



Síntesis y purificación de ajoeno y su cuantificación en aceites comerciales de ajo

Synthesis and purification of ajoene and its quantification in commercial garlic oils

Verónica Soto Vargas ¹
Alejandra Camargo ¹
Roxana González ¹
Claudio Galmarini ²

Originales
Recepción: 07/11/2006
Aceptación: 12/04/2007

RESUMEN

El ajo (*Allium sativum* L.) es una de las principales hortalizas estudiadas por sus efectos benéficos para la salud, atribuidos en su mayoría a la riqueza que posee en compuestos organoazufrados. Entre ellos, el ajoeno, presente en preparaciones de ajo añejado en aceite, se destaca por ser uno de los principales responsables de la actividad antiagregante plaquetaria. El objetivo de este trabajo fue validar una metodología analítica para su cuantificación en aceite de ajo. Como este compuesto no se comercializa en el mercado y es necesario disponer de él para su empleo como estándar de referencia, se debió adecuar su síntesis y posterior purificación. Para la síntesis se probaron dos metodologías, obteniéndose mejores resultados con la propuesta de Block et al. Se purificó colectando fracciones a la salida del HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Performance), se logró la separación de ambos isómeros y por último se cuantificaron muestras de aceite de ajo, comercializadas en la provincia de Mendoza.

SUMMARY

Garlic (*Allium sativum* L.) is widely recognized as a health-enhancing agent. Most of its properties are attributed to organosulfur compounds. One of these compounds is ajoene, which is present in commercial aged garlic oils, and has showed antiplatelet activity. The aim of this work was to validate a methodology to quantify ajoene in commercial garlic oil. Due to the fact that no ajoene standards are available in the market, it was necessary to set up a procedure for its synthesis and purification. Two protocols for ajoene synthesis were tested. The best results were obtained with the methodology proposed by Block et al. Purification of the synthesized ajoene was done by collecting fractions from the HPLC. Both ajoene isomers could be separated by HPLC-Si. The purified ajoene was used as a standard for the quantification of ajoene in commercial garlic oil samples. This is the first report on the synthesis, purification and measurement of ajoene in garlic oils from Mendoza.

Palabras clave

ajo • organoazufrados • ajoeno • cuantificación • aceite de ajo

Keywords

garlic • organosulfur • ajoene • quantification • garlic oil

- 1 Laboratorio de Análisis de Residuos Tóxicos. Facultad de Ciencias Agrarias. UNCuyo. Alte. Brown 500. Chacras de Coria. Mendoza. Argentina. M5528AHB. rtoxicos@fca.uncu.edu.ar
- 2 Estación Experimental Agropecuaria INTA La Consulta. C. C. 8. (5567) La Consulta. San Carlos. Mendoza. Argentina.

INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia, el ajo (*Allium sativum* L.) ha gozado de una gran variedad de aplicaciones. Además de su uso culinario, también se lo ha utilizado como elemento religioso, higiénico o medicinal.

En la actualidad existe amplia información que relaciona efectos clínicos benéficos con el consumo de diversas preparaciones de ajo, entre los cuales se mencionan aquellos relacionados con la reducción de factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares y cáncer (1).

El ajo posee una variedad de compuestos que permiten utilizarlo como alimento funcional; entre dichos compuestos se pueden citar los fructanos, flavonoides, fitoesteroles, minerales como el selenio y organoazufrados que son beneficiosos para la salud.

Cabe enfatizar que el ajo contiene compuestos organoazufrados como ningún otro vegetal, los cuales proveen las características de sabor y olor, siendo la mayoría biológicamente activos (2). Entre ellos, los S-alquenil cisteín sulfóxidos (ACSOs) constituyen el grupo a partir del cual se originan el resto de los compuestos a los que se les atribuyen las propiedades fitoterapéuticas. Químicamente los ACSOs son aminoácidos azufrados no proteicos: la alliina es el precursor que se encuentra en mayor proporción en dientes de ajo fresco (11).

Cuando el tejido de ajo fresco es dañado, la enzima allinasa (S- alquenil L-cisteín sulfóxido liasa) actúa sobre los ACSOs, liberando ácido sulfénico muy reactivo, amonio y piruvato (4). Dos moléculas del ácido 2-propeno sulfénico reaccionan para formar alicina (allil-2-propentiosulfonato), cuya fórmula es la siguiente:



Aunque la alicina es considerada el compuesto biológicamente activo más importante encontrado en ajo cortado, en presencia de altas temperaturas o solventes orgánicos sufre una serie de transformaciones originando otras especies químicas (8). De acuerdo con la polaridad del medio o de los solventes utilizados se formarán distintos productos de transformación de la alicina, especialmente ajoenos y vinilditiinas. En medios más polares se obtendrá una mayor proporción de ajoeno, mientras que en medios menos polares prevalecerá la formación de vinilditiinas, sobre una pequeña cantidad de ajoeno (7).

Tres moléculas de alicina se combinan, produciendo dos moléculas de ajoeno, cuya fórmula es $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{S}_3\text{O}$, con estructura $\text{CH}_2 = \text{CHCH}_2\text{S}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH} = \text{CHSSCH}_2\text{CH} = \text{CH}_2$ (4,5,9-tritiododeca-1,6,11-trieno 9-óxido) (figura 1, pág. 95). Presenta dos isómeros conformacionales: trans (isómero Z-) y cis (isómero E-) (2). El interés por su estudio se debe a que evidencia un potente efecto antitrombótico tan activo como la aspirina en la prevención de la agregación de las plaquetas sanguíneas. Además se le atribuyen otras actividades biológicas como antimicrobiana e hipocolesterolémica.

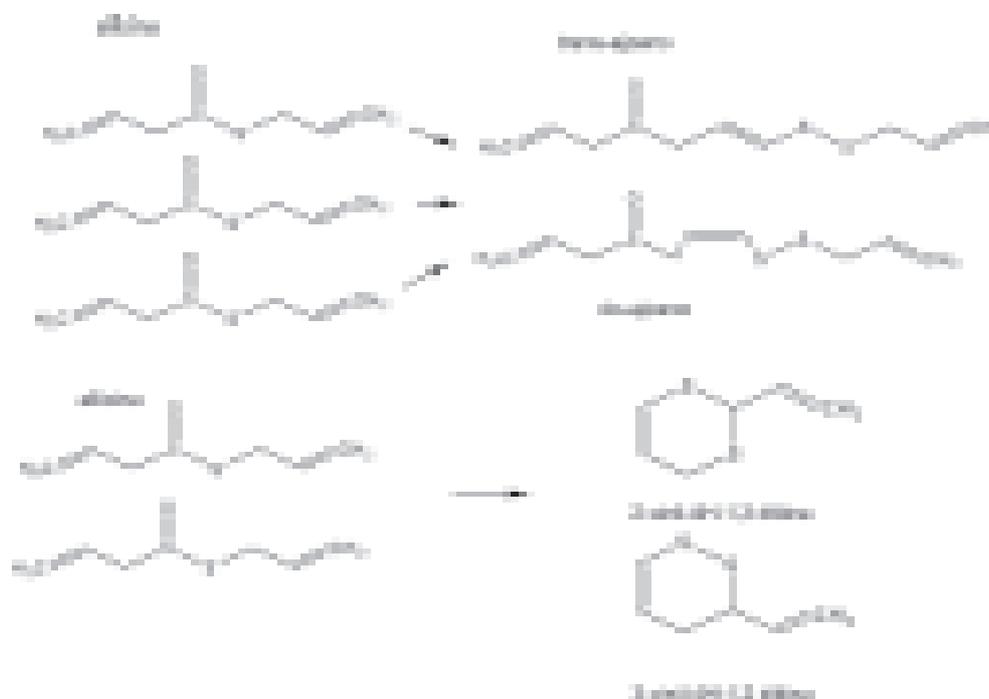


Figura 1. Formación de ajoeno y vinilditiinas a partir de allicina (2).

Las operaciones de acondicionamiento de la materia prima, elaboración, envasado, almacenamiento y distribución de los productos comerciales de ajo involucran variables que influyen en el tipo y cantidad de principios bioactivos presentes en estos productos. Ante esta situación, surge la necesidad de contar con un método analítico confiable para estandarizar y evaluar los niveles de ajoeno en dichas preparaciones.

Lo expuesto precedentemente motivó el planteo de los siguientes objetivos: lograr la síntesis y purificación de E y Z ajoeno, para su posterior empleo como estándares de referencia para análisis cuantitativo en productos comerciales mediante Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC).

MATERIALES Y MÉTODOS

Síntesis de ajoeno

Luego de la consulta bibliográfica se seleccionaron dos metodologías que corresponden a los trabajos de Block et al. (3) e Iberl et al. (7), las cuales fueron aplicadas con fines comparativos.

Síntesis de ajoeno según Block et al. (3)

El método consiste en la incubación de allicina en un medio polar con la finalidad de favorecer su transformación en ajoeno y vinilditiinas para lo cual se disolvió allicina cruda, sintetizada según Mayeux et al. (10) modificada por González (6), en acetona-agua al 40 %,

fue agitada y calentada a 64 °C durante 4 horas. Transcurrido ese tiempo fue disuelta en metanol-agua al 50 % y extraída con pentano. El extracto metanólico fue saturado con sulfato de amonio y luego extraído 50 veces con diclorometano. Este último extracto fue concentrado mediante evaporador rotatorio al vacío. Para evaluar la calidad de la síntesis, el residuo obtenido fue redisolto e inyectado al HPLC.

Síntesis de ajoeno según Iberl et al. (7)

Este método consiste en disolver la alicina en isopropanol y dejar incubar 12 días a temperatura ambiente. Luego, la solución fue diluida en agua y extraída con diclorometano. El extracto obtenido fue concentrado mediante evaporador rotatorio al vacío. Para evaluar la calidad de la síntesis, el residuo obtenido fue redisolto e inyectado al HPLC.

Purificación del ajoeno sintetizado

Fue realizada por medio de la colección de fracciones directamente del HPLC. Se trabajó con una columna de fase normal, empleando como fase móvil hexano:isopropanol, grado HPLC (92:8); flujo 1 ml.min⁻¹; *loop* de 100 µl; longitud de onda del detector 240 nm. El ajoeno sintetizado fue disuelto en fase móvil a razón de 5 µl.ml⁻¹. Con estas condiciones se colectaron por separado los isómeros Z-ajoeno y E-ajoeno los cuales fueron concentrados mediante barrido con nitrógeno y conservados a -21 °C.

Para evaluar la calidad de la purificación, el residuo fue redisolto e inyectado nuevamente al HPLC. De cada compuesto purificado se realizó un barrido espectral (UV) desde los 190 a los 290 nm y los espectros obtenidos fueron comparados con los que figuran en el estudio de Lawson et al. (9).

Determinación de la concentración del ajoeno sintetizado

El cálculo de la concentración de la solución se realizó leyendo las absorbancias a 210 y 240 nm, empleando la relación de Lambert y Beer y teniendo en cuenta los coeficientes de extinción citados en la bibliografía (9).

Cuantificación de ajoeno en aceites de ajo

Las muestras de aceite de ajo (de cultivares desconocidos) fueron compradas en locales comerciales de la provincia de Mendoza, las cuales se prepararon de acuerdo con la metodología propuesta por Lawson, Wang and Hughes (9) que consiste en la extracción con acetonitrilo grado HPLC, a razón de 10 ml por cada gramo de aceite pesado. Para el análisis se trabajó con un equipo HPLC provisto de columna de fase reversa octadecilsilano (C18), de 250 mm de longitud por 4,6 mm de diámetro, con partículas esféricas de 5 µm; como solventes de la fase móvil se trabajó con una mezcla de acetonitrilo:agua:metanol (50:41:9), la detección fue mediante detector ultravioleta UV a 240 nm. Para la cuantificación se trabajó empleando como estándar externo el ajoeno sintetizado y purificado, como fue descrito en el ítem «purificación del ajoeno sintetizado». Cada una de las muestras problema fue preparada por triplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Síntesis de ajoeno

Síntesis de ajoeno según Block et al. (3)

Se obtuvo un concentrado pardo-rojizo con un leve olor a ajo el cual fue diluido e inyectado en HPLC configurado con columna de fase normal y fase móvil hexano:isopropanol 92:8, flujo 1 ml.min⁻¹, longitud de onda del detector 240 nm. Con las condiciones operacionales antes mencionadas se pudo resolver la mezcla de los isómeros E y Z ajoeno, como se evidencia en el cromatograma de la figura 2.

Síntesis según Iberl et al. (7)

Por medio de este método se obtuvo también un residuo pardo-rojizo con un leve aroma a ajo. Para la evaluación de este residuo se procedió como se indica en el punto anterior. Se obtuvo un cromatograma que se muestra en la figura 3.

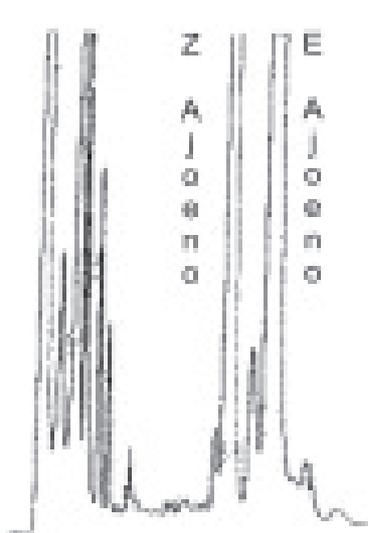


Figura 2.

Ajoeno sintetizado según Block et al. (3). Si-HPLC, hexano:isopropanol 92:8; 1 ml.min⁻¹; 240 nm.

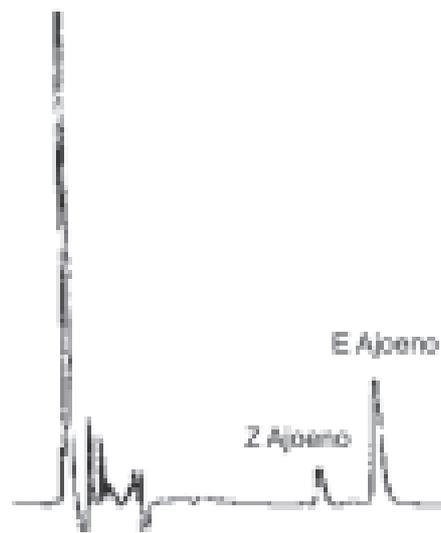


Figura 3.

Ajoeno sintetizado según Iberl et al. (7). Si-HPLC, hexano:isopropanol 92:8; 1 ml.min⁻¹; 240 nm.

La mezcla de isómeros sintetizados por ambos métodos pudo ser separada de un modo eficiente mediante una columna Si-HPLC, empleando fase móvil hexano:isopropanol 92:8, con flujo de 1 ml.min⁻¹, como se evidencia en las figuras 2 y 3.

Al considerar las áreas de los cromatogramas correspondientes a cada ensayo, inyectando cada uno de ellos por triplicado, se determinó que ambos isómeros sintetizados mediante el método propuesto por Block et al. (3) representan un 14 % de Z-ajoeno y 45 % de E-ajoeno relativo al porcentaje total del área de los cromatogramas.

Se mantuvo una relación promedio de 1/3 entre el Z y E ajoeno. En los cromatogramas obtenidos, tras la síntesis según Iberl et al. (7), se pudo observar que las áreas correspondientes al E y Z ajoeno sintetizado representan un 1,5 % de Z y 2,3 % de E ajoeno, relativo al porcentaje total de área de los cromatogramas. Se mantuvo una relación de 1/1,5 entre el Z y E ajoeno. La relación de isómeros obtenida con el método de Block et al. (3) no coincidió con lo que los autores mencionan en su trabajo, donde indican que obtienen una relación 1/9 entre los isómeros Z y E ajoeno.

Purificación mediante HPLC

El residuo pardo-rojizo obtenido tras la síntesis fue disuelto en fase móvil e inyectado al HPLC. Cada uno de los isómeros fue colectado a la salida del equipo por separado. Las sucesivas fracciones fueron reunidas y la fase móvil eliminada mediante barrido con nitrógeno, obteniéndose tanto para el E como el Z ajoeno un residuo seco, incoloro e inodoro. Para evaluar la calidad de los mismos se les realizó un barrido espectral UV e inyección al HPLC. La pureza de las sustancias quedó evidenciada en el único pico mayoritario que se observa en los cromatogramas obtenidos (figura 4). Los espectros de absorbancia obtenidos se muestran en la figura 5 manifestando un hombro característico para el Z ajoeno a los 235 nm y a los 244 nm para el E ajoeno, coincidiendo con lo citado en la bibliografía (7, 9).

Figura 4.

- a** Z Ajoeno purificado
- b** E Ajoeno purificado

Si-HPLC, hexano:isopropanol 92:8;
1 ml.min⁻¹; 240 nm.

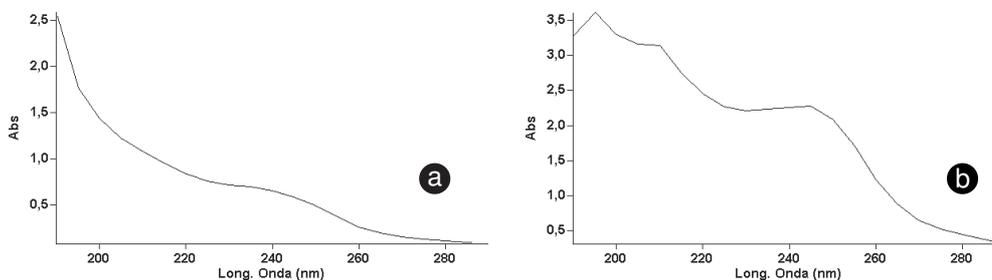
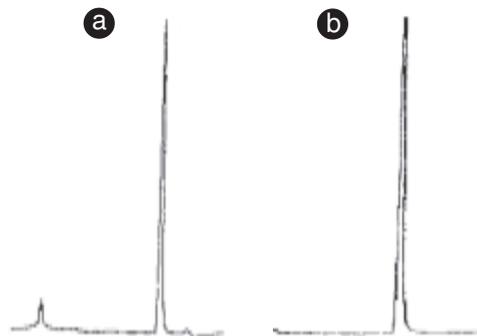


Figura 5.

Espectro de absorción de la solución en acetonitrilo de **a** Z Ajoeno y **b** E Ajoeno.

Determinación de la concentración del ajoeno sintetizado

Por medio de las lecturas de absorbancia a 210 y 240 nm de los isómeros Z y E ajoeno purificados, empleando los datos de coeficientes de extinción citados en la bibliografía (9), se calculó la concentración de cada isómero mediante la ley de Lambert y Beer. Los resultados obtenidos se detallan en la tabla 1.

Tabla 1. Concentración de los isómeros de ajoeno a 210 y 240 nm.

	$\lambda 210$	$\lambda 240$
Z Ajoeno	42,20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	32,66 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
E Ajoeno	43,36 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	36,88 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$

Cuantificación de ajoeno en aceites de ajo

Se cuantificaron cuatro muestras por triplicado de aceite macerado de ajo. Las medias de los valores obtenidos se detallan en la tabla 2.

Tabla 2. Resultados obtenidos tras la cuantificación de ajoeno en muestras de aceite de ajo añejado.

Muestra	Ajoeno ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
Aceite A	168,51
Aceite B	162,29
Aceite C	232,58
Aceite D	282,68

Actualmente, existen escasos datos bibliográficos que hagan referencia a cantidades de ajoeno presentes en las preparaciones comerciales de ajo añejado en aceite. Esto puede atribuirse a que hasta el momento no se han establecido normas tendientes a la estandarización de este tipo de macerados. Cabe citar como referencia el trabajo de Lawson (9) que presenta valores que alcanzan los $115 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Los niveles obtenidos en las muestras analizadas en este trabajo fueron mayores.

CONCLUSIONES

- ❖ De los métodos de síntesis de ajoeno ensayados se puede afirmar que ambos resultan satisfactorios. Mediante el método de síntesis propuesto por Block et al. (3) se obtienen mayores rendimientos que con el método de síntesis propuesto por Iberl et al. (7). Sin embargo, el empleo de mayor cantidad de insumos hace su obtención más onerosa mientras que el bajo costo y la facilidad que implica la síntesis propuesta por Iberl et al. (7) lo convierte en una opción válida en el caso de poder esperar los 12 días que implica.

- ❖ La elección del método de purificación resultó adecuada ya que permitió en un día de coleccionar fracciones purificar cantidades suficientes como para ser empleadas como estándares de cuantificación.
- ❖ Los resultados obtenidos permiten afirmar que siguiendo el método de Block y purificando mediante Si-HPLC se logra el objetivo propuesto.
- ❖ Se cuantificó por primera vez el contenido de ajoeno en productos comerciales locales. Resulta complejo comparar los valores obtenidos con datos de referencia debido a la escasez de antecedentes bibliográficos. En comparación con el único valor hallado, los resultados obtenidos fueron mayores.

BIBLIOGRAFÍA

1. Amagase, H.; Petesch, B.; Matsuura, H.; Kasuga, S.; Itakura, Y. 2001. Recent advances on the nutritional effects associated with the use of garlic as a supplement: Intake of garlic and its bioactive components. American Society for Nutritional Sciences. p. 955-962.
2. Block, E. 1985. The chemistry of garlic and onion. Scientific American 252. p. 114-119.
3. Block, E.; Ahmad, S.; Catalfamo, J.; Jain, M.; Apitz-Castro, R. 1986. Antithrombotic organosulfur compounds from garlic: Structural, mechanistic and synthetic studies. Journal American Chemical Society 108. p. 7045-7055.
4. Brewster, J. Onions and other Vegetable *Alliums*. 1994. The Biochemistry and Food Science of Alliums. Crop Production Science in Horticulture 9. p. 203-212.
5. Feldberg, R.; Chang, S.; Kotik, A.; Nadler, M.; Neuwirth, Z.; Sundstrom, D.; Thompson N. 1988. In Vitro Mechanism of Inhibition of Bacterial Cell Growth by Allicin. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 32(12): 1763-1768.
6. González, R. 2004. Evolución del contenido de Allicina durante la conservación poscosecha, para el empleo de *Allium sativum* L. en la elaboración de alimentos funcionales. Tesis de Grado. Universidad Nacional de Cuyo. Facultad de Ciencias Agrarias.
7. Iberl, B.; Winkler, G.; Knobloch, K. 1990. Products of allicin transformation: Ajoenes and dithiins, characterization and their determination by HPLC. Planta Medica 56. p. 202-211.
8. Lawson, L.; Wood, S.; Hughes, B. 1991. HPLC analysis of allicin and other thiosulfates in garlic clove homogenates. Planta Médica, 57. p. 263-270.
9. Lawson, L.; Wang, Z.; Hughes, B. 1991. Identification and HPLC quantitation of sulfides and dialk(en)yl thiosulfates in commercial garlic products. Planta Médica 57. p. 363-370.
10. Mayeux, P.; Agrawal, K.; Tou, J.; King, B.; Lipton, H.; Hyman, A.; Kadowitz, P.; Mcnamara, D. 1988. The pharmacological effects of allicin, a constituent of garlic oil. Agents and Actions 25. p.182-190.
11. Randle, W.; Lancaster, J. 1990. Sulphur compounds in Alliums in relation to flavour quality. In: Allium crop science: Recent advances. Ed. Rabbinowitch, H. D and Currah, L. CABI Publishing. U.K. p. 329-355.