39
2.7.1	Fundamentos básicos.....	39
2.7.2	Componentes	40
2.7.2.1	Fuente de ionización.....	41
2.7.2.2	Analizador de masa	41
2.7.2.3	Detector	42
2.7.3	Interpretación de espectros de masas	42
2.8	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).....	44
2.9	Antecedentes	45
2.10	Hipótesis	51
2.11	Objetivo general	52
2.11.1	Objetivos específicos.....	52
Capítulo 3.	Metodología	53
3.1	Selección de la muestra	53
3.2	Preparación de la muestra	53
3.3	Proceso de extracción	54
3.4	Pruebas Analíticas	55
3.4.1	Cromatografía en capa fina (TLC)	55
3.4.2	Separación por cromatografía en columna	56
3.4.2.1	Preparación de la columna cromatográfica.....	56
3.4.2.1	Adición de la muestra	57
3.4.3	Análisis por GC-MS	58
Capítulo 4.	Análisis de Resultados	60
4.1	Extractos orgánicos totales	60
4.2	Cromatografía en capa fina	60
4.3	Separación por cromatografía en columna.....	61
4.4	Resultados del análisis por GC-MS	63

4.4.1 Análisis de los fragmentogramas de los extractos	65
4.4.2 Análisis de los fragmentogramas de las fracciones	69
Capítulo 5. Conclusiones y recomendaciones	77
5.1 Conclusiones	77
5.2 Recomendaciones	79
Referencias	80
Anexos	88

Índice de cuadros

Cuadro 1. Taxonomía de la planta	4
Cuadro 2. Compuestos con efectos benéficos	5
Cuadro 3. Compuestos sulfurados	6
Cuadro 4. Clasificación de los métodos cromatográficos en columna ...	23
Cuadro 5. Compuestos sulfurados reportados en estudios anteriores ..	49
Cuadro 6. Condiciones de operación del equipo GC-MS.....	58
Cuadro 7. Fracciones seleccionadas para el análisis GC-MS	63
Cuadro 8. Compuestos encontrados en el eot-1	66
Cuadro 9. Compuestos encontrados en el eot-2	68
Cuadro 10. Compuestos identificados en la fracción 1 del eot-1	70
Cuadro 11. Compuestos identificados en la fracción 1 del eot-2	72
Cuadro 12. Compuestos identificados en este estudio.....	73

Índice de figuras

Figura 1. Estructura química de la aliína	7
Figura 2. Principales transformaciones de los tiosulfinatos.....	10
Figura 3. Reacción química de la formación de alicina.....	12
Figura 4. Aspecto de la placa tras el desarrollo de la cromatografía en capa fina	25
Figura 5. Diagrama que muestra la separación de una mezcla	28
Figura 6. Representación esquemática del principio empleado en MS..	40
Figura 7. Ajos morados tipo chino con 56mm a 65mm de diámetro ...	53
Figura 8. Proceso de extracción asistido por agitación con ultrasonido	54
Figura 9. Eliminación del solvente.....	54
Figura 10. Preparación de una columna cromatográfica	56
Figura 11. Equipo de GC-MS	58
Figura 12. Extractos orgánicos totales eot-1 y eot-2	60

Figura 13. Presencia de compuestos orgánicos en los extractos eot-1 y eot-2	61
Figura 14. Purificación de los extractos y fracciones obtenidas	61
Figura 15. Cromatoplasmas de las fracciones del extracto eot-1	62
Figura 16. Cromatoplasmas de las fracciones del extracto eot-2	62
Figura 17. Concentración de las fracciones.....	63
Figura 18. Fragmentograma del extracto eot-1	65
Figura 19. Fragmentograma del extracto eot-2.....	67
Figura 20. Fragmentograma de la fracción 1 del eot-1	69
Figura 21. Fragmentograma de la fracción 1 del eot-2	71
Figura 22. Principales compuestos de degradación de la alicina.....	74
Figura 23. Degradación de la alicina bajo las condiciones de GC.....	75

Índice de ecuaciones

Ecuación 2.1 Constante R_f	27
Ecuación 2.2 Constante R_x	27



Capítulo 1. Introducción

1.1 Problemática

El creciente interés por el uso de sustancias nutraceuticas de origen natural sugiere un estudio sistemático sobre la extracción y caracterización de los principales componentes activos contenidos en las plantas.

Fuera de los metabolitos primarios (carbohidratos, proteínas y otros), las plantas sintetizan miles de otros compuestos llamados fitoquímicos o metabolitos secundarios. Aunque en muchos casos no se conoce con certeza la verdadera función de estos compuestos en las plantas; su actividad biológica en los animales es tradicionalmente muy conocida y en algunos casos hasta bien documentada (Lock de Ugaz O., 1988). La investigación fitoquímica actual va centrando cada vez más sus esfuerzos en el conocimiento de las propiedades terapéuticas y la extracción de estos principios activos.

El aislamiento y la identificación de estos metabolitos secundarios, así como la determinación de su acción biológica es una tarea muy importante pero que puede tomar años de estudio en una sola planta.

Entre los productos vegetales de gran interés en la medicina tradicional, el ajo (*Allium sativum* L.) es un producto natural empleado, desde la época de los egipcios, en la prevención y/o el tratamiento de una gran diversidad de enfermedades. Entre los principales componentes activos contenidos en el ajo podemos mencionar la alicina que es un compuesto organosulfurado cuya actividad antitrombótica, hipotensora, antimicrobiana, antifúngica, anticarcinogénica, antitumorogénica e



inmunomoduladora está ampliamente documentada (López T., 2007). Otros componentes activos también fueron reportados con actividades biológicas diversas (Lawson L. D. & Wang Z., 2005).

Sobre la base de estos antecedentes se piensa que la optimización de un método rápido y eficiente para la extracción de los principales compuestos activos sería de gran utilidad para permitir la diversificación del uso de este recurso natural renovable. Los diferentes componentes extraídos deberán ser caracterizados y/o identificados para su posterior aislamiento.

1.2 Planteamiento del problema

En la actualidad, el ajo (*Allium sativum* L.) es considerado uno de los bulbos más importantes debido a su contenido de metabolitos secundarios con una amplia gama de propiedades nutracéuticas, entre ellos la alicina, que es un compuesto sulfurado muy inestable responsable de la mayoría de las propiedades farmacológicas además del olor característico de este bulbo (Fujisawa H. & col., 2008).

Desde hace 30 años, se han reportado trabajos sobre el análisis cualitativo y cuantitativo de los compuestos presentes en diversos productos derivados del ajo, empleando diversos métodos (Cavallito C. J., 1944; Miething H., 1985; Lawson L. D., 1990). Debido a que, en el análisis de dichos compuestos, la principal complicación que se presenta durante el proceso es la inestabilidad, pérdida y/o degradación de muchos de estos, que en lapsos de corto tiempo a temperatura ambiente, dan lugar a otros compuestos de menor actividad biológica, no así menos importantes (Alonso J., 2007).

Por lo anterior, se requiere de la optimización de un método rápido y eficiente para la extracción de los principales compuestos activos, para permitir la diversificación del uso de este recurso natural renovable. Los



diferentes componentes extraídos deberán ser caracterizados y/o identificados para su posterior aislamiento.

1.3 Justificación

Los compuestos sulfurados presentes en el ajo (*Allium sativum* L.), en especial la alicina, poseen diversas propiedades nutraceuticas benéficas para la salud. Sin embargo, la mayor parte de éstos compuestos son altamente inestables y termosensibles, lo que dificulta el estudio de sus propiedades.

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

Los diferentes componentes extraídos serán caracterizados y/o identificados para su posterior aislamiento.



Capítulo 2. Marco teórico

2.1 Ajo (*Allium sativum* L.)

El ajo es una planta herbácea, perteneciente a la familia de las Alliáceas, caracterizada por crecer formando bulbo de hasta 20 dientes o más (*Cuadro 1*).

Cuadro 1. Taxonomía de la planta

Familia	<i>Liliaceae</i> , subfam. <i>Allioideae</i>
Nombre científico	<i>Allium sativum</i> L.
Planta	bulbosa, vivaz y rústica
Sistema radicular	Raíz bulbosa, compuesta de 20 o más bulbos, reunidos en su base por medio de una película delgada. De la parte superior del bulbo nacen las partes fibrosas, que se introducen en la tierra para alimentar y anclar la planta.
Tallos	Fuertes, de crecimiento determinado, alcanzando hasta 50 cm de altura.
Hoja	Lineares, dispuestas en forma de roseta, alcanzando hasta 60 cm de largo.
Flores	Blancas o rosadas, conformando una umbela en el extremo del tallo que se cierra antes de la floración.

Fuente: Alonso J., 2007

El uso del ajo se remonta a los comienzos de la humanidad, aproximadamente 3000 años a. C. era utilizado para combatir la parasitosis y prevenir epidemias. Ha sido mencionado en papiros egipcios que datan de aproximadamente el año 1500 a. C., y en los que



se mencionan varios usos: cefaleas, trastornos cardíacos, parásitos y tumoraciones (Banerjee S. K. & col., 2003).

2.2 Composición general del ajo

El ajo se compone principalmente de agua 56-68% en peso, seguido por los carbohidratos 26-30%. Los componentes con propiedades nutraceuticas, son los compuestos sulfurados (11-35 mg/100g de ajo fresco). Otros componentes son las vitaminas (ácido ascórbico, 30mg/100g peso fresco; vitamina E, 9.4 µg/g) y minerales como el Selenio (0.014 mg/100g) (Lawson L. D., 1993).

2.3 Composición química del ajo

Desde 1844 hasta la fecha se han descubierto más de 200 sustancias componentes del ajo, algunas de estas sustancias se les atribuyen efectos biológicos benéficos para los humanos (*Cuadro 2*):

Cuadro 2. Compuestos con efectos benéficos

Compuesto	Actividad Biológica
Compuestos fenólicos (Alicina)	Antioxidantes, anti inflamatorios, antivirales y antibacteriana
Adenosina	Vasodilatador, hipotensor, miorelajante y estimula la síntesis de hormonas esteroídicas
Polisacáridos (Fructanos)	Cardioprotectores, antioxidante y estimula el sistema inmunológico
Quercitina	Efectos benéficos contra el asma y algunas alergias
Saponinas	Hipotensora y antibacteriana

Fuente: García J. & Sánchez F., 2000; Ferri N. & col., 2003



Sin embargo, los compuestos sulfurados (azufrados) han sido considerados la clave de los beneficios para la salud (Alonso J., 2007). En el *Cuadro 3* se detallan los principales compuestos sulfurados del ajo y sus posibles acciones biológicas.

Cuadro 3. Compuestos sulfurados

Característica	Compuesto	Actividad biológica
Solubles en agua	S-alil-cisteína S-alil-mercaptocisteína S-metilcisteína γ-glutamil-cisteína	Hipocolesterolemiantes, antioxidantes, quimioprotectores frente al cáncer. Favorecen la acción desintoxicante del hígado frente a sustancias químicas
Solubles en aceite	Sulfuro dialílico Disulfuro dialílico (dialil disulfuro) Alicina (Oxido de disulfuro dialílico) Trisulfuro dialílico Trisulfuro alilmetílico Alíina Ditíinas Viniloditíinas Ajoeno	Antibiótico, antifúngico, antiviral Desintoxicante Anticancerígeno, previene daños químicos del ADN Hipocolesterolemiante, previene la arterosclerosis, antitumoral Hipotensora, hipoglucemiante Anti-inflamatorio, vasodilatador, hipotensor, antibiótico

Fuente: Modificado de Alonso J., 2007

2.3.1 Compuestos sulfurados del ajo

Los principales compuestos sulfurados del ajo son las cisteínas sulfóxidos, como la alíina (7-14 mg/g), metíina (0.5-2 mg/g) e isoalíina (0.1-2 mg/g). Estas cisteínas sulfóxidos se forman del γ-glutamil-cisteína (γ-glutamil-S-trans-1-propenil cisteína, γ-glutamil-S-alilcisteína



y γ -glutamil-S-metilcisteína) durante la maduración, que es cuando aumentan los niveles de la enzima γ -glutamil-transpeptidasa.

El contenido total de sulfuros en el ajo es de aproximadamente 1.0% en peso seco y 0.35% en peso fresco (Lawson L. D., 1993).

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

2.3.2 Aliína

La aliína o S-alilcisteína sulfóxido es el compuesto sulfurado más abundante en el ajo fresco, es inodora y estable. El ajo contiene 7 - 14 mg de aliína por gramo de peso fresco, y de 18 - 42 mg/g de peso seco.

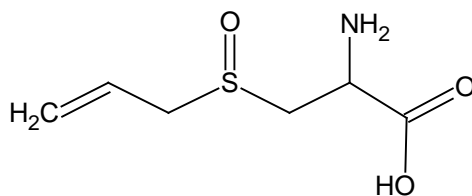


Figura 1. Estructura química de la aliína

La aliína es estable en soluciones acuosas y a temperaturas elevadas (Stoll A. & col., 1951). Cuando las células se rompen, la aliína reacciona, y en aproximadamente diez segundos toda la aliína expuesta se convierte en tiosulfinatos que emiten el aroma característico del ajo fresco (Lawson L. D. & Wang Z. J., 2005).

2.3.3 Enzima alinasa

La alinasa (E.C.4.4.1.4) comprende del 10 al 12% del material proteico soluble en los dientes de ajo. Se encuentra en las vacuolas de la célula



separada físicamente de su substrato natural, la aliína, que se encuentra en el citoplasma de las células del ajo (Kuettner B. & col., 2002).

Ésta enzima se activa a pH de 4.5 hasta 9, pero se inactiva rápidamente y de forma irreversible a pH 1.5-3.

Estudios anteriores determinan que la actividad enzimática decrece rápidamente a la temperatura de 42°C, indicando que la temperatura óptima de activación de la enzima alinasa, se encuentra entre 35°C hasta 47°C y su inactivación se produce de 42°C a 60°C, a temperaturas mayores de 60°C la enzima es destruida en su totalidad (Krest J. G. & Keusgen M., 2000).

2.3.4 Tiosulfinatos

2.3.4.1 Formación

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

La alicina representa el 70-80% del total de tiosulfinatos formados, seguido por los tiosulfinatos, alil-SS(O)-metil (6-16%), metil-SS(O)-alil (3-9%), trans-1-propenil-SS(O)-alil (1-7%), alil-SS(O)-trans-1-propenil (0.2-4%), trans-1-propenil-SS(O)-metil y metil-SS(O)-trans-1-propenil (0.1-2.5%), y metil-SS(O)-metil (2%) (Lawson L. D., 1993).

La formación de alicina, se completa en 0.2-0.5 minutos a temperatura ambiente, mientras que la formación del metil tiosulfinato termina en 1.5-5 min. Los alil tiosulfinatos representan entre el 95 y 98 % del total de los tiosulfinatos, y los metil tiosulfinatos entre el 10 y el 30% del total (Lawson L. D., 1993).



2.3.4.2 Estabilidad

Los tiosulfinatos son compuestos muy reactivos y experimentan un gran número de transformaciones que dependen de variables como la temperatura, el pH y las condiciones de extracción.

Los alil-S-tiosulfinatos son considerados los compuestos sulfurados menos estables del ajo, porque tienden a formar tioacroleína ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}=\text{S}$) y alil mercaptano (alil-SH) como intermediarios para reacciones posteriores. En cambio, los alil-S(O) tiosulfinatos, son estables debido a que no pueden formar tioacroleína.



2.3.4.3 Transformación

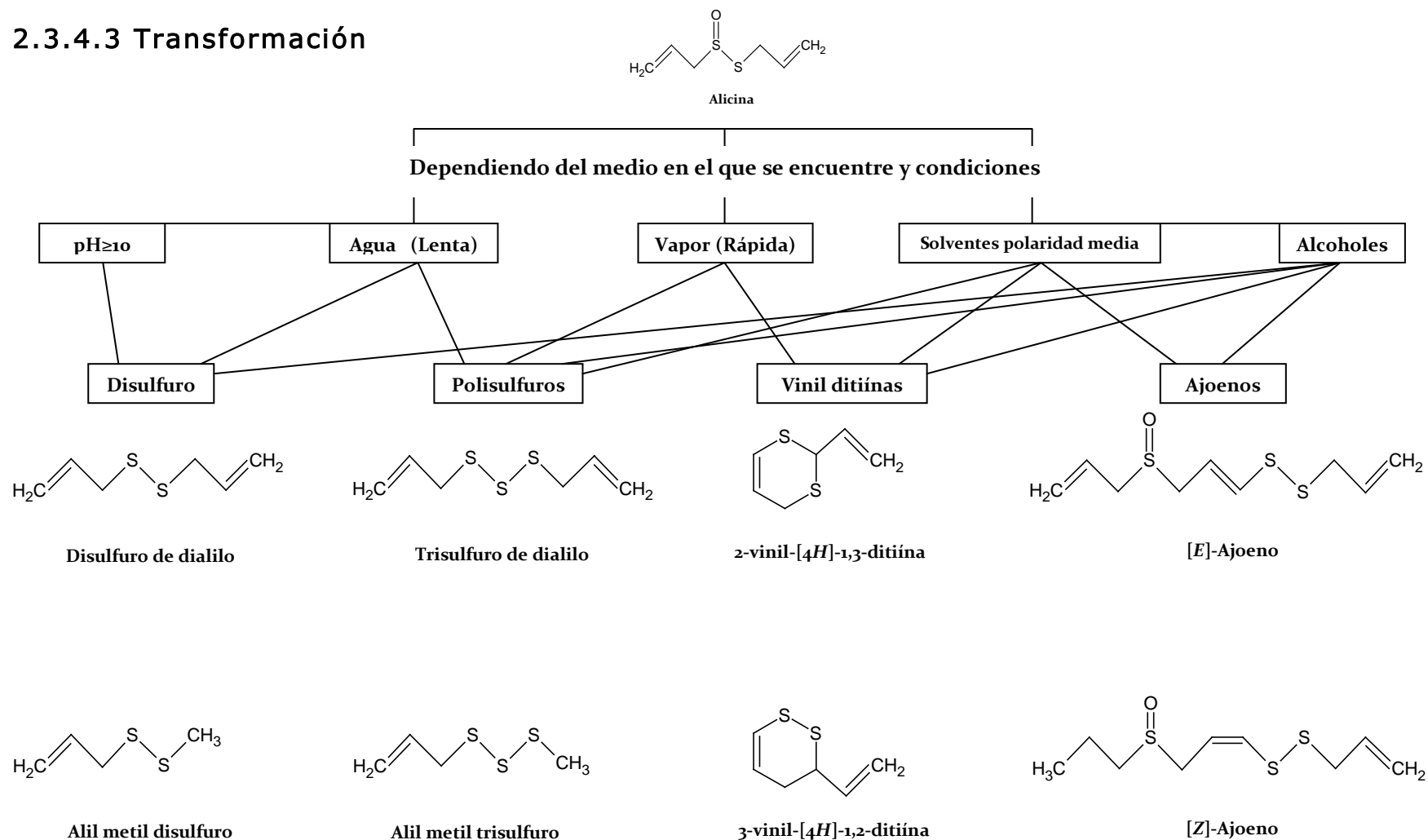


Figura 2. Principales transformaciones de los tiosulfinatos
(modificado de Lawson L.D., 1993; Block E.& col., 1993)



Los tiosulfatos al mezclarse con agua se transforman principalmente en trisulfuro de dialilo, disulfuro de dialilo y alil metil trisulfuro (*Figura 2*). La velocidad de formación de los sulfuros incrementa considerablemente al someter a calentamiento al ajo.

Los estudios del ajo en fresco, el deshidratado y el aceite de ajo indican que los trisulfuros se forman primero, seguidos por la lenta formación de algunos disulfuros, que son tan estables como los tetrasulfuros. Al mezclarse la alicina o alil metanotiosulfato con solventes medianamente polares, o sin solvente, se produce principalmente 3-vinil-[4H]-1,2-ditiína (51%), 2-vinil-[4H]-1,3-ditiína (19%) y en menor cantidad el ajoeno (12%) y sulfuros (18%).

La alicina en alcoholes, como el metanol produce trisulfuros de dialilo (83%) y disulfuros de dialilo (10%), ajoeno (1%) y vinil-ditiínas (1%), y un 5% de compuestos no identificados (Lawson L. D., 1993). En el caso del etanol, produce trisulfuro de dialilo (73%) y algunos disulfuros de dialilo (8%) y ajoeno (8%) principalmente. Sin embargo, al usar alicina pura se obtiene ajoeno (55%), vinil-ditiínas (34%) y algunos sulfuros (11%). Entre los tiosulfatos se tienen disulfuros y trisulfuros

A la temperatura de 100°C o más, se forman compuestos poli-sulfuros que contienen más de 5 átomos de azufre.



2.3.5 Alicina

La alicina es un componente oxidante producido por el ajo crudo cuando sus células se rompen por la acción de un corte o triturado, permitiendo la interacción de la enzima aliinasa la cual cataliza la conversión de aliína en alicina, en contacto con el aire y pH superior a 3 (Lawson L. D. & Hughes B., 1992). La reacción se completa de 0.2 a 0.5 minutos después de haber iniciado (Lawson L. D., 1993).

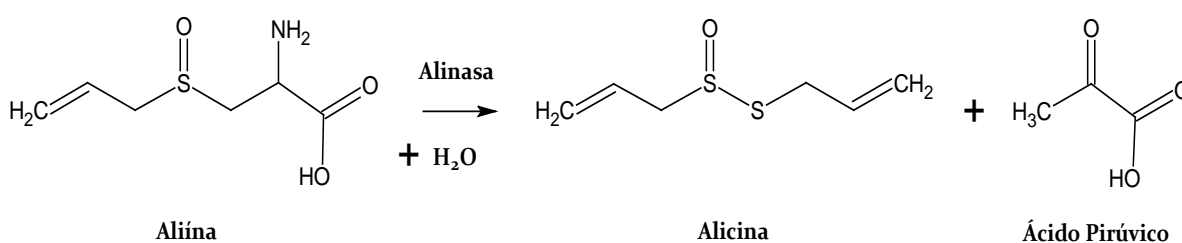


Figura 3. Reacción química de la formación de alicina

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

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

Entre las propiedades nutraceuticas atribuidas a este compuesto, destacan su acción antitrombótica, hipotensora, antimicrobiana, antifúngica, anticarcinogénica, antitumorogénica e inmunomoduladora (López T., 2007).



Dado que la alicina es un compuesto altamente inestable y de reacción oxidante, es fácilmente transformada en otros compuestos azufrados tales como sulfuro, disulfuro y trisulfuro dialílico (Block E. & col., 1992).

La vida promedio de la alicina a temperatura ambiente, en 1 mM de ácido cítrico con un pH 3 es de 10 días, 4 días en agua, 30hrs en diclorometano, 48 hrs en metanol o cloroformo, 24hrs en etanol o acetonitrilo, 3hrs en éter, 2h en hexano, y 16hrs en la ausencia de solventes (Lawson L. D., 1993).

Los compuestos obtenidos del ajo pueden variar según las condiciones de temperatura, pH y el método de extracción empleado.

Entonces para el análisis de los compuestos sulfurados, el empleo de solventes polares en el proceso de extracción permite la estabilización de la mayoría de ellos, incluyendo la alicina.

2.4 Métodos de extracción de productos naturales

2.4.1 Consideraciones iniciales

Un proceso extractivo, debe definir la selectividad del solvente a ser usado en el proceso. Dependiendo del propósito al que se destine, se puede obtener un extracto cuya composición química contiene la mayor parte de los constituyentes químicos de la planta, o un extracto que contiene solamente constituyentes químicos con una determinada característica (Sharapin N., 2000).

Para el primer caso, normalmente se usa un solvente de naturaleza general, de alta polaridad. En el segundo se emplea un solvente selectivo, de menor polaridad.

La selectividad del solvente de extracción, así como la permanencia en la composición química de la materia vegetal, representan dos aspectos de suma importancia en el aislamiento de sustancias naturales (Alejandro D. X., 1973).



Durante el proceso de extracción ocurren dos fenómenos paralelos: la lixiviación de las sustancias solubles de células rotas y la disolución y difusión de las sustancias solubles de células intactas. Mientras la lixiviación de las muestras de las células rotas es rápida, la difusión de las sustancias a través de la membrana de células intactas es lenta y requiere etapas de humedecimiento y ablandamiento para aumentar la permeabilidad de la membrana.

2.4.2 Variables del proceso extractivo

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

2.4.2.1 Estado de división

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

La penetración del solvente en fragmentos mayores de la muestra es lenta y la salida de las sustancias extraíbles es difícil.

2.4.2.2 Agitación

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



2.4.2.3 Temperatura

La disolución de las sustancias extraíbles es facilitada por el aumento de la temperatura, que contribuye al desplazamiento de la constante de equilibrio de saturación y aumenta la eficiencia del proceso. Sin embargo, muchos principios activos son termolábiles y pueden ser destruidos, total o parcialmente, a temperaturas elevadas. El aumento de la temperatura también puede causar la pérdida de sustancias volátiles.

2.4.2.4 pH

El pH influye en la solubilidad de diversos compuestos ya que permite la posibilidad de formación de sales.

2.4.2.5 Naturaleza del solvente

Dependiendo de la finalidad deseada, el solvente utilizado extrae, selectivamente o no, cierta clase de compuestos.

2.4.2.6 Tiempo de extracción

Se determina en función del solvente y del equipo seleccionado. Esta variable es resultante de todos los factores antes mencionados. El tiempo de extracción debe ser suficiente para permitir la separación de los compuestos de interés.

2.4.3 Procesos de extracción

La extracción puede definirse como un proceso de separación en el cual un soluto se reparte o distribuye entre dos fases diferentes. Lo más común es realizar una extracción entre dos fases líquidas, aunque también pueden realizarse extracciones sólido-líquido.

2.4.3.1 Extracción líquido-líquido

La extracción líquido-líquido, también se conoce como extracción con disolventes, consiste en la separación de los componentes de una



solución líquida por contacto con otro líquido parcialmente insoluble (miscible). Si las sustancias que componen la solución original se distribuyen de manera distinta entre las dos fases líquidas, se puede lograr cierto grado de separación, que puede incrementarse mediante el uso de contactos múltiples. En todas las operaciones de este tipo, la solución que se va a extraer se llama alimentación y disolvente al líquido con el cual se pone en contacto la alimentación. El producto se llama extracto.

Se utiliza para separar especies moleculares simples, compuestos de coordinación y compuestos orgánicos, de las disoluciones acuosas en las que se encuentran inicialmente. El procedimiento consiste en agitar las disoluciones acuosas con un disolvente orgánico inmiscible con el agua y dejar separar ambas fases. Se establece entonces un equilibrio o reparto de los solutos entre las dos fases gobernado por la solubilidad relativa de los solutos en las fases acuosa y orgánica.

Las aplicaciones de la extracción líquida se clasifican en varias categorías: aquellas aplicaciones en que la extracción está en competencia directa con otros métodos de separación y aquellas aplicaciones en que el único método adecuado (Treybal R., 1980).

2.4.3.2 Extracción sólido-líquido

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

La extracción sólido-líquido recibe distintos nombres según la finalidad del proceso; así, se le conoce como lixiviación, macerado, percolación, etc. La finalidad de esta operación puede ser diversa, pues en algunos



casos es necesario eliminar algún componente no deseable de un sólido mediante disolución con un líquido, denominándose lavado a este proceso de extracción.

La forma en que el soluto esté contenido en el sólido inerte puede ser diversa. Así, puede ser un sólido disperso en el material insoluble o estar recubriendo su superficie. También puede tratarse de un líquido que esté adherido o retenido en el sólido, o bien estar contenido en su estructura molecular.

Aplicaciones importantes de la extracción sólido-líquido son: extracción de aceites y grasas animales o vegetales, entre otras.

2.4.4 Métodos para optimizar el proceso

En la actualidad, las extracciones sólido-líquido son asistidas por otras técnicas para la optimización en la eficiencia del proceso.

2.4.4.1 Extracción asistida por microondas

Las microondas son ondas electromagnéticas de alta energía. Su principal actuación consiste en su capacidad de producir cambios en la rotación molecular y en la movilidad iónica del medio sin alterar la muestra.

Las microondas producen dos interacciones básicas:

1. *Disipación de energía por conductividad térmica:* Al atravesar una onda electromagnética un fluido, los iones presentes en ésta se ven afectados por su paso ejerciendo una fuerza que hace migrar los iones en función del campo eléctrico. Esta migración iónica lleva asociada una resistencia del fluido al movimiento de iones. De este modo esa resistencia produce un calentamiento generalizado de la muestra ya que los iones están en todas partes del fluido.



2. Disipación de energía por rotación de dipolos: En moléculas con dipolos eléctricos el campo eléctrico asociado a la radiación electromagnética produce un alineamiento de los mismos con el campo. De este modo cuando pasa la onda los dipolos se encuentran ordenados perfectamente en la dirección del campo pero cuando este cesa las moléculas se reorganizan anárquicamente produciéndose fricción con el disolvente y, por lo tanto, calor.

Ambos fenómenos ocurren en todos los lugares de la disolución por igual, de este modo es mucho más eficaz.

✓ Ventajas del uso de las microondas

- Técnica rápida
- Bajo consumo de disolventes
- Control de todos los parámetros de extracción
- Agitación y extracción de modo simultáneo
- Se logran altas temperaturas y presiones

✓ Desventajas

- Filtrado posterior
- Costo del equipo

2.4.4.2 Extracción por agitación con ultrasonido

La agitación con ultrasonido, usa el principio de sonidos cuya frecuencia es inaudible para el oído humano pero son de magnitud muy alta. Esta técnica, constituye una manera económica, simple y eficaz de producir una disolución en muestras sólidas (Harborne, J. B. & Baxter H., 1995).

Las ondas sonoras son ondas de presión que se transmiten a través de un medio material. Precisamente por ello las ondas sonoras provocan la contracción y posterior expansión del medio en el cual se propagan. Cuando este medio es un disolvente, se forman burbujas o cavidades en



el líquido que terminan por explotar violentamente en un fenómeno que se conoce como cavitación. Esto produce un incremento de presión y temperatura que no son perceptibles en el sistema, debido al tamaño pequeño de las burbujas .

Debido al aumento de temperatura, el proceso de sonicación favorece la solubilidad donde se produce la explosión de la burbuja, además, el aumento de presión produce una mejor penetración del disolvente al interior del sólido (Suslick K. S., 1998).

Bajo una intensa sonicación, enzimas o proteínas pueden ser liberadas de las células u orgánulos subcelulares como resultado de la desintegración de la célula. En este caso, el compuesto que se disuelve en un disolvente está encerrado en una estructura insoluble. La interrupción de la célula es un proceso delicado, ya que la capacidad de la pared celular para resistir la presión osmótica en el interior es grande. Un buen control de la interrupción de la célula es necesario, para evitar una liberación sin complicaciones de todos los productos intracelulares incluyendo restos de células y ácidos nucleídos, o la desnaturalización de productos. El ultrasonido sirve como un medio controlable para la desintegración de la célula. Logra una mayor penetración de un disolvente en un tejido de la planta y mejora la transferencia de masa (Mummery C. L., 1978).

✓ Ventajas del uso de la agitación con ultrasonido

- Rapidez
- Control de todos los parámetros de extracción
- Agitación y extracción de modo simultáneo
- Bajo costo



2.5 Métodos analíticos

La química analítica se ocupa de los métodos de determinación de la composición química de la materia. Los métodos cualitativos nos proporcionan información sobre la identidad de las especies atómicas o moleculares de la muestra, o de los grupos funcionales que hay en ella; por otra parte, un método cuantitativo nos aporta la información numérica de la cantidad relativa que hay de uno o varios de estos componentes.

Los métodos analíticos se clasifican en clásicos e instrumentales

a) Métodos clásicos

La mayor parte de los análisis se realizan separando los componentes de interés de una muestra (analitos) mediante procedimientos de separación y determinación (gravimétricos o volumétricos).

b) Métodos instrumentales

Para el análisis de una gran variedad de analitos inorgánicos, orgánicos y bioquímicos a través de estos métodos, se emplean técnicas que permitan la medición de las propiedades físicas (conductividad, la adsorción o emisión de luz, etc.) de dichos componentes.

2.5.1 Criterios de funcionamiento

Los criterios cuantitativos de funcionamiento de los instrumentos se pueden utilizar para decidir si un determinado método instrumental es o no adecuado para el análisis analítico.



2.6 Fundamentos de cromatografía

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

Es difícil definir rigurosamente el término de *cromatografía*, ya que se ha aplicado ese nombre a varios sistemas y técnicas. Sin embargo, todos esos métodos tienen en común el uso de una *fase estacionaria* y una *fase móvil*.

En todas las separaciones cromatográficas, la muestra se desplaza con una fase móvil, que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico. Esta fase móvil se hace pasar a través de una fase estacionaria con la que es inmisible, y que se fija a una columna o a una superficie sólida. Las dos fases se eligen de tal forma, que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos componentes que son fuertemente retenidos 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 o zonas discretas que pueden analizarse cualitativa y/o cuantitativamente (Skoog D. A., 2001).

2.6.1 Tipos de separación cromatográfica

Los métodos cromatográficos se pueden clasificar de dos modos. El primero de ellos se basa en la forma en que las fases estacionaria y móvil se ponen en contacto, diferenciándose así la cromatografía en columna de la cromatografía en plano.



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.): Implicaciones analíticas

En la *cromatografía en columna*, un tubo estrecho contiene la fase estacionaria a través de la cual hace se pasar la fase móvil por presión o gravedad.

En la *cromatografía en plano*, la fase estacionaria se fija sobre una placa plana o a los intersticios de un papel; en este caso la fase móvil se desplaza a través de la fase estacionaria por capilaridad o por efecto de la gravedad.

Otra clasificación más fundamental de los métodos cromatográficos se basa en el tipo de fase móvil y estacionaria, y en la clase de equilibrios implicados en la transferencia de los solutos entre las fases (*Cuadro 4*).



Cuadro 4. Clasificación de los métodos cromatográficos en columna

Clasificación general	Método específico	Fase estacionaria	Tipo de equilibrio
Cromatografía de líquidos (LC) Fase móvil: líquida	Líquido-líquido, o reparto Líquido-fase unida Químicamente Líquido-sólido, o adsorción Intercambio iónico Exclusión por tamaño	Líquido adsorbido sobre un sólido Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida Sólido Resina de intercambio Iónico Líquido en los intersticios de un sólido polimérico	Distribución entre líquidos inmiscibles Distribución entre líquido y la superficie enlazada Adsorción Intercambio iónico Distribución/exclusión
Cromatografía de gases (GC) Fase móvil: gas	Gas-líquido Gas-fase unida químicamente	Líquido adsorbido sobre un sólido Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre un gas y un líquido Distribución entre el líquido y la superficie enlazada
Cromatografía de fluidos supercríticos (SFC) Fase móvil: fluido Supercrítico	Gas-sólido	Sólido Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Adsorción Distribución entre el fluido supercrítico y superficie enlazada

Fuente: Skoog D. A., 2001



Hay que mencionar que solamente la cromatografía de líquidos es la que puede llevarse a cabo en columnas o sobre superficies planas; por otra parte, tanto la cromatografía de gases como la de fluidos supercríticos están restringidas a los procedimientos en columna, de tal modo que las paredes de la columna contienen la fase móvil.

2.6.1.1 Cromatografía plana

Los métodos de cromatografía plana incluyen la *cromatografía en capa fina* (TLC) y la *cromatografía en papel* (PC). En todos los casos se emplea una capa plana y relativamente delgada de un material que a su vez es el soporte, o bien que recubre una superficie de vidrio, plástico o metálica. La fase móvil se mueve a través de la estacionaria por capilaridad, a veces ayudada por gravedad o por aplicación de un potencial eléctrico. En la actualidad, la cromatografía en plano se centra en la técnica de la capa fina, que es más rápida, tiene mejor resolución, y es más sensible que su alternativa en papel. Por ello nos centraremos en los métodos de capa fina.

Las separaciones en capa fina se realizan en placas de vidrio o plástico que se recubren con una capa delgada y adherente de partículas finamente divididas; esta es la capa estacionaria.

Las placas de capa fina o cromatoplacas, se pueden obtener de forma comercial y sus tamaños son varios 5x20, 10x20, y 20x20. Estas placas comerciales se presentan en dos formatos. El convencional, donde las placas tienen un espesor de 200 a 250 μm un tamaño de partícula de 20 μm o más. Presentan por lo común unos 2000 platos teóricos en 12 cm. y con un tiempo de desarrollo de 25 min. El segundo tipo de placas comerciales es el de alta eficacia, que tienen películas de unos 10 μm de espesor, y un diámetro de partícula de 5 μm o menos. El número de platos teóricos es mayor unos 4000 en 3cm y con 10 minutos de



desarrollo. Las placas de alta eficacia permiten mejores separaciones y en menos tiempo, pero tienen la desventaja de tener una menor capacidad de carga.

La aplicación de la muestra es el aspecto más crítico de la cromatografía en capa fina. Por lo general, se aplica una disolución de la muestra del 0,001 al 0,1 %, como una mancha, a 1 o 2 cm. del extremo de la placa. Pero para una separación de mayor eficacia, la mancha debería tener un diámetro mínimo aproximadamente 5mm para una aplicación cualitativa y menor para el análisis cuantitativo, y en el caso de las disoluciones diluidas se realiza tres o cuatro aplicaciones superpuestas secando la zona entre aplicación. La aplicación puede ser manual o por aplicadores mecánicos. Si es manual es por contacto entre la placa y un capilar que contiene la muestra, o utilizando una jeringa hipodérmica. En el caso de que sea mecánico, se mejorara la precisión y exactitud de la aplicación (*Figura 4*).

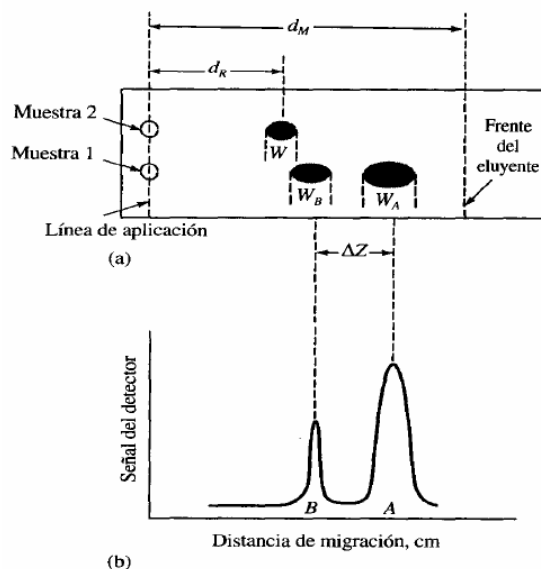


Figura 4. Aspecto de la placa tras el desarrollo de la cromatografía en capa fina



2.6.1.2 Identificación de compuestos

Existen distintos tipos de análisis cualitativos para identificar los distintos componentes de la muestra tras realizar la cromatografía en capa fina:

- *Uso de patrones:* Consiste en aplicar a la placa la muestra desconocida y disoluciones de muestras purificadas, de las especies que probablemente pueden estar presentes en la muestra desconocida. La coincidencia entre los valores R_f de alguna de las manchas de la muestra desconocidas el de alguno de los estándares proporciona evidencias para la identificación de uno de los componentes de la muestra. El R_f es un nuevo parámetro denominado *relación de frente*. Este método necesita una confirmación mediante la repetición del ensayo con diferentes fases móviles y estacionarias y con distintos reactivos de revelado.

- *Métodos de elución:* Se raspa la zona de la placa que contiene el analito con una espátula o una navaja, y se recoge el sólido sobre un papel satinado. Se trasfiere a un tubo de ensayo u otro recipiente, donde el analito se disuelve con un disolvente adecuado y se separa de la fase estacionaria por centrifugación o filtración. La identificación se realiza por técnicas como la espectrometría de masas, la resonancia magnética nuclear o la espectroscopia de absorción en infrarrojo.

2.6.1.3 Constantes R_f y R_x

La constante R_f o Relación de frente es simplemente una manera de expresar la posición de un compuesto sobre una placa como una fracción decimal, que mide la retención de un componente. Se define como:



$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por la sustancia}}{\text{distancia recorrida por el disolvente}}$$

[Ec. 2.1]

La distancia recorrida por el compuesto se mide generalmente desde el centro de la mancha, los cálculos se simplifican si el denominador es 10. Para que los R_f sean reproducibles deben ser fijadas una serie de condiciones como el espesor de la placa, la fase móvil, la fase estacionaria y la cantidad de muestra. El máximo valor de R_f que se puede alcanzar es de 1.

Para averiguar si dos compuestos son iguales, se colocan ambos sobre la misma placa y se desarrolla con varios eluyentes. Una vez desarrollados se calculan los R_f y si son distintos, puede deducirse con toda seguridad que no se trataba del mismo compuesto. Por el contrario si los R_f son iguales los compuestos pueden ser iguales o no serlo.

Si se sospecha que dos compuestos son muy parecidos se eluyen sobre la misma placa con el mismo eluyente u otros de menor polaridad, hasta apreciar una separación mínima. En este caso no se pueden usar reveladores químicos, ya que alterarían los compuestos, sino se emplea una lámpara ultravioleta (Abbott D. & Andrews R.S., 1973).

En algunos casos, es más conveniente expresar el movimiento de alguna sustancia por comparación con el movimiento de otra que sea similar químicamente. En este caso es mejor aplicar los valores de R_x que los de R_f :

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por la sustancia}}{\text{distancia recorrida por la sustancia estándar } X}$$

[Ec. 2.2]



2.6.2 Cromatografía en columna

La cromatografía en columna emplea el concepto de elución en columna. La elución implica el transporte de una especie a través de una columna por la adición continuada de fase móvil. El proceso empieza cuando una única porción de la muestra se introduce en la parte superior de la columna (tiempo t_0) después de lo cual los componentes de la muestra se distribuyen entre las dos fases, La introducción de fase móvil adicional, *el eluyente*, hace que la fase móvil que contiene una parte de la muestra avance por la columna, donde tienen lugar un reparto entre la fase móvil y las porciones frescas de la fase estacionaria a las que accede (tiempo t_1). Al mismo tiempo, tiene lugar una distribución entre el disolvente nuevo y la fase estacionaria en el lugar en el que inicialmente se ubicaba la muestra (*Figura 5*).

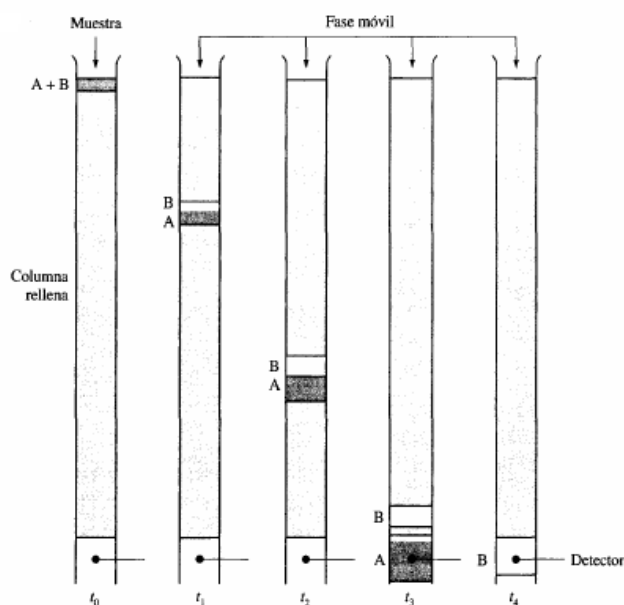


Figura 5. Diagrama que muestra la separación de una mezcla por cromatografía de elución en columna

Las sucesivas adiciones de la fase móvil hacen avanzar las moléculas de soluto (analitos) por la columna en una serie de continuas transferencias entre las fases estacionaria y móvil. Sin embargo, debido



a que el movimiento de los solutos solo puede ocurrir en la fase móvil, *la velocidad* media a la que una zona de soluto migra en la columna *depende de la fracción de tiempo que reside en esta fase*. Esta fracción de tiempo es pequeña para las sustancias que son retenidas fuertemente por la fase estacionaria (compuesto B) y es grande cuando es más probable la retención en la fase móvil (componente A). Las diferencias de velocidad que resultan hacen que se separen los componentes de la mezcla en bandas o zonas, que se localizan a lo largo de la columna (tiempo t_2). El aislamiento de las especies separadas se realiza haciendo pasar suficiente cantidad de fase móvil a través de la columna hasta que las bandas individuales salen de ella, pudiendo así detectarse o reconocerse (tiempos t_3 y t_4).

La cromatografía en columna es uno de los principales métodos para la separación de especies químicas. Además, se puede emplear para la identificación tanto cualitativa como para la determinación cuantitativa de las especies separadas.

En el análisis cualitativo, la cromatografía proporciona información acerca de las especies de la muestra en cuanto a su tiempo de retención o su posición en la fase estacionaria tras el periodo de elución. A pesar de lo anterior, la cromatografía no aporta mucha información de la identificación positiva de las especies químicas separadas, pero sí es un método eficaz para evidenciar la ausencia de ciertos compuestos.

La información cuantitativa acerca de las especies separadas, se basa en la comparación de la altura o el área, del pico del analito con la de uno o más patrones.



2.6.2.1 Cromatografía de gases (GC)

La cromatografía de gases es una técnica cromatográfica en la que la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de gas inerte. A diferencia de los otros tipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito; su única función es la de transportar el analito a través de la columna.

Existen dos tipos de cromatografía de gases (GC): la cromatografía gas-sólido (GSC) y la cromatografía gas-líquido (GLC), siendo esta última la que se utiliza más ampliamente, y que se puede llamar simplemente cromatografía de gases (GC). En la GSC la fase estacionaria es sólida y la retención de los analitos en ella se produce mediante el proceso de adsorción. Precisamente este proceso de adsorción, que no es lineal, es el que ha provocado que este tipo de cromatografía tenga aplicación limitada, ya que la retención del analito sobre la superficie es semipermanente y se obtienen picos de elución con colas. Su única aplicación es la separación de especies gaseosas de bajo peso molecular. La GLC utiliza como fase estacionaria moléculas de líquido inmovilizadas sobre la superficie de un sólido inerte.

2.6.2.1.1 Componentes del equipo GC

La cromatografía de gases se lleva a cabo en un cromatógrafo de gases (GC). Éste consta de diversos componentes como el gas portador, el sistema de inyección de muestra, la columna (generalmente dentro de un horno), y el detector.

2.6.2.1.1.1 Gas portador

El gas portador cumple básicamente dos propósitos: Transportar los componentes de la muestra, y crear una matriz adecuada para el detector. Un gas portador debe reunir ciertas condiciones:



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.): Implicaciones analíticas

- ✓ Debe ser inerte para evitar interacciones (tanto con la muestra como con la fase estacionaria)
- ✓ Debe ser capaz de minimizar la difusión gaseosa
- ✓ Alta pureza
- ✓ Adecuado al detector a utilizar
- ✓ Económico

El gas portador debe ser un gas inerte, para prevenir su reacción con el analito o la columna. Generalmente se emplean gases como el helio, argón, nitrógeno, hidrógeno o dióxido de carbono, y la elección de este gas en ocasiones depende del tipo de detector empleado. El almacenaje del gas puede ser en tanques normales o empleando un generador, especialmente en el caso del nitrógeno y del hidrógeno. También se tiene un sistema de manómetros y reguladores de flujo para garantizar un flujo estable.

Generalmente la regulación de la presión se hace a dos niveles: un primer manómetro se sitúa a la salida del tanque del gas y el otro a la entrada del cromatógrafo, donde se regula el flujo. Las presiones de entrada varían entre 10 y 25 psi, lo que da lugar a caudales de 25 a 150 mL/min en columnas de relleno y de 1 a 25 mL/min en columnas capilares. El caudal se mide utilizando un rotámetro o un medidor de bombas de jabón, el cual proporciona una medida muy exacta del caudal volumétrico que entra a la columna.

La pureza de los gases es sumamente importante, se requieren niveles de pureza del 99.999 %. Sin embargo, debido al cuidado que se debe tener con la fase activa de la columna, se hace completamente necesaria la instalación de trampas a la entrada del gas carrier. Estas trampas evitan el ingreso de hidrocarburos, agua, CO entre otros.



2.6.2.1.1.2 Sistema de inyección de muestra

La inyección de muestra es un apartado crítico, ya que se debe inyectar una cantidad adecuada, y debe introducirse de forma rápida para evitar el ensanchamiento de las bandas de salida; este efecto se da con cantidades elevadas de analito. El método más utilizado es empleando una microjeringa para introducir el analito en una cámara de vaporización instantánea. Esta cámara está a 50 °C por encima del punto de ebullición del componente menos volátil, y está sellada por una junta de goma de silicona llamada septa.

Si la columna empleada es rellena, el volumen a inyectar será de unos 20 μL , y en el caso de las columnas capilares dicha cantidad es menor, de 1 μL , y dependiendo del tipo de columna capilar se utiliza o no, todo el volumen inyectado de muestra. Para obtener menor cantidad de volumen, se utiliza un divisor de flujo (modo Split) a la entrada de la columna que desecha parte del analito introducido. Si se utiliza todo el volumen de muestra la inyección se emplea el modo Splitless.

2.6.2.1.1.3 Columnas

En GC se emplean dos tipos de columnas: las *empacadas* y las *capilares*. Estas últimas son más comunes en la actualidad debido a su mayor rapidez y eficiencia. La longitud de estas columnas es variable, de 2 a 60 metros, y están construidas en acero inoxidable, vidrio, sílice fundida o teflón. Debido a su longitud y a la necesidad de ser introducidas en un horno, las columnas suelen enrollarse en una forma helicoidal con diámetros de 10 a 30 cm, dependiendo del tamaño del horno.



2.6.2.1.1.3.1 Tipos de columnas

2.6.2.1.1.3.1.1 Columnas empacadas

Las columnas de relleno o empacadas consisten en unos tubos de vidrio, metal (acero inoxidable, Níquel, Cobre o Aluminio) o teflón, de longitud de 2 a 3 metros y un diámetro interno de unos pocos milímetros. El interior se rellena con un material sólido, finamente dividido para tener una máxima superficie de interacción y recubierto con una capa de espesores entre 50 nm y 1 μm . Para que puedan introducirse en el horno, se enrollan convenientemente.

El material de relleno ideal consiste en pequeñas partículas, esféricas y uniformes, con una buena resistencia mecánica, para tener una máxima superficie donde interaccionar la fase estacionaria y el analito. Como todos los componentes de columnas para GC, debe ser inerte a altas temperaturas ($\sim 400\text{ }^{\circ}\text{C}$) y humectarse uniformemente con la fase líquida estacionaria durante el proceso de fabricación. El material preferido actualmente, es la tierra de diatomeas natural, debido a su tamaño de poro natural. Por tanto y debido a que el sistema de absorción superficial del analito y la fase estacionaria es parecido, son materiales especialmente útiles.

El tamaño de partículas es crítico a la hora de darse el proceso de interacción del analito, y a menor tamaño la eficiencia de la columna es mayor.

2.6.2.1.1.3.1.2 Columnas capilares

Las columnas capilares son de dos tipos básicos: las de pared recubierta (WCOT) y las de soporte recubierto (SCOT). Las WCOT son simplemente tubos capilares donde la pared interna se ha recubierto con una finísima capa de fase estacionaria. Las columnas SCOT tienen en su parte interna una fina capa de material absorbente como el



empleado en las columnas empacadas, donde se ha adherido la fase estacionaria. Las ventajas de las SCOT frente a las WCOT es la mayor capacidad de carga de esta última, ya que en su fabricación se emplean mayores cantidades de fase estacionaria, teniendo así una superficie de intercambio mayor.

Considerando la eficacia de las columnas podemos darles el siguiente orden: En primer lugar están las WCOT, luego las SCOT y por último las columnas de relleno.

Las columnas WCOT se fabrican a partir de sílice fundida, conocidas como *columnas tubulares abiertas de sílice fundida* o FSOT. Estas columnas, con propiedades como baja reactividad, resistencia física y flexibilidad, han sustituido a las WCOT clásicas.

Las columnas FSOT tienen diámetros internos variables, entre 250 y 320 μm para columnas normales, y 150-200 μm para columnas de alta resolución. Estas últimas requieren menor cantidad de analito y un detector más sensible, al eluir menor cantidad de gas. Existen asimismo columnas *macrocapilares* con diámetros de hasta 530 μm , que admiten cantidades de analito comparables a las de relleno.

En estas columnas existe un problema debido a la absorción del analito sobre la superficie de la sílice fundida, adsorción debida a la presencia de grupos silanol (Si-OH), los cuales interaccionan fuertemente con moléculas polares orgánicas. Este inconveniente se suele solventar inactivando la superficie por sililación con dimetilclorosilano (DMCS).

2.6.2.1.1.4 Tipos de fases estacionarias

Las propiedades necesarias para una fase estacionaria líquida inmobilizada son:



- ✓ Características de reparto (factor de capacidad y factor de selectividad α) adecuados al analito
- ✓ Baja volatilidad, el punto de ebullición de la fase estacionaria debe ser al menos 100 °C mayor que la máxima temperatura alcanzada en el horno
- ✓ Baja reactividad
- ✓ Estabilidad térmica, para evitar su descomposición durante la elución

Para elegir una debe tenerse en cuenta la polaridad del analito, ya que a mayor polaridad del analito, mayor polaridad deberá tener la fase estacionaria. Algunas fases estacionarias utilizadas actualmente son:

- *Polidimetilsiloxano*, fase no polar de uso general para hidrocarburos, aromáticos, polinucleares, drogas, esteroides y PCB.
- *Polifenilmetildifenilsiloxano* (10% fenilo), para ésteres metílicos de ácidos grasos, alcaloides, drogas y compuestos halogenados.
- *Polifenilmetilsiloxano* (50% fenilo), para drogas, esteroides, pesticidas y glicoles.
- *Politrifluoropropildimetilsiloxano*, para aromáticos clorados, nitroaromáticos, bencenos alquilsustituídos.
- *Polietilenglicol*, sirve para compuestos polares, también para compuestos como glicoles, alcoholes, éteres, aceites esenciales.
- *Polidicianoalildimetilsiloxano*, para ácidos grasos poliinsaturados, ácidos libres y alcoholes.

Generalmente, en columnas comerciales, la fase estacionaria se presenta enlazada y entre cruzada para impedir su pérdida durante las operaciones de elución o lavado. De esta forma se obtiene una monocapa adherida químicamente a la superficie de la columna. La reacción implicada suele ser la adición de un peróxido al líquido a fijar, iniciándose una reacción por radicales libres que tiene como resultado la



formación de un enlace carbono-carbono que además incrementa su estabilidad térmica.

Otros tipos de fases estacionarias son las quirales, las cuales permiten resolver mezclas enantioméricas. Este tipo de fases suelen ser aminoácidos quirales o algún derivado adaptado al trabajo en columna.

El grosor de la película varía entre 0,1 y 5 μ m; el grosor depende de la volatilidad del analito. Así, un analito muy volátil requerirá una capa gruesa para aumentar el tiempo de interacción y separar más efectivamente los diferentes componentes de la mezcla.

2.6.2.1.1.5 Sistemas de control de temperatura

La temperatura es una variable importante, ya que de ella va a depender el grado de separación de los diferentes analitos. Ésta depende del punto de ebullición del analito o analitos, como también la máxima temperatura de funcionamiento de la columna (fase estacionaria), y por lo general se ajusta a un valor igual o ligeramente superior a él. Para estos valores, el tiempo de elución va a oscilar entre 2 y 40 minutos. Si tenemos varios componentes con diferentes puntos de ebullición, se ajusta una *rampa de temperatura* que va aumentando ya sea de forma continua o por etapas. En muchas ocasiones, el ajustar correctamente la rampa puede significar separar o no los diferentes analitos. Es recomendable utilizar temperaturas bajas para la elución ya que aunque a mayor temperatura la elución es más rápida, se corre el riesgo de degradar los analitos.

2.6.2.1.1.6 Detectores

El detector es la parte del cromatógrafo que se encarga de determinar cuándo ha salido el analito de la columna.



Las características de un detector ideal son:

- ✓ *Sensibilidad*. Es necesario que pueda determinar con precisión cuándo sale analito y cuando sale sólo el gas portador
- ✓ *Respuesta lineal al analito* con un rango de varios órdenes de magnitud.
- ✓ *Tiempo de respuesta corto*, independiente del caudal de salida
- ✓ *Intervalo de temperatura de trabajo amplio*, desde temperatura ambiente hasta unos 350-400 °C, temperaturas típicas trabajo
- ✓ *Estabilidad y reproducibilidad*, es decir, a cantidades iguales de analito debe dar salidas de señal iguales
- ✓ *Alta fiabilidad y manejo sencillo*, o a prueba de operadores inexpertos
- ✓ *Respuesta selectiva y altamente predecible* para un reducido número de analitos.

Algunos tipos de detectores:

- Detector de ionización de llama o Flame Ionization Detector (FID)
- Detector de conductividad térmica o Thermal Conductivity Detector (TCD)
- Detector termoiónico o ThermoIonic Detector (TID)
- Detector de captura de electrones o Electrón-Capture Detector (ECD)
- Detector de emisión atómica o Atomic Emission Detector (AED)

Otros detectores minoritarios son el *detector fotométrico de llama* (PFD), empleado en compuestos como pesticidas e hidrocarburos que contengan fósforo o azufre.

2.6.2.1.2 Aplicaciones

La GC tiene dos importantes campos de aplicación. Por una parte su capacidad para separar mezclas orgánicas complejas, compuestos



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.): Implicaciones analíticas

organometálicos y sistemas bioquímicos. Otra aplicación es como método para determinar cuantitativa y cualitativamente los componentes de la muestra. Para el análisis cualitativo se suele emplear el tiempo de retención, que es único para cada compuesto dadas unas determinadas condiciones (mismo gas portador, rampa de temperatura y flujo), o el volumen de retención. Cuantitativamente, integrando las áreas de cada compuesto o midiendo su altura, con una curva de calibración adecuada se obtiene la concentración o cantidad presente de cada analito.



2.7 Espectrometría de masas

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

Un análisis por espectrofotometría de masas consta de las siguientes etapas:

1ra etapa. Atomización de la muestra

2da etapa. Conversión de una fracción significativa de los átomos formados en la etapa 1 en un flujo de iones

3ra etapa. Separación de los iones que se formaron en la etapa anterior con base en su relación masa/carga (m/z), donde m es el número de masa de ion en unidades de masa atómica y z es el número de cargas fundamentales

4ta etapa. Conteo del número de iones de cada tipo o medición de la corriente iónica producida cuando los iones formados a partir de la muestra inciden en un detector

Como la mayoría de los iones formados tienen una sola carga, m/z por lo regular es el número de masa del ion.

2.7.1 Fundamentos básicos

El espectrofotómetro de masas determina qué moléculas están presentes en una muestra, basándose en el principio de que las



moléculas poseen masas diferentes. Estos iones también tienen una carga, que significa que debido a ella tendrán movimiento bajo la influencia de un determinado campo eléctrico.

Estos iones se envían a un compartimiento de aceleración y se pasan a través de una lámina metálica. Se aplica un campo magnético a un lado del compartimiento que atrae a cada uno de los iones con la misma fuerza (suponiendo carga idéntica) y los desvía hacia un detector. Naturalmente, los iones más ligeros se desviarán más que los iones pesados porque la fuerza aplicada a cada ion es igual pero los iones ligeros tienen menos masa. El detector mide exactamente cuán lejos se ha desviado cada ion y, a partir de ese dato se calcula el cociente masa por unidad de carga (*Figura 6*). Con esta información es posible determinar o proponer la composición química de la muestra original (Skoog D. A., 2001).

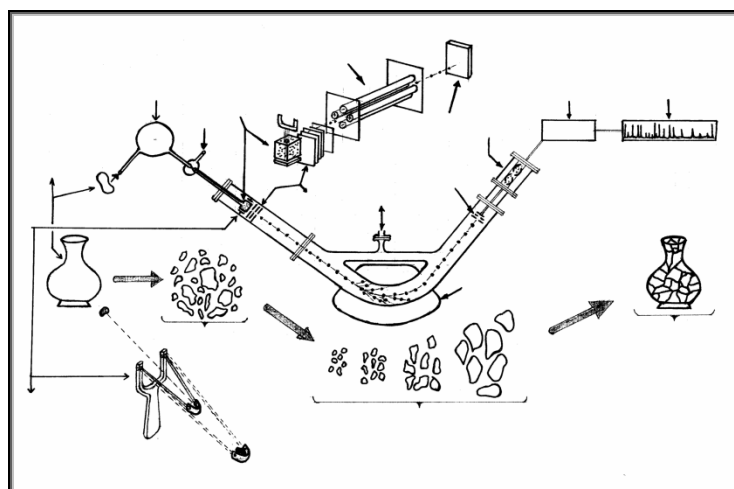


Figura 6. Representación esquemática del principio empleado en MS (Siles S., 2010)

2.7.2 Componentes

Un espectrómetro de masas consta de tres componentes fundamentales: la fuente de ionización, el analizador de masa y el detector.



2.7.2.1 Fuente de ionización

La *fente de iones* es el elemento del espectrómetro que ioniza la muestra analizada. Luego los iones son transportados por los campos magnéticos o eléctricos al analizador total.

Las técnicas para la ionización han sido dominantes para determinar qué tipos de muestras se pueden analizar por espectrometría de masa. La ionización del electrón y la ionización molecular se utilizan para los gases y los vapores.

2.7.2.2 Analizador de masa

El analizador de masa es la pieza más flexible del espectrómetro de masa. Utiliza un campo eléctrico o magnético para afectar la trayectoria o la velocidad de las partículas cargadas de una cierta manera.

Todos los analizadores totales utilizan las *fuerzas de Lorentz* de una manera u otra en la determinación de masa-carga, estáticamente o dinámicamente. Además de los tipos originales del área magnética, otros tipos de analizadores están actualmente en un uso más común, incluyendo tiempo-de-vuelo, la trampa cuadrupolo del ion, cuadrupolo y Fourier transforma analizadores de la masa de la resonancia del ciclotrón del ion.

Así, el analizador dirige las partículas al detector, variando un campo eléctrico o magnético que se basa en el cociente masa/carga (m/z).

Actualmente existen diferentes métodos para "filtrar" los iones respecto a su relación masa/carga. El más comúnmente usado es el denominado cuadrupolo. Se compone de 4 barras alargadas en formación cuadrada, conectadas eléctricamente entre sí en pares opuestos. A dichos pares (polos) se les aplica una tensión de radiofrecuencia variable que sintoniza con un determinado ion. Cuando existe sintonía entre el ion



que está pasando por ellas y la frecuencia aplicada, dicho ion continúa su camino hasta impactarse con el detector.

2.7.2.3 Detector

El detector registra la carga inducida o la corriente producida cuando un ion pasa cerca o golpea una superficie. En un instrumento de exploración la señal es producida en el detector durante la trayectoria de la misma (en qué m/z) y producirá un espectro de masa, un expediente del m/z en el cual los iones están presentes.

2.7.3 Interpretación de espectros de masas

La interpretación de un espectro de masas se realiza aplicando la siguiente regla: Una molécula fragmentará en un espectrómetro de masas de manera tal que se formarán los iones más estables.

Tomando en cuenta lo anterior, se concentran los pasos que se deben seguir para la interpretación de espectros de masa:

1. Examinar el aspecto general del espectro de masa
2. Seleccionar un candidato para el ion molecular ($M^{+\bullet}$). Ésta puede estar basada en los criterios que se muestran a continuación:

✓ Sí el compuesto es conocido, el ión molecular tendrá una razón m/z igual a la suma de las masas atómicas de los isótopos más abundantes de los elementos que forman la molécula.

✓ Si el compuesto contiene solamente C, H, O, Si, P y halógenos, la razón m/z nominal del ión molecular deberá ser un número par.

✓ Regla del Nitrógeno: Los compuestos que contienen un número impar de átomos de nitrógeno en su molécula, tendrán un peso molecular impar.

3. Examinar el espectro buscando patrones isotópicos característicos



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

4. Evaluar el candidato a $M^{+\bullet}$, buscando señales correspondientes a pérdidas razonables
5. Identificar el pico base del espectro, observar si puede proponerlo como un fragmento del ión molecular o identificar como un fragmento de masa característica
6. Buscar otros fragmentos de masa baja característicos
7. Basándose en los criterios antes mencionados, proponer estructura para el compuesto



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

Este es una técnica analítica que combina las características de la cromatografía de gases y la espectrometría de masas para identificar diferentes sustancias dentro de una muestra. Algunas de las aplicaciones de la técnica GC-MS incluyen la detección de drogas, análisis ambiental, investigaciones forenses, e identificación de muestras desconocidas. Además, se pueden identificar trazas de componentes en las muestras, que se creía degradados o desintegrados más allá de la identificación.

El GC-MS se compone de dos bloques principales: el cromatógrafo de gas y el espectrómetro de masas. Estos dos componentes, juntos, permiten la identificación de sustancias con un mayor grado eficacia, que empleando ambas técnicas por separado.

El proceso de espectrometría de masas requiere, generalmente, una muestra pura, mientras que la cromatografía de gases utilizando un detector común (por ejemplo un FID) detecta múltiples moléculas que pueden tener el mismo tiempo de retención, lo que deriva en dificultades para la identificación de dichas moléculas. En otras ocasiones, se presentan dos moléculas diferentes con un patrón similar de fragmentación en un espectrómetro de masas. Por lo que, la combinación de las dos técnicas (GC-MS) hace que sea extremadamente improbable que dos moléculas diferentes se comporten de la misma manera, proporcionando una mayor certidumbre en la identificación del analito.

En conclusión, es una técnica analítica que proporciona resultados absolutos y confiables.



2.9 Antecedentes

El estudio de Cavallito C. J. & Bailey J. H. (1944) fue el primero que logró el aislamiento de la alicina del ajo macerado en aceite obtenido por destilación, determinando que es un aceite incoloro con una solubilidad en agua de un 2.5 % y relativamente inestable. Demostró también, la acción antibacterial del compuesto.

El análisis de los componentes volátiles del ajo sometido a diversos procesos de cocción, fue realizado por Yu T. H. & col. (1993) extrayendo los componentes por arrastre de vapor con pentano/éter (1:1) y analizando los extractos con GC y GC-MS, encontrando un total de 41 componentes en las cinco muestras.

En uno de sus trabajos, Block E. & col. (1993) realiza extracciones de diversas especies de *Allium* (Ajo, cebolla, etc.) con cloruro de metileno para después analizarlas por cromatografía de gases, GC-MS y HPLC, reportando 15 principales tiosulfatos presentes en los extractos. Concluyendo que la GC y GC-MS presentan componentes formados por la degradación de sus precursores, debido a las altas temperaturas que emplean ambos métodos.

En el año 1992, Block E. & col. realizaron el análisis de los tiosulfatos presentes en nueve especies de *Allium*, realizando las extracciones con diclorometano para su evaluación inmediata por método en HPLC, concluyendo que el estudio de los perfiles de tiosulfatos pueden ser de gran utilidad para fines taxonómicos de las especies *Allium*.

Kim S. M. & col. (1995) realiza un estudio sobre el efecto del aceite de soya en los compuestos volátiles del ajo, aplicando la destilación por arrastre de vapor como método de aislamiento a muestras de ajo con y sin aceite de soya, usando como solventes extractivos pentano/diéter (1:1). Para la identificación de los compuestos volátiles en las muestras emplearon análisis en GC-MS y HPLC. Concluyen que el aceite



de soya puede eliminar algunos compuestos o factores que reaccionan con algunos de componentes volátiles, en especial con la alicina.

Para el estudio de la obtención y caracterización de la oleorresina del ajo, Durán M. A. & col. (2007), emplearon dos sistemas de extracción, soxhlet y en frío con agitación usando como solvente de extracción al éter etílico. Para analizar por GC-MS los extractos y determinar los componentes volátiles presentes en ellos. Encontraron siete compuestos principales, sin embargo la alicina no se detectó en el análisis de forma directa, pero sí productos de su degradación.

En la determinación de los componentes sulfurados en los extractos de ajo que realizó Artacho M. R. & col. (1995), las extracciones se realizaron con éter etílico y el análisis de componentes con un método de GC-MS. Identificando diez componentes, de los cuales, el compuesto de mayor presencia fue 2-vinil-4(H)-1,3-ditiína, con una concentración de 839 mg / 100g, y el compuesto menos abundante fue trisulfuro de dimetilo (0.075 mg / 100 g).

El método HPLC en el análisis de alicina en ajos se registró por primera vez en el año de 1985 por Miething H., quien analizó extractos de éter dietílico de ajo y otros productos de ajo, utilizando HPLC con columna de sílice. Desde entonces se han reportado trabajos sobre el análisis de ajo por el método HPLC y al mismo tiempo hay diferencias significativas en las técnicas empleadas.

En el año de 1988, Mochizuki E. & Nakayama A. proponen un método por cromatografía de líquidos (LC) para la determinación de aliína (compuesto precursor de la alicina) en el ajo y en productos de ajo. El método consistió en calentar la muestra en un baño de agua hirviendo seguida por la homogenización y centrifugación. La recuperación de aliína fue mayor al 90%.



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.): Implicaciones analíticas

Block E. & col. (1992), en este trabajo concluyeron que la cromatografía de gases presenta una composición errónea de los extractos de varias especies *Allium*, debido a las altas temperaturas con las que opera el método, lo que provoca la degradación de algunos componentes como la alicina. Por esa razón, realizaron el análisis de los extractos de ajo por HPLC ofreciendo resultados fiables de la presencia de compuestos volátiles en muestras de ajo.

Lawson L. D. & col. (1991) demostraron a través de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), la variación del contenido de compuestos sulfurosos en diversos productos de ajo, concluyendo que los productos de aceite de ajo contenían aproximadamente la misma cantidad del total de compuestos que los dientes de ajos recién homogenizados, sin embargo, los productos de ajo macerado en aceite presentaban sólo el 20%, mientras que los productos de ajo en polvo variaban de 0 a 100%. Los productos de ajo pulverizado en suspensión de gel o en disolución acuosa de alcohol no contenían cantidades detectables de compuestos de azufre. Identifican 22 compuestos de su interés.

En otro trabajo, Lawson L. D. & col. (1991) utilizaron el método HPLC en fase inversa para separar y cuantificar todos los tiosulfinatos detectables, incluyendo configuraciones isoméricas, en dientes de ajo. Se encontraron cinco tiosulfinatos no identificados en trabajos anteriores. Proponen el método empleado para la estandarización en la cuantificación de alicina en muestras de ajo fresco.

Mondy & col. (2001) en un análisis comparativo entre GC-MS y HPLC para la evaluación de volátiles en especie *Allium*, concluyen que el análisis por HPLC era el más adecuado ya que trabaja a temperatura ambiente y permite separaciones a menor tiempo, y debido a la naturaleza termolábil de los compuestos de volátiles, la cromatografía de gases provoca la degradación de varios de ellos.



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.): Implicaciones analíticas

En la evaluación del contenido de alicina en ecotipos de ajo de Irán, Baghalian K. & col. (2005) aplicaron el análisis por HPLC a los 24 ecotipos de ajo recolectados de las principales zonas de cultivo de Irán. Concluyendo que los 24 ecotipos contenían altas concentraciones de alicina y que los valores registrados fueron superiores a los de calidad farmacéutica.



Cuadro 5. Compuestos sulfurados reportados en estudios anteriores

Nombre del compuesto	Tiempo de Retención (R _T) min				
	Kim S.M. & col. 1995	Durán M.A & col. 2007	Artacho R.M. & col. 1995	Yu T. H. & col. 1993	Mondy N. & col. 2001
	Extracción por destilación por arrastre de vapor Ajo fresco (Con y sin aceite de soya) Solventes Pentano y Éter dietílico 60°C, 4 min; 2°C/min; 200°C, 30 min	Extracción Soxhlet Ajo fresco Solventes Etanol 75%, hexano y una mezcla (1:1) de ambos 35°C a 280°C, 34 min	Extracción por macerado y destilación por arrastre de vapor Ajo fresco Solvente Éter dietílico 50°C, 1 min; 1°C/min; 150°C, 1 min	Extracción por arrastre de vapor Ajo sometido a cocción Solvente mezcla pentano/éter (1:1) 40°C, 10 min; 1.5 °C/min; 200°C, 60 min	Extracción sólido-líquido simple Ajo fresco Solvente Éter dietílico 70°C a 250°C, 5°C/min
Metil alil sulfuro	7.30	-	6.25	6.00	-
Dimetil disulfuro	10.25	-	7.50	9.00	-
Sulfuro dialílico	13.00	-	8.50	11.00	-
CH ₃ -SO-S-CH=CH-CH ₃	-	-	-	-	12.5
CH ₃ -CH=CH-SO-S-CH ₃	-	-	-	-	13.00
Metil alil disulfuro	19.91	-	11.30	17.30	-
Dimetil trisulfuro	25.93	-	13.00	25.30	-
Alil propil disulfuro	29.02	-	-	29.50	-
Disulfuro de dialilo	32.46	12.88	15.00	34.60	-
Metil alil trisulfuro	39.48	-	17.50	42.60	-
3-vinil-[4H]-1,2-ditiína	48.46	14.68	21.50	53.00	17.00
Trisulfuro de dialilo	51.65	16.03	23.50	60.00	-
2-vinil-[4H]-1,3-ditiína	54.99	14.98	26.30	62.70	19.00
Alicina	-	-	-	-	30.00



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.): Implicaciones analíticas

Considerando estos antecedentes (*Cuadro 5*) se propone el desarrollo de un método de extracción sólido-líquido asistido por agitación con ultrasonido, lo que se cree minimizará la degradación de los compuestos activos presentes en el ajo. En el proceso se evaluará el efecto de solventes medianamente polares (cloroformo y acetato de etilo) en la extracción de compuestos de interés.

Los extractos obtenidos a través del método propuesto, se analizarán empleando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) para determinar su composición.



2.10 Hipótesis

La extracción sólido líquido con un solvente orgánico mediante un baño de ultrasonido a temperatura ambiente, permite la obtención de compuestos activos volátiles termosensibles, minimizando las pérdidas y la degradación.



2.11 Objetivo general

Evaluar el proceso de extracción y purificación de los componentes sulfurados contenidos en el ajo fresco.

2.11.1 Objetivos específicos

1. Evaluar el proceso de extracción con solventes de diferentes polaridades
2. Evaluar el efecto de la polaridad en la obtención de la mayor cantidad de compuestos sulfurados
3. Evaluar el proceso de purificación de los extractos orgánicos
4. Analizar las fracciones purificadas a través de métodos analíticos
5. Determinar los componentes sulfurados contenidos en los extractos de ajo



Capítulo 3. Metodología

Se evaluará un proceso de extracción sólido-líquido asistido por agitación con ultrasonido de muestras de ajo fresco con el siguiente método:

3.1 Selección de muestra

Se usa como materia prima, ajos morados tipo chino de calibre 6 (*Figura 7*). Se separan los dientes de ajo, eliminando la cáscara exterior manualmente, y se eligen los que no presenten daños



Figura 7. Ajos morados tipo chino con 56mm a 65mm de diámetro

3.2 Preparación de la muestra

Los bulbillos de ajo seleccionados, se trituran en un molino eléctrico (Marca Krups, modelo GX410011), tomando 123 gr de muestra (Balanza electrónica Marca Denver Instrument, modelo XS-210) a los que se agregan 350 ml de solvente que se propone para la extracción.

Para la evaluación del efecto de la polaridad de los solventes en la extracción, se emplearan cloroformo ($K= 4$) y acetato de etilo ($K=6.8$).



3.3 Proceso de extracción

Las muestras se someten a la agitación en baño de ultrasonido (Marca Fisher Scientific, modelo FS36H) durante 60 minutos a temperatura ambiente, esto provocará daño en las estructuras celulares que favorecerán la extracción de metabolitos secundarios (*Figura 8*).



Figura 8. Proceso de extracción asistido por agitación con ultrasonido

Los extractos se filtran para separar los componentes sólidos suspendidos de la fase acuosa del extracto.

En la eliminación del solvente excedente de los extractos, se usa un sistema de rotavapor (Marca Büchi, modelo R-110) sin la necesidad de aplicar calor, evitando así la degradación y/o pérdida de compuestos (*Figura 9*).



Figura 9. Eliminación del solvente

Los extractos orgánicos totales (EOT) obtenidos se identificarán como: **eot-1** al extracto que uso cloroformo y **eot-2** al de acetato de etilo. Se les realizarán las pruebas analíticas que determinen la composición química de ambos.



3.4 Pruebas analíticas

3.4.1 Cromatografía en capa fina (TLC)

La prueba de TLC se realizará en placas cromatográficas de silicagel (Marca Merck, FG254 de 3x10 cm). Usando un tubo capilar, se toma una alícuota del extracto y se toca la superficie de la placa, a una distancia al borde inferior de un centímetro y Secar el punto de toque en la placa con una pistola de aire (Marca Master, HG-501).

La placa se coloca en un recipiente saturado con el vapor de la fase móvil [tolueno/acetato de etilo (3:1)], el solvente ascenderá hasta quedar a unos 0.5 cm del borde. Así, los compuestos permanecen en la placa, y la distancia recorrida por el solvente es fija. Al retirar la placa del recipiente, secar nuevamente para eliminar la fase móvil excedente.

Los métodos usados para el revelado de las cromatoplasas, son:

- a) Método físico, expone la placa a luz ultravioleta
- b) Método químico, expone la placa a vapores de Iodo, que reaccionan con los compuestos formando complejos coloreados en tonos amarillo-marrón



3.4.2 Separación por cromatografía en columna

La cromatografía en columna separará las mezclas complejas de compuestos contenidas en los extractos, obteniendo fracciones purificadas de los extractos orgánicos totales.

3.4.2.1 Preparación de la columna cromatográfica

Esta etapa de la técnica de cromatografía en columna es clave, pues define la eficiencia y la separación de los componentes en la muestra.

A continuación se describe la preparación de ésta:

1. En un soporte universal se monta la columna, se verifica que la llave de flujo de la columna este cerrada. Un pedazo de fibra de vidrio se introduce al fondo de la columna, y se agregan aproximadamente 10 mL de fase móvil [Tolueno/Acetato de etilo (3:1)]. Se deben eliminar las burbujas de aire atrapadas en la fibra y fijar al fondo.
2. La columna se llena con una suspensión de silicagel (Marca Merck, Silicagel 40) y 50 mL de fase móvil. El empacado de la columna debe quedar compactado y libre de burbujas de aire (*Figura 10*).



Figura 10. Preparación de una columna cromatográfica



3.4.2.2 Adición de la muestra

La muestra del extracto (1 mL) se distribuye en la superficie de la columna. Abrir la llave de la columna y dejar que eluya hasta que el nivel de la muestra esté a 2mm de la superficie. Agregar fase móvil.

La velocidad de flujo será de 1 gota/seg.

Se colectarán fracciones de 10 mL para cada extracto orgánico total (EOT).



3.4.3 Análisis por GC-MS

Esta técnica de análisis identificará los compuestos químicos contenidos en los extractos orgánicos totales y en las fracciones purificadas. El análisis se realizará por duplicado de cada muestra (extractos y fracciones).



Figura 11. Equipo de GC-MS

El cromatógrafo de gases acoplado al espectrómetro de masas (marca Perkin Elmer, serie Clarus 500) emplea el software TurboMass, versión 5.4.2. (Figura 11). Las condiciones de operación del equipo de GC-MS, se muestran en el siguiente cuadro:

Cuadro 6. Condiciones de operación del equipo GC-MS

Parámetro	Especificaciones
Programa GC	
Columna	Elite 5 Wax (50% Fenilpolisiloxano); 30 m de longitud; 320 μ de diámetro interno; 5 μ de espesor de fase
Gas de Arrastre	Helio (He), 15 psi de presión
Split	50 %
Temperatura del inyector	200°C
Condiciones de temperatura	50 °C, 5 min; 50-200 °C, 25 °C/min; 200 °C, 2 min
Volumen de la muestra	2.5 μ l



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

Programa MS	
Temperatura de línea de transferencia	230 °C
Rango de lectura de masas	45-450 m/z
Tiempo de barrido	2 seg



Capítulo 4. Análisis de resultados

En este capítulo se analizarán los resultados de las pruebas analíticas realizadas a los extractos orgánicos **eot-1** y **eot-2**, y las fracciones obtenidas de ellos. Se evaluó el efecto de la agitación con ultrasonido en la extracción de compuestos de interés de las muestras de ajo, y el efecto de la polaridad de los solventes empleados en el proceso.

4.1 Extractos orgánicos totales

Los extractos orgánicos totales (EOT) resultantes del método de extracción sólido-líquido propuesto para este estudio, presentan características físicas diferentes originadas por la naturaleza del solvente de extracción empleado (*Figura 12*).



Figura 12. Extractos orgánicos totales eot-1 y eot-2

El efecto de la polaridad de los solventes en conjunto con el método propuesto se evaluó por medio de pruebas analíticas. Los resultados se muestran a continuación:

4.2 Cromatografía en capa fina

En las cromatoplasmas de los extractos orgánicos totales eot-1 y eot-2, se observa la presencia de compuestos orgánicos, que indican que el



proceso de extracción propuesto permite la obtención de compuestos de interés.

La información proporcionada puede observarse en la *Figura 13*, la presencia de compuesto es notable, sin embargo, la separación de éstos no es la adecuada y se corre el riesgo de saturar la columna del GC-MS.

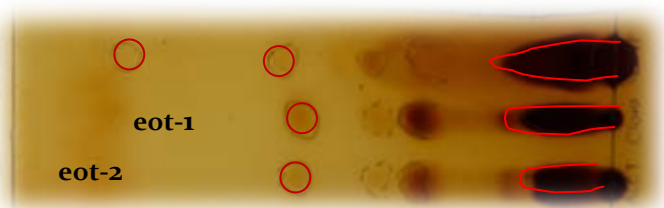


Figura 13. Presencia de compuestos orgánicos en los extractos eot-1 y eot-2

Esto lleva a realizar cromatografía en columna para obtener fracciones más purificadas de los extractos.

4.3 Separación por cromatografía en columna

Esta técnica permitió la separación de las mezclas complejas de compuestos, contenida en los extractos orgánicos, obteniendo 13 fracciones purificadas para cada uno (*Figura 14*).

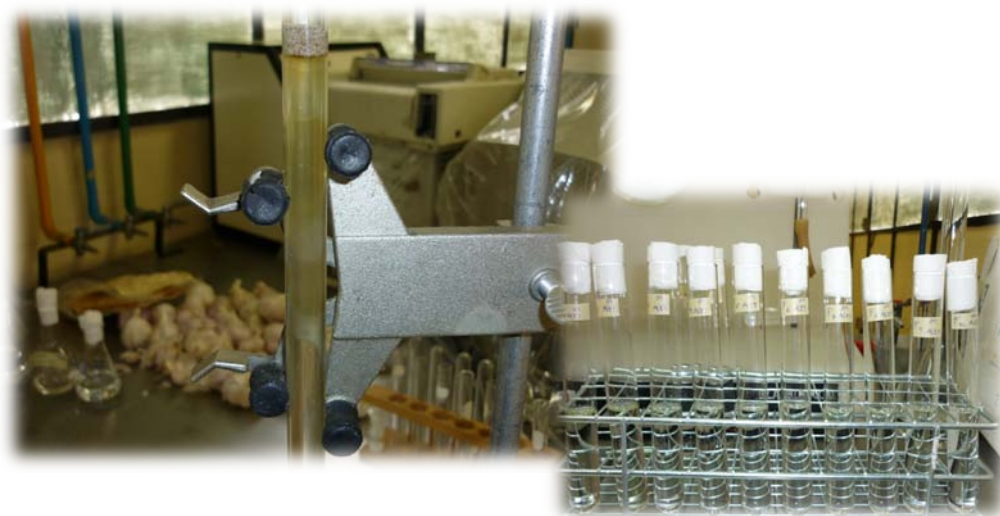


Figura 14. Purificación de los extractos orgánicos de ajo y fracciones obtenidas



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.): Implicaciones analíticas

Se hizo cromatografía en capa fina de las fracciones -2,4,6-, -1,3,5- y -8,10,13- de cada extracto **eot-1** y **eot-2**, para verificar la eficiencia en la separación de compuestos por cromatografía en columna (*Figuras 15 y 16*).

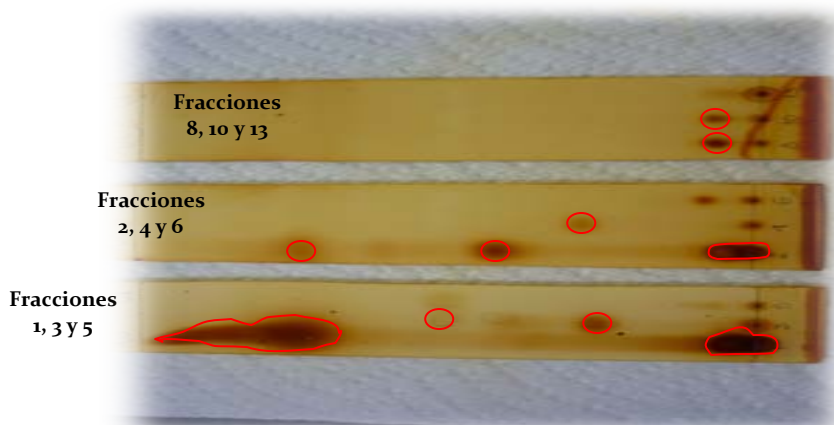


Figura 15. Cromatoplas de las fracciones del extracto eot-1

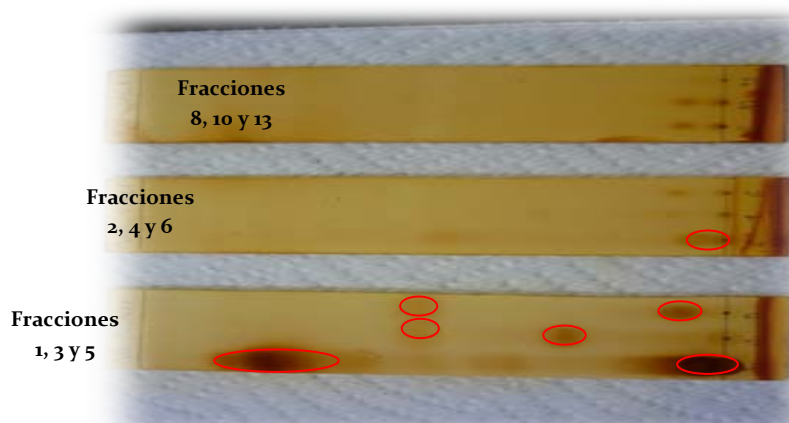


Figura 16. Cromatoplas de las fracciones del extracto eot-2

Basándose en los resultados de las placas, se eligieron las fracciones que mostraban la presencia de compuestos orgánicos (*Cuadro 7*) y se les realizó el análisis GC-MS correspondiente.



Cuadro 7. Fracciones seleccionadas para el análisis GC-MS

Extracto eot1	Extracto eot2
Fracción 1	Fracción 1
Fracción 2	Fracción 2
Fracción 3	Se juntan las fracciones 3, 4 y 5
Se juntan de la fracción 4 a la 12	Se juntan de la fracción 6 a la 12

La concentración de las fracciones elegidas para el análisis por GC-MS se efectuó con aire directo a la muestra (*Figura 17*).



Figura 17. Concentración de las fracciones

4.4 Resultados del Análisis por GC-MS

El análisis por GC-MS de los extractos orgánicos totales **eot-1** y **eot-2**, y de las fracciones obtenidas de ellos, dio como resultado diez fragmentogramas de la muestra, sin embargo, en la interpretación fueron descartados seis de ellos, debido a que no proporcionaron información de importancia.

Cabe mencionar que se realizaron cambios al programa GC-MS empleado para el análisis de las fracciones basando este criterio en la



información obtenida de los fragmentogramas de los extractos. Los cambios realizados se aplicaron a dos parámetros :

1. Condiciones de temperatura 60 °C, 3 min; 60-200 °C, 20 °C/min; 200 °C, 15 min para asegurar la ausencia de compuestos al término del tiempo de análisis empleado para los extractos orgánicos totales.
2. Rango de barrido: 25 a 450 m/z. Debido a la ausencia de iones con masa menor a 45 m/z, característicos en los compuestos presentes en los extractos orgánicos totales.

De los fragmentogramas, se generan espectros de masas de cada pico presente y la interpretación de cada uno identifica un compuesto químico presente en el extracto.

La interpretación de los espectros de masas, se realizó bajo los criterios mencionados anteriormente (*ver sección 2.7.3*) en combinación con la base de datos del National Institute of Standards and Technology (NIST, 2008).



4.4.1 Análisis de los fragmentogramas de los extractos (*ver Anexo 1*)

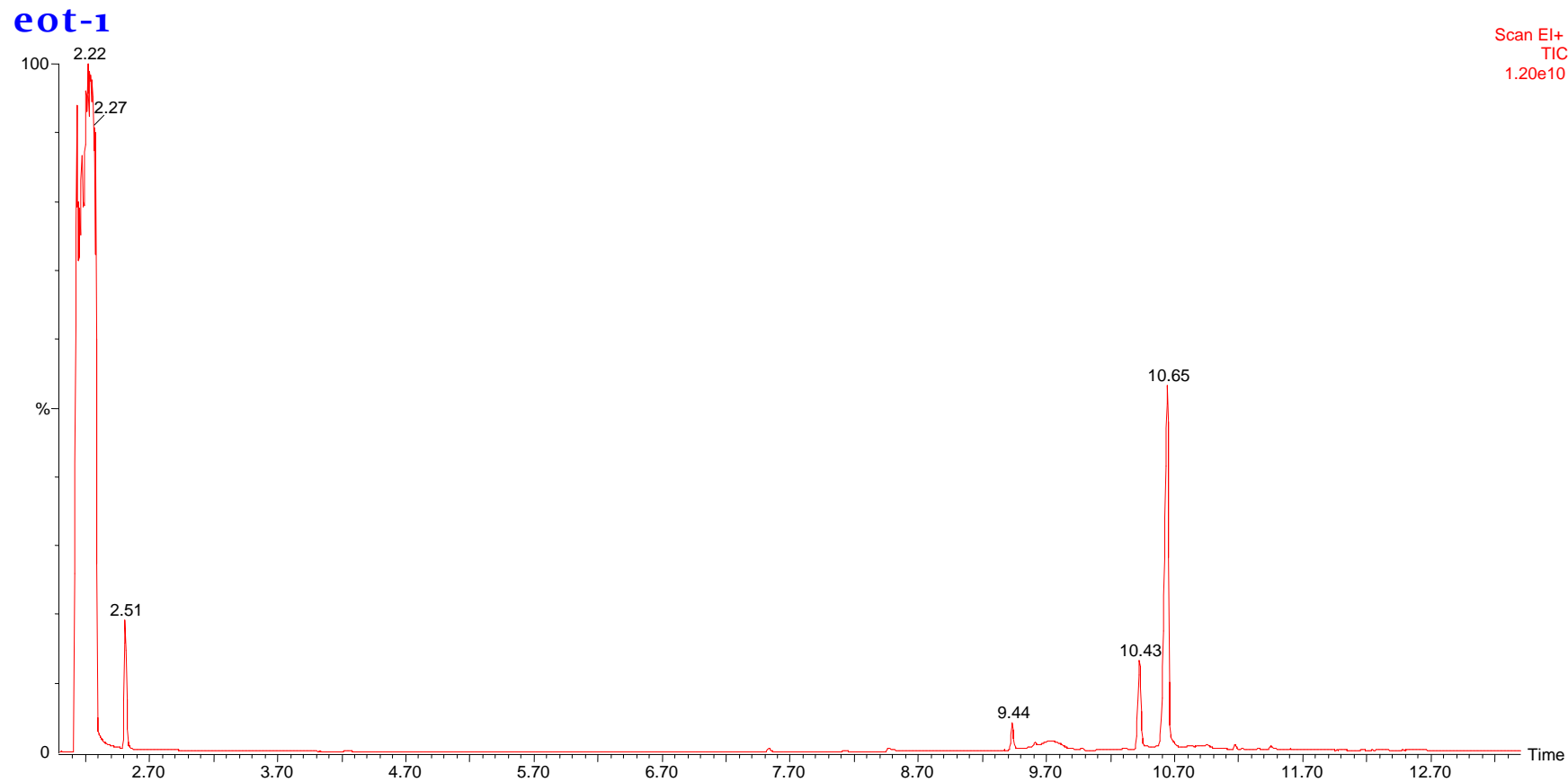


Figura 18. Fragmentograma del extracto eot-1



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

Los compuestos químicos encontrados en el extracto **eot-1** (*Figura 18*) se muestran a continuación:

Cuadro 8. Compuestos encontrados en el eot-1

Tiempo de Retención (min)	Nombre del Compuesto	Estructura
6.574	<i>Sulfuro de Alilo</i>	
7.537	<i>1,3 ditiína</i>	
8.470	<i>S-metil-metanotiosulfinato</i>	
9.439	<i>Disulfuro de dialilo</i>	
9.615	<i>Trisulfuro de dialilo</i>	
10.427	<i>3-vinil-1,2-ditiaciclohex-4-ano</i>	
10.649	<i>3-vinil-1,2-ditiaciclohex-5-ano</i>	



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

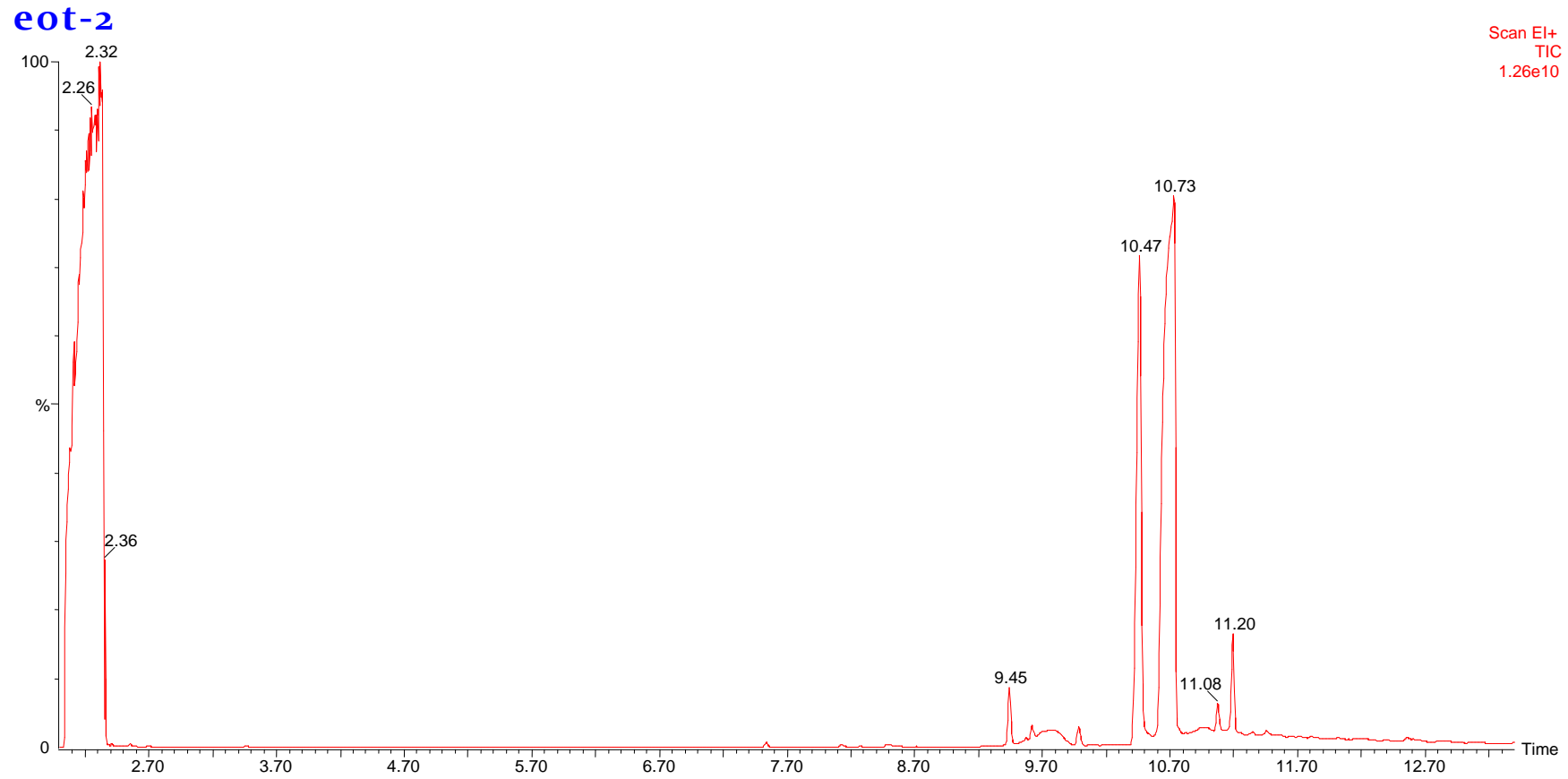
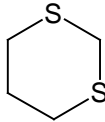
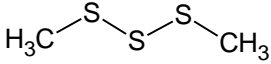
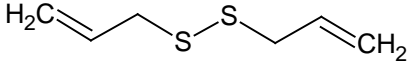
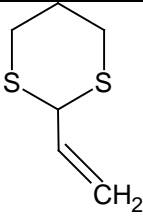
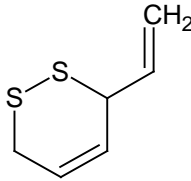
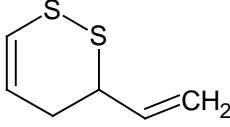
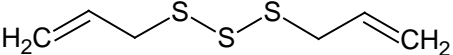


Figura 19. Fragmentograma del extracto eot-2



Los componentes químicos en el fragmentograma del extracto eot-2 de la *Figura 19* :

Cuadro 9. Compuestos encontrados en el eot-2

Tiempo de Retención (min)	Nombre del Compuesto	Estructura
7.537	<i>1,3 ditiína</i>	
8.279	<i>Trisulfuro dimetilo</i>	
9.448	<i>Disulfuro de dialilo</i>	
9.625	<i>2-vinil-1,3-ditiína</i>	
10.467	<i>3-vinil-1,2-ditiaciclohex-4-ano</i>	
10.734	<i>3-vinil-1,2-ditiaciclohex-5-ano</i>	
11.198	<i>Trisulfuro de dialilo</i>	

Ambos extractos presentan una composición química muy similar entre sí, a pesar de que los extractos orgánicos totales eran de características físicas muy diferentes.



4.4.2 Análisis de los fragmentogramas de las fracciones de los extractos (*ver Anexo 2*)

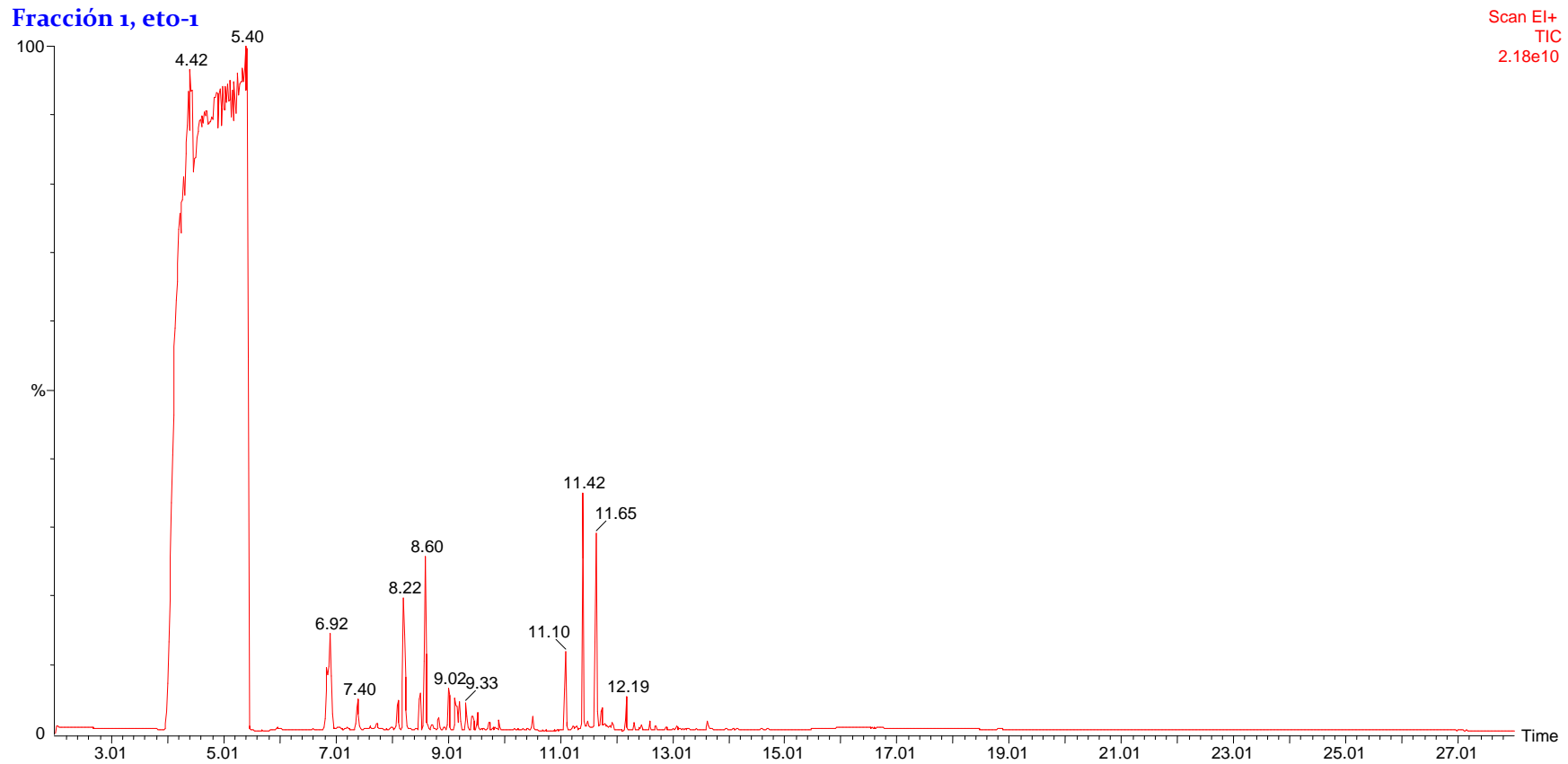


Figura 20. Fragmentograma de la fracción 1 del eot-1



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

Esta fracción (*Figura 20*) es la única donde se identifican compuestos de interés, los cuales se muestran en el *Cuadro 10* :

Cuadro 10. Compuestos identificados en la fracción 1 del eot-1

Tiempo de Retención (min)	Nombre del Compuesto	Estructura
10.518	<i>Alil metil sulfuro</i>	
10.701	<i>Metil etil disulfuro</i>	
11.102	<i>3-vinil-1,2-ditiaciclohex-4-ano</i>	
11.420	<i>3-vinil-1,2-ditiaciclohex-5-ano</i>	
11.752	<i>Trisulfuro de dialilo</i>	



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.): Implicaciones analíticas

Fracción 1, eot-2

Scan EI+
TIC
1.09e10

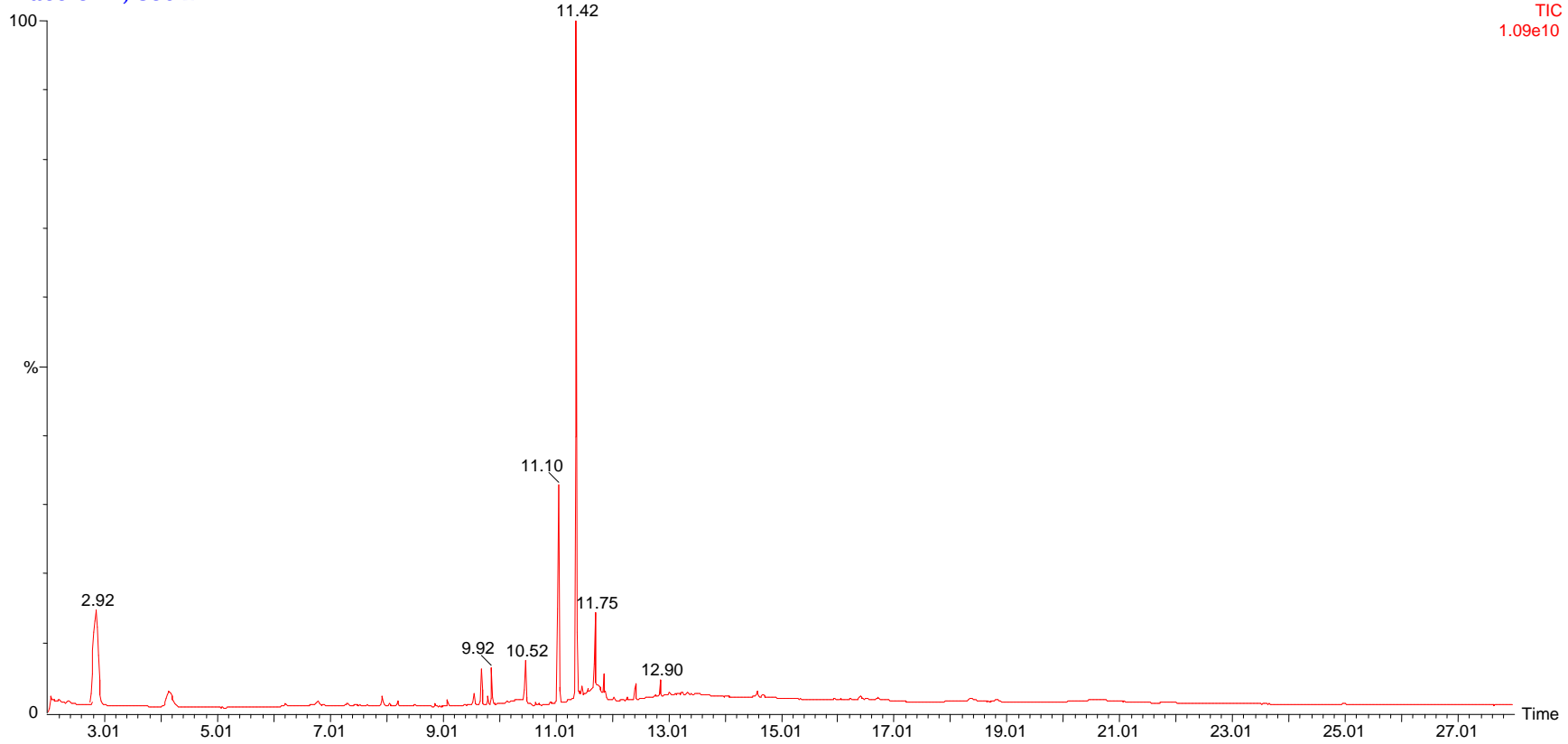


Figura 21. Fragmentograma de la fracción 1 del eot-2



La composición química de la fracción 1 del extracto eot-2 (Figura 21) se muestra a continuación (Cuadro 11):

Cuadro 11. Compuestos identificados en la fracción 1 del eot-2

Tiempo de Retención (min)	Nombre del Compuesto	Estructura
7.984	<i>Metil-2-propenil-disulfuro</i>	
8.101	<i>Metil-1-propenil-disulfuro</i>	
9.602	<i>S-metil-metanotiosulfinato</i>	
9.735	<i>Disulfuro de dialilo</i>	
10.519	<i>Alil metil sulfuro</i>	
11.103	<i>3-vinil-1,2-ditiaciclohex-4-ano</i>	
11.420	<i>3-vinil-1,2-ditiaciclohex-5-ano</i>	
11.753	<i>Trisulfuro de dialilo</i>	
12.086	<i>S-metil-1-propanotiosulfinato</i>	
12.320	<i>Alil ditioisobutirato</i>	



Sabiendo que, dependiendo del proceso de extracción los tiosulfatos se transforman en diferentes compuestos (Lawson L. D., 1993), al analizar los extractos de las muestras de ajo y de las fracciones obtenidas de estos, para evaluar el proceso de extracción propuesto y el efecto de los solventes en este, encontramos (*Cuadro 12*) :

Cuadro 12. Compuestos identificados en este estudio

Nombre del compuesto sulfurado
<i>Sulfuro de alilo</i>
<i>1,3 ditiína</i>
<i>Metil-2-propenil-disulfuro</i>
<i>Metil-1-propenil-disulfuro</i>
<i>Trisulfuro dimetilo</i>
<i>Disulfuro de dialilo</i>
<i>S-metil-metanotiosulfinato</i>
<i>Trisulfuro de dialilo</i>
<i>2-vinil-1,3-ditiína</i>
<i>Alil metil sulfuro</i>
<i>Metil etil disulfuro</i>
<i>3-vinil-1,2-ditiaciclohex-4-ano</i>
<i>3-vinil-1,2-ditiaciclohex-5-ano</i>
<i>S-metil-1-propanotiosulfinato</i>
<i>Alil ditioisobutirato</i>

De los compuestos identificados en las muestras analizadas por GC-MS, se encontraron compuestos como alilos y metil mono-, di-, y trisulfuros, reportados en trabajos anteriores como el de Lawson L. D. & col., 1991, son considerados productos de degradación de la alicina.



La presencia de estos compuestos se puede explicar basandose en el uso de temperaturas elevadas en el análisis de GC-MS, que aceleran el proceso de degradación de la alicina (*Figura 22*).

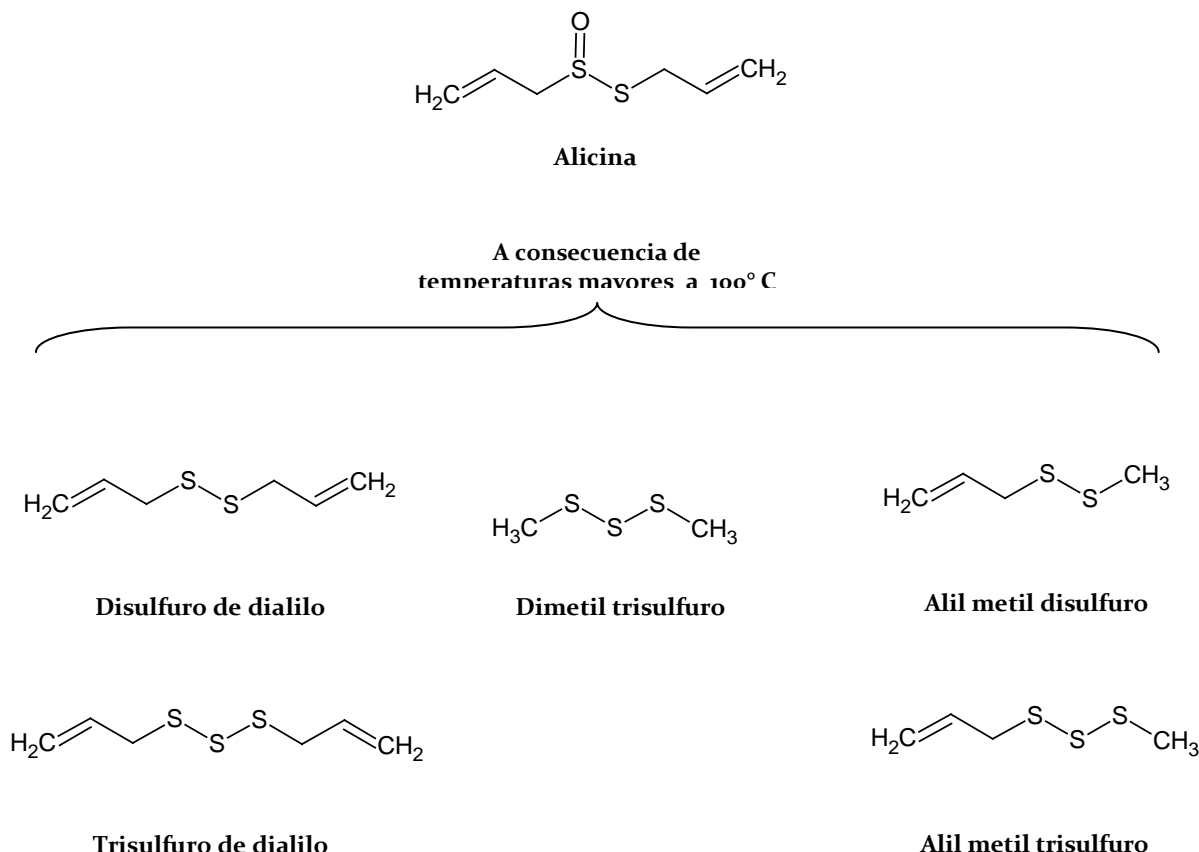


Figura 22. Principales compuestos de degradación de la alicina a causa de las temperaturas elevadas

La alicina no se identificó en los extractos ni en las fracciones de estos, se hallaba presente antes del análisis por GC-MS, y los compuestos de degradación encontrados evidencian este hecho.

Otros compuestos considerados como productos de la degradación de la alicina, debido a la temperatura empleada en el puerto de inyección en el equipo de GC-MS, son las vinil dtíinas, tal y como se reportó en el trabajo de Block E. & col., 1993 (*Figura 23*).



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.): Implicaciones analíticas

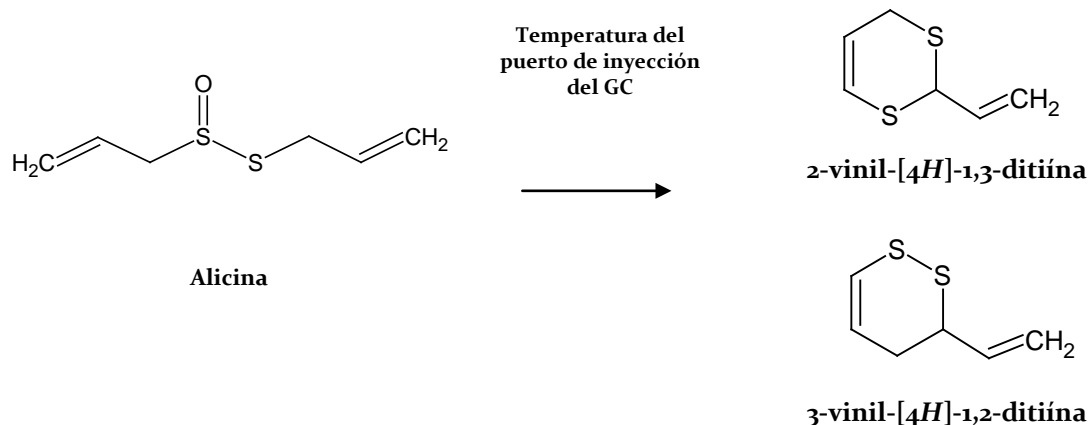


Figura 23. Degradación de la alicina bajo las condiciones de GC (Block E., 1993)

Otros compuestos encontrados en los extractos de ajo obtenidos por el método de extracción propuesto, *S*-metil-metanotiosulfinato, *S*-metil-1-propanotiosulfinato, son reportados como compuestos de la degradación de otros (Yu T. H. & col., 1994; Mochizuki E. & col., 1998), sin embargo, no definen el origen exacto de estos.

A pesar de que los compuestos hallados en los extractos **eot-1** y **eot-2** y las fracciones de estos, son productos de la degradación de la alicina, el número de ellos en cada extracto permite considerar que la extracción sólido-líquido por agitación con ultrasonido con acetato de etilo como solvente de extracción, obtiene y preserva más compuestos sulfurados volátiles.

En resumen se puede mencionar que:

- La alicina se identificó de forma indirecta, por la presencia de algunos compuestos de su degradación.
- Se identificaron compuestos polisulfurados que coinciden con resultados obtenidos en trabajos anteriores.



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.): Implicaciones analíticas

- La diferencia en la composición entre el extracto y su fracción puede deberse a la pérdida y/o degradación durante el proceso de purificación.
- La fracción del extracto en acetato de etilo, presenta la mayor cantidad de compuestos identificados, entre ellos, dos compuestos poco comunes (*S*-metil-1-propanotiosulfinato y Alil ditioisobutirato).



Capítulo 5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

La capacidad de extracción del método propuesto, permite la obtención de extractos orgánicos totales cuyo contenido de compuestos sulfurados es de importancia.

El efecto de la polaridad de los solventes orgánicos empleados en la obtención de extractos orgánicos totales de ajo se evaluó demostrando que a pesar de poseer una polaridad similar, la pequeña diferencia en sus constantes dieléctricas (cloroformo $K = 4.8$ y acetato de etilo $K = 6$) es suficiente para que a nivel molecular esto repercuta, obteniendo composiciones químicas de los extractos orgánicos totales diferentes.

La presencia de un mayor número de compuestos sulfurados en el extracto orgánico obtenido con acetato de etilo como solvente de extracción, permite determinar que el uso de este solvente orgánico es el adecuado para la extracción de éste grupo de compuestos, para el caso de este estudio.

La cantidad de compuestos sulfurados identificados en los extractos orgánicos totales de las muestras de ajo es aceptable. En el análisis por GC-MS no se detectó alicina de forma directa, pero se hallaron compuestos como *3-vinil-1,2-ditiaciclohex-4-ano*, *3-vinil-1,2-ditiaciclohex-5-ano*, entre otros, que son el resultado de la degradación de la alicina ocasionada por las condiciones de temperatura empleadas en las pruebas.

Los compuestos sulfurados identificados, tales como los alil sulfuros y las ditiínas poseen propiedades nutraceuticas importantes para la salud.



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.): Implicaciones analíticas

Entre las que destacan las propiedades hipotensora, antimicrobiana e antitumorogénica.

La cantidad de compuestos identificados en los extractos obtenidos mediante el método de extracción propuesto coincide en gran parte con resultados que se reportan en trabajos anteriores donde se emplean otros métodos de extracción.

El método de análisis por GC-MS empleado para este trabajo, muestra una notable reducción en el tiempo de análisis, permitiendo la identificación de compuestos de interés. Con esto, obtenemos la separación de los compuestos con R_T menores, lo que se traduce en una reducción de costos del análisis.



5.2 Recomendaciones

- Se debe considerar el estudio de extractos orgánicos totales (EOT) obtenidos a partir de un proceso de extracción sólido-líquido con solventes orgánicos que posean polaridades variadas, así como también, la realización de mezclas complementarias entre éstos, con el fin de obtener la mayor diversificación en las composiciones químicas en los EOT.
- Se propone que el proceso de obtención de los extractos orgánicos totales sea realizado en condiciones de bajas temperaturas (4°C), esto con el fin de minimizar la pérdida y/o degradación de los compuestos sulfurados del ajo.
- De igual forma, es importante considerar un análisis de los extractos orgánicos totales empleando un método analítico como la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS), que permita reducir la pérdida y/o degradación de los compuestos de interés de las muestras, debido a que el equipo HPLC-MS opera a condiciones de temperaturas más amigables para este tipo de compuestos sulfurados volátiles.



Referencias

- Abbott D. y Andrews R.S. Introducción a la cromatografía. Editorial ALHAMBRA. España, 1973.
- Alejandro Domínguez X. Métodos de investigación fitoquímica. Editorial LIMUS. México, 1973.
- Alonso, J. Tratado de fitofármacos y nutraceuticos. Editorial CORPUS. Argentina, 2007.
- Arnault I., Christidés J.P., Mandon A., Haffner T., Kahane R., Auger J. High-Performance Ion-Pair Chromatography Method For Simultaneous Analysis Of Alliin, Deoxyalliin, Allicin And Dipeptide Precursors In Garlic Products Using Multiple Mass Spectrometry And UV Detection. Journal of Chromatographia, pp. 69-75. 2003.
- Artacho R., Olea M. F. y Ruiz M. D. Determination of organic sulphur compounds in garlic extracts by gas chromatography and mass spectrometry. Food chemistry, volume 53, pp. 91-93. 1995.
- Baghalian K., Ziai S., Naghavi M.R., Badi H. N. y Khalighi A. Evaluation Of Allicin Content And Botanical Traits In Iranian Garlic (*Allium Sativum* L.) Ecotypes. Scientia Horticulturae, volumen 103, pp. 155-166. 2005.
- Bhagyalakshmi N., Thimmaraju R., Venkatachalam L., Chidambara N. K. y Sreedhar R. V. Nutraceutical Applications of Garlic and the Intervention of Biotechnology. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, volume 45 , pp. 607-621. 2005.
- Banerjee S. K., Mukherjee P. K. y Maulik S. K. Garlic as an antioxidant: the good, the bad and the ugly. Phytotherapy Research, volume 17, pp. 97-106. 2003.



- Base de datos del National Institute of Standards and Technology (NIST, 2008).
- Block E. The chemistry of garlic and onions. Scientific American. pp. 114-119. 1985.
- Block E., Naganathan S., Putman D. y Zhao S. Organosulfur chemistry of garlic and onion: Recent results. Pure & Applied Chemistry, vol. 65, pp. 625-632. 1993.
- Block E., Naganathan S., Putman D., Zhao S. Angew. 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. Chemie International Edition England, volume 31, pp. 1135-1178. 1992.
- Bocchini P., Andaló C., Pozzi R., Galletti G.C. y Antonelli A. Determination Of Diallyl Thiosulfinate (Allicin) In Garlic (*Allium Sativum* L.) By High-Performance Liquid Chromatography With A Post-Column Photochemical Reactor. Analytica Chimica Acta, pp. 37-43. 2001
- Cavallito C. J. y Bailey J. H. Allicin, the principle antibacterial of *Allium sativum* I. Isolation, physical properties, and antibacterial action. Journal of the American Chemical Society, volume 66, pp. 1950-1951. 1944.
- Durán M. A., González P. A. y Cardona L. Obtención y caracterización de la oleorresina del ajo (*Allium sativum*). Scientia et Technica, volumen 37, pp. 551-555. 2007.
- Ferri N., Yokoyama K., Sadilek M., Paoletti R., Apitz-Castro R., Gelb M. H. y Corsini A. Ajoene, a garlic compound, inhibits protein prenylation and arterial smooth muscle cell proliferation. Journal of Pharmacology, volume 138, pp. 811-818. 2003.



**Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas**

- Fujisawa H., Suma K., Origuchi K., Kumagal H., Seki T. y Ariga T. Biological and chemical stability of garlic-derived Allicin. *Journal of agricultural and food chemistry*, volume 56, pp. 4229-4235. 2008.
- Galen W. E. *Analytical instrumentation handbook*. Editorial MARCEL DEKKER, INC. Estados Unidos de América, 1997.
- Garbuzov V. G., Misharina T. A., Aerov A. F. y Golovnya, R. V. Gas chromatographic retention indices for sulphur(II)-containing organic substances, *Journal Analytical Chemistry*, volume 40, pp. 576-586. 1985.
- García J y Sánchez F. Efectos cardiovasculares del ajo (*Allium sativum*). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, volume 503, pp. 219-229. 2000.
- *Handbook of chromatography. Practical Applications: Detection Reagents for paper and thin layer chromatography. Volume II, section III.*
- Harborne, J. B. y Baxter H. *Phytochemical dictionary: A handbook of bioactive compounds from plants*. Editorial TAYLOR & FRANCIS. Inglaterra, 1995.
- Harris J. C., Cottrell S. L., Plummer S. y Lloyd D. Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic). *Appl Microbial Biotechnology*, volume 57, pp. 282-286. 2001.
- Hughes B. G. y Lawson L. D. Antimicrobial effects of *Allium sativum* L. (Garlic), *Allium ampeloprasum* L. (Elephant Garlic), and *Allium cepa* L. (Onion), garlic compounds and commercial garlic supplement products. *Phytotherapy Research*, volume 5, pp. 154-158. 1991.



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

- Ibarz Ribas A. y Barbosa-Cánovas G. V. Operaciones unitarias en la ingeniería de alimentos. Ediciones MUNDI-PRENSA, pp. 767-814. México, 2005.
- Kim H. K., Ye S. H., Lim T. S., Ha T. Y. y Kwon J. H. Physiological activities of garlic extracts as affected by habitat and solvents. Journal of Medicinal Food, volume 8, pp. 476-481. 2005.
- Kim S. M., Wu C. M., Kubota K. y Kobayashi A. Effect of soybean oil on garlic volatile compounds isolated by distillation. Journal of agricultural and food chemistry, volume 45, pp. 449-452. 1995.
- Kim S. M. y Zayas J. F. Parámetros de procesamiento de la extracción de quimosina por ultrasonido. Journal of Food Science, volume 54, pág. 700. 1989.
- Krest J. G. y Keusgen M. Cysteine sulfóxidos and Alliinase activity of some Allium species. Journal of Agricultural and Food Chemistry, volume 48, pp. 3753-3760. 2000.
- Krest J. G. y Keusgen M. Quality of herbal remedies from Allium sativum: Differences between allinase from garlic powder a fresh garlic. Planta Medica, volume 65, pp, 139-143. 1999.
- Kubec R., Svobodová M. y Velíšek J. Gas chromatographic determination of S-alk(en)ylcysteine sulfoxides. Journal of Chromatography, pp. 85-94. 1999.
- Kuettner, E. B., Hilgenfeld, R., y Weiss, M. Purification, characterization, and crystallization of allinase from garlic. Archives of biochemistry and biophysics, volume 402, pp. 192-200. 2002.



- Kuettnner, E. B., Hilgenfeld, R., y Weiss, M. The Active Principle Of Garlic At Atomic Resolution. *Journal of Biological Chemistry*, pp. 46402–46407. 2002.
- Lawson L. D. Bioactive organosulfur compounds of garlic and garlic products: role in reducing blood lipids. In: *Human medicinal agents from plants*. American Chemical Society, Chapter 21, pp. 306-330. 1993.
- Lawson L. D. The Composition And Chemistry Of Garlic Cloves And Processed Garlic. In H. P. Koch & L. D. Lawson (Eds.), *Garlic: The science and therapeutic application of Allium sativum L. and related species*. pp. 37–108. 1996.
- Lawson L. D. y Hughes B. G. Characterization of the formation of Allicin and other Thiosulfinates from Garlic. *Planta Medica*, volume 58, pp. 345-350. 1992.
- Lawson L. D. y Wang Z. J. Allicin and allicin –derived garlic compounds increase breath Acetone through Allyl Methyl Sulfide: Use in measuring Allicin bioavailability. *Journal of agricultural and food chemistry*, volume 53, pp. 1974-1983. 2005.
- Lawson L. D., Wang Z. J. y Hughes B. G. Identification And HPLC Quantitation Of The Sulfides And Dialk(En)YL Thiosulfinates In Commercial Garlic Products. *Planta Medica*, volumen 57, pp. 363-370. 1991.
- Lawson L. D., Wang Z. J. y Hughes B. G. γ -glutamyl-S-alkylcysteines in garlic and other *Allium* SPP.: Precursors of age-dependent Trans-1-propenyl Thiosulfinates. *Journal of Natural Products*, volume 54, pp. 436-444. 1991.
- Lawson L. D., Wood S. G. y Hughes B. G. HPLC Analysis Of Allicin And Other Thiosulfinates In Garlic Clove Homogenates. *Planta Medica*, volume 57, pp 263-270. 1991.



- Lawson L. D., Woody S. G. y Hughes B. G. HPLC Analysis Of Allicin And Other Thiosulfinates In Garlic Clove Homogenates. *Planta Medica*, pp. 263-270. 1990
- Lock de Ugaz, O. Métodos en el estudio de productos naturales. Fondo editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú. 1988.
- López L. T. El ajo. *Ámbito Farmacéutico: Fitoterapia*, volumen 26, pp. 77-81. 2007.
- Mazelis M. y Crews L. Purification of the Alliin Lyase of Garlic, *Allium sativum* L. *Journal of Biochemistry*, volume 108, pp. 725-730. 1968.
- Méndez L. L. y Castaigne F. Effect of temperature cycling on allinase activity in garlic. *Journal of Food Chemistry*, volume 111, pp. 56-60. 2008
- Miething, H. Allicin And Oil In Garlic Bulbs-HPLC Quantitative Determination. *Journal of the Chemical Society*, volume 125, pp. 2049-2050. 1985.
- Miething, H. HPLC-analysis of the volatile oil of garlic bulbs. *Phytotherapy Research*, volume 2, pp. 149-151. 1987.
- Miron, T., Shin, I., Feigenblat, G., Weiner, L., Mirelman, D., Wilchek, M. y Rabinkov, A. A spectrophotometric assay for allicin, alliin, and alliinase (alliin lyase) with a chromogenic thiol: reaction of 4-mercaptopyridine with thiosulfinates. *Analytical Biochemistry*, pp. 76-83. 2002.
- Mochizuki E. y Nakayama A. Liquid Chromatographic Determination Of Alliin In Garlic And Garlic Products. *Journal of Chromatography*, volume 455, pp. 271-277. 1988.
- Mochizuki E., Yamamoto T., Komiyama Y. y Nakazawa, H. Identification of *Allium* products using flame photometric detection gas chromatography and distribution patterns of volatile sulfur compounds.



Journal of Agricultural and Food Chemistry, volume 46, pp. 5170-5176.
1998

•Mondy N., Naudin A., Christidés J. P., Mandon N. y Auger J. Comparison Of GC-MS And HPLC For The Analysis Of Allium Volatiles. Journal of Chromatographia, volume 53, pp. 356-360. 2001.

•Mummery, C. L. El efecto del ultrasonido en fibroblastos in vitro. Tesis de Doctorado, Universidad de Londres, Inglaterra. 1978.

•Munchberg U., Anwar A., Mecklenburg S. y Jacob C. Polysulfides as biologically active ingredients of garlic. Journal Organic and Biomolecular Chemistry, volume 5, pp. 1505-1548.

•Rybak M. E., Calvey E. M. y Harnly J. M. Quantitative determination of Allicin in Garlic: Supercritical fluid extraction and standard addition of alliin. Journal of Agricultural and Food Chemistry, volume 52, pp. 682-687. 2004.

•Schwimmer S. y Weston W. J. Enzymatic development of pyruvic acid in onion as a measurement of pungency. Journal of Agricultural and Food Chemistry, volume 9, pp. 301-304. 1961.

•Sharapin, Nikolai. Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Editorial CYTED. Colombia, 2000.

•Siles Alvarado, S. Curso Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas, 2010.

•Skoog, D. A., Holler, F. J. y Nieman, T. A. Principios de análisis instrumental. Editorial McGraw-Hill. España, 2001.

•Stoll A. y Seebeck E. Chemical investigations on alliin, the specific principle of garlic. Advances in Enzimology and Related Areas of Molecular Biology, Wiley Interscience, Ed. F. F. Nord, volume 11, pp. 377-400. 1951

•Suslick K. S. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, Ed. J. Wiley & Sons, volume 26, pp 517-541. 1998.



- Treybal R. E. Operaciones de transferencia de masa. Editorial McGraw-Hill, pp. 529-543. 1980.
- Yu T. H. y Wu C. M. Stability of Allicin in Garlic juice. Journal of Food Science, volume 54, pp. 977-981. 1989.
- Yu T.H., Wu C. M. y Ho C.T. Volatile compounds of deep-oil fried, microwave-heated, and oven.baked garlic slices. Journal of Agricultural and Food Chemistry, volumen 41,pp. 800-805. 1993.
- Yu T. H., Lin L. Y. y Ho C. T. Volatile compounds of blanched, fried blanched, and baked blanched garlic slices. Journal of Agricultural and Food Chemistry, volume 42, pp. 1342-1347. 1994.
- Yu T. H., Wu C. M., Rosen R. T., Hartman T. G. y Ho C. T. Volatile compounds in generated from thermal degradation of alliin and deoxyalliin in an aqueous solution. Journal of Agricultural and Food Chemistry, volume 42, pp. 146-153. 1994.
- Zoghbi M. G. B., Ramos L. S., Maia J. G. S., Da Silva M. L. y Luz A. I. R. Volatile sulfides of the Amazonian garlic bush. Journal of Agricultural and Food Chemistry, volume 32, pp. 1009-1010. 1984.



Anexo 1. Análisis de espectros de masas

A1.1 Condiciones de operación

Programa GC

Columna capilar: Elite 5 Wax (50% Fenilpolisiloxano); 30 m de longitud; 320 μ de diámetro interno; 5 μ de espesor de fase

Gas de arrastre: Helio (He)

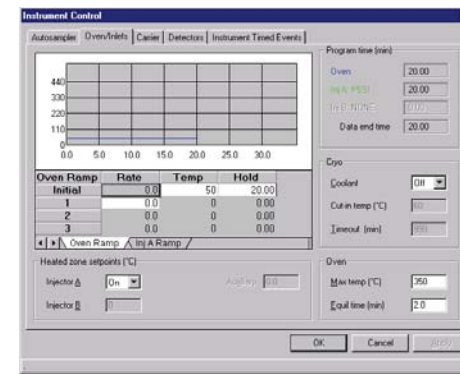
Presión de flujo: 15 psi

Split: 50%

Temperatura del inyector: 200 °C

Condiciones de temperatura: 50 °C, 5 min; 50-200 °C,
25 °C/min; 200 °C, 2 min

Volumen de inyección 2.5 μ l



Programa MS

Temperatura de línea de transferencia: 230 °C

Rango de barrido: 45 a 450 m/z

Tiempo de barrido: 2 seg

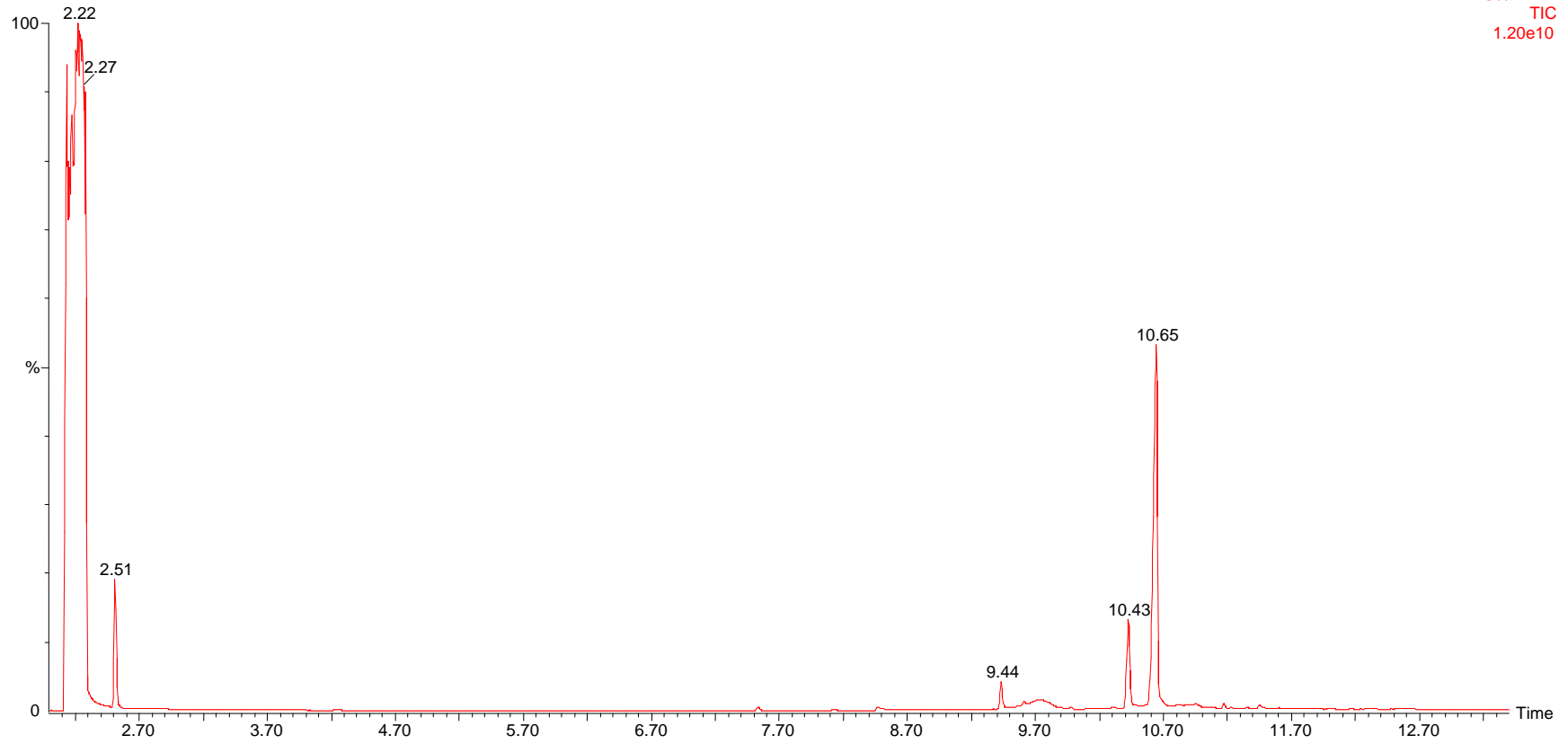




Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

eot-1

Scan EI+
TIC
1.20e10

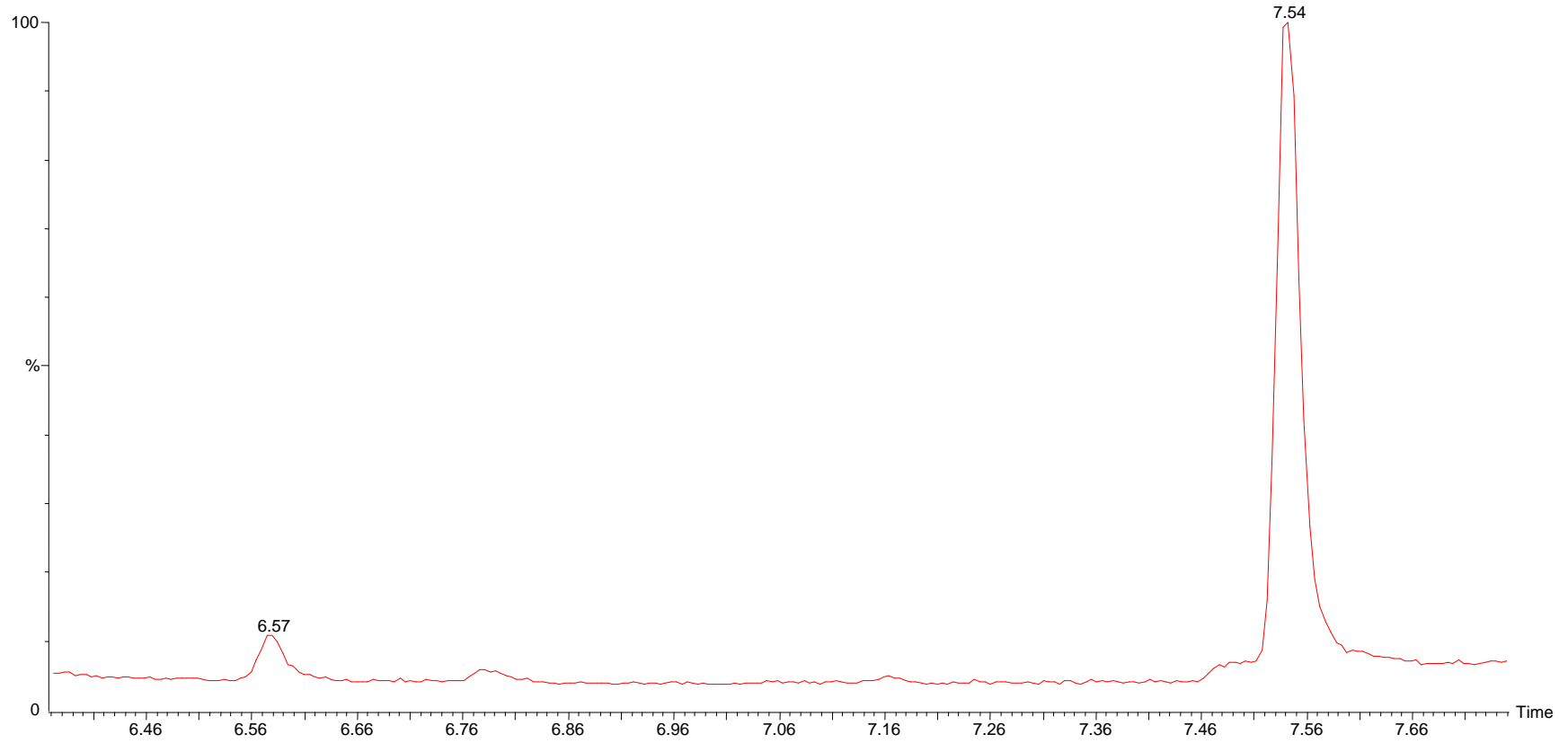


GC-1. eot-1 en cloroformo (Total)



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

eot-1



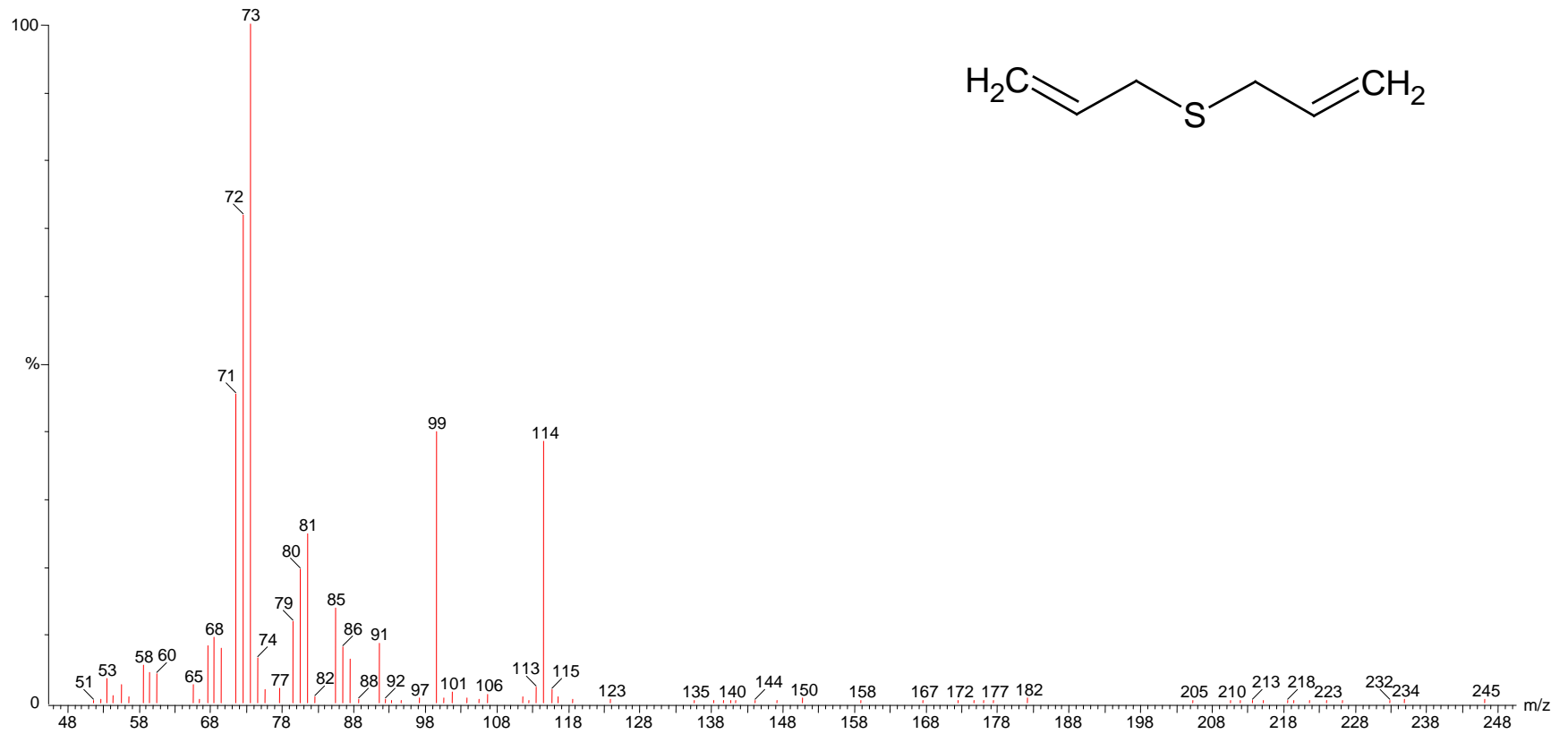
GC-1.1. eot-1 en cloroformo



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

MS-1

$R_T=6.574$

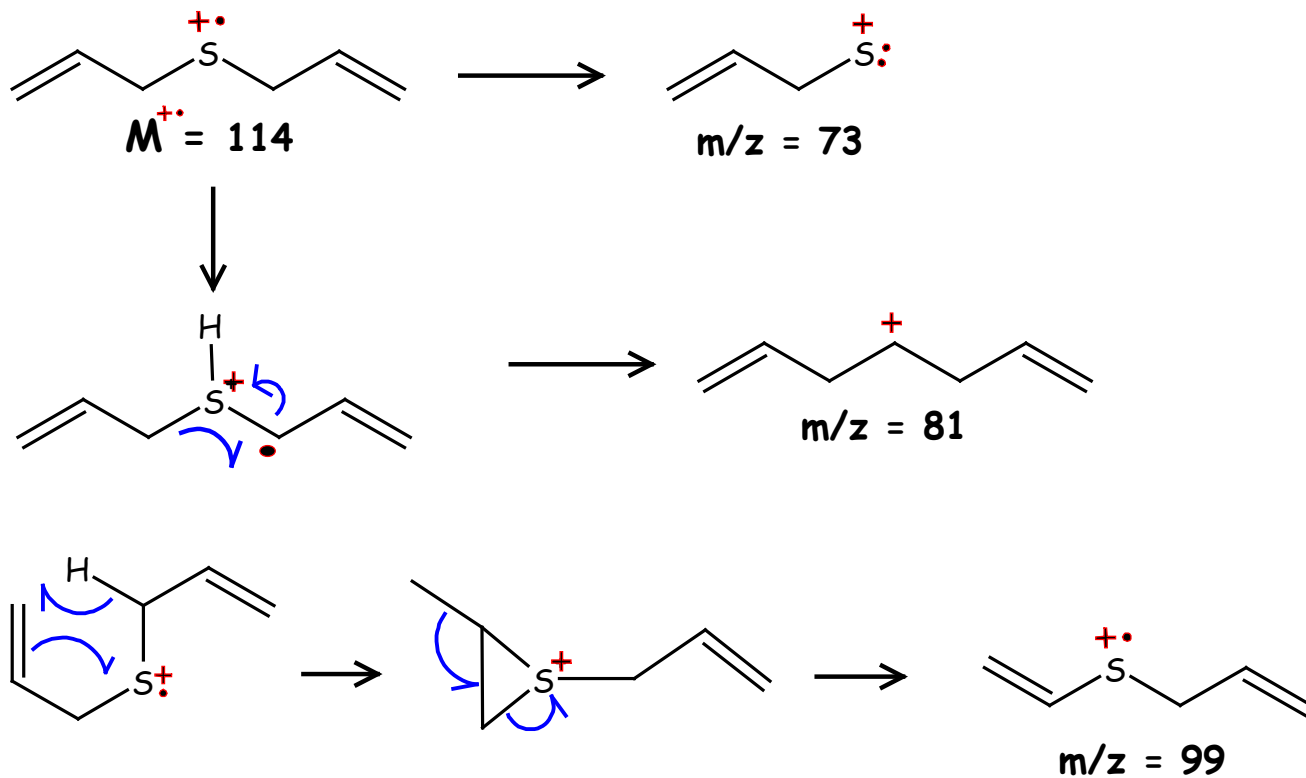




Nombre : Dialil sulfuro

m/z : 114 ($M^{+\bullet}$, 38), 99 (49), 81 (25), 73 (100)

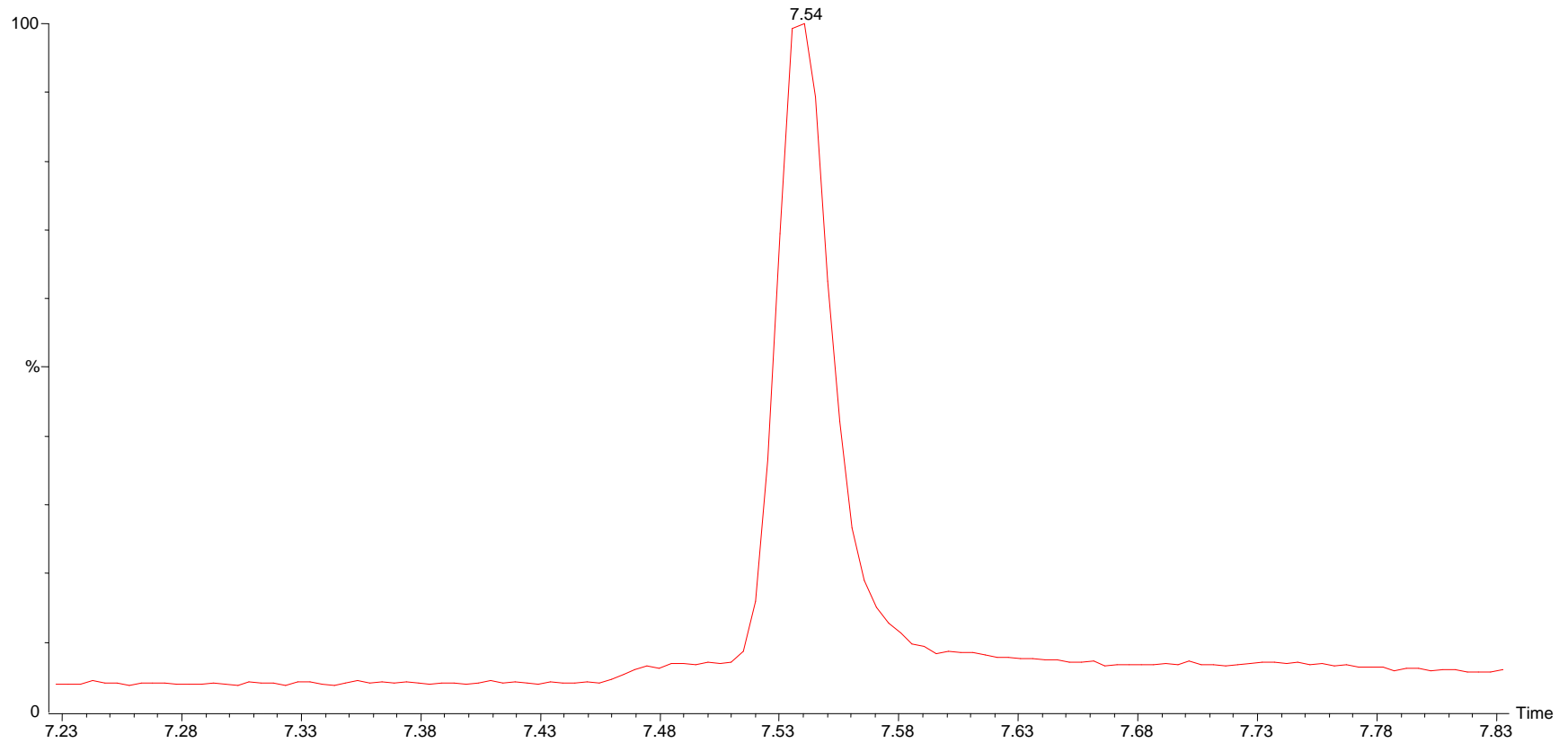
✓ Fragmentaciones ocurridas en MS-1





Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

eot-1



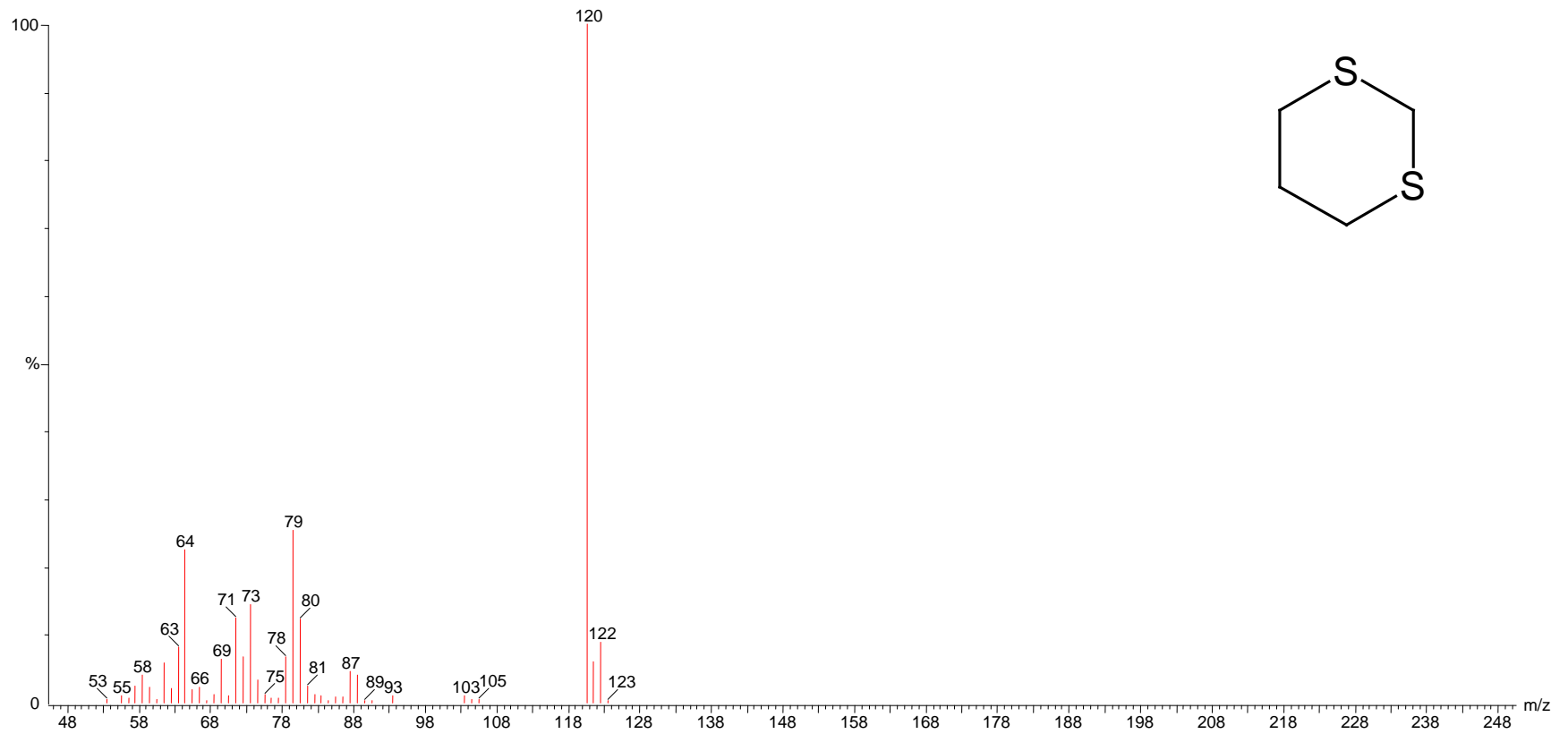
GC-1.2. eot-1 en cloroformo



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

MS-2

$R_T = 7.537$

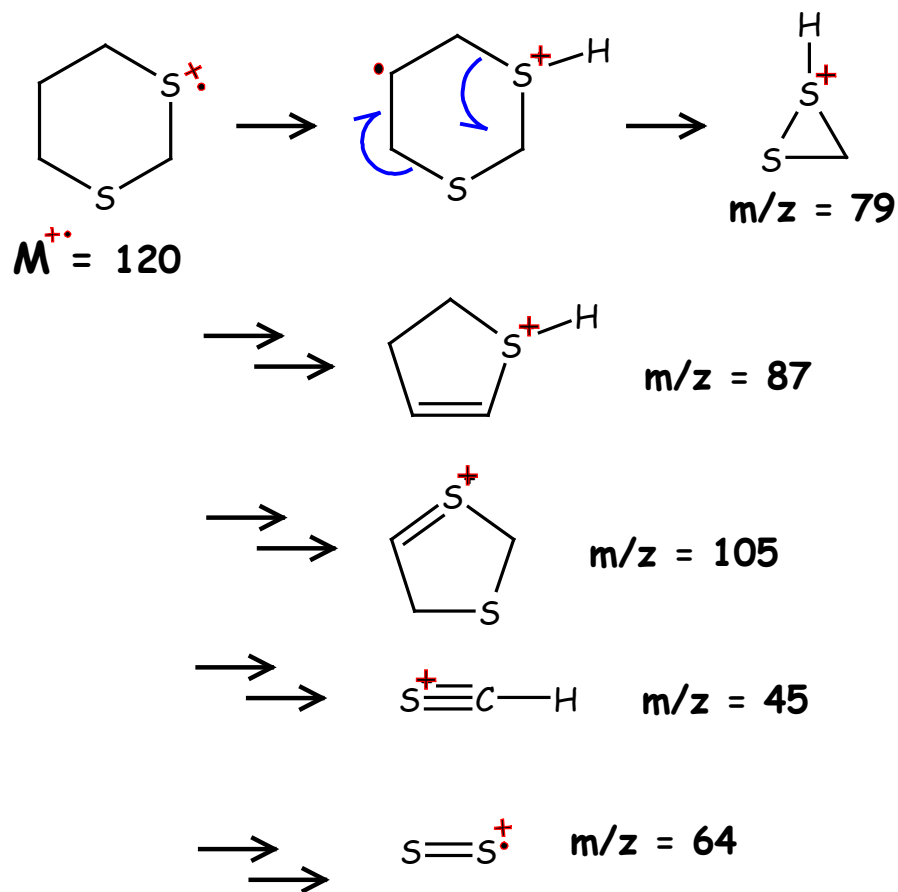




Nombre: 1,3 Ditiína

m/z: 120 (100, M^{+•}), 105 (1), 80 (12), 79 (25), 73 (14), 71(12), 64 (23)

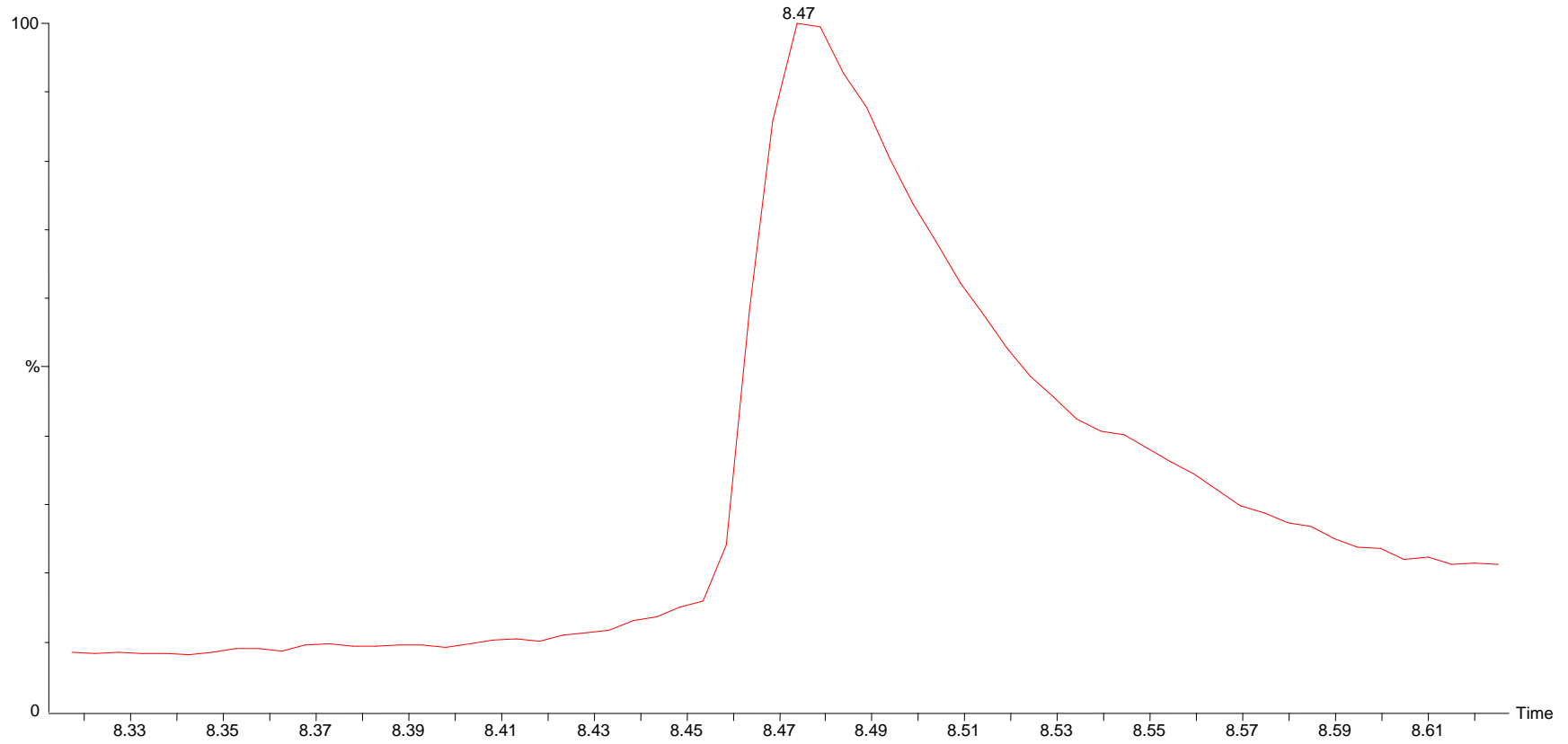
✓ Fragmentaciones ocurridas en MS-2





Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

eot-1



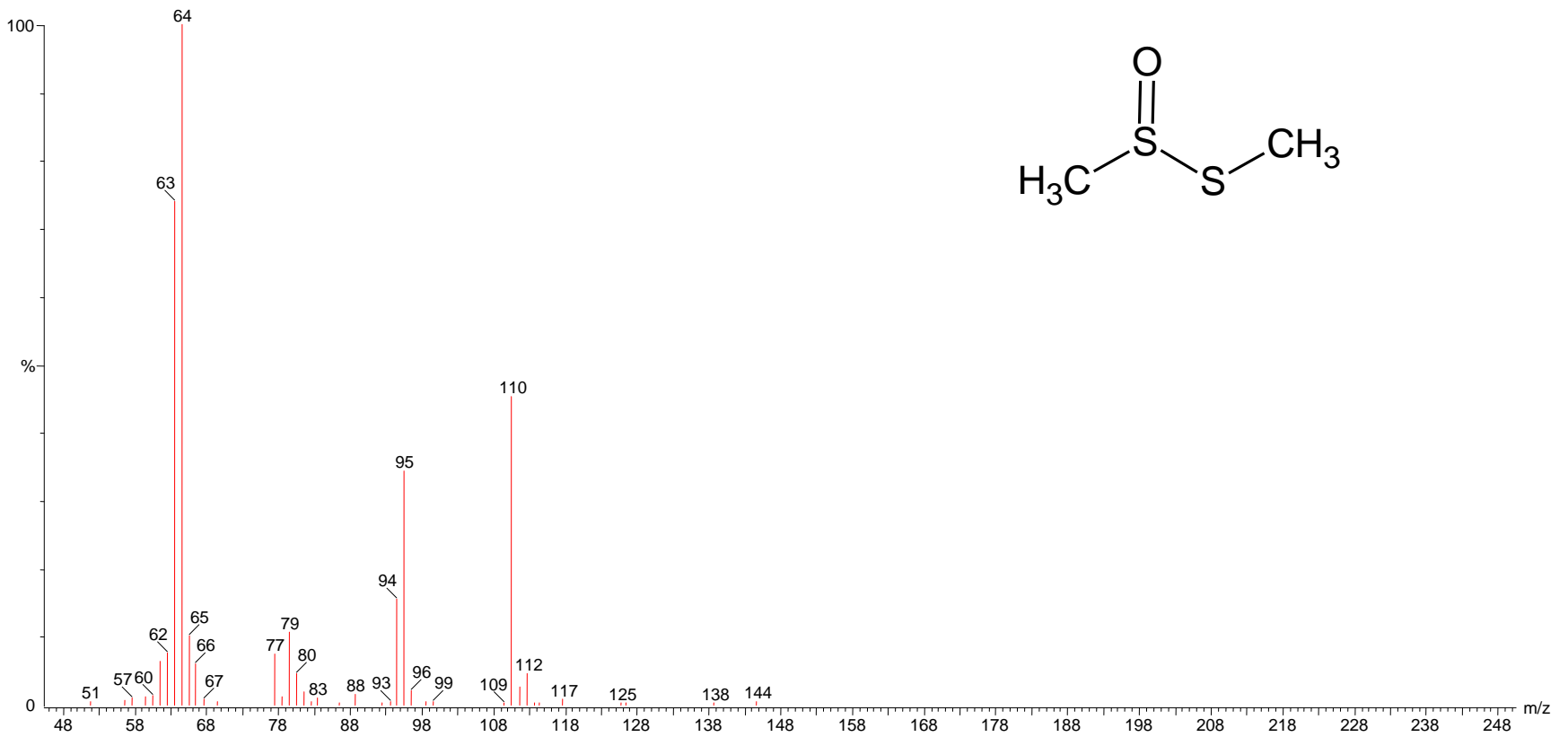
GC-1.3. eot-1 en cloroformo



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

MS-3

$R_T = 8.470$

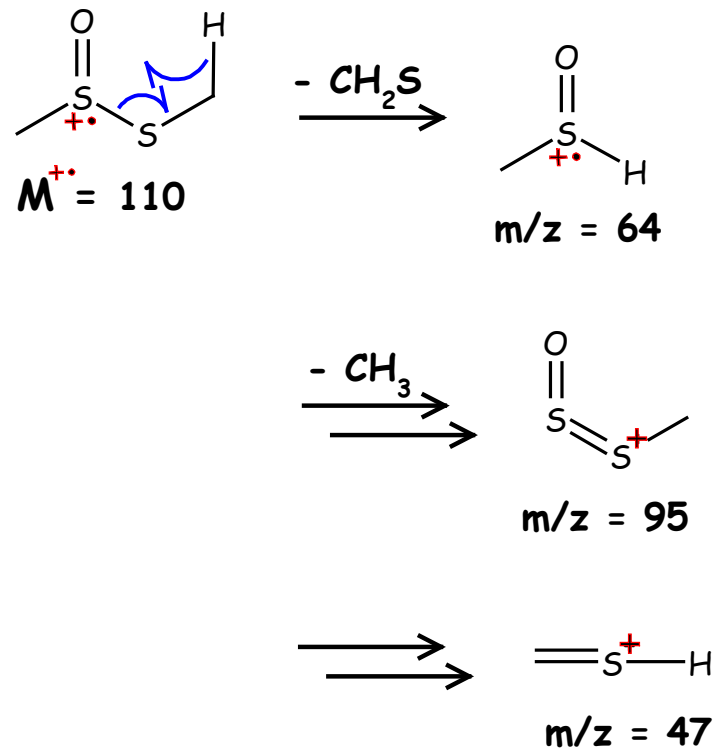




Nombre: Dimetil disulfuro, S-oxido

m/z: 110 (45, M^{+•}), 95 (34), 79 (11), 64 (100), 63 (74)

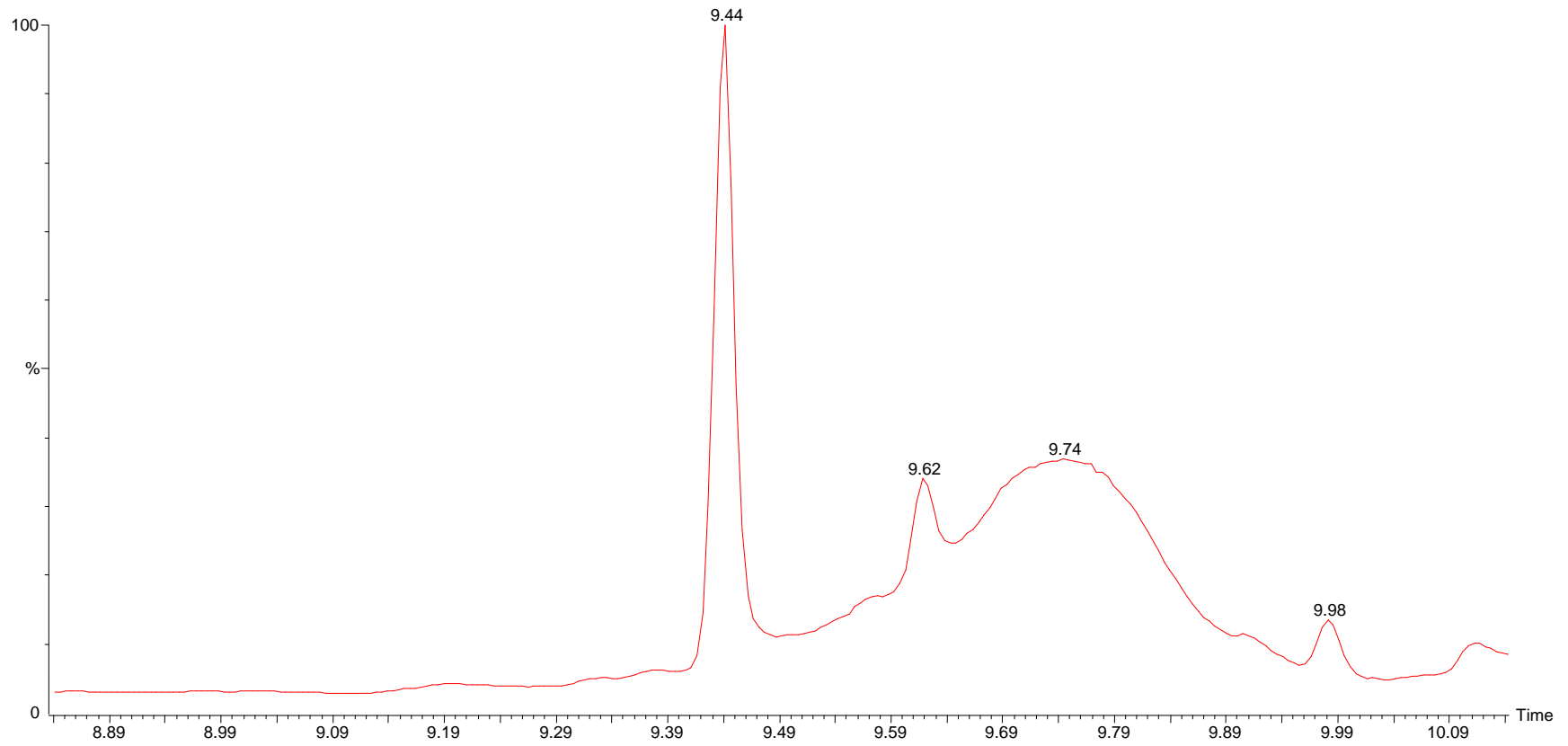
✓ Fragmentaciones ocurridas en MS-3





Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

eot-1



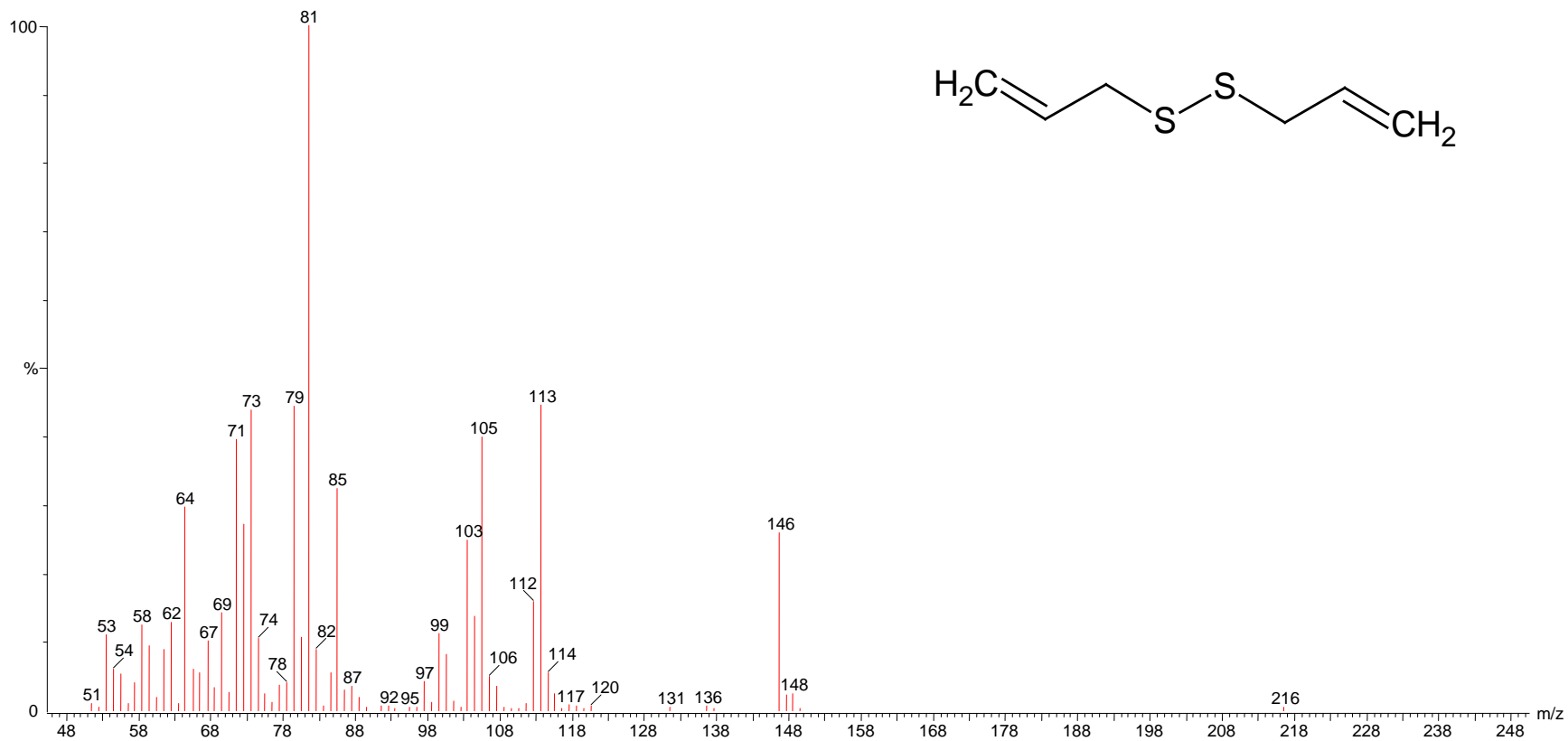
GC-1.4. eot-1 en cloroformo



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

MS-4

$R_T = 9.439$

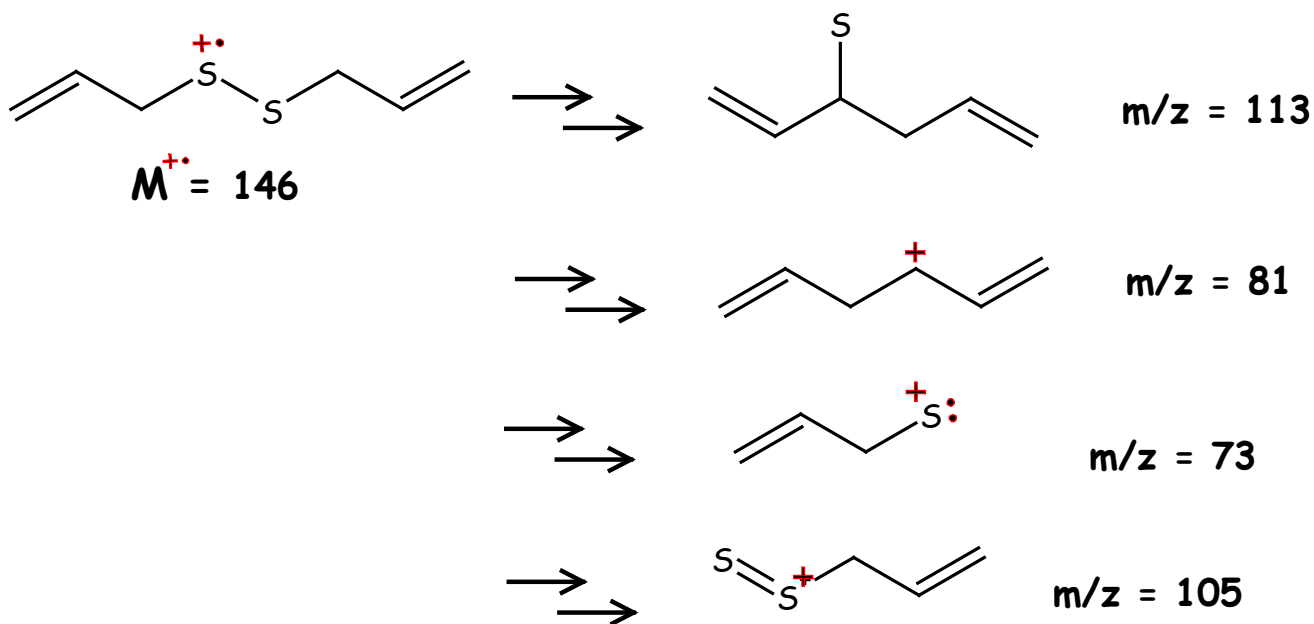




Nombre: Dialil disulfuro

m/z: 146 (26), 113 (45), 105 (40), 81 (100), 79 (44), 73 (44), 64 (30)

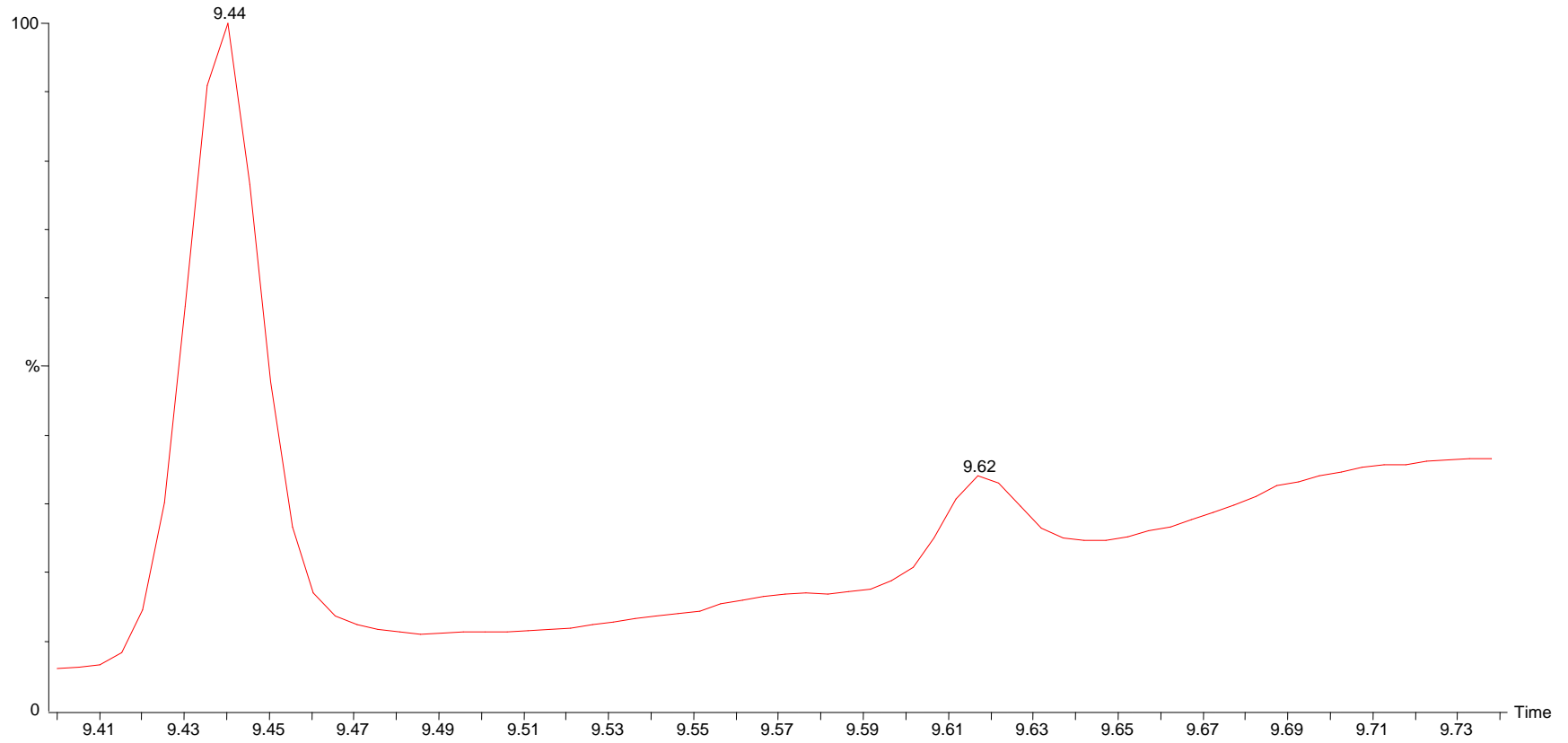
✓ Fragmentaciones ocurridas en MS-4





Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

eot-1



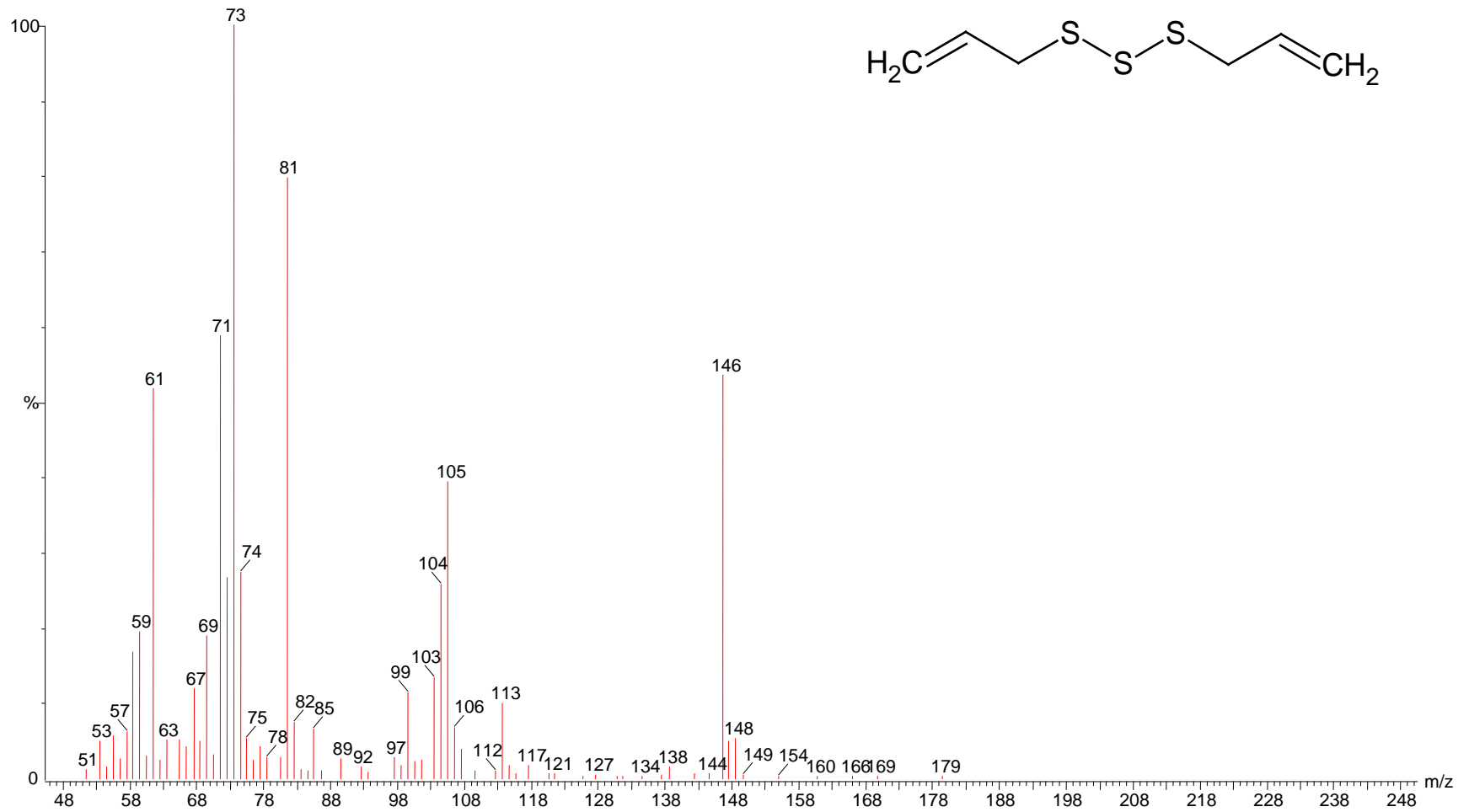
GC-1.5. eot-1 en cloroformo



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

MS-5

$R_T = 9.615$

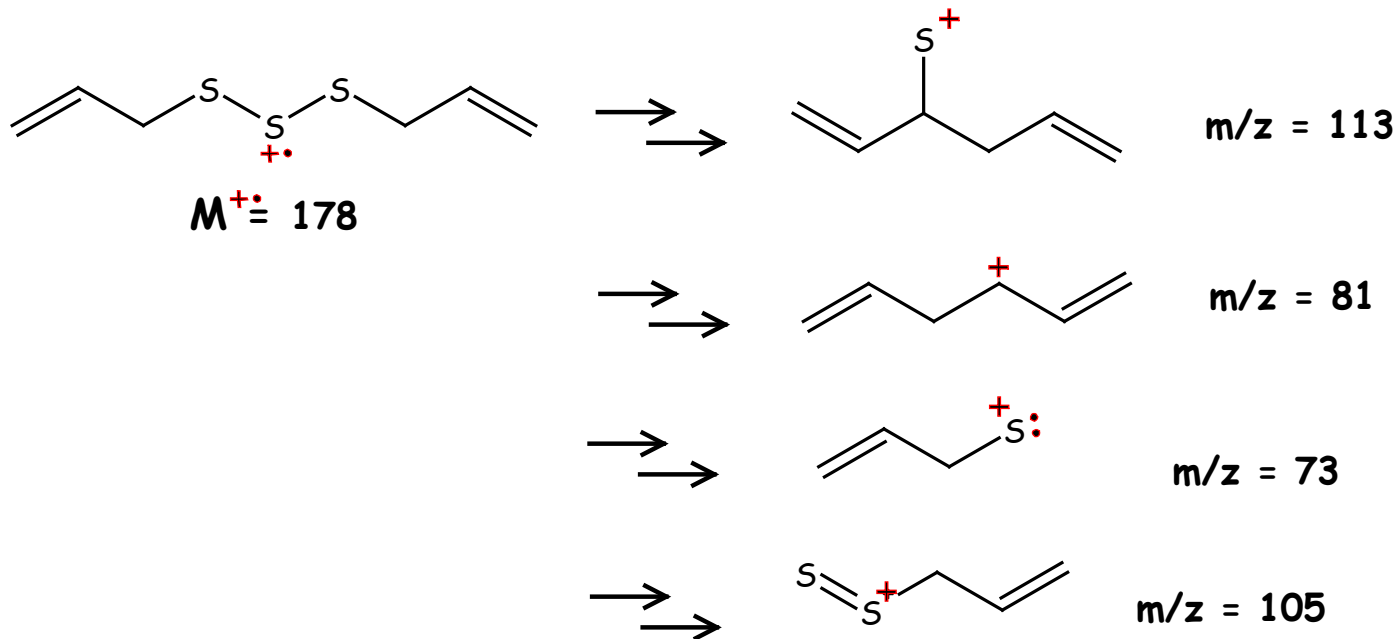




Nombre: Dialil trisulfuro

m/z: 178 (0, M^{+•}), 113 (10), 105 (39), 81 (80), 73 (100), 61 (52)

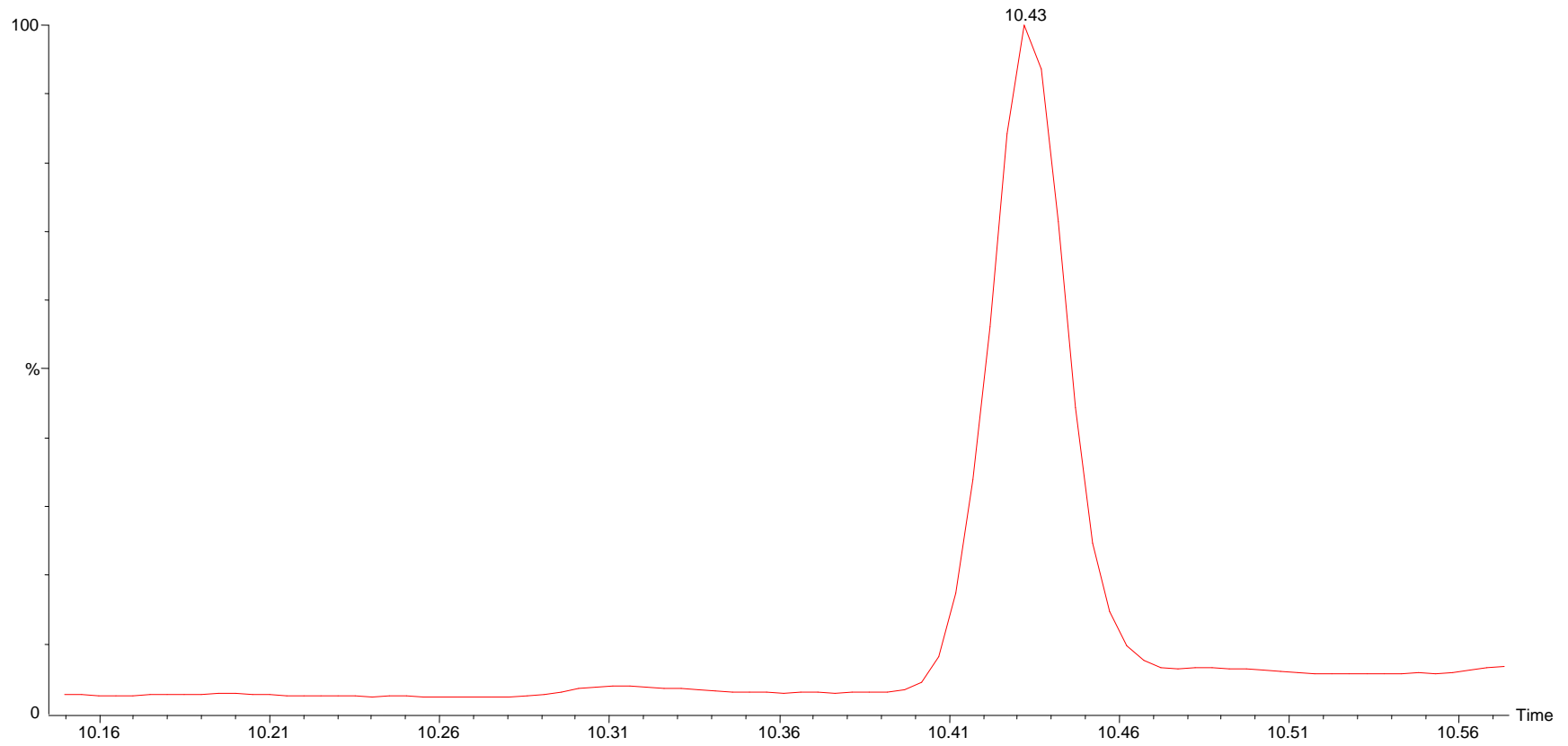
✓ Fragmentaciones ocurridas en MS-5





Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

eot-1



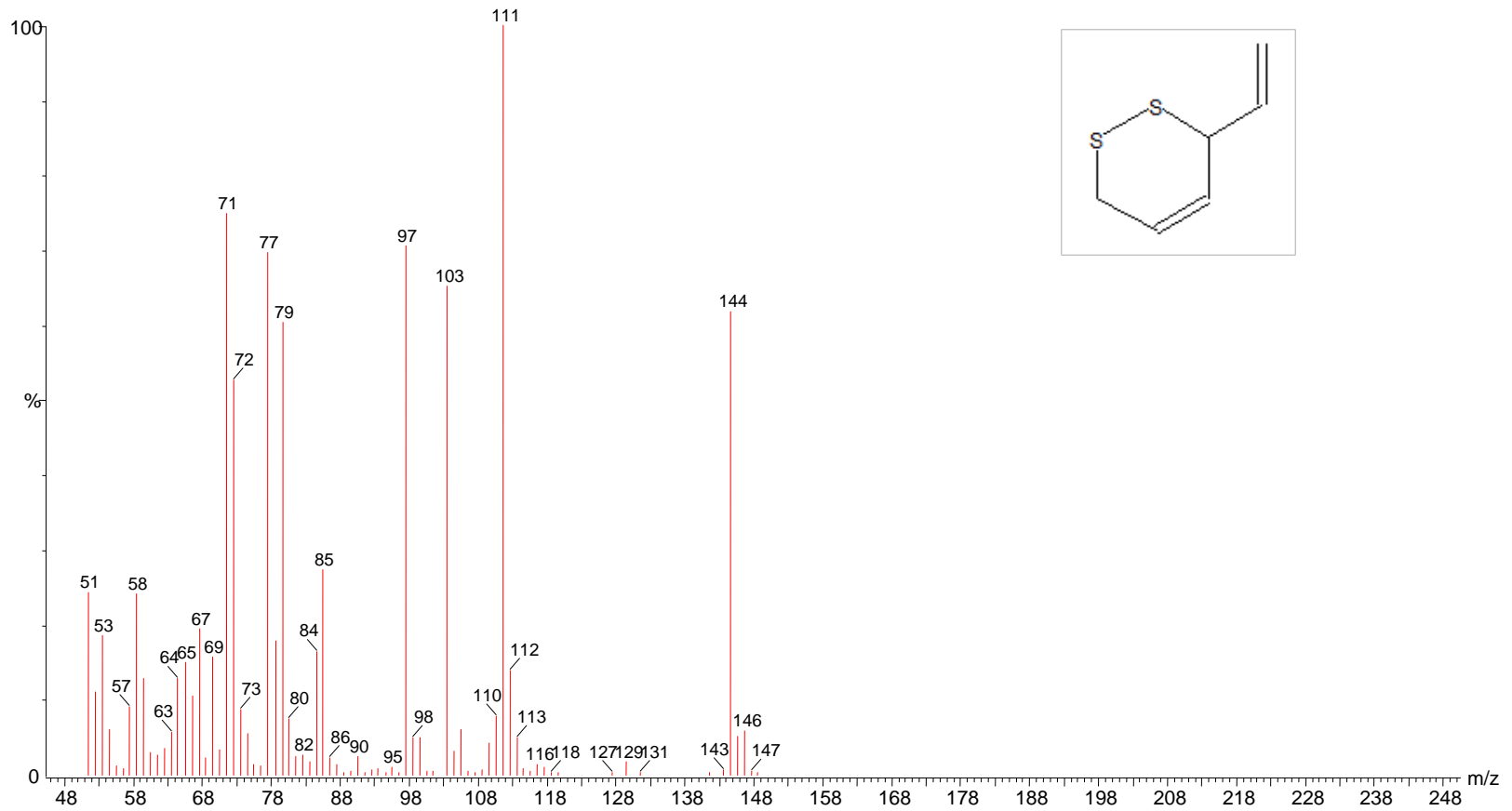
GC-1.6. eot-1 en cloroformo



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

MS-6

$R_T = 10.427$





Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

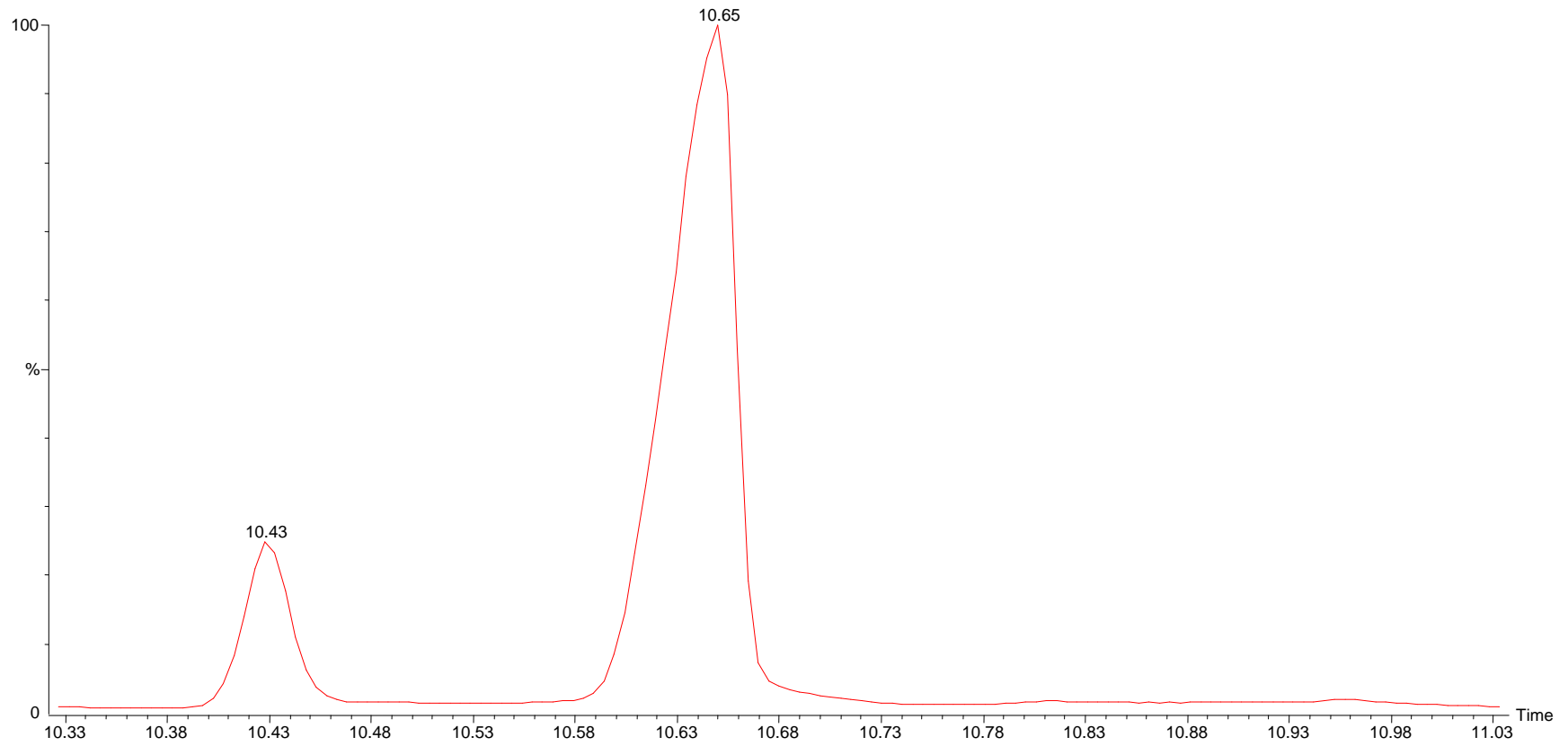
Nombre: *3-vinil-1,2-ditiaciclohex-4-ano*

m/z: 144 (62, M⁺), 111 (100), 103 (65), 97 (71), 85 (27), 79 (60), 77 (70), 72 (53), 71 (75)



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

eot-1



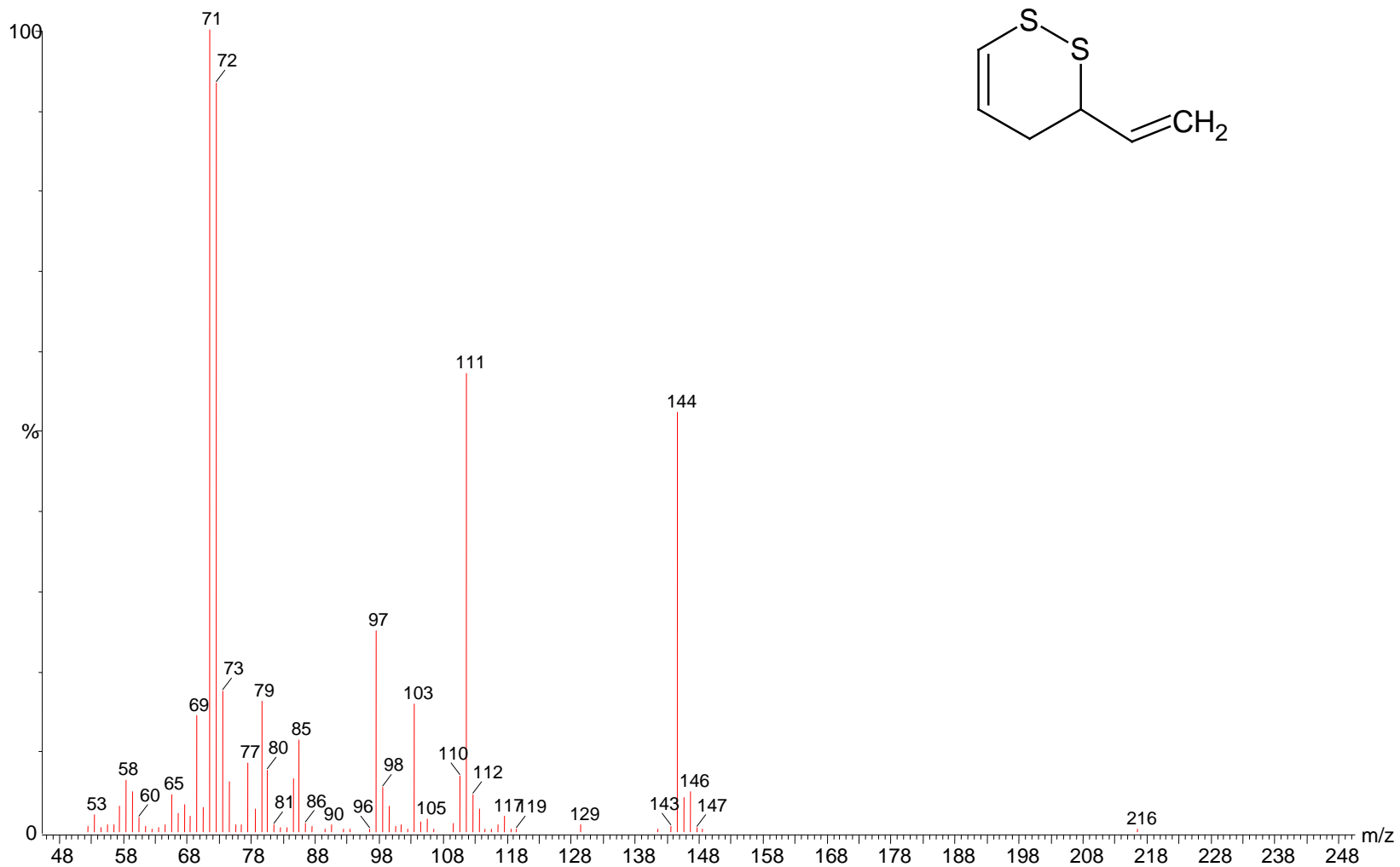
GC-1.7. eot-1 en cloroformo



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

MS-7

$R_T = 10.649$

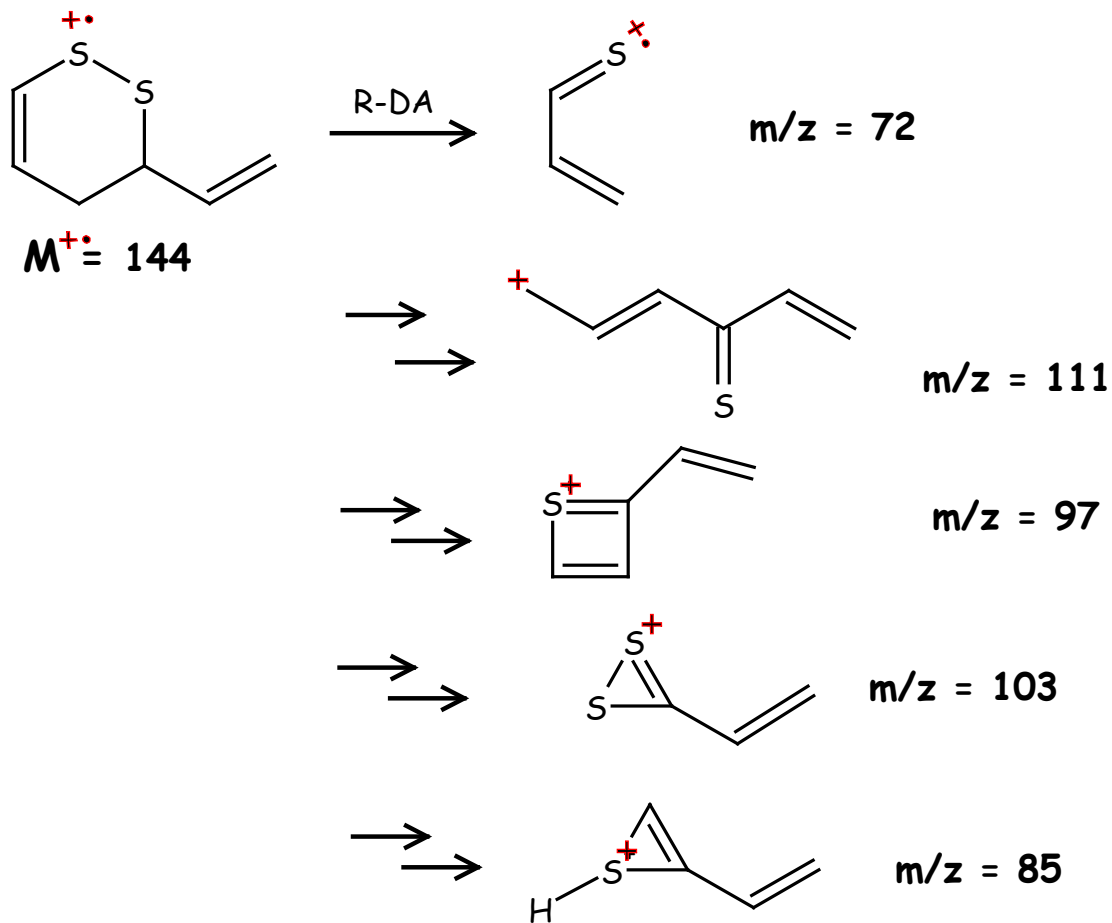




Nombre: 3-vinil-1,2-ditiaciclohex-5-eno

m/z: 144 (52, M⁺•), 111 (57), 97 (25), 89 (0.2), 79 (16), 77 (9), 72 (93), 71 (100)

✓ Fragmentaciones ocurridas en MS-7

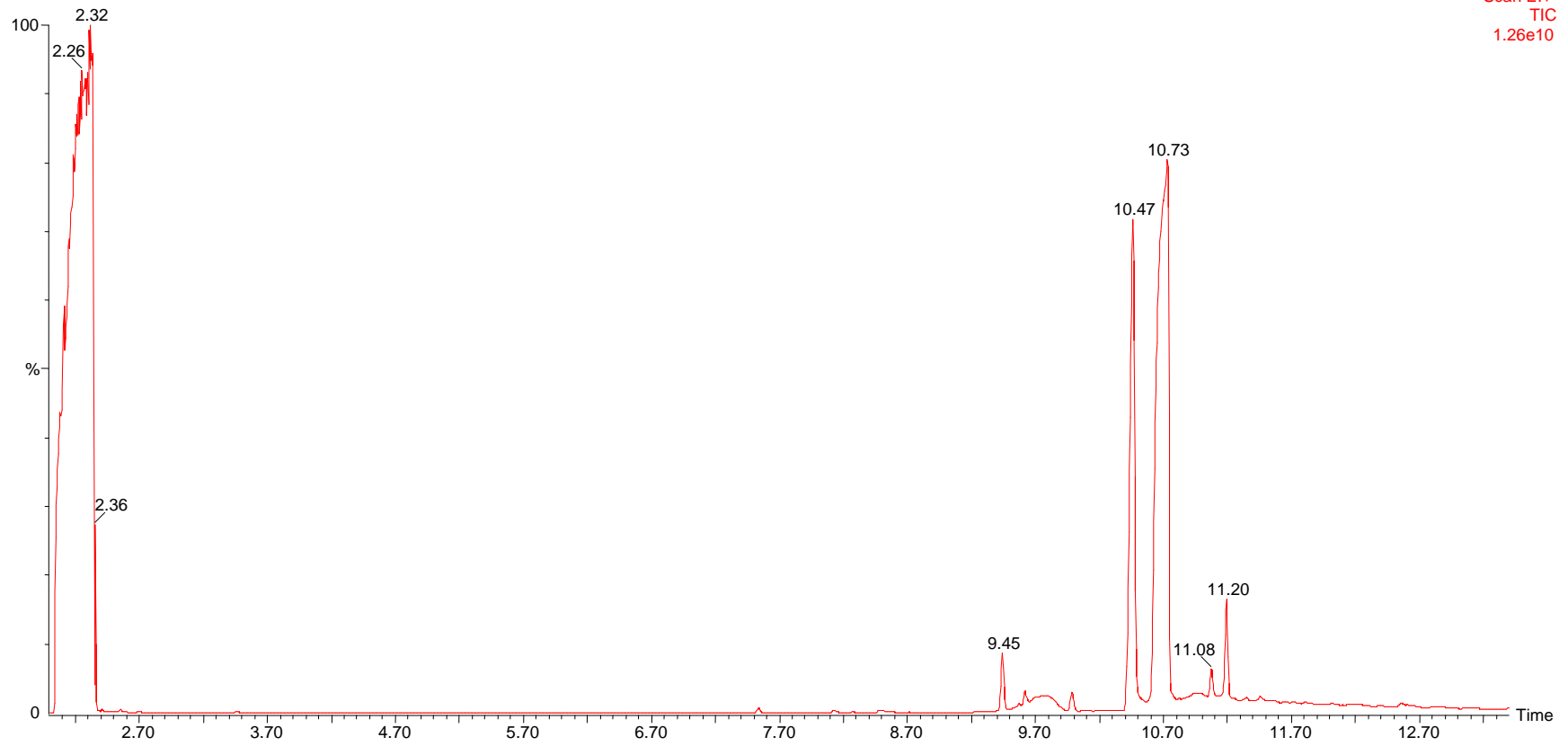




Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.): Implicaciones analíticas

eot-2

Scan EI+
TIC
1.26e10

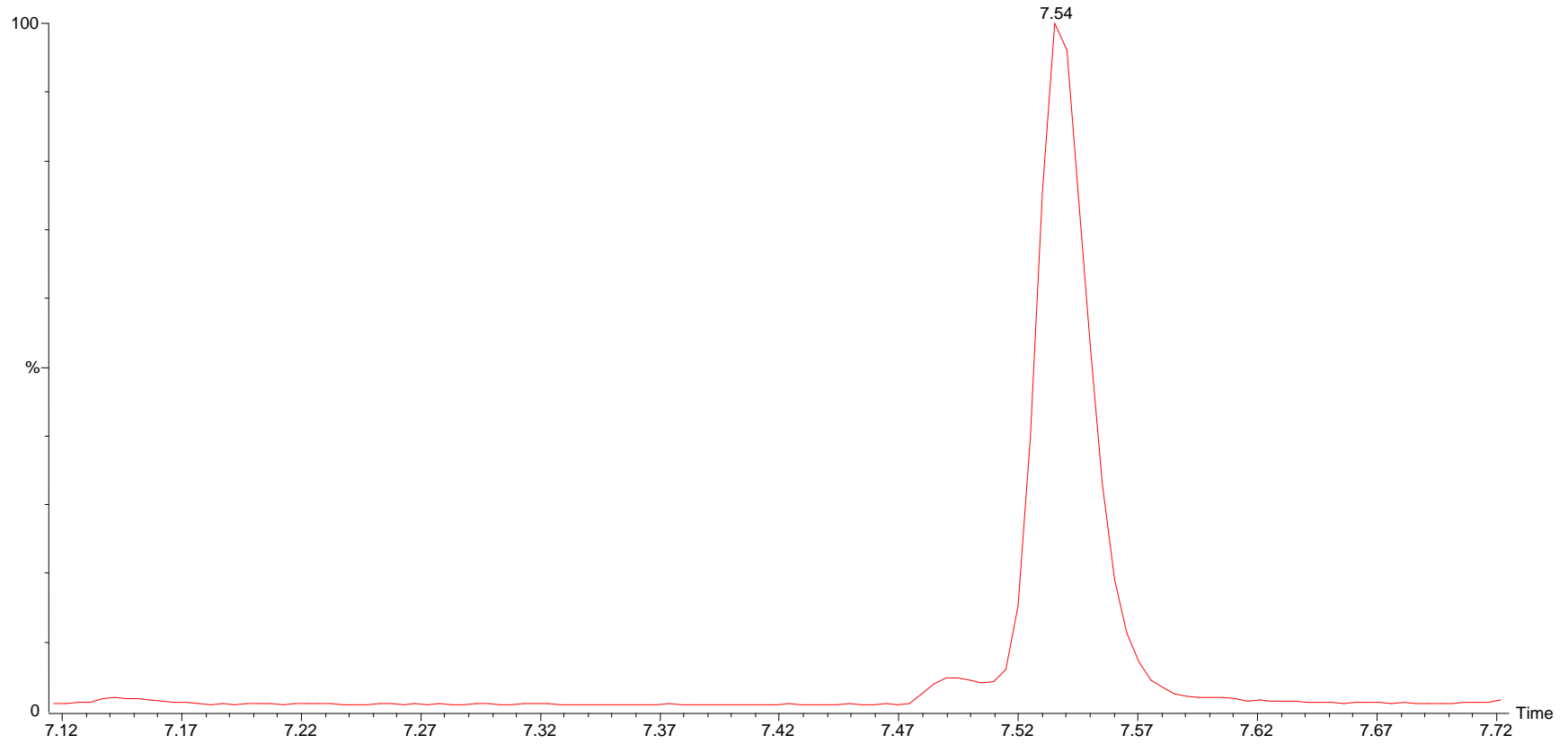


GC-2. eot-2 en acetato de etilo (Total)



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

eot-2



GC-2.1. eot-2 en acetato de etilo



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

MS-8

$R_T = 7.537$





Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

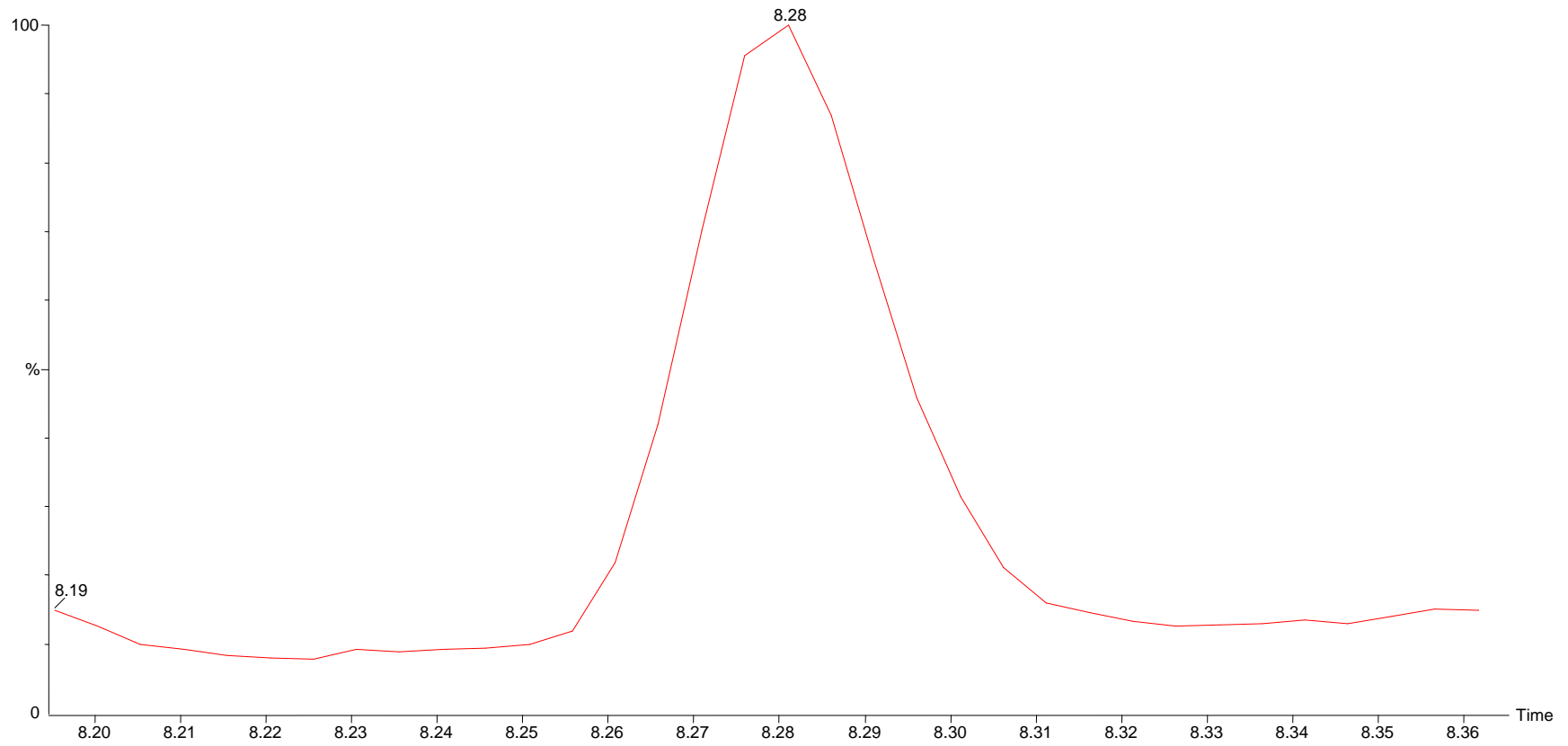
Nombre: 1,3 ditiína

m/z: 120 (100, M⁺•), 105 (1), 80 (11), 79 (21), 73 (17), 71 (11), 64 (17)



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

eot-2



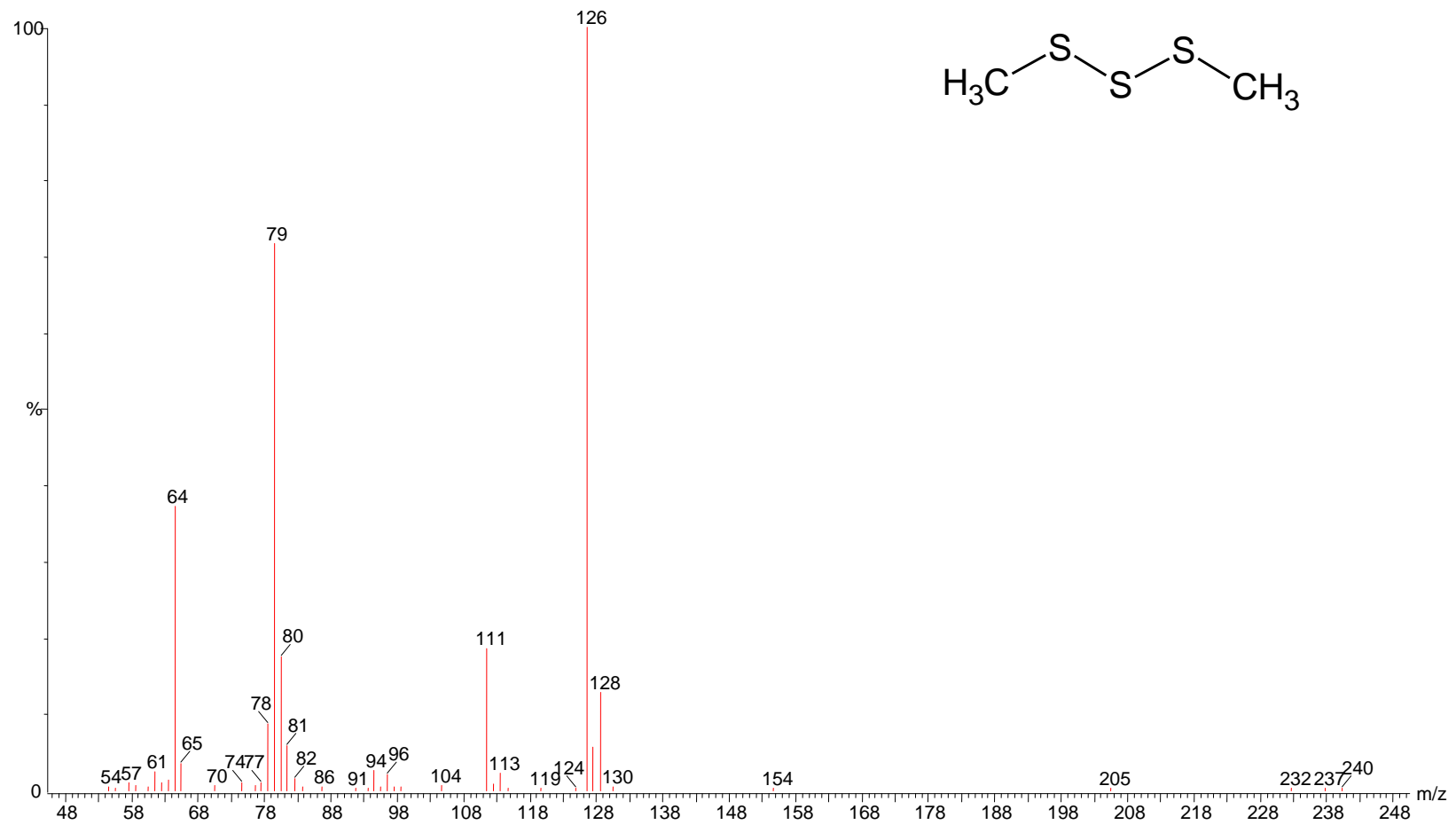
GC-2.2. eot-2 en acetato de etilo



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

MS-9

$R_T = 8.279$





Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

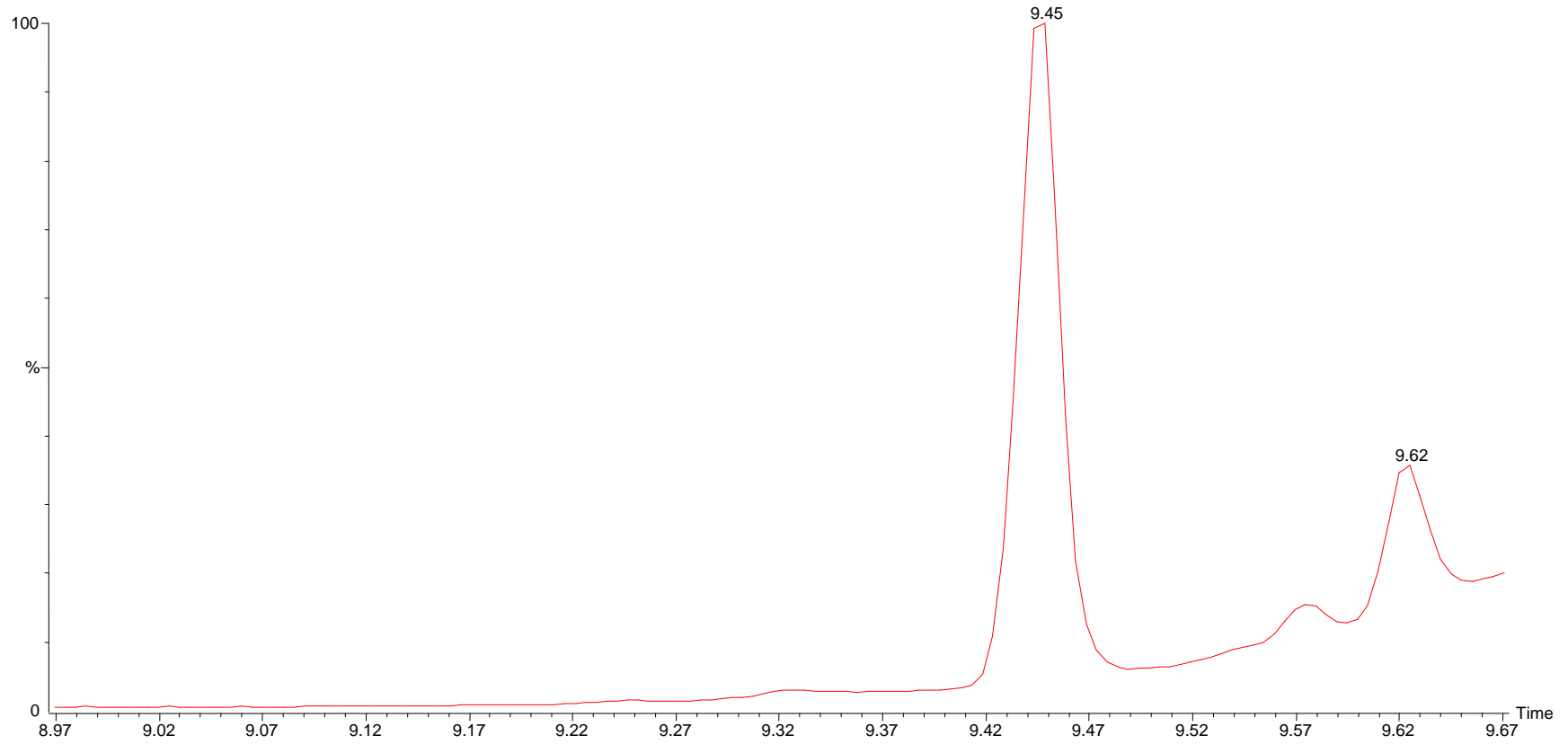
Nombre: Dimetil trisulfuro

m/z: 126 (100, M⁺), 111 (19), 80 (18), 79 (72), 64 (37)



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

eto-2



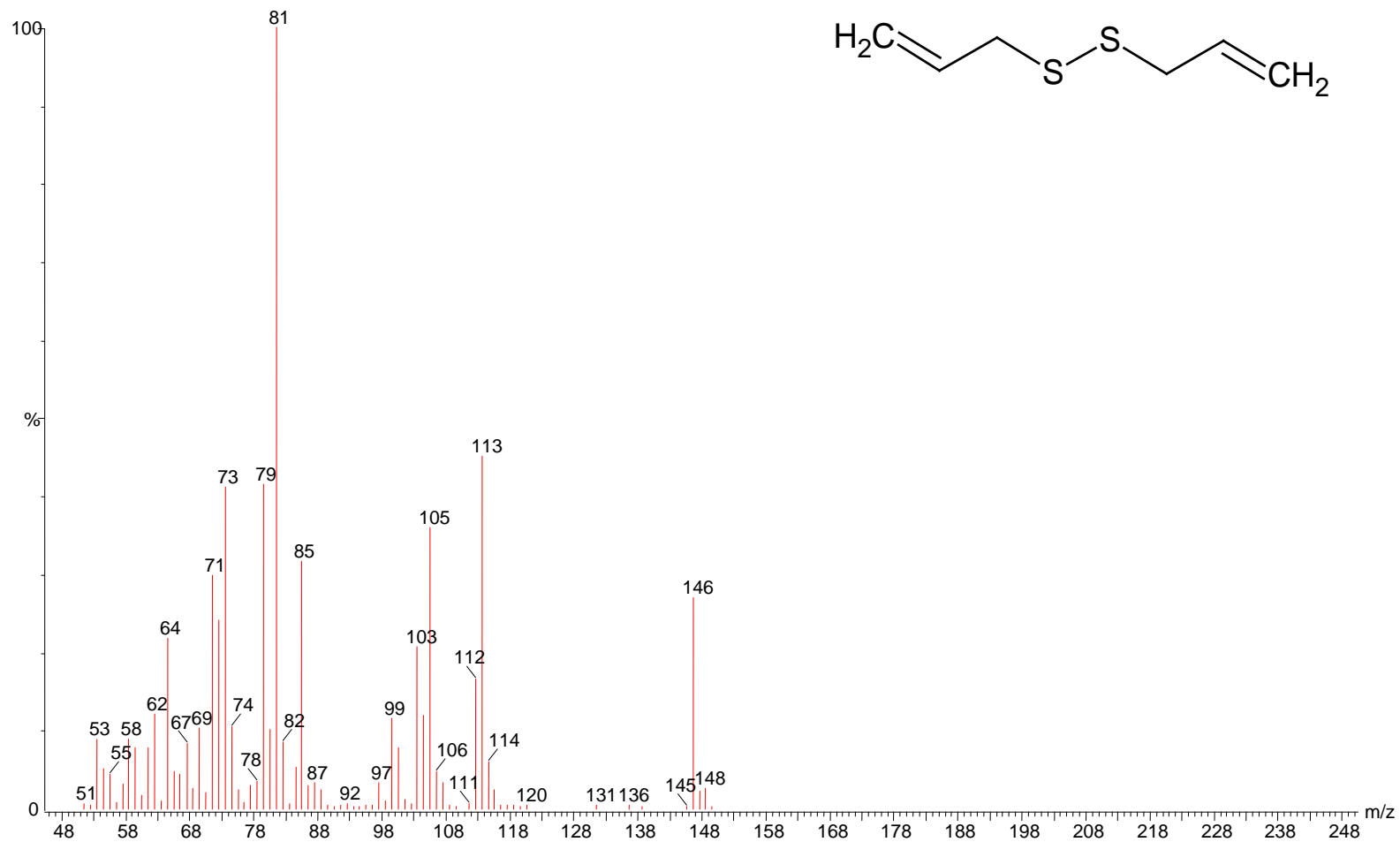
GC-2.3. eot-2 en acetato de etilo



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

MS-10

$R_T = 9.448$





Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

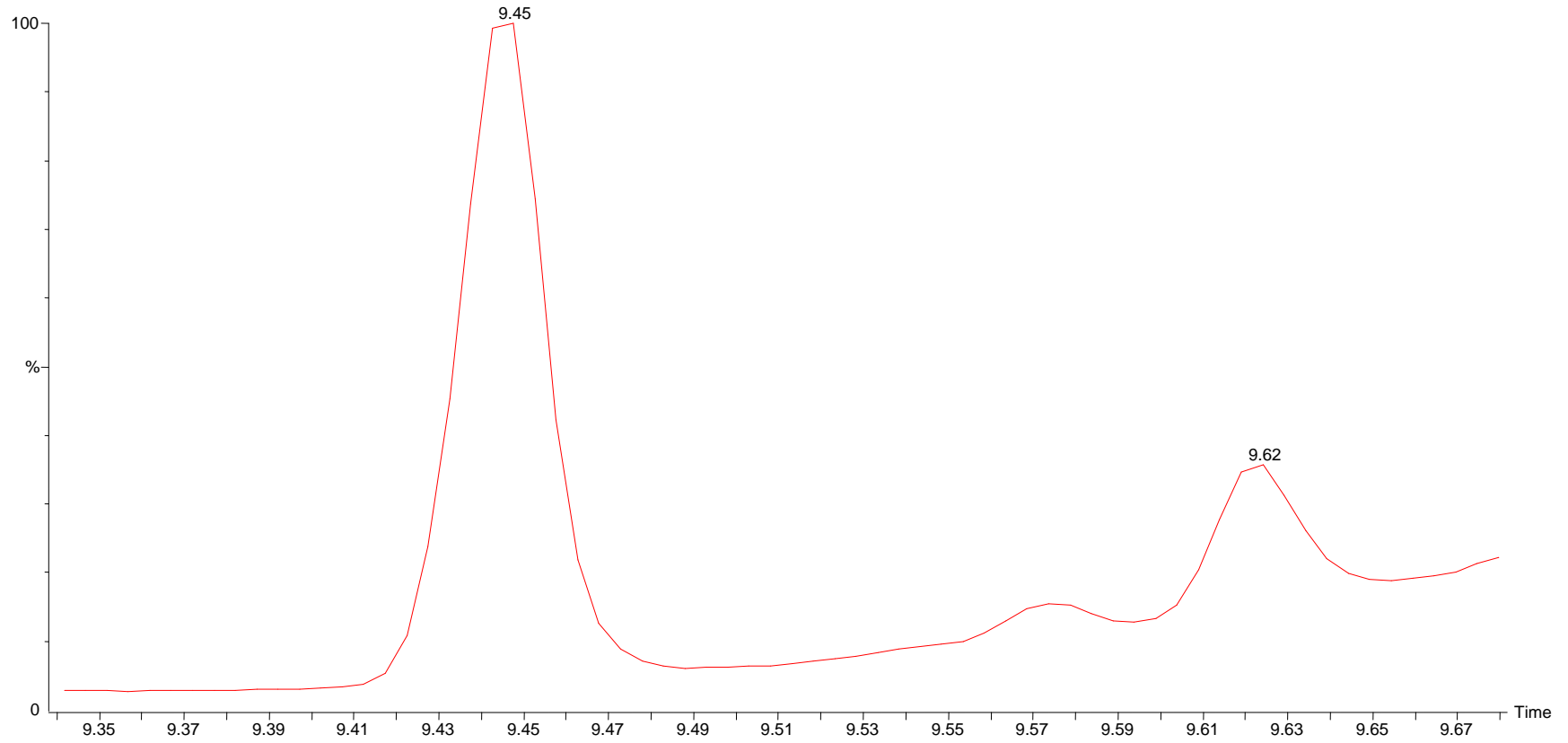
Nombre: Dialil disulfuro

m/z: 146 (27, M⁺), 113 (45), 105 (36), 103 (21), 89 (1), 81 (100), 79 (42), 73 (41), 64 (22)



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

eot-2



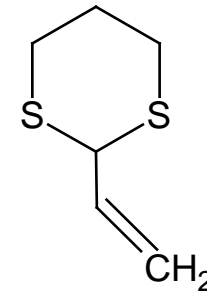
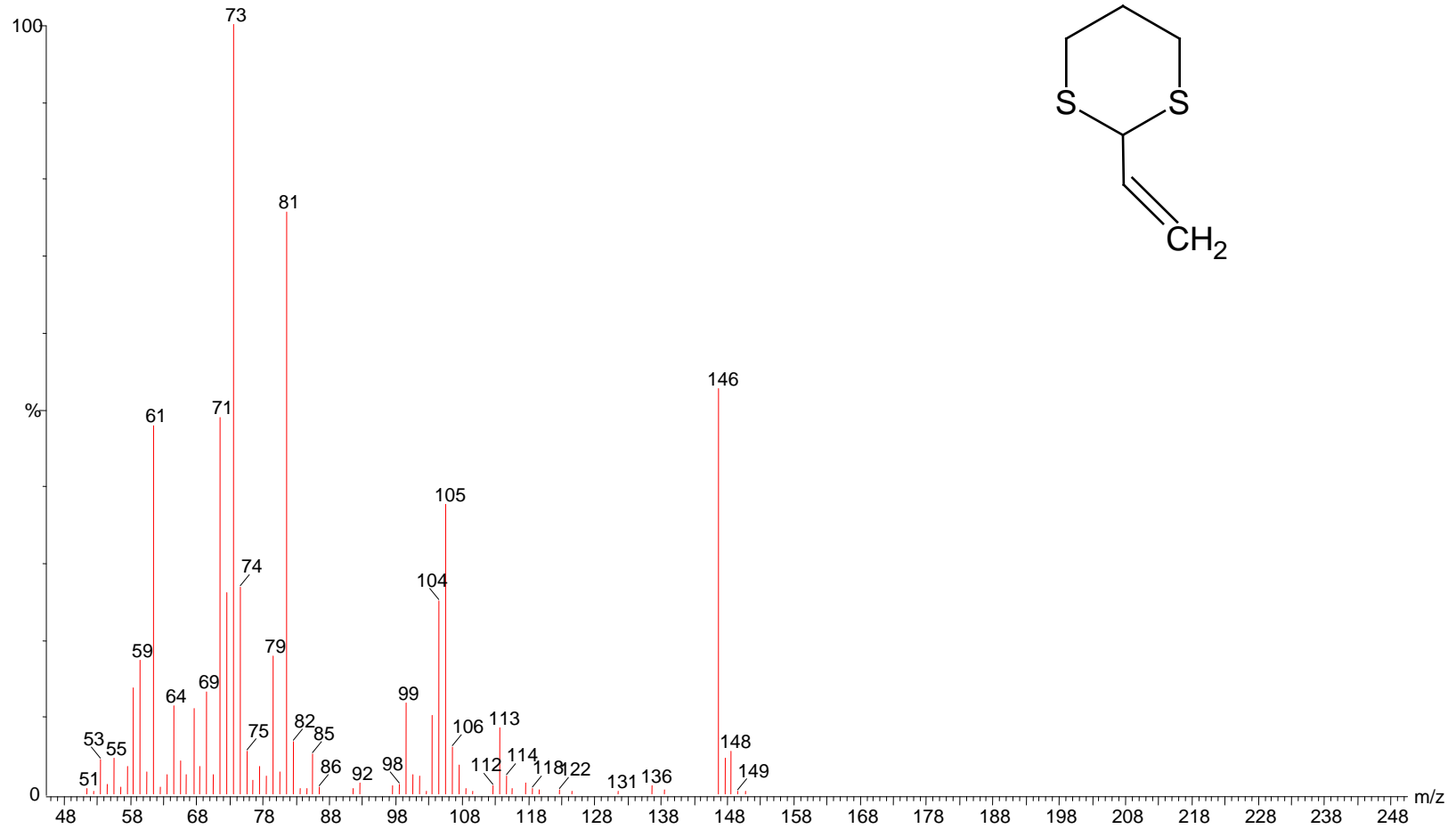
GC-2.4. eot-2 en acetato de etilo



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

MS-11

$R_T = 9.625$

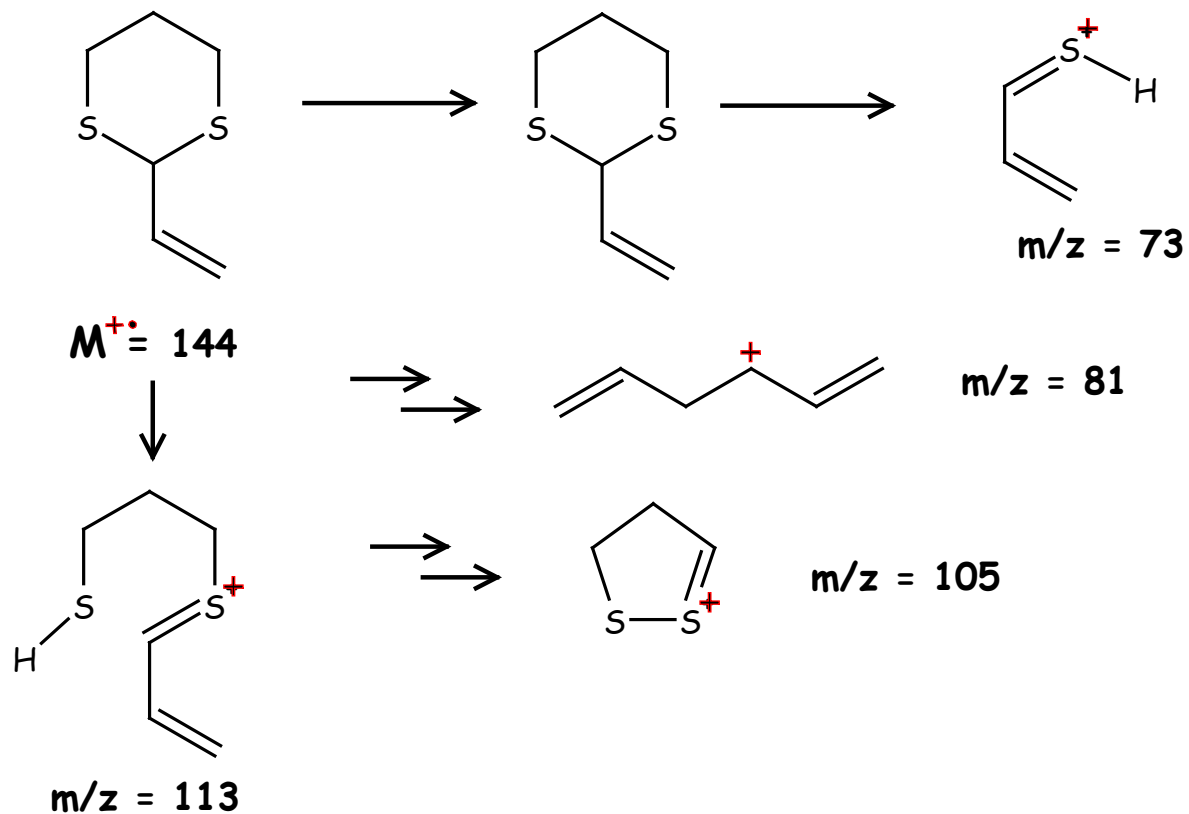




Nombre: 2-vinil-1,3-ditiína

m/z: 146 (53, M^{+•}), 113 (8), 109 (1), 103 (10), 99 (12), 81 (76), 79 (18), 73 (100), 71 (49), 64 (11)

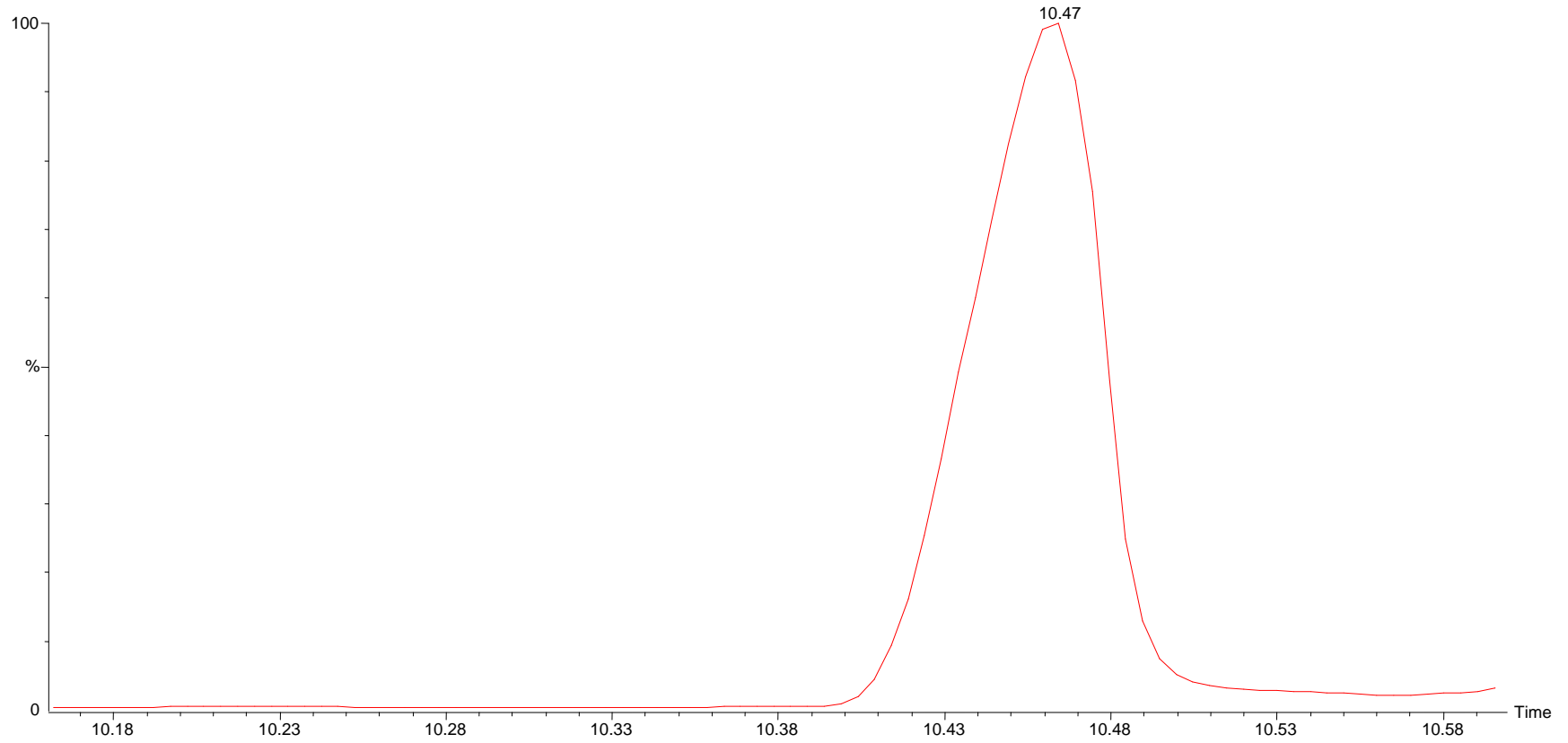
✓ Fragmentaciones ocurridas en MS-11





Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

eot-2



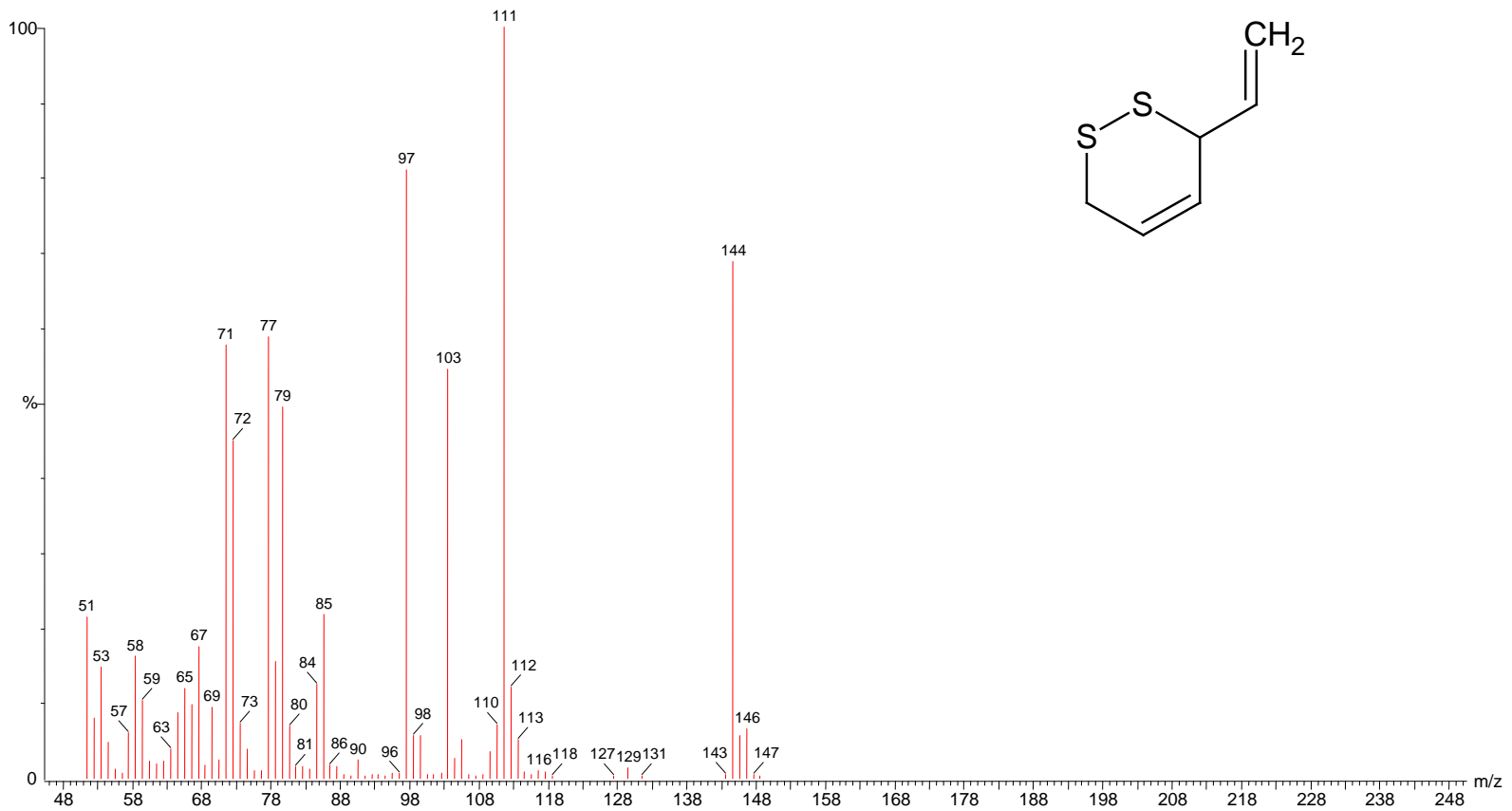
GC-2.5. eot-2 en acetato de etilo



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.): Implicaciones analíticas

MS-12

$R_T = 10.467$





Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

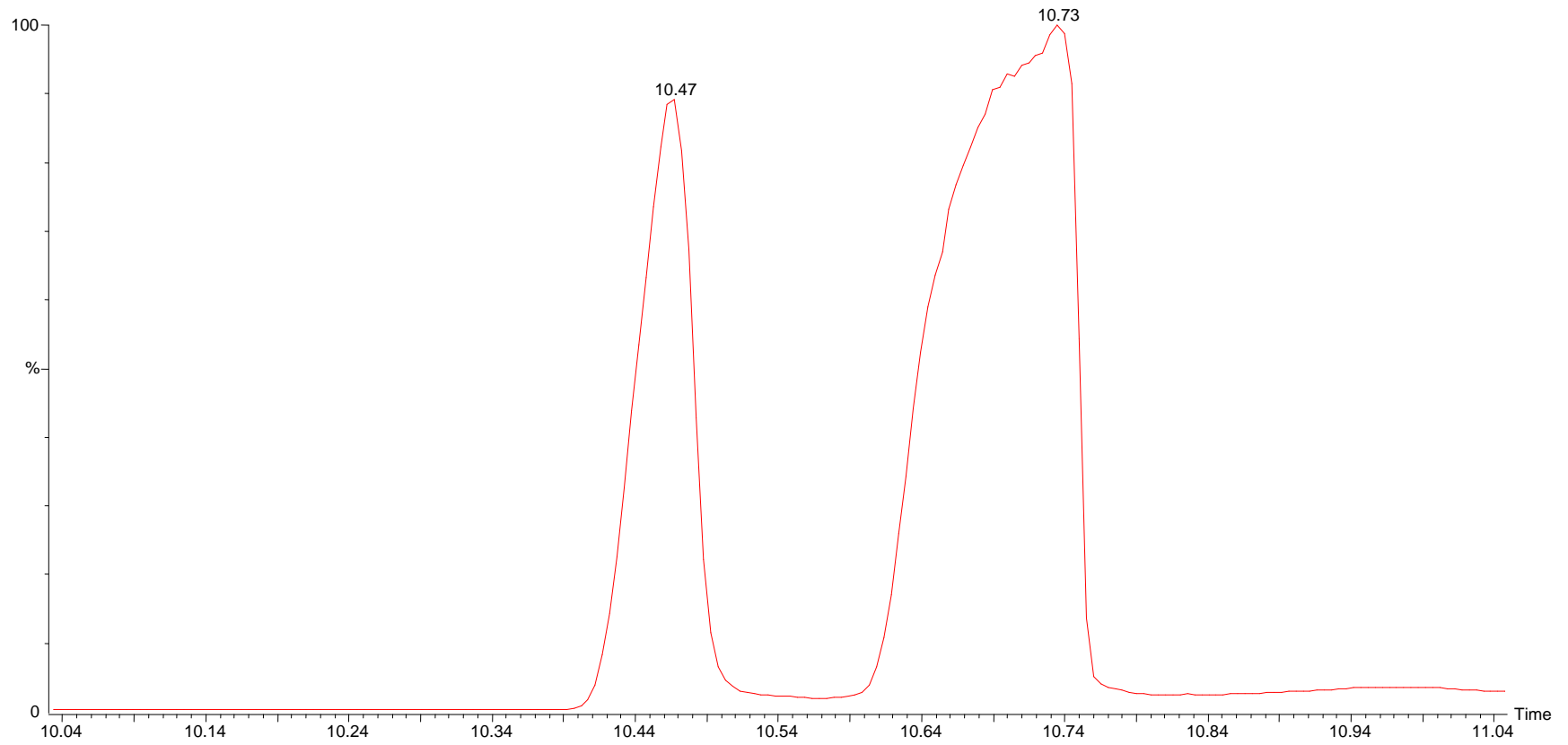
Nombre: 3-vinil-1,2-ditiaciclohex-4-ano

m/z: 144 (69, M⁺•), 111 (100), 103 (54), 97 (81), 89 (1), 79 (49), 77 (59), 73 (7), 69 (9), 58 (16)



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

eot-2



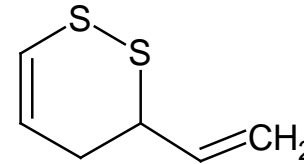
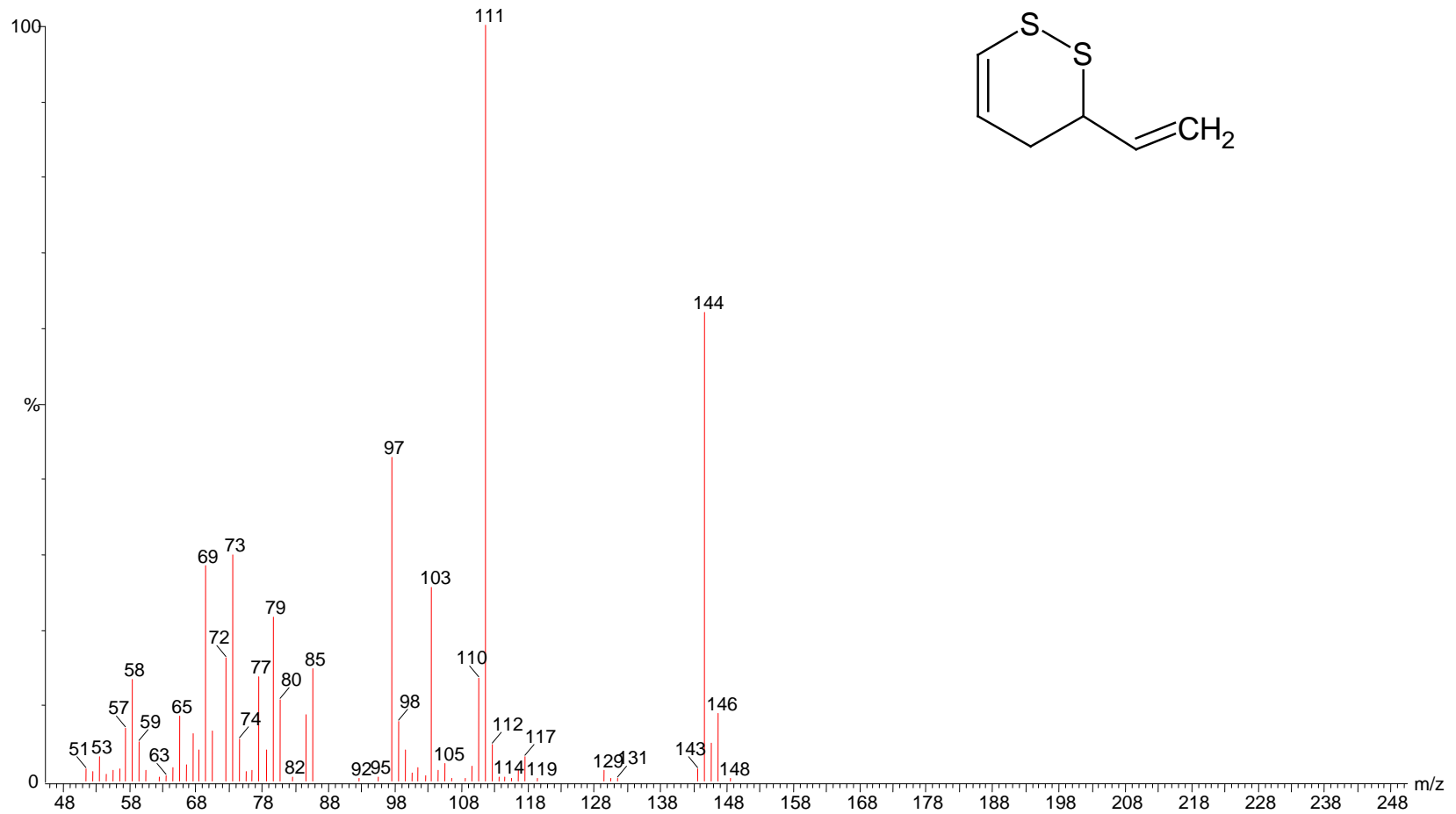
GC-2.6. eot-2 en acetato de etilo



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

MS-13

$R_T = 10.734$





Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

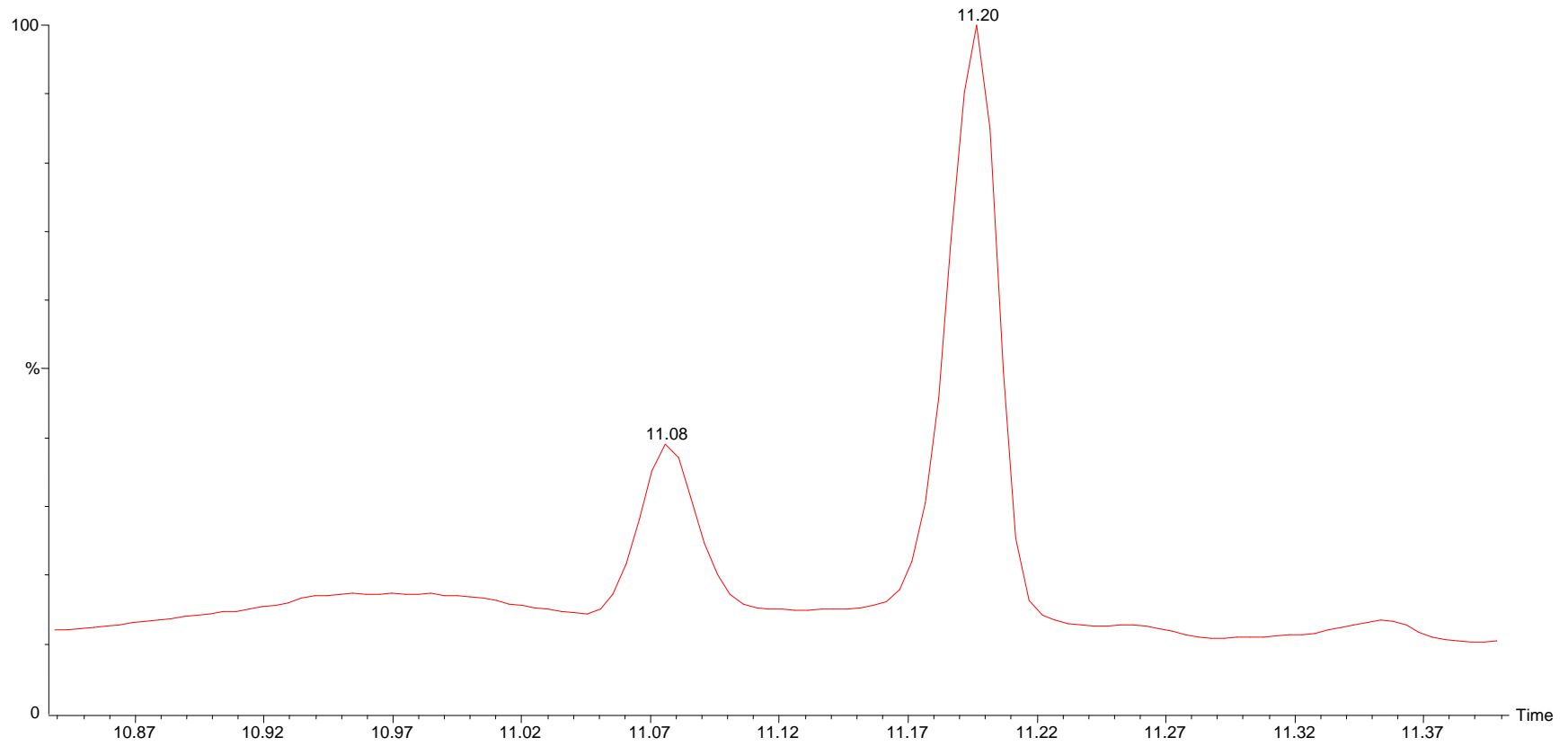
Nombre: 3-vinil-1,2-ditiaciclohex-5-ano

m/z: 144 (62, M⁺•), 111 (100), 97 (43), 85 (15), 79 (22), 77 (14), 73 (30), 69 (28), 58 (13)



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

eot-2



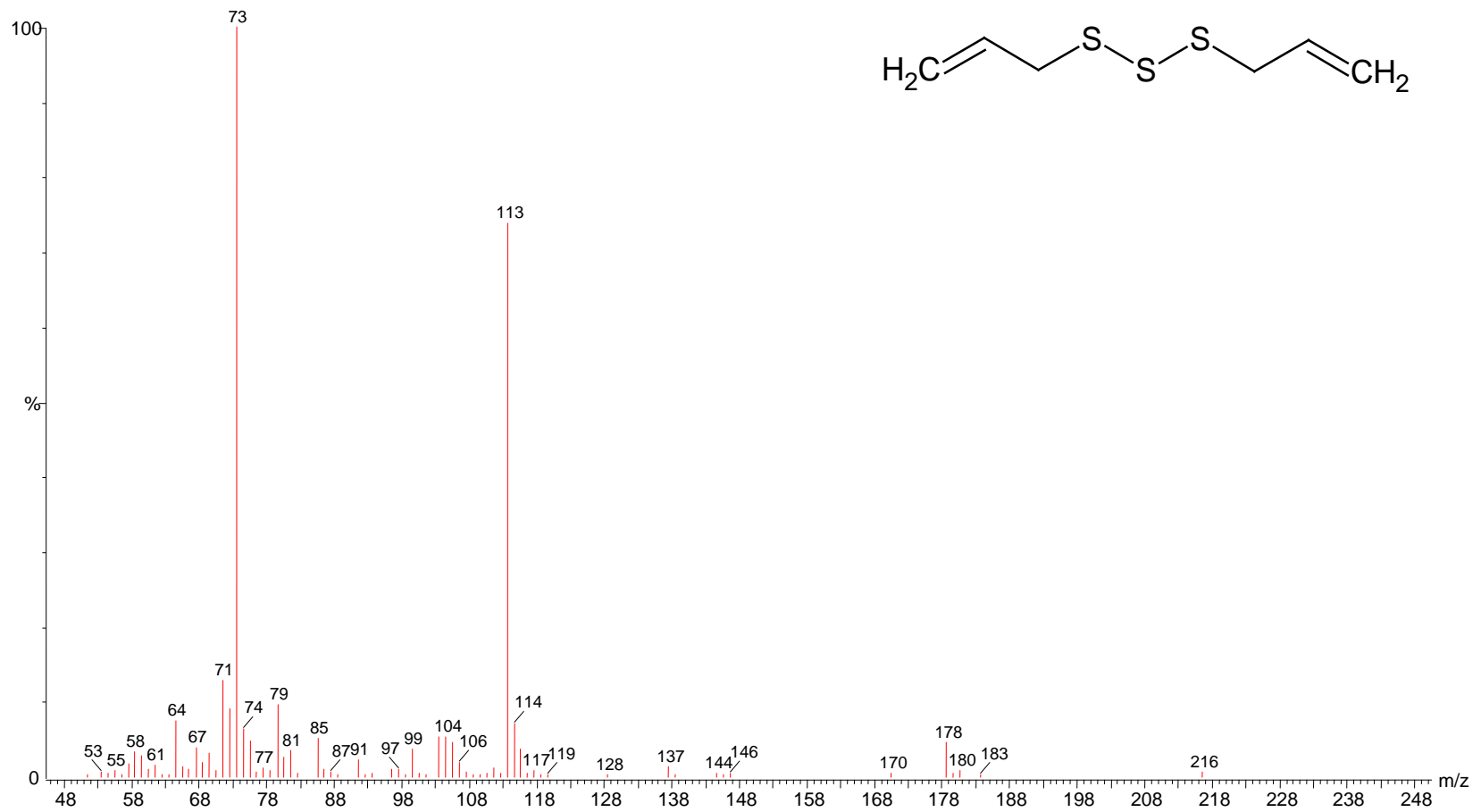
GC-2.7. eot-2 en acetato de etilo



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

MS-14

$R_T = 11.198$





Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

Nombre: Di-2-propenil- trisulfuro

m/z: 178 (5, M⁺), 146 (1), 113 (74), 105 (5), 85 (5), 73 (100), 64 (7)



Anexo 2. Análisis de espectros de masas (Fracciones)

A2.1 Condiciones de operación

Programa GC

Columna capilar: Elite 5 Wax (50% Fenilpolisiloxano); 30 m de longitud; 320 μ de diámetro interno; 5 μ de espesor de fase

Gas de arrastre: Helio (He)

Presión de flujo: 15 psi

Split: 50%

Temperatura del inyector: 200 °C

Condiciones de temperatura: 60 °C, 3 min; 60-200 °C, 20 °C/min; 200 °C, 15 min

Volumen de inyección 2.5 μ l

Programa MS

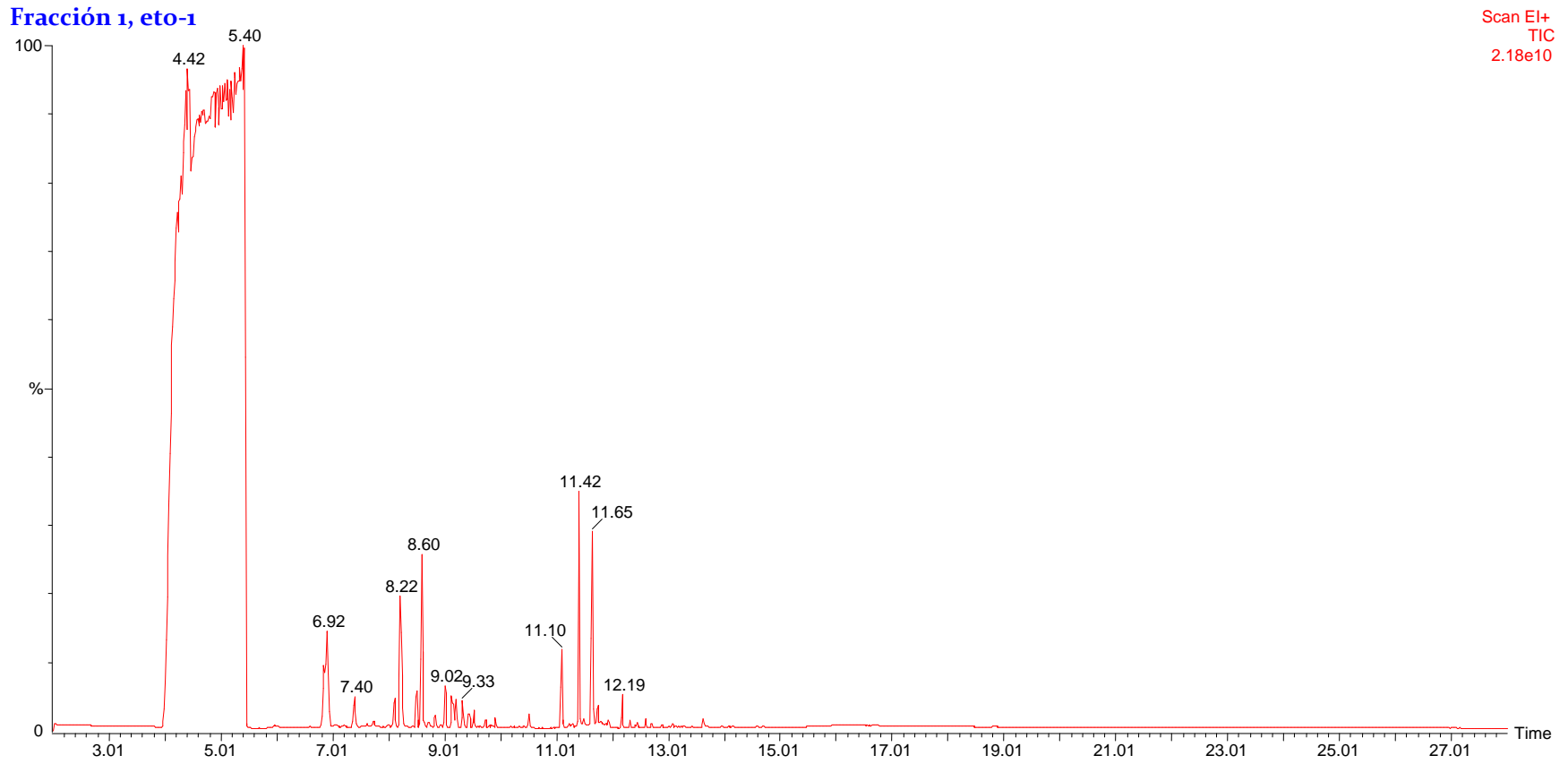
Temperatura de línea de transferencia: 230 °C

Rango de barrido: 25 a 450 m/z

Tiempo de barrido: 2 seg



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

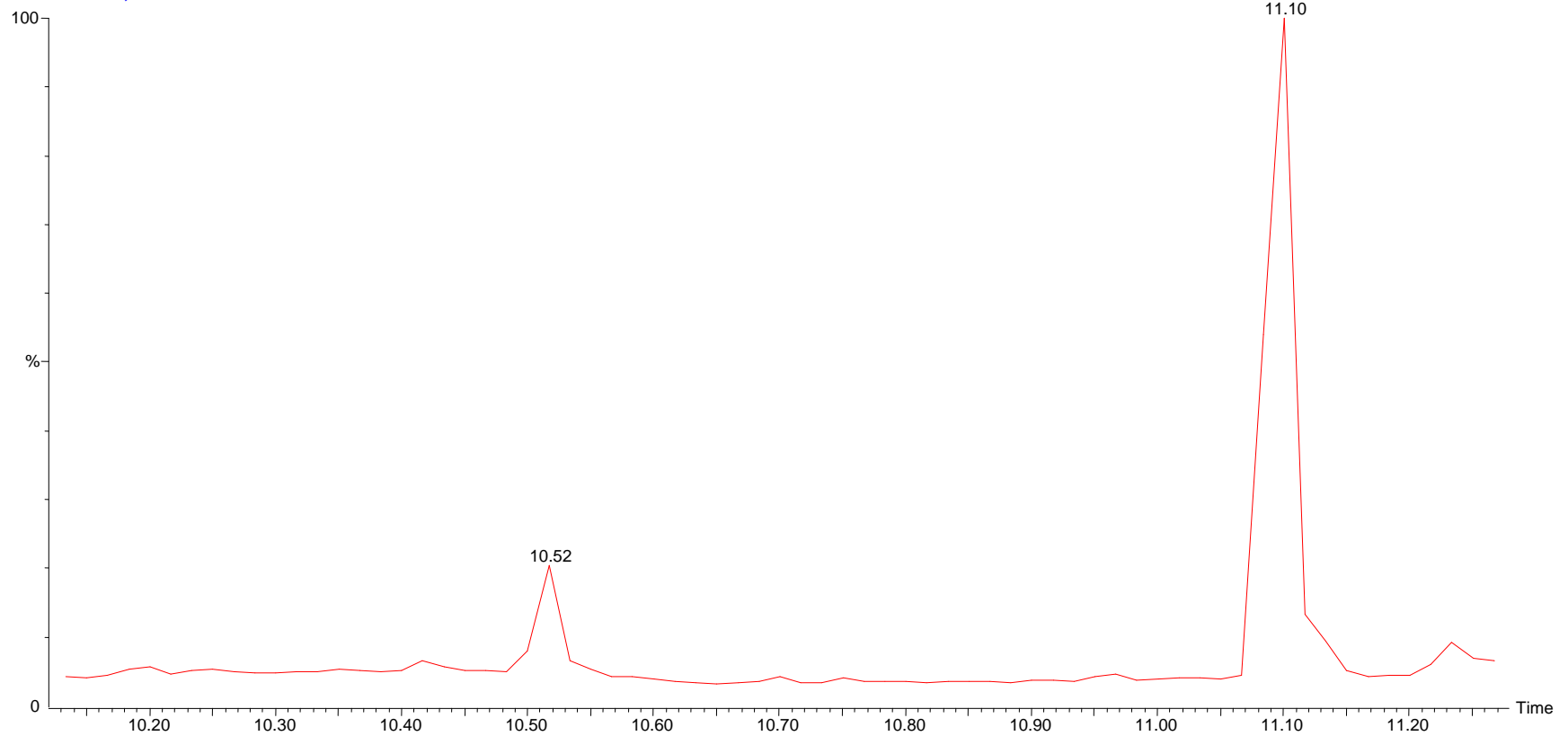


GC-3. Fracción 1 del eot-1 en cloroformo (Total)



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.): Implicaciones analíticas

Fracción 1, eot-1



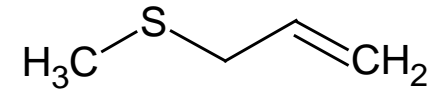
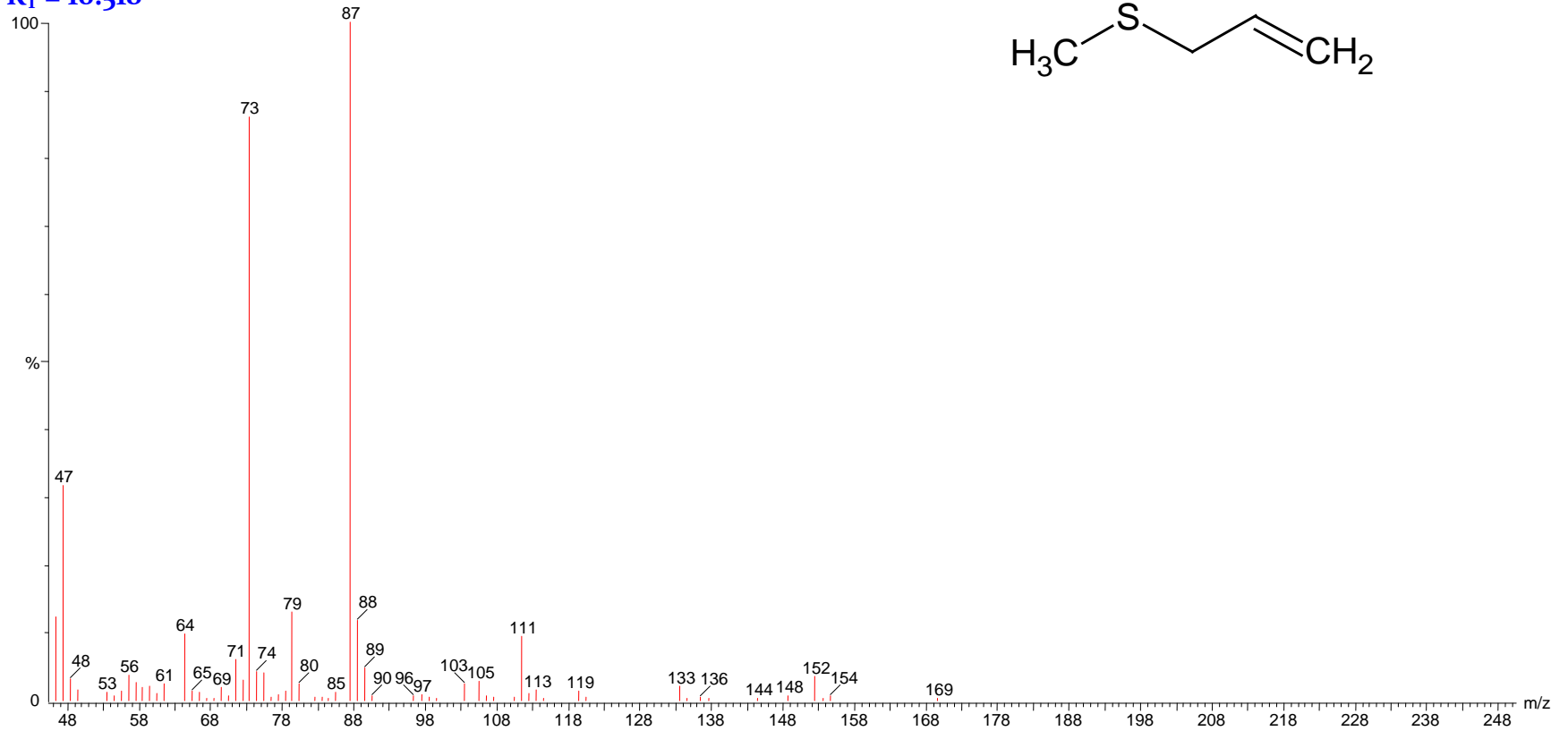
GC-3.1. Fracción 1 del eot-1 en cloroformo



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

MS-15

$R_T = 10.518$



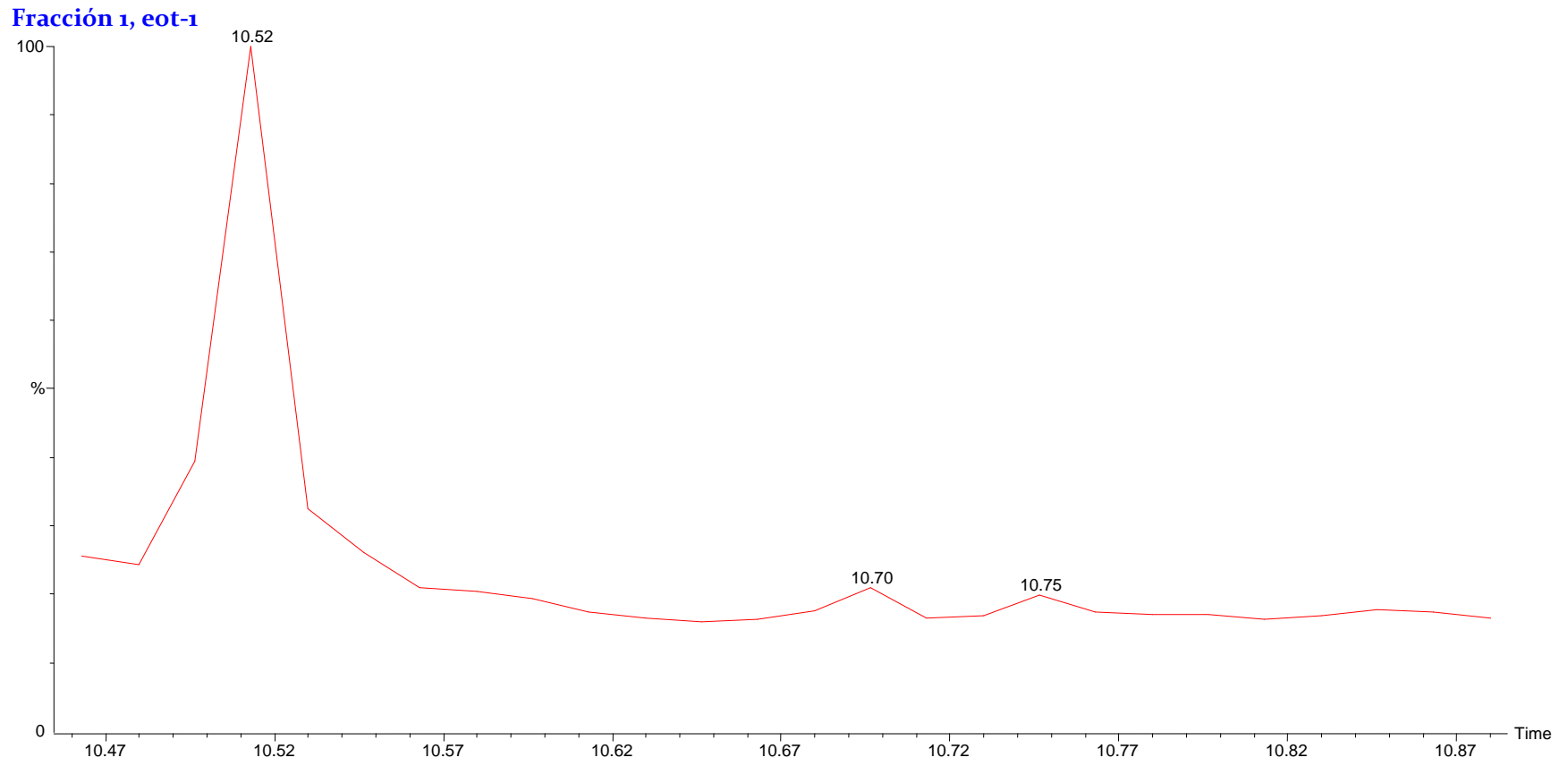


Nombre: Alil metil sulfuro

m/z: 152 (4), 148 (1), 111 (9), 88 (12, M⁺), 87 (100), 73 (86), 64 (10)



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.): Implicaciones analíticas



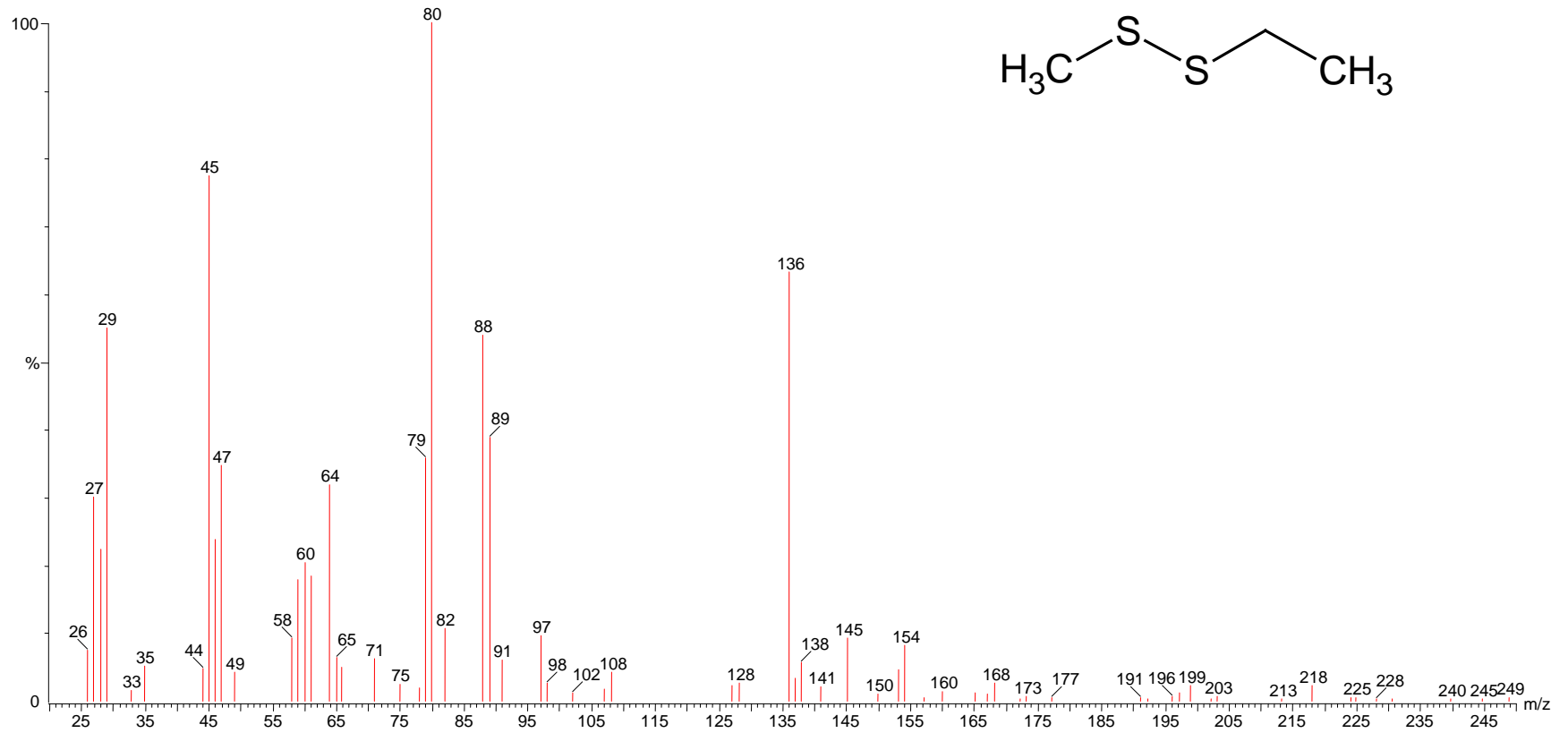
GC-3.2. Fracción 1 del eot-1 en cloroformo



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.): Implicaciones analíticas

MS-16

Fracción 1, eot-1





Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

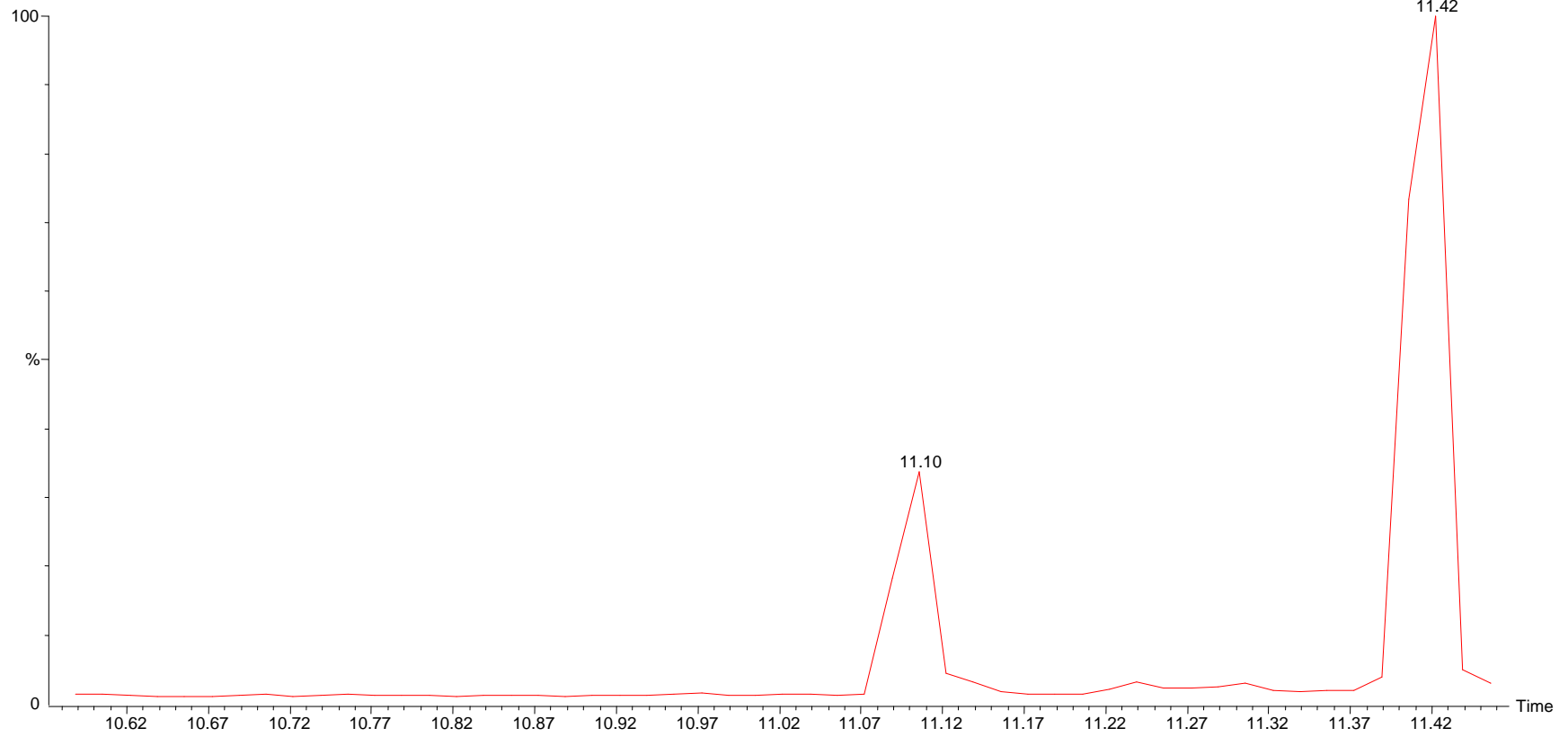
Nombre: Metil etil disulfuro

m/z: 108 (4, M⁺), 97 (10), 89 (39), 88 (54), 80 (100), 79 (36), 64 (32), 60 (20), 47 (35), 45 (77), 29 (55)



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

Fracción 1, eot1



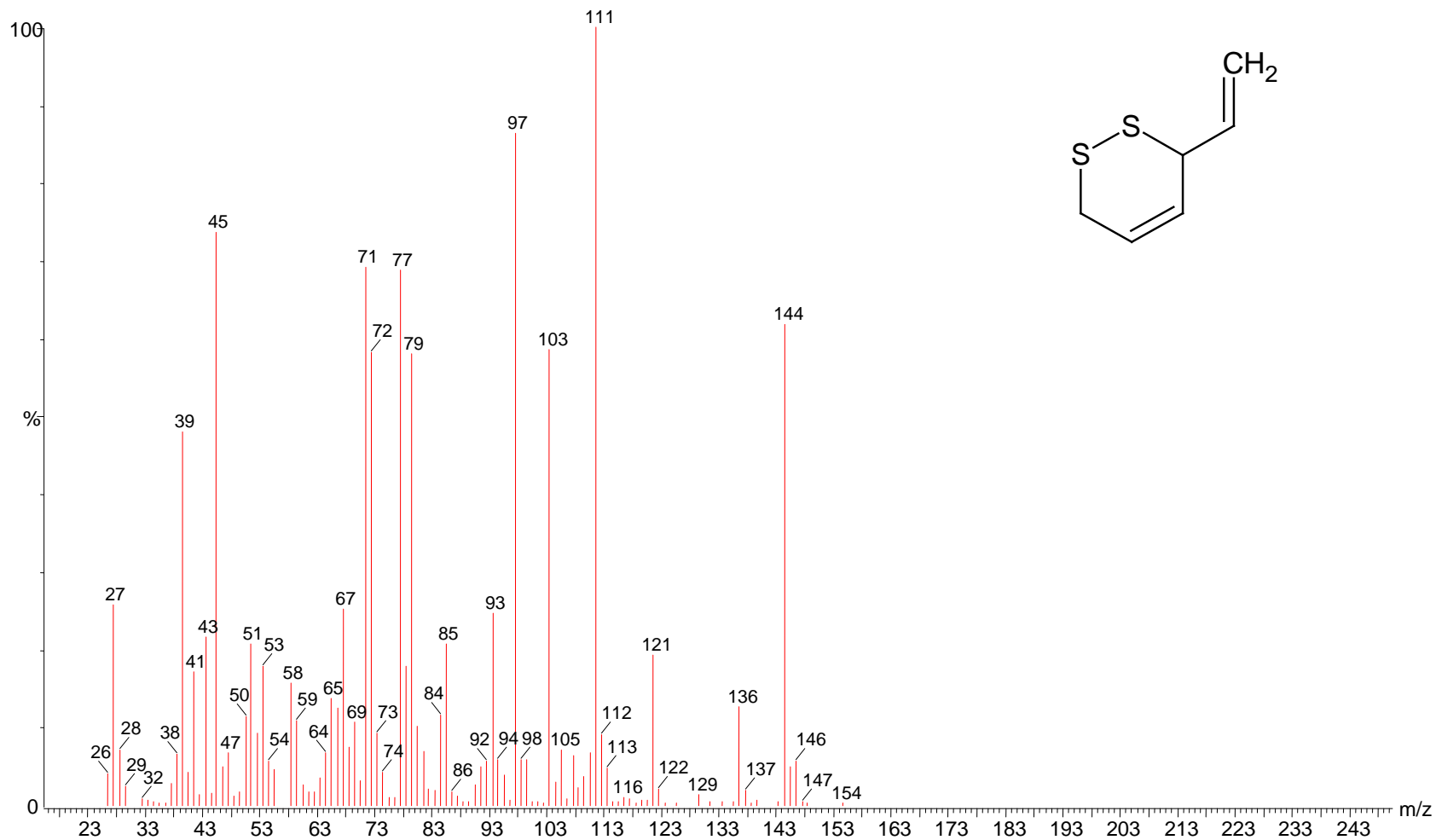
GC-3.3. Fracción 1 del eot-1 en cloroformo



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.): Implicaciones analíticas

MS-17

$R_T = 11.102$





Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

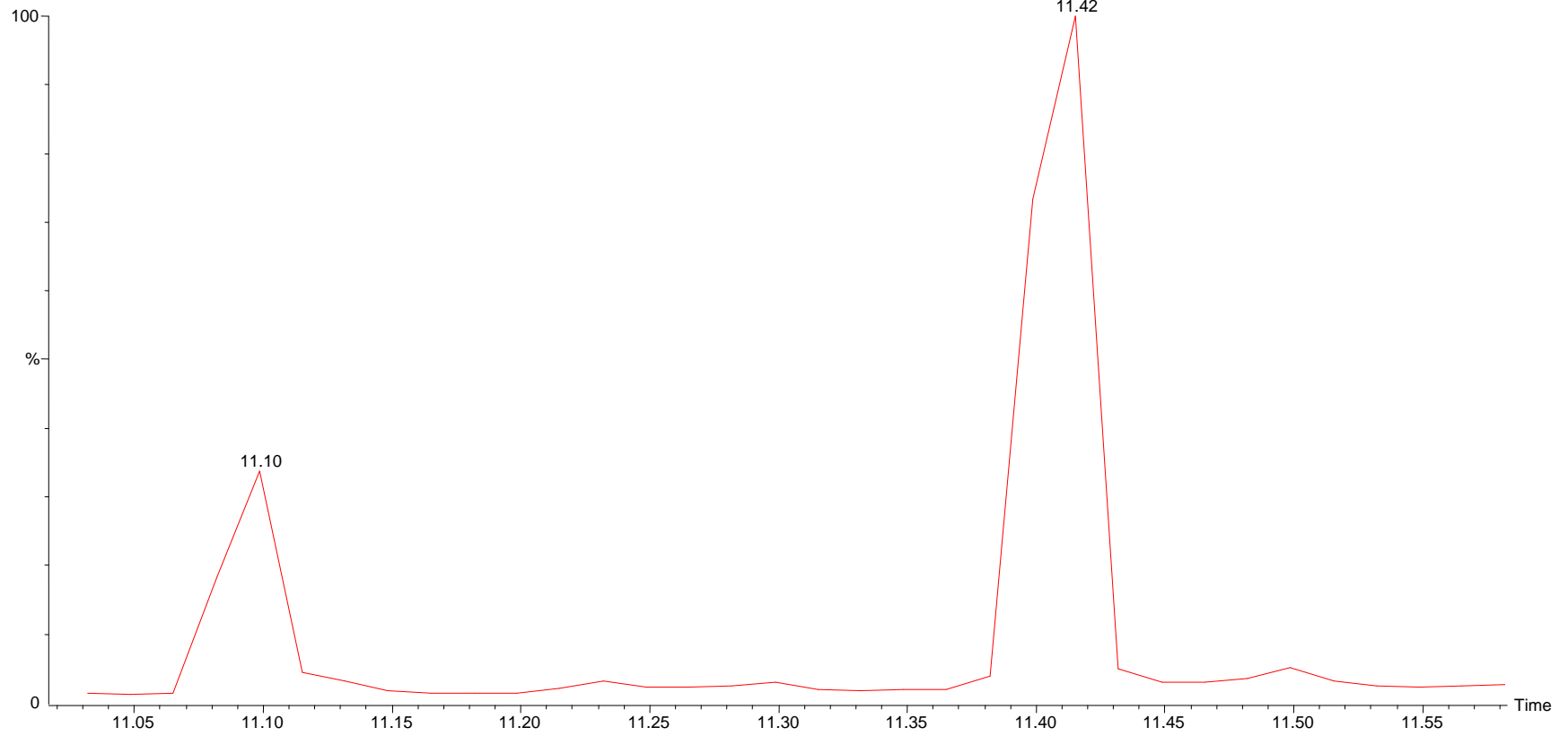
Nombre: 3-vinil-1,2-ditiaciclohex-4-ano

m/z : 144 (62, M⁺), 136 (13), 121 (19), 111 (100), 103 (59), 97 (86), 93 (25), 85 (21), 79 (58), 77 (69), 72 (58), 71 (69)



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

Fracción 1, eot-1



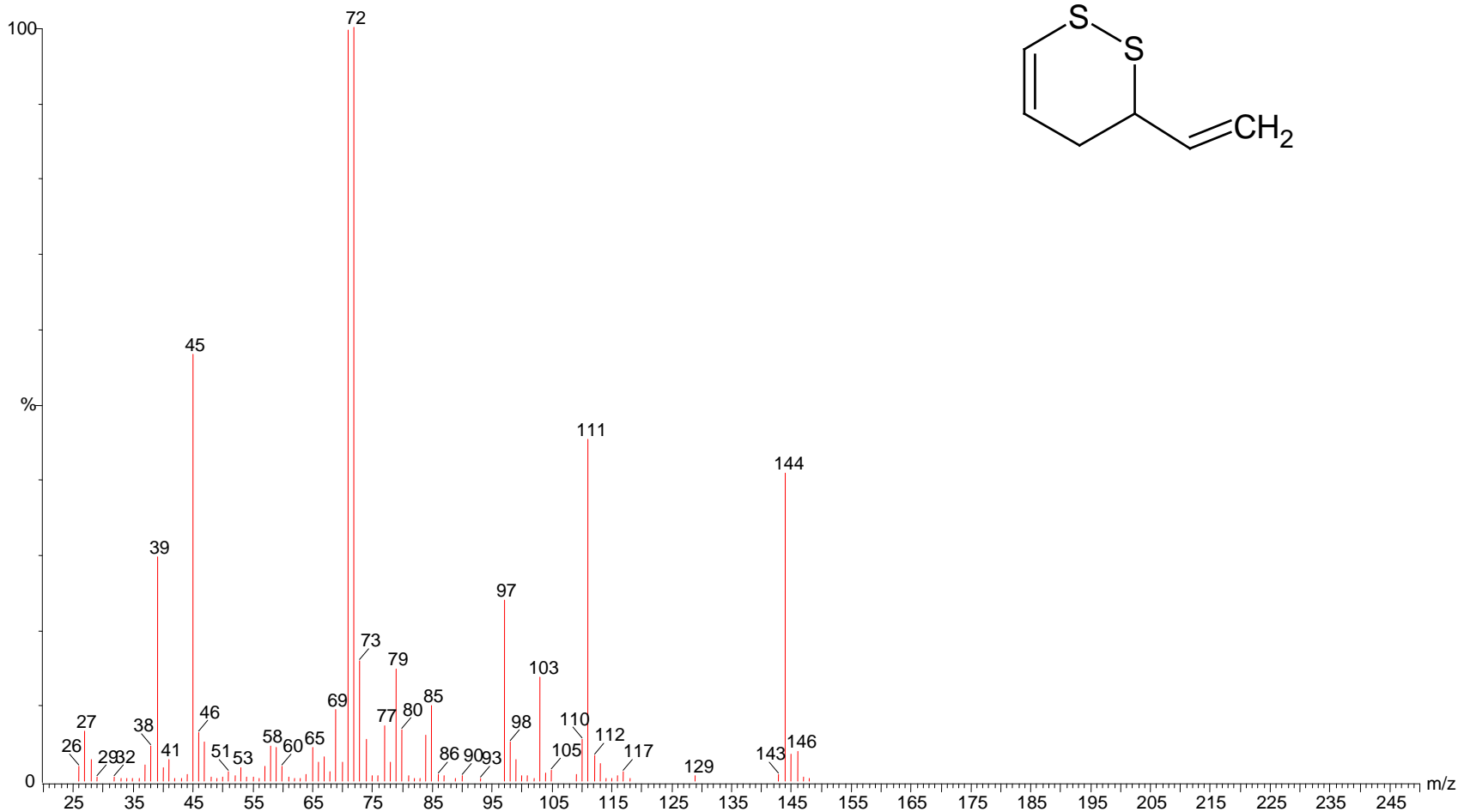
GC-3.4. Fracción 1 del eot-1 en cloroformo



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

MS-18

$R_T = 11.420$





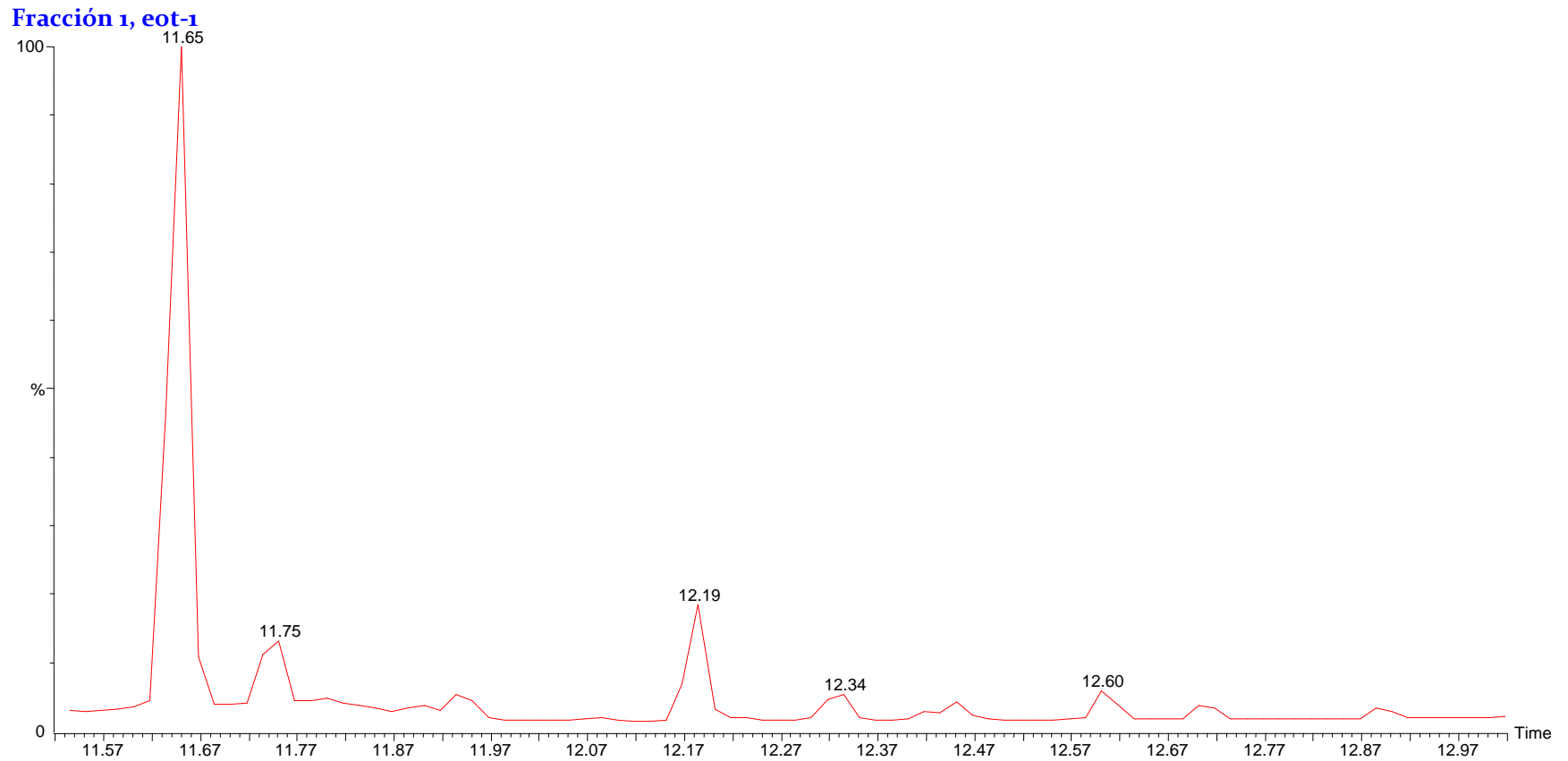
Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

Nombre: 3-vinil-1,2-ditiaciclohex-5-ano

m/z : 144 (41, M⁺•), 111 (45), 103 (14), 97 (24), 89 (1), 79 (15), 77 (7), 73 (16), 72 (100), 71 (99),
45 (57), 39 (30)



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas



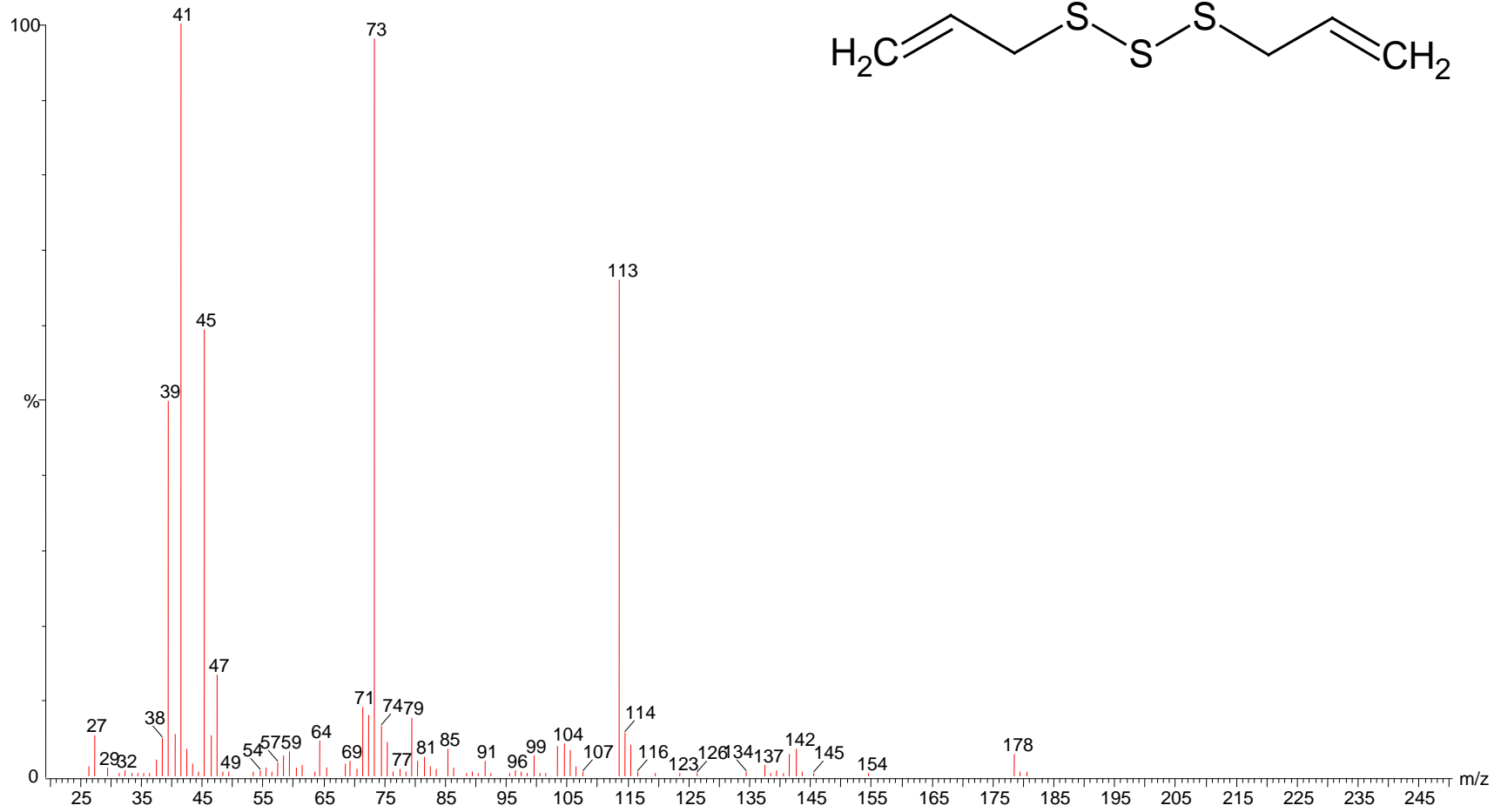
GC-3.5. Fracción 1 del eot-1 en cloroformo



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

MS-19

$R_T = 11.752$





Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

Nombre: Di-2-propenil- trisulfuro

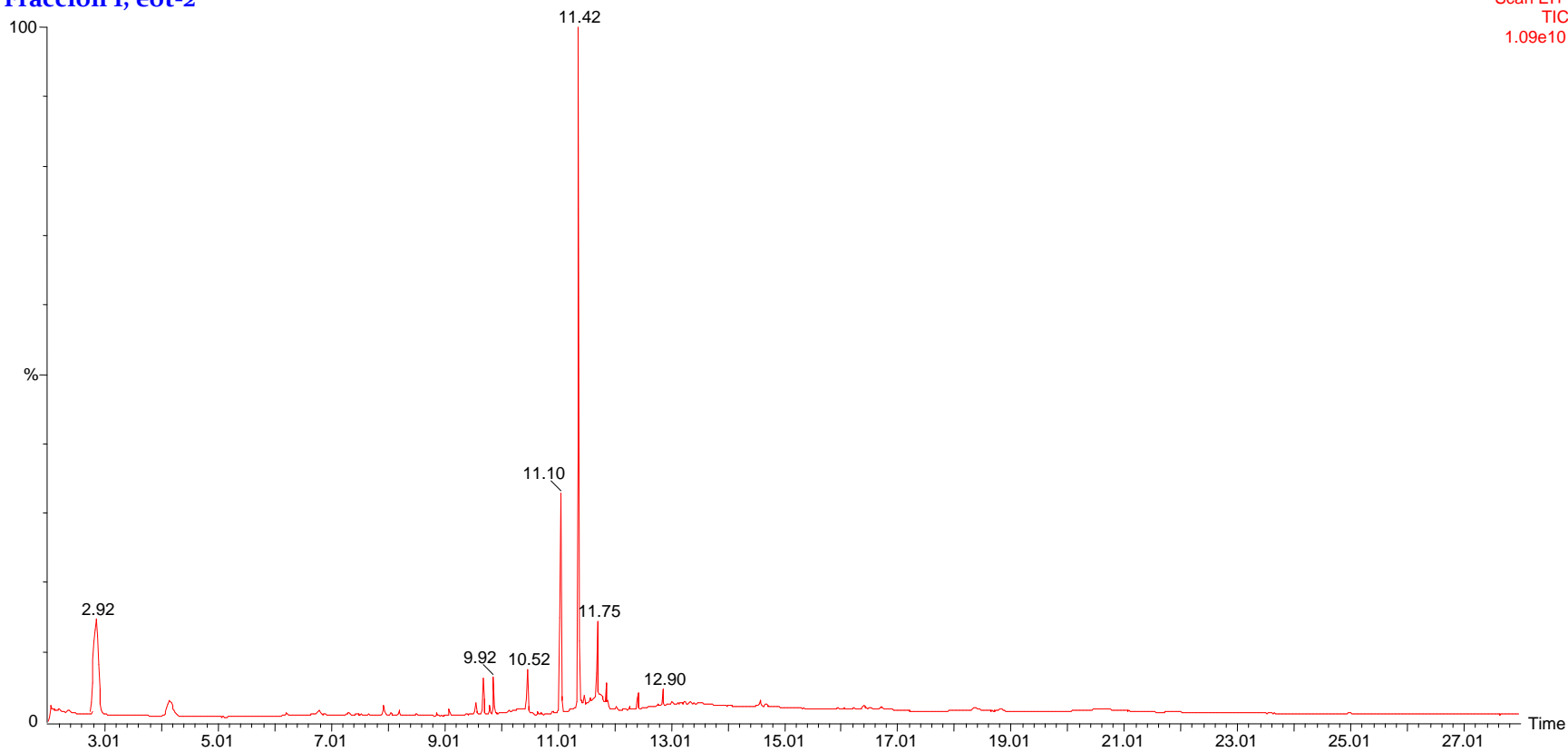
m/z : 178 (3, M⁺), 142 (3), 113 (66), 85 (3), 79 (8), 73 (98), 64 (4), 47 (13), 45 (59), 41 (100), 39 (50)



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.): Implicaciones analíticas

Fracción 1, eot-2

Scan EI+
TIC
1.09e10

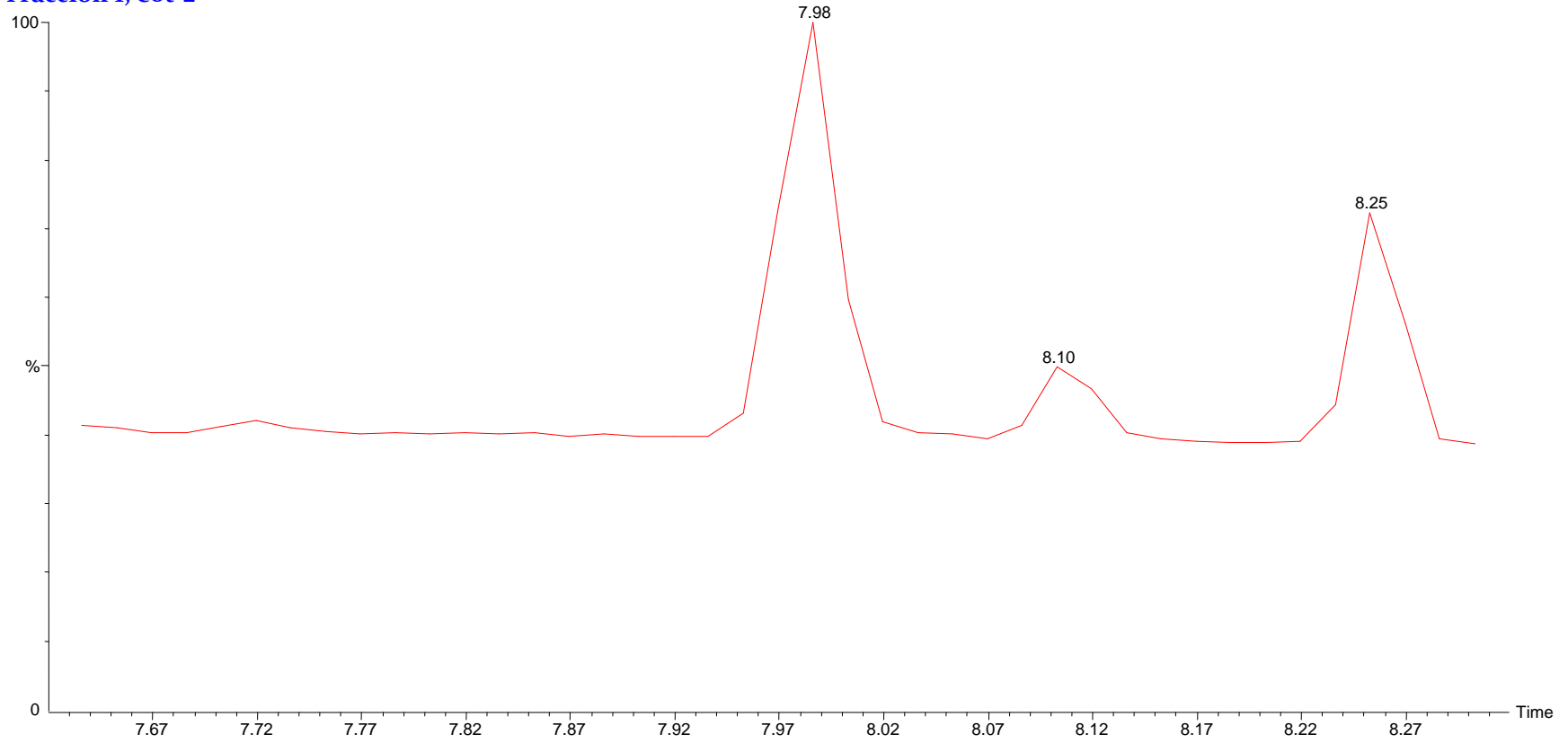


GC-4. Fracción 1 de eot-2 en acetato de etilo (Total)



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.): Implicaciones analíticas

Fracción 1, eot-2



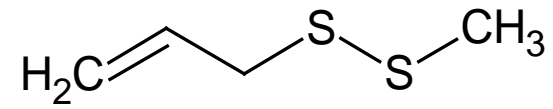
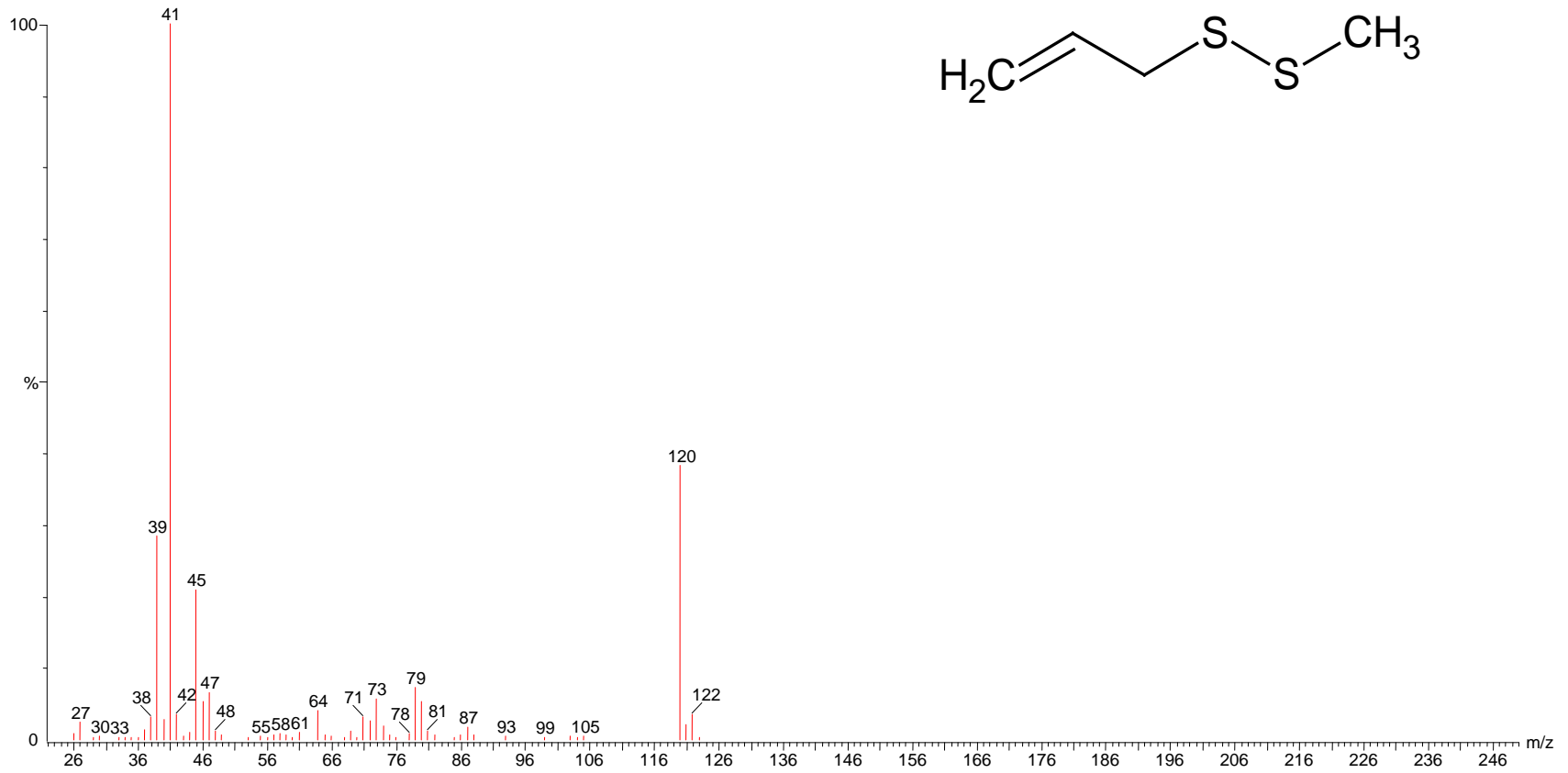
GC-4.1. Fracción 1 de eot-2 en acetato de etilo



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

MS-20

$R_T = 7.984$





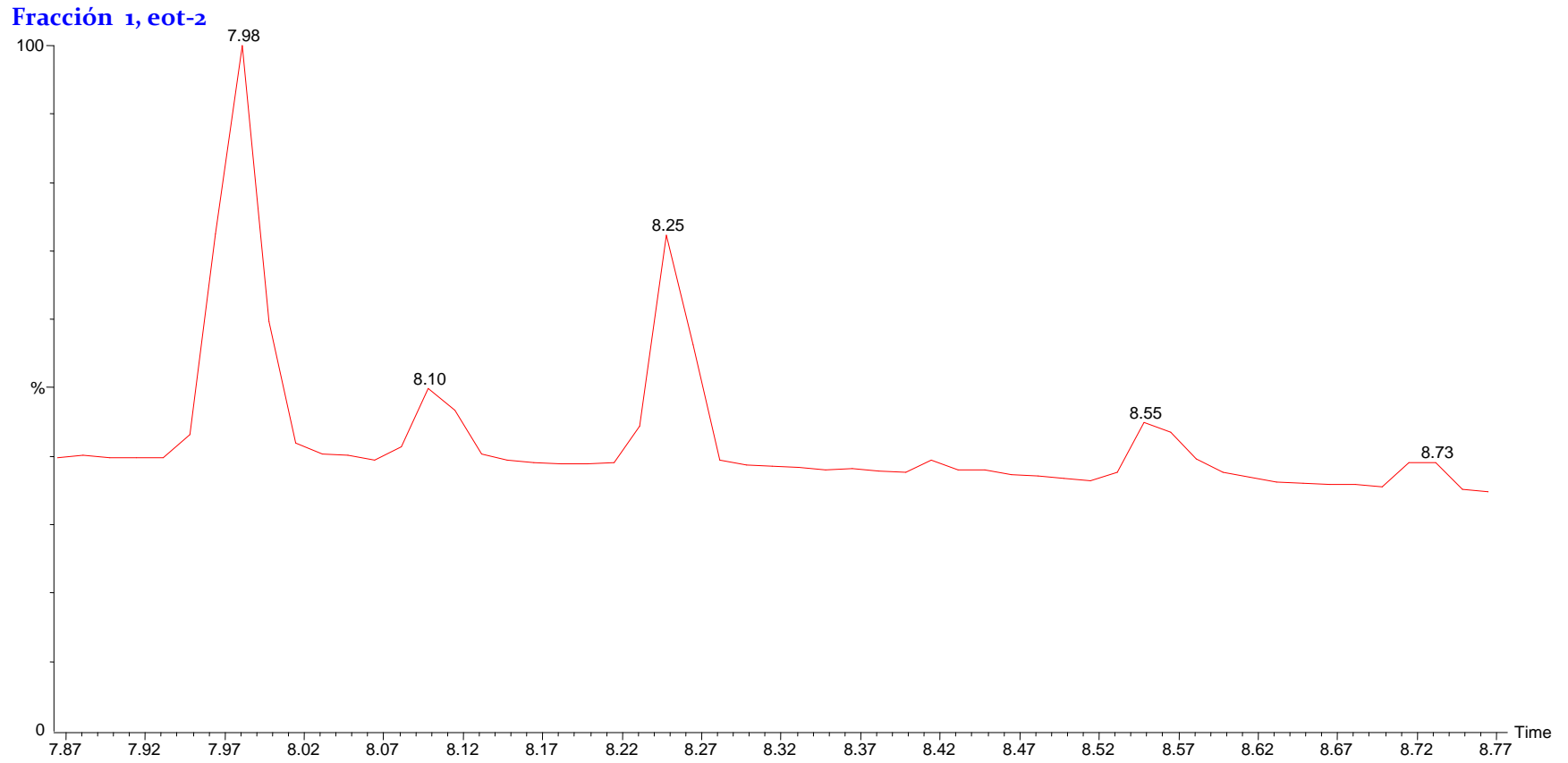
Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

Nombre: Metil-2-propenil-disulfuro

m/z : 120 (38, M⁺), 105 (1), 79 (7), 73 (6), 64 (4), 47 (6), 45 (21), 41 (100), 39 (28)



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas



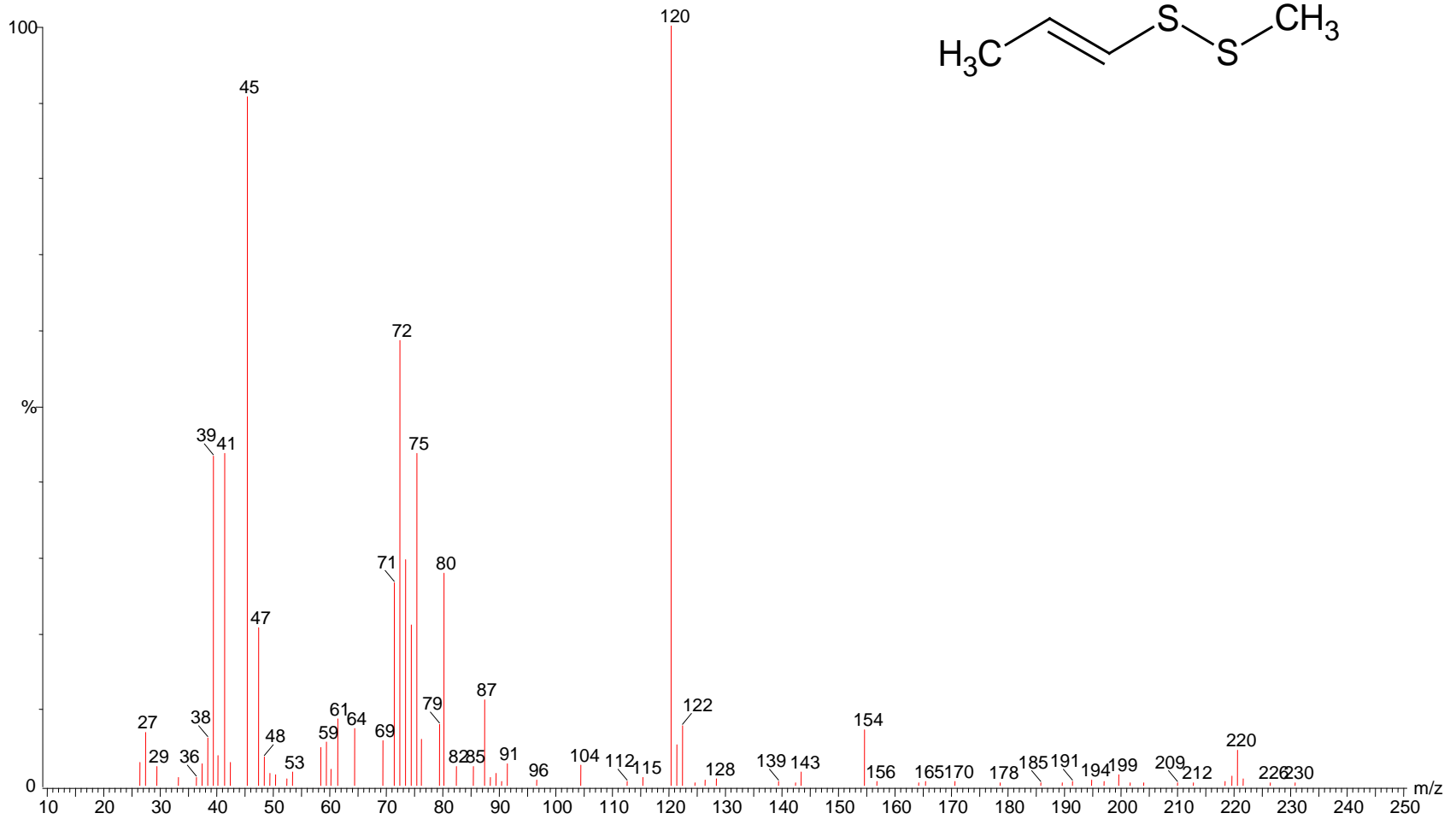
GC-4.2. Fracción 1 de eot-2 en acetato de etilo



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

MS-21

$R_T = 8.101$





Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

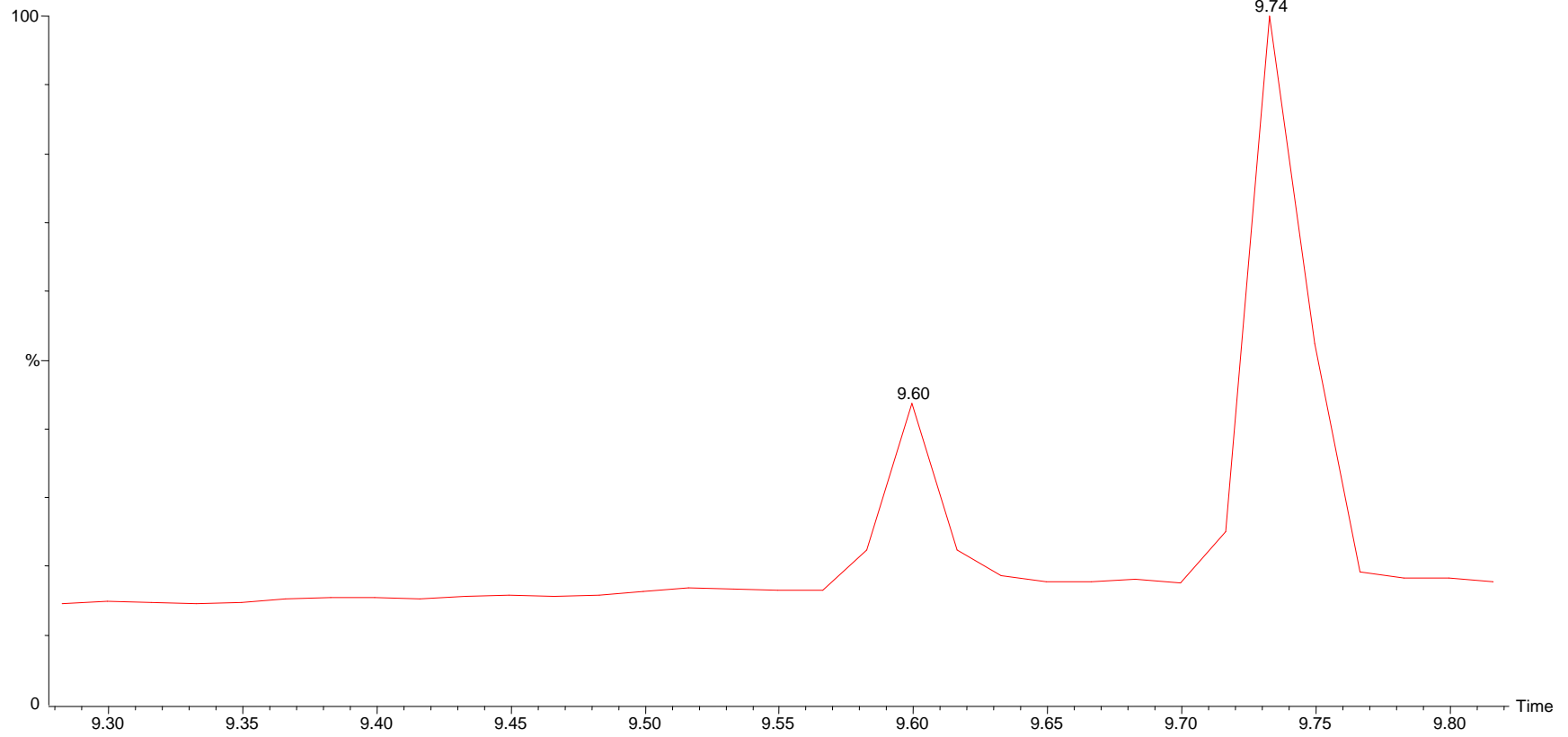
Nombre: Metil-1-propenil-disulfuro

m/z : 220 (5), 154 (7), 120 (100, M⁺), 87 (11), 80 (28), 75 (44), 73 (30), 72 (59), 64 (7), 61 (9)



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.): Implicaciones analíticas

Fracción 1, eot-2



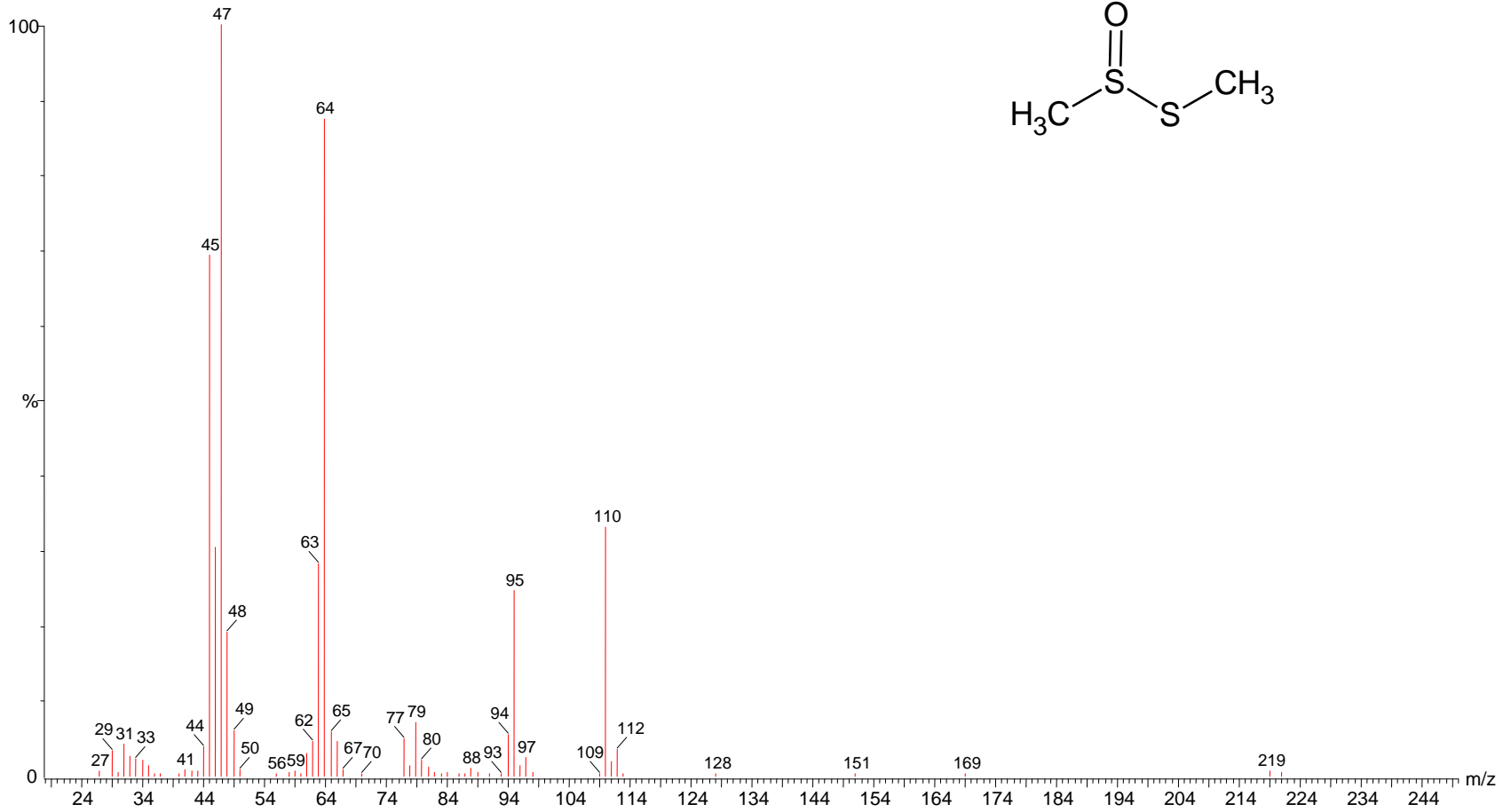
GC-4.3. Fracción 1 de eot-2 en acetato de etilo



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

MS-23

$R_T = 9.602$





Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

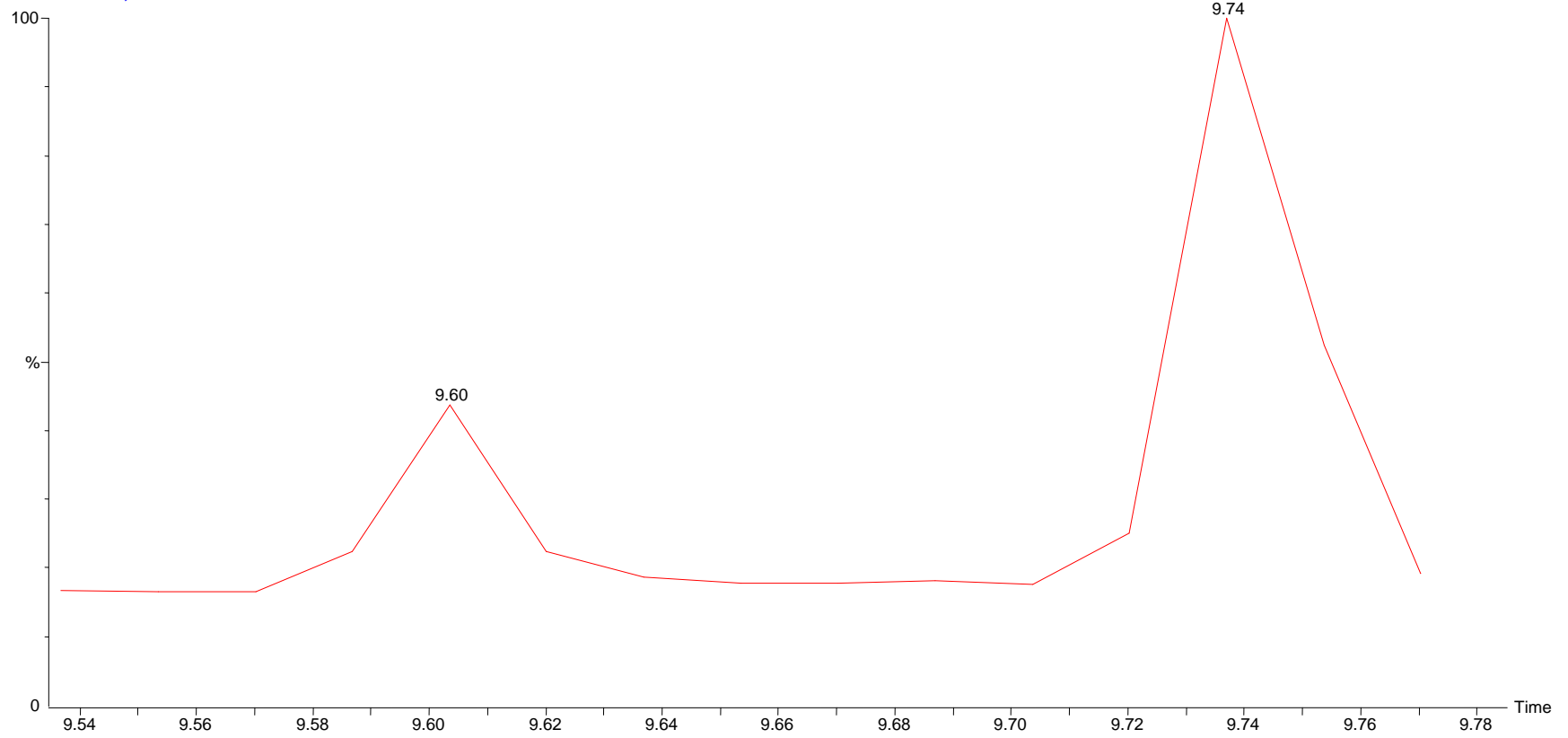
Nombre: S-metil-metanotiosulfinato

m/z : 110 (33, M⁺•), 79 (7), 64 (87), 47 (100), 45 (69)



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

Fracción 1, eot-2



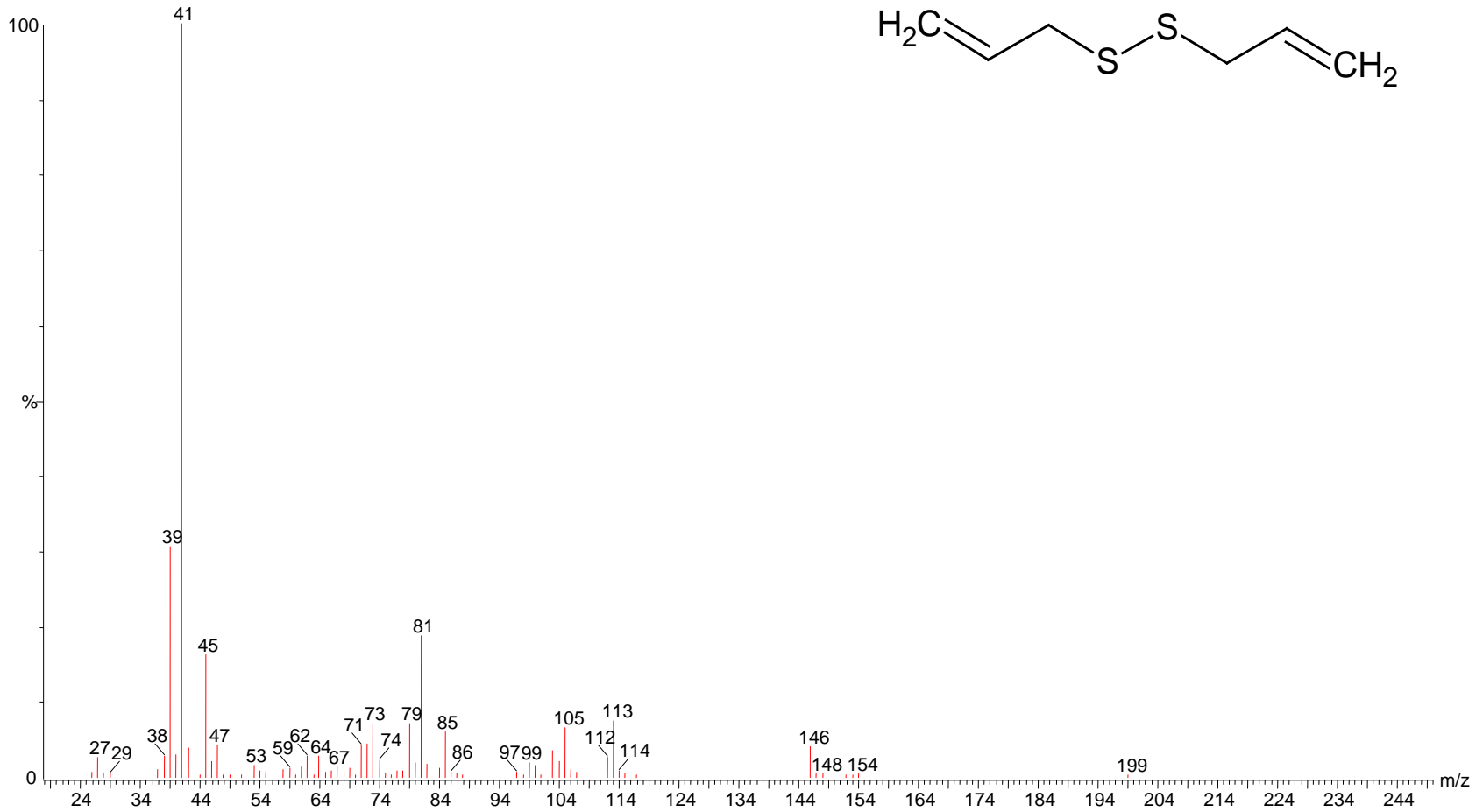
GC-4.4. Fracción 1 de eot-2 en acetato de etilo



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

MS-24

R_T 9.735





Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

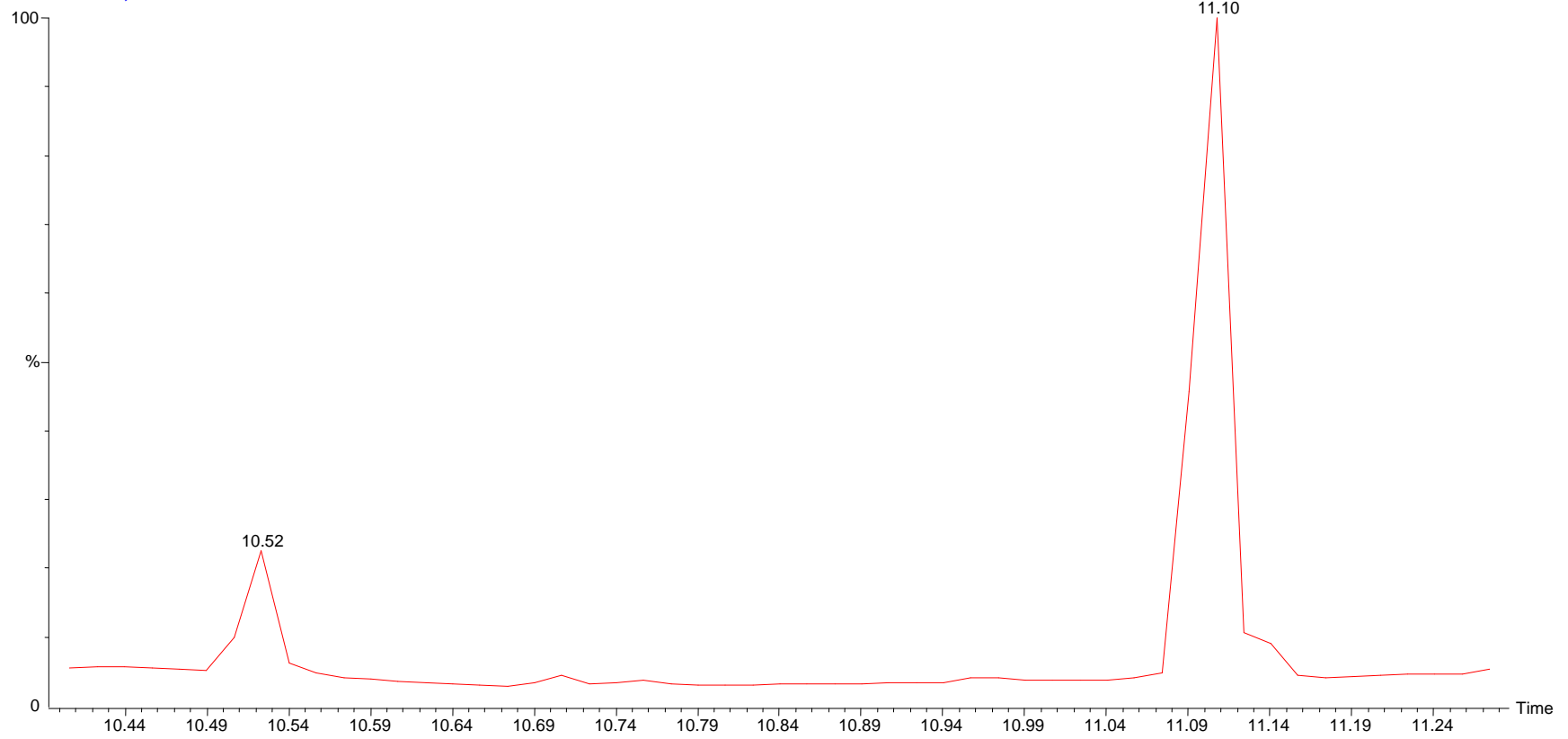
Nombre: Dialil disulfuro

m/z : 146 (4, M⁺), 113 (7), 105 (7), 81 (19), 73 (7), 64 (3), 45 (16), 41 (100), 39 (31)



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

Fracción 1, eot-2



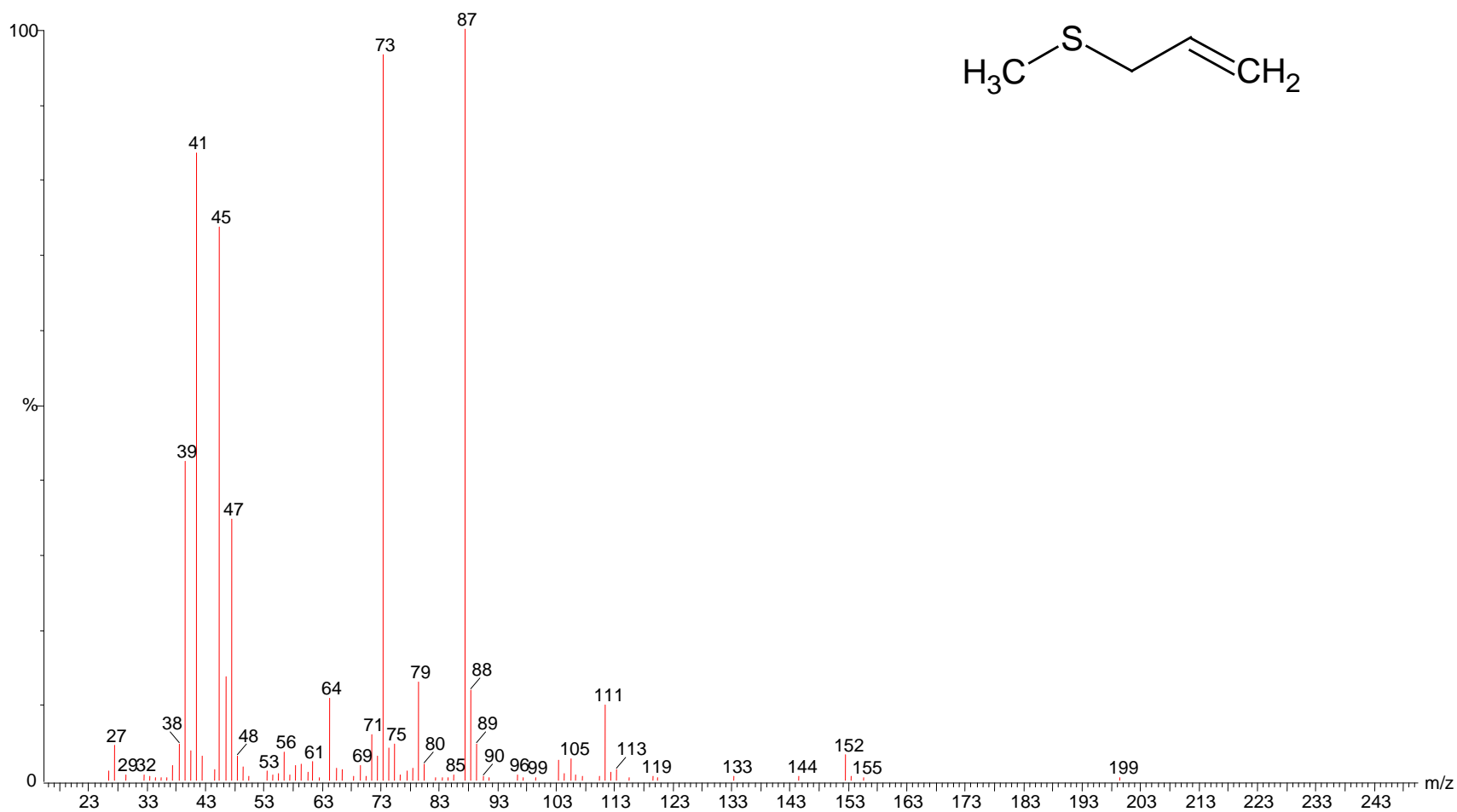
GC-4.5. Fracción 1 de eot-2 en acetato de etilo



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

MS-25

$R_T = 10.519$





Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

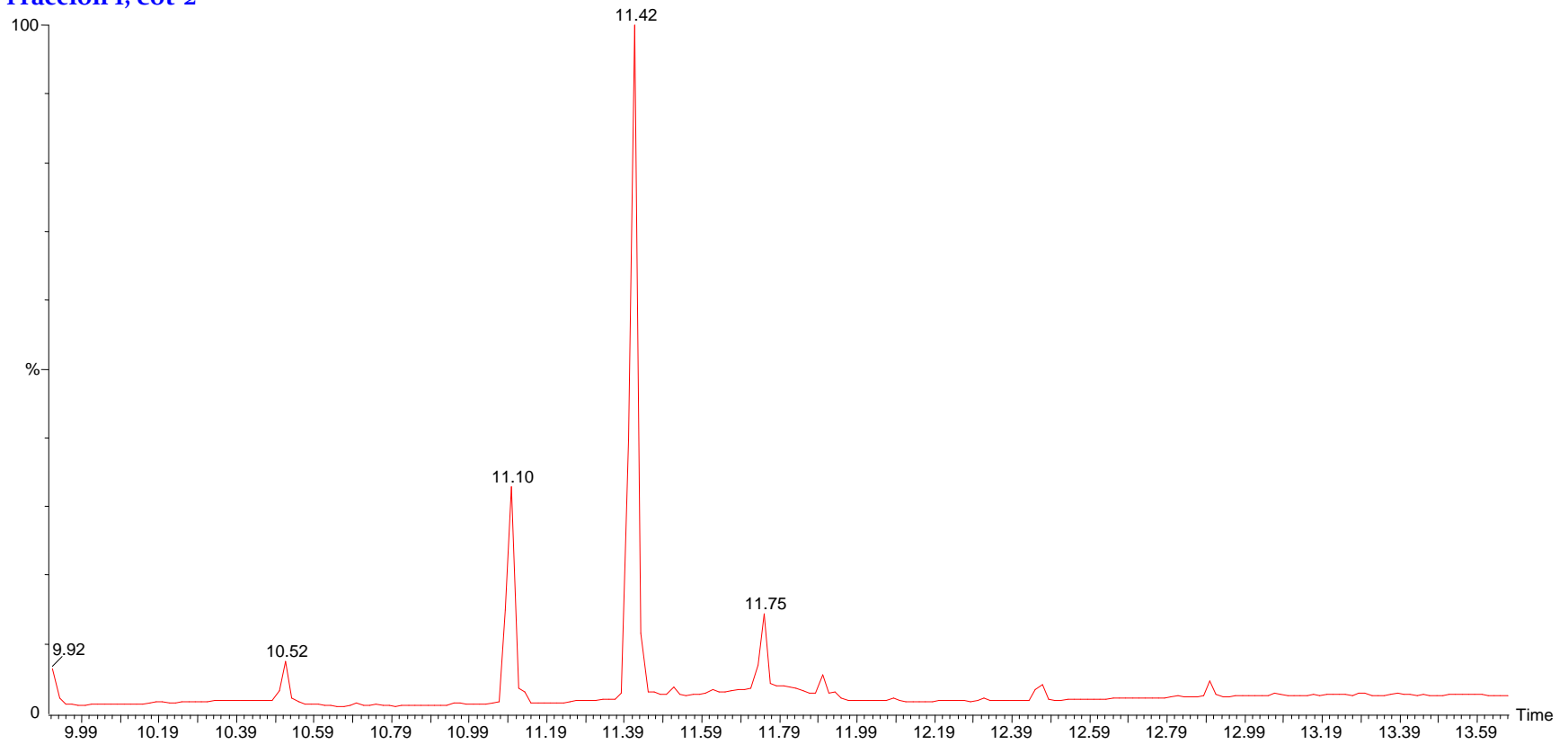
Nombre: Alil metil sulfuro

m/z : 152 (3), 111 (10), 88 (12, M⁺•), 87 (100), 73 (97), 64 (11), 47 (35), 45 (74), 41 (84)



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

Fracción 1, eot-2



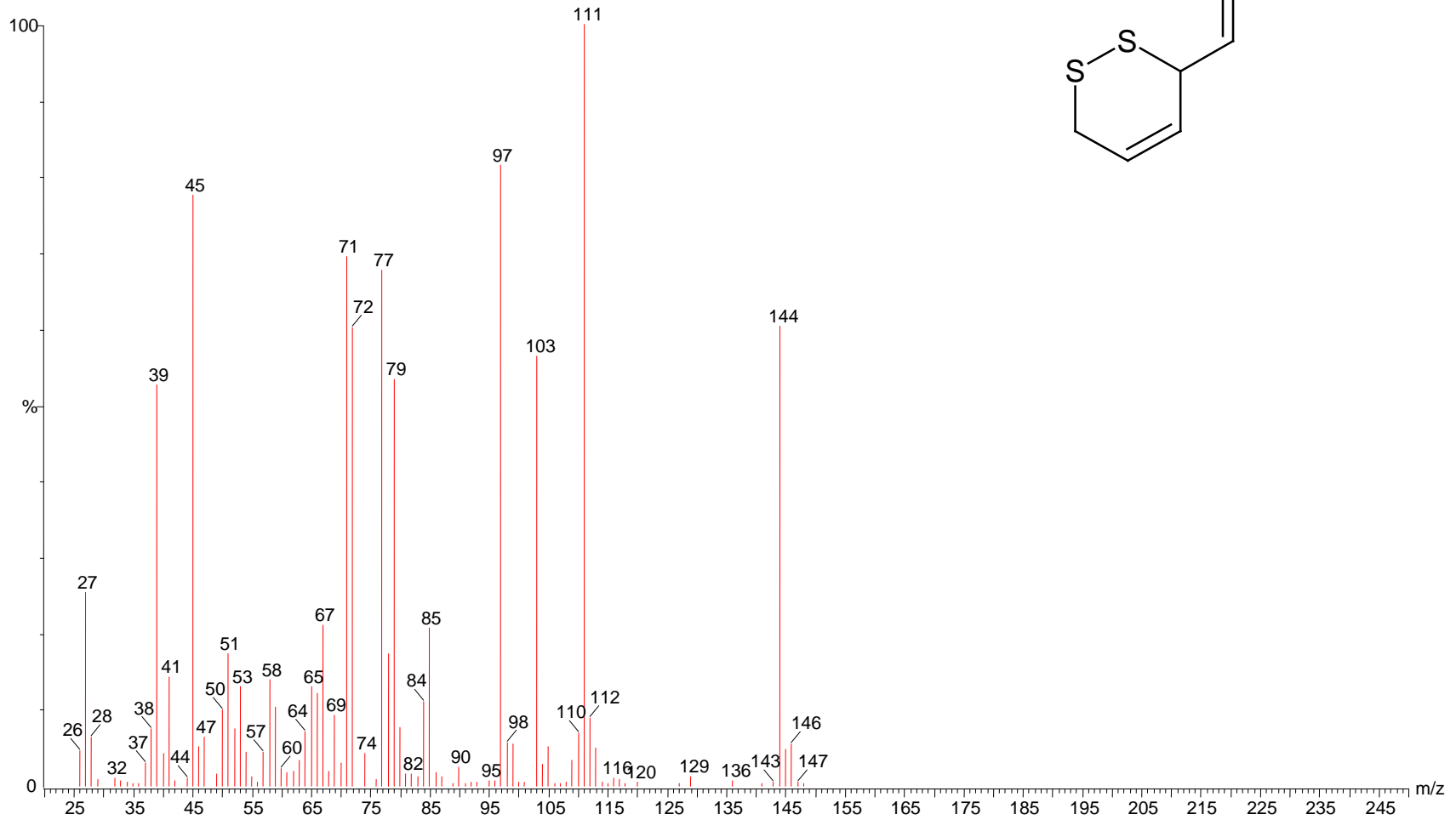
GC-4.6. Fracción 1 de eot-2 en acetato de etilo



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

MS-26

$R_T = 11.103$





Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

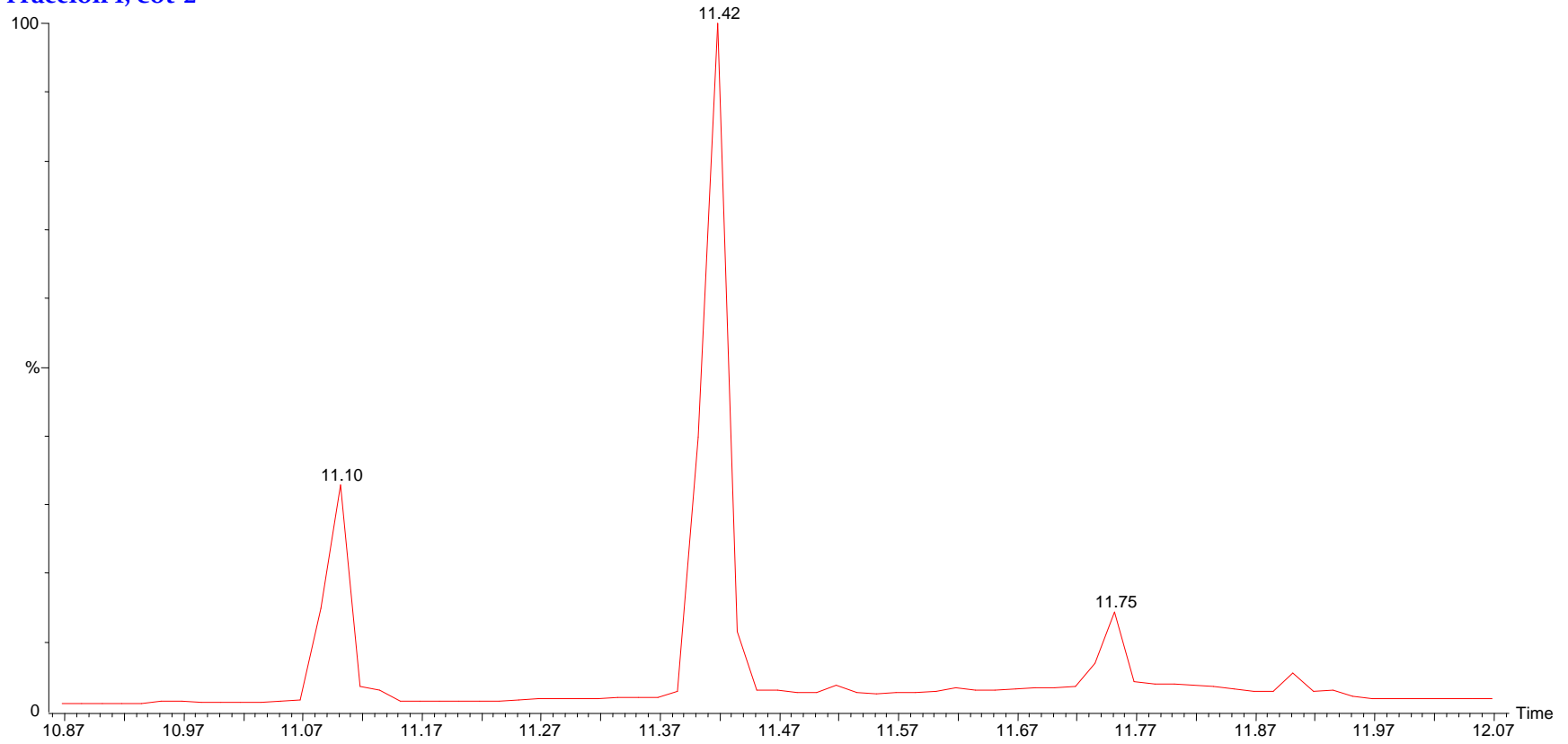
Nombre: 3-vinil-1,2-ditiaciclohex-4-ano

m/z : 144 (60, M⁺•), 111 (100), 103 (57), 97 (82), 77 (68), 71 (70), 45 (78)



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

Fracción 1, eot-2



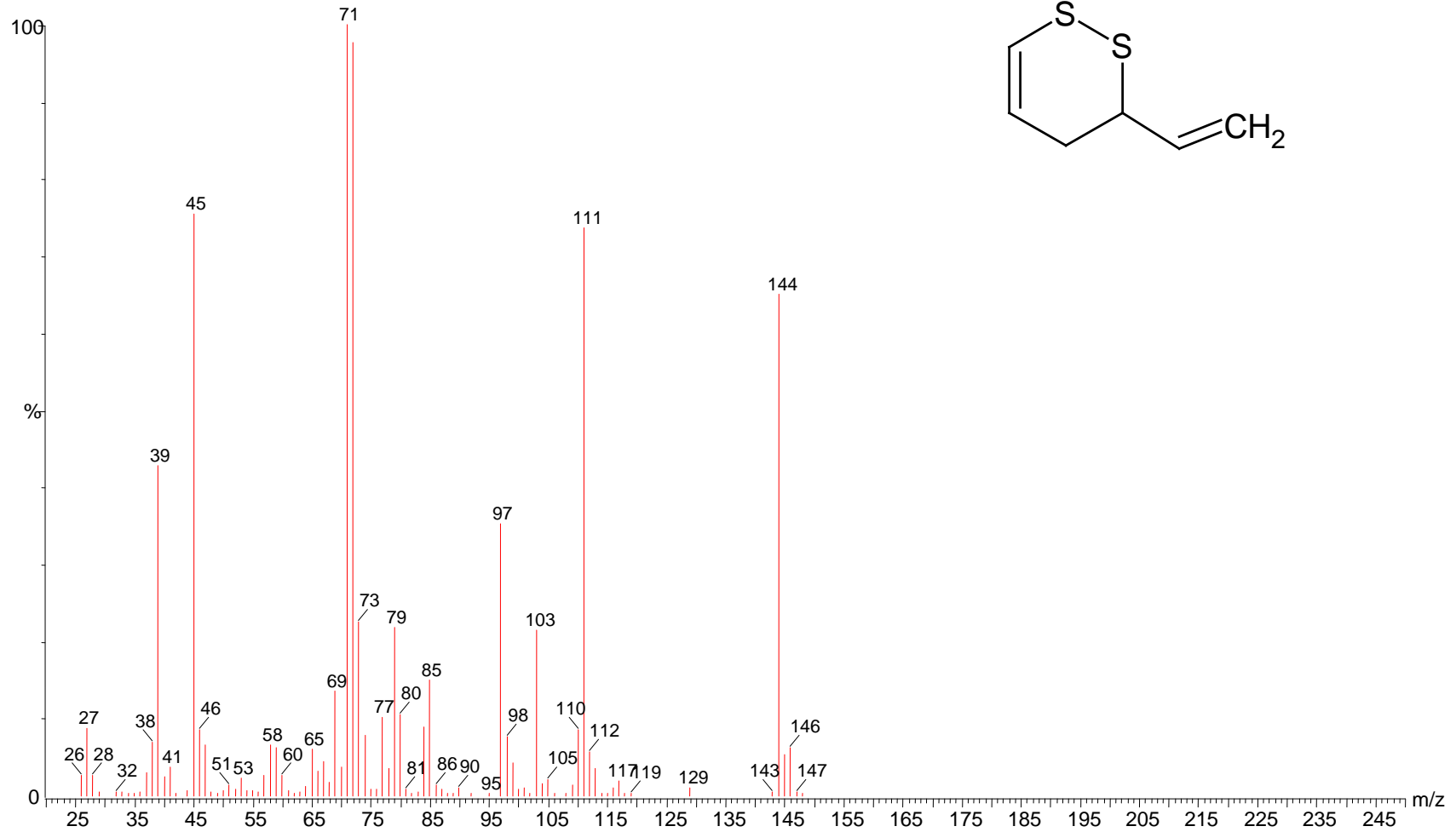
GC-4.7. Fracción 1 de eot-2 en acetato de etilo



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

MS-27

$R_T = 11.420$





Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

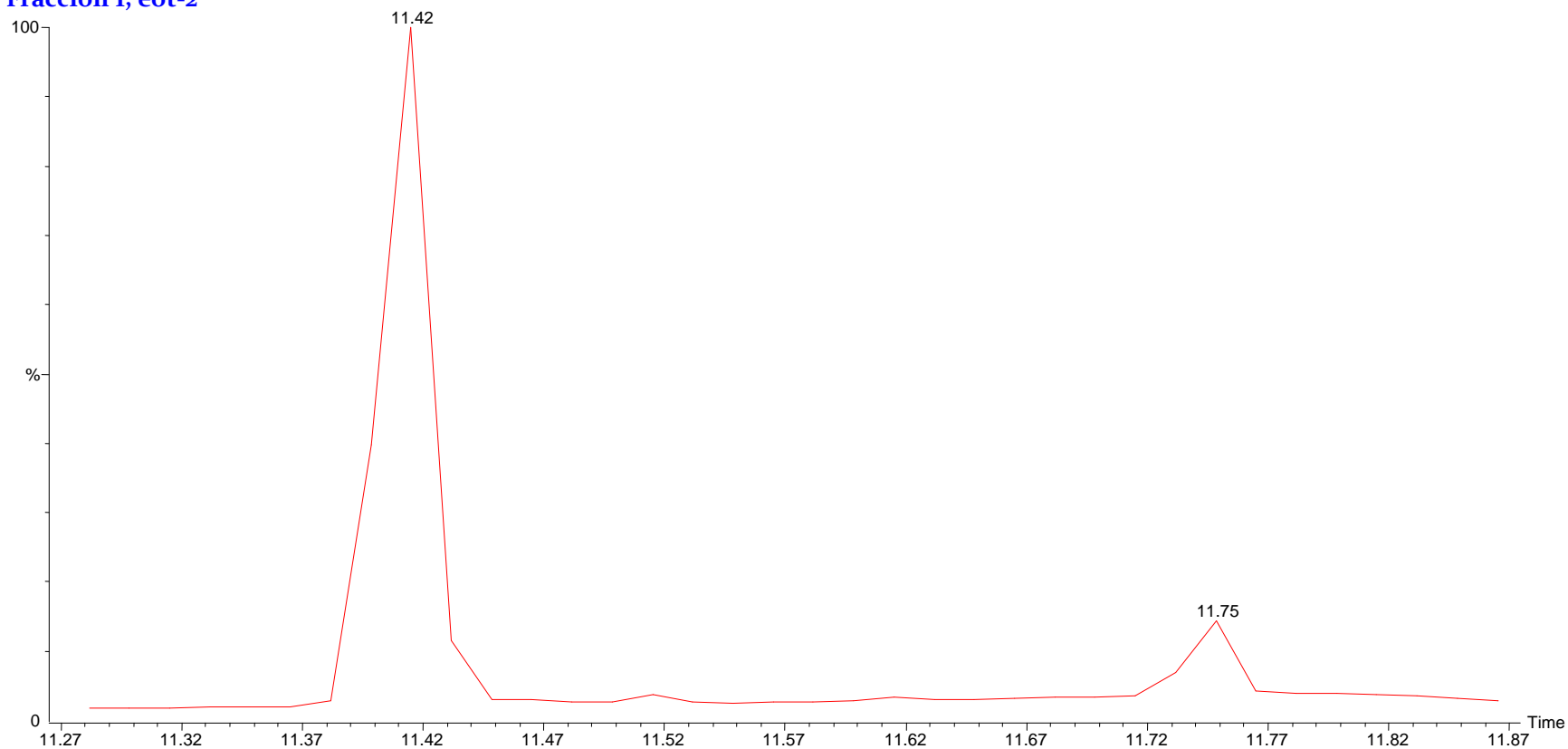
Nombre: 3-vinil-1,2-ditiaciclohex-5-ano

m/z : 144 (65, M⁺•), 111 (74), 103 (21), 97 (35), 83 (1), 79 (22), 73 (22), 72 (98),
71 (100), 45 (75), 39 (43)



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

Fracción 1, eot-2



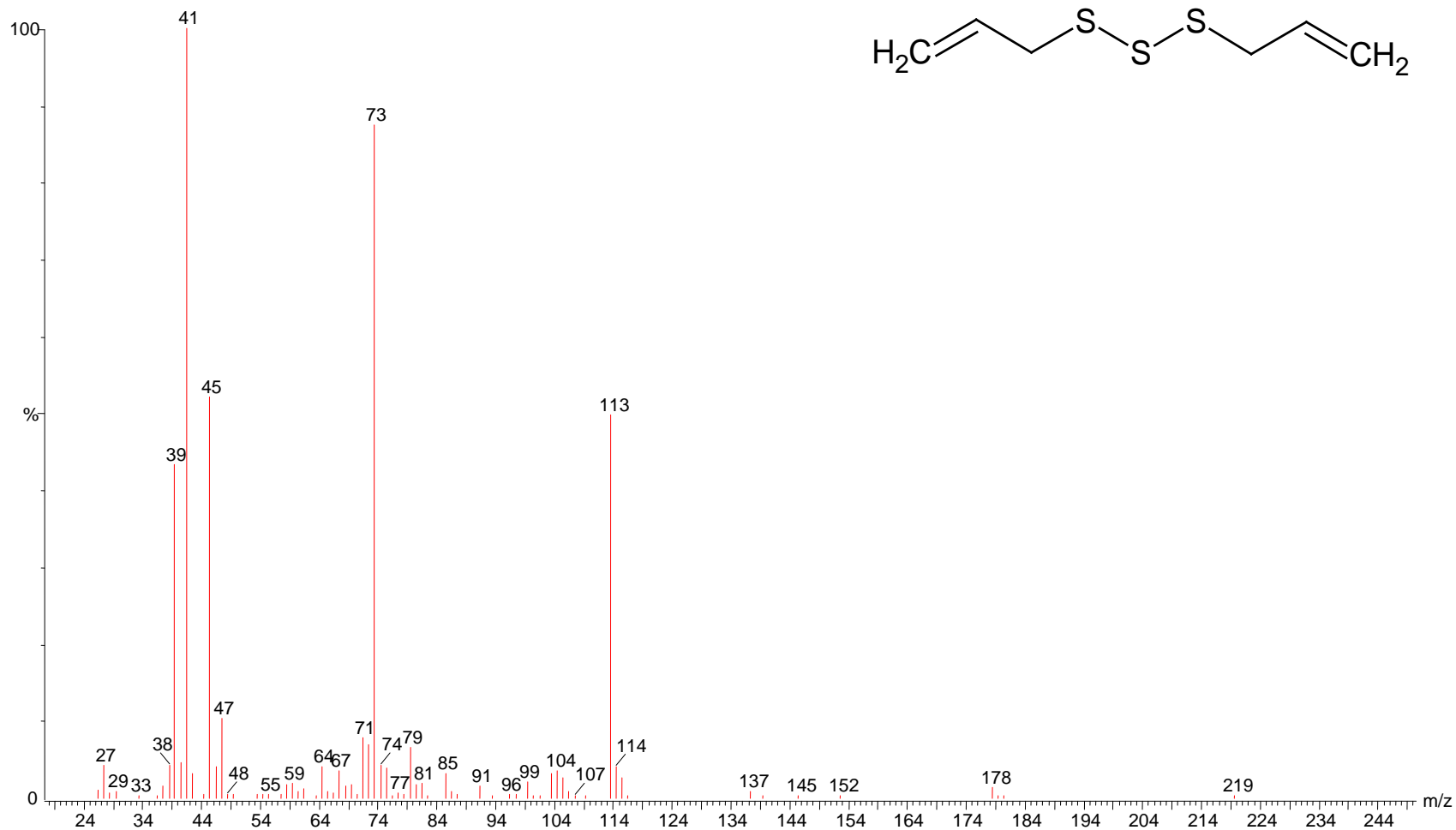
GC-4.8. Fracción 1 de eot-2 en acetato de etilo



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

MS-28

$R_T = 11.753$





Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

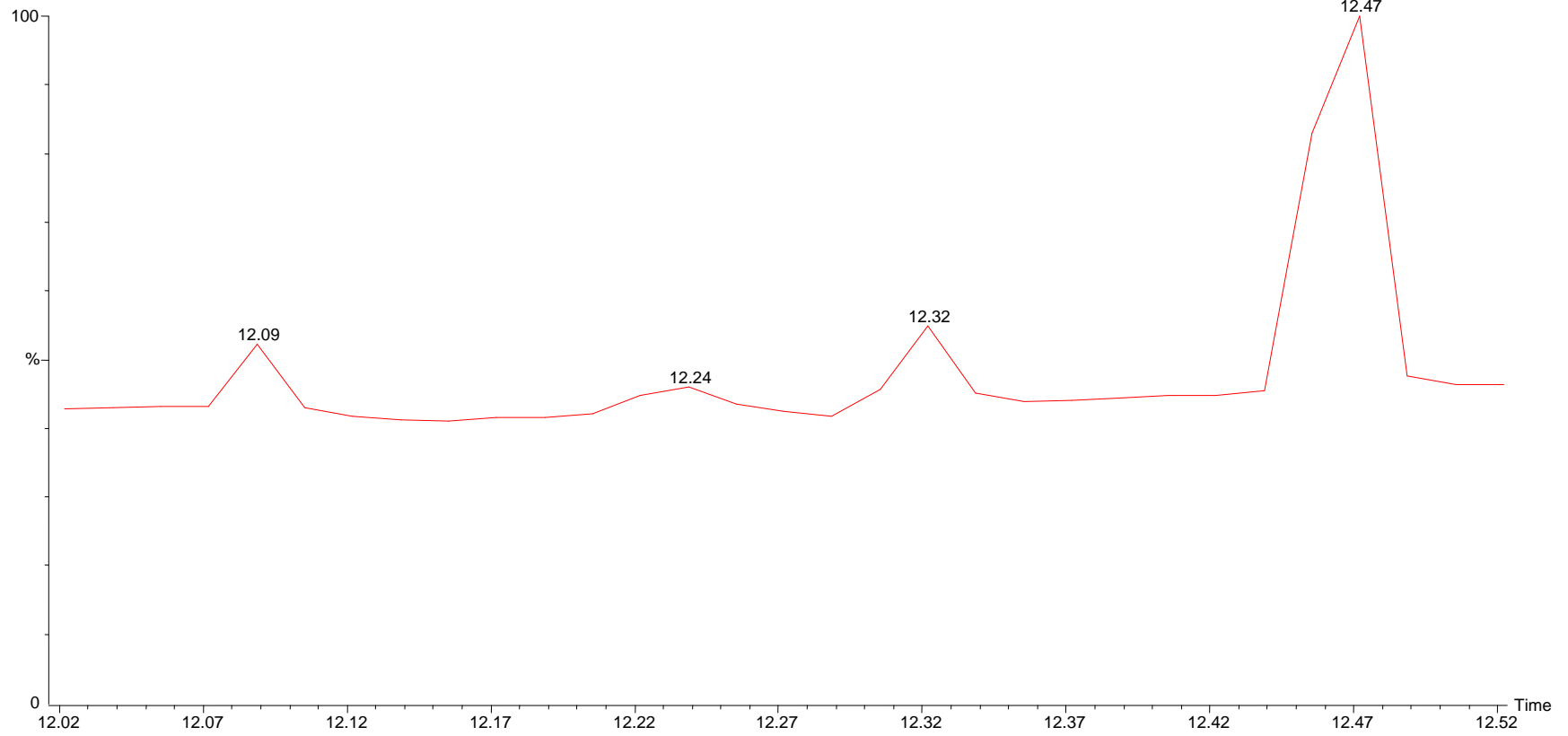
Nombre: Di-2-propenyl- trisulfuro

m/z : 178 (1, M⁺), 113 (50), 73 (87), 47 (10), 45 (52), 41 (100), 39 (43)



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.): Implicaciones analíticas

Fracción 1, eot-2



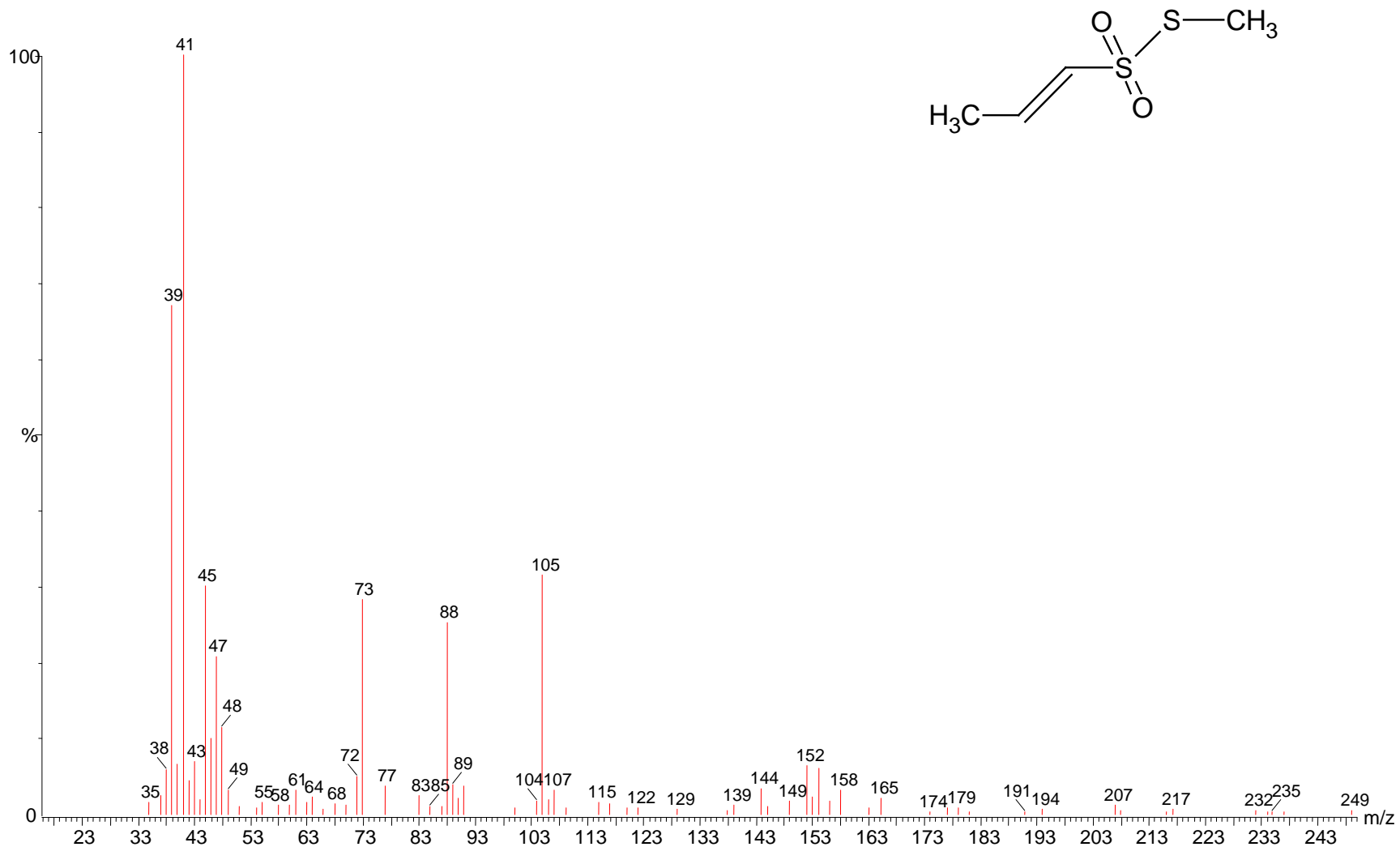
GC-4.9. Fracción 1 de eot-2 en acetato de etilo



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

MS-29

$R_T = 12.086$





Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

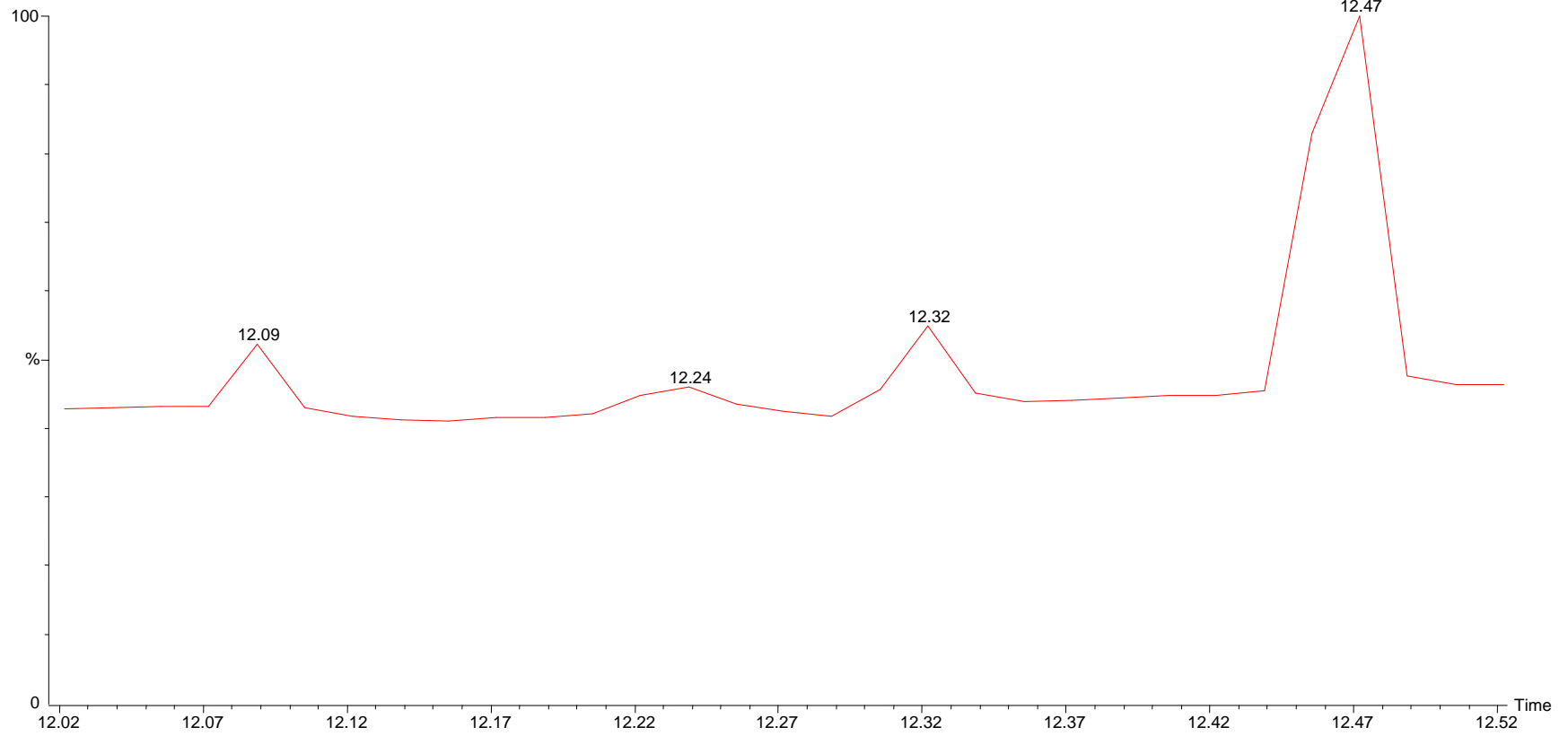
Nombre: S-metil-1-propanotiosulfinato

m/z : 152 (6, M⁺), 105 (32), 88 (25), 73 (28), 47 (21), 45 (30), 41 (100), 39 (67)



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.): Implicaciones analíticas

Fracción 1, eot-2



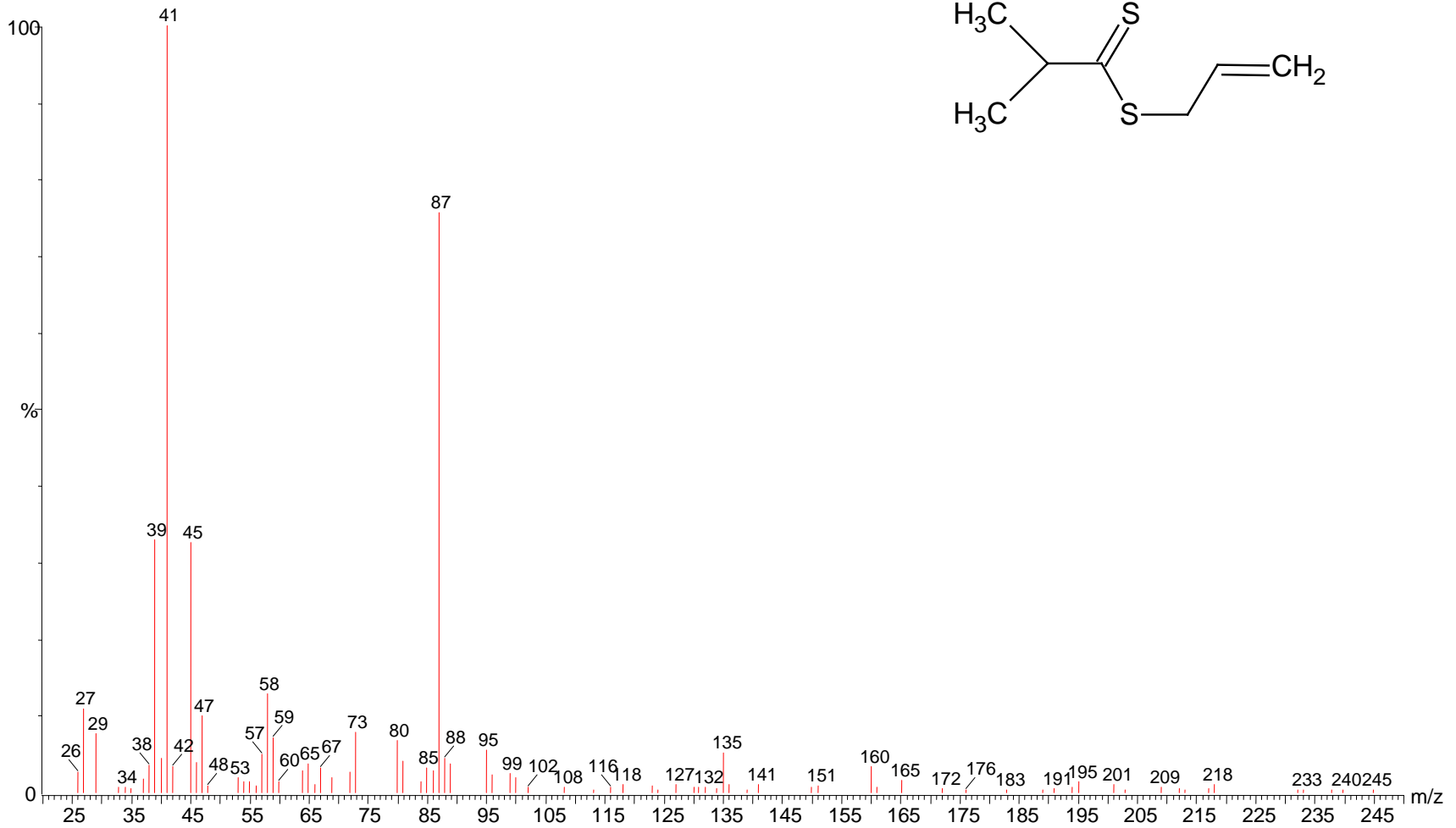
GC-4.10. Fracción 1 de eot-2 en acetato de etilo



Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

MS-30

$R_T = 12.320$





Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.):
Implicaciones analíticas

Nombre: Alil ditioisobutirato

m/z : 160 (3, M⁺), 135 (5), 87 (76), 73 (8), 58 (13), 47 (10), 45 (33), 41 (100), 39 (33)