

Estudo do Teor de Alicina em Alho

Patrícia Alexandra Pinto Mendes

Dissertação apresentada á Escola Superior de Tecnologia e de Gestão de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química

Orientado por
Professor Doutor José António Correia Silva

**Bragança
2008**

Aos meus pais e irmã,

Agradecimentos

Ao professor Dr. José Silva, que me orientou, acompanhou e aconselhou nas várias etapas deste trabalho, um obrigado pelo seu voto de confiança, dedicação e paciência;

Às técnicas Paula e Maria João, pela ajuda, simpatia e disponibilidade dos laboratórios LQA e LPQ, equipamento e material;

À Ivone Trigo e ao Marco Nicolau pela amizade, pelo carinho com que me ajudaram e deram força, estando sempre ao meu lado quando mais precisei; e a todos os colegas do laboratório (LSRE), pela amizade, momentos de descontração e energia positiva, proporcionando incentivo e bom ambiente de trabalho;

Aos meus pais e irmã Susana; e toda a minha família, pela preocupação e ternura com que me apoiou, deu força, confiança e animou nos momentos mais difíceis;

Ao LSRE e à escola Superior de Tecnologia e Gestão do Instituto Politécnico de Bragança pelos meios concedidos e oportunidade.

À Comissão Científica e a todos os professores do departamento de Química que directa ou indirectamente contribuíram para a realização deste trabalho.

“Não é porque as coisas são difíceis que não ousamos. É porque não ousamos que as coisas são difíceis.”

Lucius Annaeus Seneca

Resumo

A alicina (dialil-tiosulfonato) é o componente biológico mais activo no alho com inúmeras aplicações a nível da saúde, já conhecida desde décadas.

Existem actualmente diversos métodos publicados para a determinação do teor de alicina no alho por HPLC e espectrofotometria. No entanto, os resultados mostram discordância no teor de alicina medido pelos vários métodos.

Este estudo tem por objectivo a determinação do teor de alicina por métodos de HPLC e espectrofotometria; e comparação dos seus resultados.

Os métodos de HPLC usados neste estudo foram os propostos por Eagling e Sterling¹ e pelo *Institute for Nutraceutical Advancement* (INA)². Através do primeiro método, que se baseia na introdução de um padrão interno (PI) na amostra e a sua análise por HPLC, obteve-se uma concentração média de $2.0 \text{ mg}_{\text{alicina}}/\text{g}_{\text{alho hum}} \pm 0.32$. No método INA, que consiste num método de padrão externo de alicina obtido por uma técnica de extracção em fase sólida (SPE) obteve-se uma concentração de alicina média no alho de $5.4 \text{ mg}_{\text{alicina}}/\text{g}_{\text{alho hum}} \pm 0.70$.

Os métodos de espectrofotometria usados para o estudo foram os propostos por Lawson³ e por Miron⁴. Através do primeiro método, que se baseia na reacção de cisteína em excesso com alicina, obteve-se uma concentração de alicina média no alho de $0.9 \text{ mg}_{\text{alicina}}/\text{g}_{\text{alho hum}} \pm 0.48$. No segundo método, que se baseia na reacção de 4-mercaptopiridina em excesso com alicina, obteve-se uma concentração de alicina média no alho de $2.5 \text{ mg}_{\text{alicina}}/\text{g}_{\text{alho hum}} \pm 0.30$.

Palavras-chave: Alho; Alicina; HPLC; Espectrofotometria

Abstract

Allicin (diallyl-thiosulfinate) has been known for decades and is the main biologically active component in garlic with numerous applications in health.

Actually there exist several methods for the determination of Allicin content in garlic by HPLC and spectrophotometry, however, the results published of the various methods don't coincide.

The main objective of this study is to determine the allicin content by HPLC and spectrophotometry in order to evaluate the results obtained.

The HPLC methods used for this study were taken from Eagling and Sterling¹ and from the *Institute for Nutraceutical Advancement (INA)*². By the first method, which consists of a mixture of an internal standard (PI) in the sample and HPLC assay, results a medium allicin concentration of $2.0 \text{ mg}_{\text{allicin}}/\text{g}_{\text{garlic}} \pm 0.32$. Using the INA method, which includes an external standard method of allicin by a solid phase extraction (SPE), results a medium allicin concentration of $5.02 \text{ mg}_{\text{allicin}}/\text{g}_{\text{garlic}} \pm 0.39$.

The spectrophotometric methods used in this study were proposed by Lawson³ and Miron⁴. Through the first method which consists on the reaction of cysteine in excess with allicin, results a medium allicin concentration of $0.9 \text{ mg}_{\text{allicin}}/\text{g}_{\text{garlic}} \pm 0.48$. With the second method, which consists on the reaction of 4-Mercaptopyridine in excess with allicin, results a medium allicin concentration of $2.5 \text{ mg}_{\text{allicin}}/\text{g}_{\text{garlic}} \pm 0.30$.

Keywords: Garlic; Allicin; HPLC; Spectrophotometry

Índice geral

Índice geral.....	vii
Índice de figuras.....	ix
Índice de tabelas.....	x
Nomenclatura.....	xi
1. Introdução.....	1
1.1. Alho.....	1
1.2. Alicina.....	1
1.3. A importância da alicina.....	2
1.4. Dificuldades no estudo da alicina no alho.....	2
1.5. Métodos para a determinação do teor de alicina no alho.....	2
1.5.1. Método HPLC proposto por Eagling e Sterling (<i>Método PI</i>).....	2
1.5.2. Método HPLC proposto pelo <i>Institute for Nutraceutical Advancement</i> (<i>Método INA</i>).....	3
1.5.3. Método espectrofotométrico indirecto de Lawson utilizando cisteína (<i>Método Cisteína</i>)...	6
1.5.4. Método espectrofotométrico directo de Miron utilizando 4MP (<i>Método 4MP</i>).....	7
1.5.5. Resumo e comparação global dos métodos.....	8
2. Objectivo.....	9
3. Estudo experimental.....	10
3.1. Equipamento.....	10
3.1.1. Cromatografia líquida de alta performance (HPLC).....	10
3.1.2. Espectrofotómetro.....	12
3.1.3. Analisador de humidade <i>Sartorius</i>	13
3.2. <i>Método PI</i>	14
3.2.1. Reagentes.....	14
3.2.2. Condições Experimentais.....	14
3.2.3. Procedimento.....	15
3.2.4. Resultados e Discussão.....	15
3.3. <i>Método INA</i>	18
3.3.1. Reagentes.....	18
3.3.2. Condições experimentais.....	18
3.3.3. Procedimento.....	19
3.3.4. Resultados e Discussão.....	22
3.4. <i>Método Cisteína</i>	26
3.4.1. Reagentes.....	26
3.4.2. Condições Experimentais.....	26
3.4.3. Procedimento.....	27
3.4.4. Resultados e Discussão.....	28
3.5. <i>Método 4MP</i>	31

3.5.1. Reagentes	31
3.5.2. Condições Experimentais	32
3.5.2. Procedimento	32
3.5.3. Resultados e discussão.....	33
4. Conclusões	35
Apêndice A	I
Apêndice B.....	III
Apêndice C.....	IV
Bibliografia	VII

Índice de figuras

- Figura 1.1** – Reacções para a formação da alicina por condensação enzimática.
- Figura 1.2** – Distribuição de frequência do teor de alicina em 200 amostras de alho australiano.
- Figura 1.3** – Evolução da concentração de alicina ao longo do tempo, para o *Método INA* e o *Método PI*.
- Figura 1.4** – Representação geral das reacções que ocorrem na aplicação do *Método Cisteína*.
- Figura 1.5** – Reacção da alicina com o 4MP em excesso para o *Método 4MP*.
- Figura 1.6** – Reacção da alicina e outros tiosulfinafos na presença de tiois não reactivos.
- Figura 3.1** – Esquema do equipamento experimental de HPLC.
- Figura 3.2** – Equipamento de HPLC, *Jasco, PU-2080 plus, UV-2075 plus*.
- Figura 3.3** – Esquema do processo de separação dos componentes na fase estacionária do HPLC.
- Figura 3.4** – Esquema do espectrofotómetro.
- Figura 3.5** – Espectrofotómetro UV-Visível, *Jasco, V-530*.
- Figura 3.6** – Aparelho de análise de humidade, *Sartorius MA-45*.
- Figura 3.7** – Esquematização da preparação da amostra para o *Método PI*.
- Figura 3.8** – Cromatograma da experiência 1, ensaio 1, do *Método PI*.
- Figura 3.9** – Ilustração da preparação da amostra padrão no *Método INA*.
- Figura 3.10** – Instalação experimental para a extracção por SPE; a) Cartucho de extracção, b) Balão volumétrico, c) *Manifold*, d) Bomba de sucção.
- Figura 3.11** – Esquematização da preparação da amostra padrão da 1ª parte do *Método INA*.
- Figura 3.12** – Esquematização da separação da alicina das impurezas por SPE para o *Método INA*.
- Figura 3.13** – Cromatograma do ensaio 1, experiência 1, do *Método INA*.
- Figura 3.14** – Curva de calibração do padrão de alicina no *Método INA*.
- Figura 3.15** – Instalação experimental para o acerto do pH da solução de *Hepes* no *Método Cisteína*.
- Figura 3.16** – Esquematização da 1ª parte do procedimento do *Método Cisteína*.
- Figura 3.17** – Esquematização da 2ª parte do procedimento do *Método Cisteína*.
- Figura 3.18** – Gráfico da evolução do valor de absorvância com o tempo, da 1ª parte da experiência 1 do *Método Cisteína*.
- Figura 3.19** – Gráfico da evolução do valor de absorvância com o tempo, da 2ª parte da experiência 1 do *Método cisteína*.
- Figura 3.20** – Ilustração da agitação das soluções de *Hepes A* para o *Método 4MP*.
- Figura 3.21** – Esquematização da 1ª parte do procedimento do *Método 4MP*.
- Figura 3.22** – Esquematização da 2ª parte do procedimento do *Método 4MP*.
- Figura 3.23** – Gráfico comparativo dos valores da concentração de alicina para o *Método PI* e para o *Método 4MP*.

Índice de tabelas

Tabela 1.1 – Estudo do teor de alicina no alho utilizando o *Método INA* e *PI*.

Tabela 1.2 – Comparação entre os métodos por HPLC que utilizam um padrão não reactivo.

Tabela 1.3 – Comparação entre os métodos espectrofotométricos que utilizam um padrão reactivo.

Tabela 3.1 – Condições experimentais de todas as experiências do *Método PI*.

Tabela 3.2 – Área e tempo de retenção para a experiência 1, ensaio1, do *Método PI*.

Tabela 3.3 – Valores de concentração obtidos para todas as experiências do *Método PI*.

Tabela 3.4 – Valores para a média de concentração de alicina, variância e desvio padrão no *Método PI*.

Tabela 3.5 – Condições experimentais de todas as experiências do *Método INA*.

Tabela 3.6 – Leitura das absorvâncias obtidas para a amostra padrão do *Método INA*.

Tabela 3.7 – Área e tempos de retenção para os componentes no *Método INA*.

Tabela 3.8 – Critérios para a aceitação ou rejeição da amostra padrão no *Método INA*.

Tabela 3.9 – Valores da concentração de alicina para todas as experiências do *Método INA*.

Tabela 3.10 – Valores para a média de concentração de alicina, variância e desvio padrão no *Método INA*.

Tabela 3.11 – Valores de concentração de alicina no *Método Cisteína*, para pH = 5.80.

Tabela 3.12 – Valores de concentração de alicina no *Método 4MP*, para pH = 7.50.

Tabela 3.13 – Valores para a média de concentração de alicina, variância e desvio padrão do *Método Cisteína*.

Tabela 3.14 – Valores obtidos para a concentração na aplicação do *Método 4MP*.

Tabela 3.15 – Valores para a concentração média de alicina, variância e desvio padrão do *Método 4MP*.

Nomenclatura

Variáveis

Abs – Absorvância

Abs₀ – Absorvância final da 1ª parte de cada um dos métodos espectrofotométricos

Abs_f – Absorvância final da 2ª parte de cada um dos métodos espectrofotométricos

A_i – Área do pico cromatográfico do componente *i*

c – Concentração da espécie absorvedora

C_i – Concentração do componente *i*

I – Intensidade de luz transmitida

I₀ – Intensidade de luz incidida

Imp – Percentagem de impurezas

k – Constante cinética

L – Caminho óptico percorrido pela solução

M – Massa molecular

m_i – massa do componente *i*

R – Razão das absorvâncias

r² – Coeficiente de correlação

T_{amb} – Temperatura ambiente

t_r – Tempo de retenção

V_i – Volume do componente *i*

Abreviaturas

4MP – 4-mercaptopiridina

alho a – Alho do mercado

alho b – Alho roxo fresco da marca “Ajos Montejano”

alho c – Alho em pó da marca Margão

DTNB – Ácido 5,5’ Ditiobis (2-nitrobenzoico)

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

GC – Cromatografia Gasosa (*Gas Chromatography*)

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Performance (*High performance Liquid Chromatography*)

INA – *Institute for Nutraceutical Advancement*

NTB – 2-Nitro-5-Tiobenzoato

PI – Padrão Interno

sol – Solução

SPE – Extracção em Fase Sólida (*Solid Phase Extraction*)

Letras gregas

ϵ – Absortividade molar ou coeficiente de extinção

λ – Comprimento de onda

Δ – Variação

1. Introdução

1.1. Alho

Um condimento bastante utilizado na culinária da actualidade e há várias centenas de anos é o alho, cujo nome botânico é *Allium Sativum L.* A sua exploração não foi apenas como especiaria, sendo também utilizado para outros fins dependendo da cultura. Ao longo dos tempos foi-se descobrindo que o bolbo desta planta possuía também propriedades benéficas para a saúde⁵. Vários são os componentes sulfatados do alho que proporcionam estas propriedades, mas o componente biológico mais activo é a alicina (dialil-tiosulfinato), que representa 70 % dos compostos sulfatados existentes no alho^{6,7}.

1.2. Alicina

A alicina é o componente responsável pelo odor característico do alho e é uma forma de defesa contra as agressões vindas do exterior; não estando presente no alho intacto produz-se apenas quando o alho é danificado, isto é, quando é cortado ou esmagado.

Quando as células do alho são rompidas, quebram-se também as membranas que isolam a aliina da alinase presente no alho e o seu contacto permite a formação de ácido sulfénico intermediário⁶ estando representada na reacção a) da figura 1.1. Tal como a aliina, outros compostos sulfatados presentes no alho também se convertem, combinando-se rapidamente entre si os compostos resultantes⁸ e por condensação enzimática forma-se a alicina⁶, estando representada na reacção b) na figura 1.1

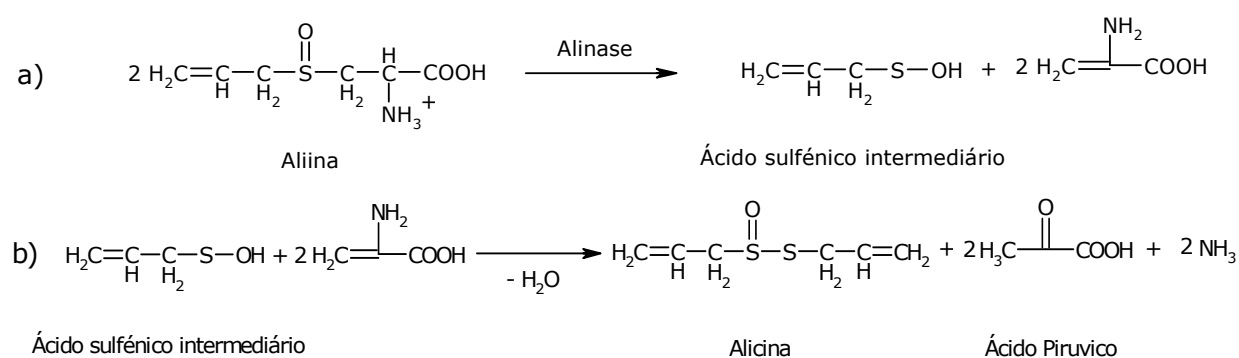


Figura 1.1 – Reacções para a formação da alicina por condensação enzimática.

A alicina quando produzida elimina fungos e inibe o desenvolvimento de bactérias que se encontrem á sua volta, pois devido ao seu poder antioxidante provoca uma reacção instantânea com os grupos livres de tiol⁹ penetrando facilmente nas células biológicas desactivando as suas enzimas¹⁰. Estas características da alicina conferem-lhe particularidade e interesse pela sua importância.

1.3. A importância da alicina

A alicina tem uma importância fulcral em inúmeras aplicações ao nível da saúde, tendo sido isolada por Cavalitto e Bailey em 1944¹¹. Ao longo dos anos vários estudos *in vitro* demonstraram que a alicina tem uma forte actividade anti-bacteriana, anti-fúngica, anti-parasitária contra uma vasta gama de microrganismos¹²⁻¹⁴ e ao nível de redução do colesterol e da pressão sanguínea¹⁵. Apesar da sua enorme actividade, o desenvolvimento do seu estudo *in vivo* não tem sido muito aprofundado devido principalmente á sua instabilidade¹⁶.

1.4. Dificuldades no estudo da alicina no alho

O estudo da alicina torna-se difícil especialmente devido á sua instabilidade, pois como se produz e degrada muito rapidamente na presença de outros compostos, torna-se complicada a sua estabilização e determinação do seu teor no alho, sendo também um composto delicado de sintetizar e armazenar em condições normais^{17 8}.

A forte actividade da alicina é reduzida sob temperaturas elevadas, pois a alicina é desnaturada com o aumento da temperatura a que é submetida, sendo também um dos inconvenientes no estudo do teor de alicina¹⁴.

Desde a descoberta da alicina vários estudos foram realizados neste âmbito, de modo a possibilitar a quantificação da alicina em amostras de alho, surgindo vários métodos para a sua determinação.

1.5. Métodos para a determinação do teor de alicina no alho

Na literatura podem-se encontrar vários trabalhos sobre o estudo do teor de alicina no alho¹⁸⁻²⁰ utilizando diferentes técnicas como: HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Performance), GC (Cromatografia Gasosa) e espectrofotometria. A espectrofotometria tem vantagem sobre os métodos cromatográficos pelo facto de não ser necessário a utilização de amostras padrão de alicina. Neste trabalho irão ser abordados apenas métodos utilizando a cromatografia líquida (HPLC) e espectrofotometria.

1.5.1. Método HPLC proposto por Eagling e Sterling (*Método PI*)

Este método consiste na utilização de um padrão interno (PI), que é analisado no HPLC misturado na amostra¹. O PI utilizado tem uma concentração conhecida inicialmente e deverá ter uma estrutura semelhante e não reactiva com a alicina. A utilização do HPLC implica a necessidade de uma fase móvel que arraste a amostra injectada para uma fase estacionária, onde as substâncias presentes são separadas. O método utiliza o *p*-hidroxibenzoato de etilo como PI e uma fase móvel constituída por metanol e água ultra pura (água destilada e desionizada) na proporção 50:50. Injectando a amostra no HPLC, pode-se calcular o teor de alicina no alho através da equação 1.1.

$$C_{alicina} (mg_{alicina} / g_{alho\ hum}) = \frac{C_{PI} A_{alicina} V_{PI}}{m_{alho} A_{PI}} \quad (1.1)$$

Onde, C_{PI} é a concentração da solução de PI, m_{alho} é a massa da pasta de alho, A_{PI} é a área correspondente ao pico do PI, $A_{alicina}$ é a área correspondente ao pico cromatográfico de alicina e V_{PI} é o volume da solução de padrão interno na preparação da amostra.

Vantagens e limitações do método PI

Este método é simples, sendo recomendado pela Farmacopeia Brasileira*²¹ mas tem a desvantagem de utilizar um PI, que pode não ter um factor de resposta semelhante ao da alicina.

Estudos realizados utilizando o método

David Eagling e Sam Sterling²² realizaram um estudo de 200 amostras com vários tipos de alho australiano, apresentando-se a distribuição da frequência das concentrações na figura 1.2, onde se retira uma gama típica para concentração de alicina de 0.5 até 9 mg_{alicina}/g_{alho hum}. A maioria das amostras possuía uma concentração entre 3 a 6 mg_{alicina}/g_{alho hum}.

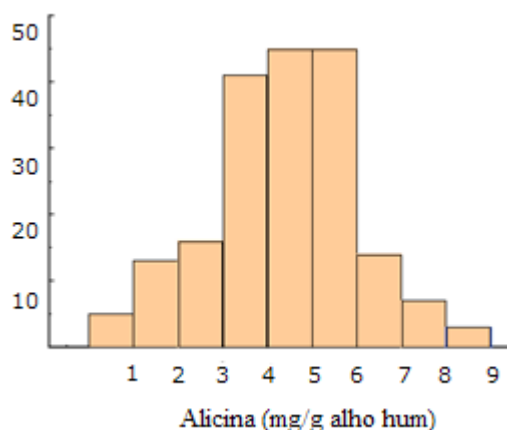


Figura 1.2 – Distribuição de frequência do teor de alicina em 200 amostras de alho australiano.

1.5.2. Método HPLC proposto pelo *Institute for Nutraceutical Advancement* (*Método INA*)

O *Método INA* surgiu na sequência do método estudado por Lawson através de HPLC¹⁹. Este método consiste na extracção em fase sólida (SPE) de uma solução aquosa de alho em pó com o objectivo de isolar a alicina². Esta solução obtida será a solução padrão utilizada para a introdução no HPLC a várias concentrações, diluindo a solução mãe. Para cada solução diluída obtém-se a quantidade de alicina por unidade de área através de um cromatograma. Com os valores obtidos para as várias concentrações da solução padrão pode-se

* Comissão Permanente de Revisão da Farmacopeia Brasileira – CPRFB, instituída pelas Portarias nº 686 de 12 de Dezembro de 2002 e nº 56 de 27 de Janeiro de 2003.

representar uma curva de calibração, cuja equação permite de um modo simples a determinação da concentração de outras soluções aquosas de alho, dependendo apenas da área do pico de alicina para essa solução.

Critérios de aceitação da curva de calibração

Para a obtenção da curva de calibração as soluções padrão só serão válidas se a equação tiver um coeficiente de correlação (r^2) igual ou superior a 0.999; e se em relação á solução padrão mãe forem aceites os seguintes critérios:

1. A razão das absorvâncias da solução para um comprimento de onda de 240 e 254 nm terá de se encontrar dentro do intervalo pretendido, representado na equação 1.2.

$$R = \frac{Abs_{240}}{Abs_{254}}, \quad 1.4 \leq R \leq 1.5 \quad (1.2)$$

Onde, Abs_{240} é a absorvância da solução padrão mãe a 240 nm e Abs_{254} é a absorvância da solução a 254 nm.

2. A percentagem de impurezas da solução terá de ser inferior a 12 % através da sua análise por HPLC, utilizando para o cálculo a equação 1.3.

$$I(\%) = \frac{A_{total} - A_{Alicina} - A_{Me\ tan\ ol}}{A_{total}} \times 100, \quad I \leq 12\% \quad (1.3)$$

Onde, A_{total} é a área total dos picos obtidos pelo cromatograma, $A_{alícina}$ é a área do pico correspondente á alicina e $A_{metanol}$ é a área do pico correspondente ao metanol.

Após a satisfação destes critérios, o cálculo da concentração da alicina presente na solução padrão mãe é baseado na absorvância a 240 nm através da equação 1.4.

$$C(\mu g / ml) = \frac{Abs_{240}}{\epsilon_{1cm}^{1\%}} \times 100000 \quad (1.4)$$

Onde $\epsilon_{1cm}^{1\%} = 145.4$ é o coeficiente de extinção da alicina em água a 240 nm para uma cuvete de quartzo de 1cm e Abs_{240} a absorvância para o comprimento de onda de 240 nm.

Vantagens e limitações do Método INA

Este método usa a alicina como padrão externo na análise em HPLC, conferindo vantagem, pois usa padrões de alicina para a determinação da concentração de alicina noutras amostras. É limitado, pois os padrões de alicina utilizados não são obtidos através de alicina pura, mas por extracção em fase sólida de soluções contendo alicina. Esta extracção de alicina da amostra padrão pode não ser completa, afectando o valor da absorvância obtida para o cálculo da concentração.

Estudo comparativo entre o Método INA e o Método PI

No Laboratório de Processos de Separação e Reacção (LSRE) do Instituto Politécnico de Bragança foi realizado um estudo com o objectivo de comparar o Método INA com o Método PI²³. Através do estudo foi retirada a conclusão que a concentração de alicina determinada pelo Método INA era superior á concentração obtida utilizando o Método PI; e que a temperatura ideal para a conservação da solução de alicina para a realização destes métodos seria a 4°C. Os valores para a concentração de alicina obtidos para os dois métodos²³ encontram-se na tabela 1.1.

Tabela 1.1 – Estudo do teor de alicina no alho utilizando o Método INA e PI.

Experiência	$C_{\text{allicina, PI}}$	$C_{\text{allicina, INA}}$
	(mg _{allicina} /g _{alho hum})	(mg _{allicina} /g _{alho hum})
1	1.1700	2.8100
2	1.0400	3.5800
3	1.2100	3.4000
4	1.1500	3.8300
5	1.0900	2.8500
6	1.1800	3.0300
7	1.1800	3.3100
8	1.5100	3.5500
9	1.4200	-
10	1.4300	-
11	1.6700	-
12	1.2100	-

Com a amostra contendo maior teor de alicina de cada método (amostra 4 para o Método INA e a amostra 11 para o Método PI) foi feito um estudo da sua estabilidade ao longo do tempo, onde a figura 1.3 mostra a evolução da concentração da alicina em cada amostra, durante oito dias²³.

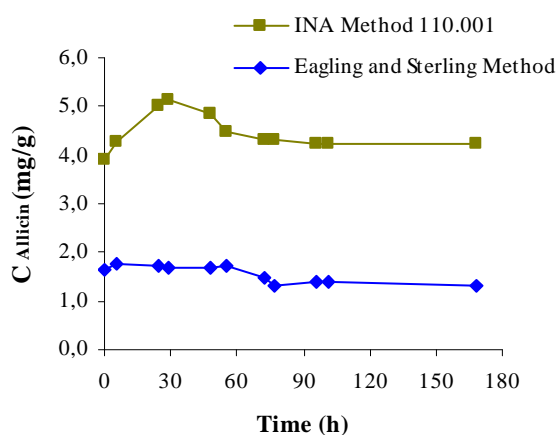


Figura 1.3 – Evolução da concentração de alicina ao longo do tempo, para o Método INA e o Método PI.

No estudo o valor da concentração média de alicina mostrou-se mais estável para o Método INA do que no Método PI. O facto da concentração de alicina ser menor utilizando o Método PI e da sua instabilidade pode dever-se á reacção inesperada do PI com a alicina, encontrando-se menos alicina na solução final do que existia inicialmente, conferindo-lhe uma desvantagem.

1.5.3. Método espectrofotométrico indirecto de Lawson utilizando cisteína (Método Cisteína)

O *Método Cisteína* foi proposto por Lawson e utiliza somente análise por espectrofotometria³. Consiste numa primeira etapa na reacção da cisteína com o DTNB originando NTB, para quantificar a cisteína.

Numa segunda etapa faz-se reagir cisteína em excesso com alicina formando S-alil mercaptocisteína e cisteína que não reagiu, pois a alicina será o reagente limitante. Numa segunda reacção, a cisteína que não reagiu em conjunto com DTNB forma NTB. O decréscimo da absorvância do NTB da primeira para a segunda etapa indica a quantidade de alicina presente em solução. O esquema reaccional da segunda etapa está representado na figura 1.4.



Figura 1.4 – Representação geral das reacções que ocorrem na aplicação do *Método Cisteína*.

A concentração de alicina na solução de alho é obtida através da equação 1.5, retirada de um estudo utilizando o método de Lawson, abordado nos estudos realizados utilizando este método²⁴.

$$C_{allicina} (\text{mmol}_{allicina} / L_{sol}) = \frac{\Delta Abs_{412} \times 100000}{2 \times \epsilon_{412}} \quad (1.5)$$

Onde, $\Delta Abs_{412} = Abs_0$ (NTB formado sem a presença de alicina) – Abs_f (NTB formado com a presença de alicina), $\epsilon_{412} = 14150$ é o coeficiente molar de extinção do NTB e 2 significa que a alicina se encontra numa proporção de metade em relação á cisteína.

ϵ_{412}

Vantagens e Limitações do *Método Cisteína*

Este método tem vantagem sobre o próximo método espectrofotométrico em estudo, pois é válido para uma gama de concentrações de alicina superior.

Contudo, confere desvantagem porque é complexo, necessitando da sequência de duas reacções para a análise dos resultados, conduzindo mais facilmente a erros experimentais. Outra desvantagem é que é um método indirecto, pois é a quantidade de NTB formado na segunda reacção da segunda etapa, que vai determinar a quantidade de alicina presente no alho.

Estudos realizados utilizando o método

Yu Li et al²⁴ utilizaram o *Método Cisteína* para a determinação do teor de alicina em alho no estudo da microencapsulação de alicina em pó. O avanço neste estudo permitiu simplificar a utilização do método de Lawson, na medida em que tornou mais fácil o procedimento e o cálculo da concentração de alicina.

1.5.4. Método espectrofotométrico directo de Miron utilizando 4-mercaptopiridina (*Método 4MP*)

O *Método 4MP* é um método espectrofotométrico proposto por Miron⁴. Este método consiste inicialmente na medição da absorvância do 4MP sem a presença de alicina. Numa segunda etapa faz-se reagir o 4MP em excesso com alicina e mede-se a absorvância do 4MP que não reagiu; a reacção que ocorre está representada na figura 1.5. O decréscimo da absorvância do 4MP da primeira para a segunda etapa indica a quantidade de alicina presente em solução.

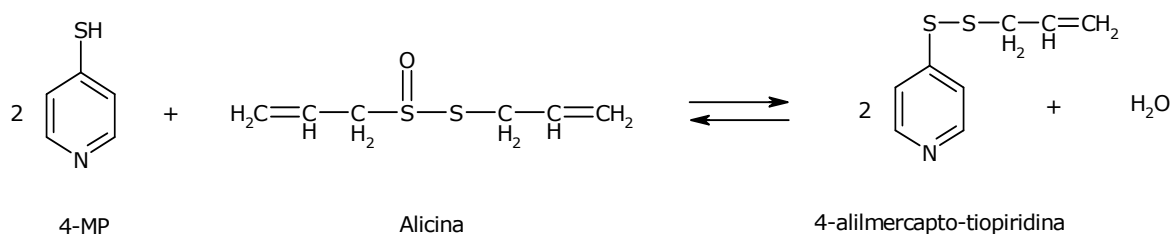


Figura 1.5 – Reacção da alicina com o 4MP em excesso para o *Método 4MP*.

A determinação do teor de alicina pode ser calculada através de um método estático ou um método cinético como se apresenta de seguida.

Método estático

O método estático aplica-se para concentrações de alicina numa gama baixa, entre 10^{-6} e 10^{-5} M, utilizando no cálculo da concentração de alicina a equação 1.6.

$$C_{\text{alícina}} (\mu\text{g}_{\text{alícina}} / \text{ml}_{\text{sol}}) = \frac{\Delta Abs_{324} \times \text{diluição}}{\epsilon_{324}} \quad (1.6)$$

Onde, $\Delta Abs_{324} = Abs_0$ (4MP sem alicina) – Abs_f (4MP com alicina), $\epsilon_{324} = 39600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ é o coeficiente de extinção do 4MP e a diluição corresponde ao volume de solução que se utiliza para diluir a mistura reaccional antes da leitura da absorvância.

Método cinético

O método cinético aplica-se para concentrações de alicina numa gama mais elevada, entre 1.2×10^{-5} e 7.5×10^{-4} M, consistindo numa aproximação cinética do comportamento da alicina na presença do 4MP, utilizando para o cálculo da concentração de alicina a equação 1.7.

$$v = k C_{4MP} C_{alicina} \Leftrightarrow C_{alicina} (M) = \frac{\Delta Abs_{324}}{k C_{4MP}} \quad (1.7)$$

Onde, $k=82 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$, $C_{4MP}=10^{-4} \text{ M}$ e $\Delta Abs_{324}= Abs_{s_0} (4MP \text{ sem alicina}) - Abs_f (4MP \text{ com alicina})$.

Limitações e vantagens do Método 4MP

Este método tem a vantagem de ser simples pois necessita apenas de uma reacção para quantificar a alicina e é directo na medida em que o composto em análise é o que reage com esta. Mas tem a desvantagem de ser válido apenas para uma gama pequena de concentrações de alicina em solução.

1.5.5. Resumo e comparação global dos métodos

De modo a facilitar a compreensão das diferenças entre os vários métodos, apresenta-se a tabela 1.2 e 1.3 com uma breve comparação entre eles.

Tabela 1.2 – Comparação entre os métodos por HPLC que utilizam um padrão não reactivo.

	<i>Método PI</i>	<i>Método INA</i>
Padrão interno (PI)	<i>p</i> -hidroxibenzoato de etilo	Não utiliza
Amostra Padrão	Não utiliza	Obtida por SPE
Fase móvel	Metanol e água ultra pura (50:50)	Metanol e água ultra pura (50:50)
λ (nm)	240, 254	240, 254

Os métodos por HPLC foram testados no laboratório LSRE/IPB e a maior diferença entre ambos é a utilização de um PI para o *Método PI* e o *Método INA* utilizar uma amostra padrão externo de alicina.

Tabela 1.3 – Comparação entre os métodos espectrofotométricos que utilizam um padrão reactivo.

	<i>Método Cisteína</i>	<i>Método 4MP</i>
Composto em excesso	Cisteína	4MP
ϵ ($\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$)	Não utiliza	19800
λ (nm)	412	324

Os compostos utilizados nos métodos espectrofotométricos possuem um grupo tiol, que facilita a reacção com a alicina devido á sua propriedade oxidante de grupos SH^{18} , baseando-se estes métodos na reacção representada na figura 1.6.



Figura 1.6 – Reacção da alicina e outros tiosulfatos na presença de tiois não reactivos.

2. Objectivo

Este trabalho tem como objectivo o estudo de diversos métodos para a determinação do teor de alicina no alho, de modo a seleccionar um método que seja simples, sensível e exacto na análise da quantificação da alicina.

As discrepâncias encontradas entre os *métodos PI e INA*²³ levam á necessidade de comparação com outros métodos existentes. Experimentalmente vai se efectuar uma análise comparativa do teor de alicina no alho medido por técnicas cromatográficas e espectrofotométricas recentemente desenvolvidas¹⁻⁴.

3. Estudo experimental

O estudo experimental consistiu na aplicação das técnicas cromatográficas: *Método INA* e *Método PI*; e técnicas espectrofotométricas: *Método Cisteína* e *Método 4MP*; e comparação dos seus resultados

O custo de alicina pura é bastante elevado e a sua síntese complexa ¹⁷, pelo que, utilizar-se-á apenas alicina proveniente da pasta de alho e de alho em pó; sendo o esmagamento do alho para a formação da pasta uma etapa muito importante e comum nos métodos, pois a produção de toda a alicina presente no alho depende do grau de maturação.

3.1. Equipamento

3.1.1. Cromatografia líquida de alta performance (HPLC)

A análise das amostras por HPLC realizou-se no equipamento da *Jasco*, esquematizado na figura 3.1 e ilustrado na figura 3.2. O equipamento de HPLC foi utilizado para o *Método PI* e *INA*.

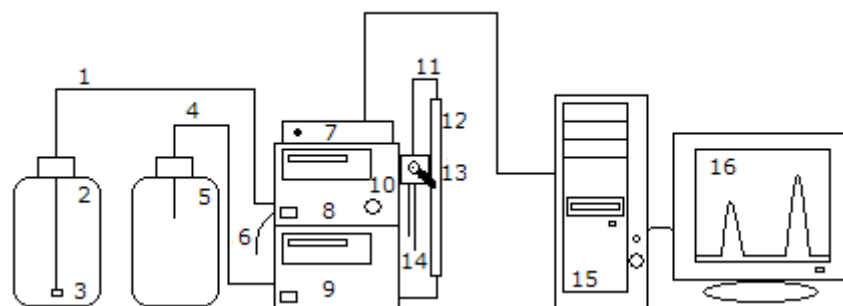


Figura 3.1 – Esquema do equipamento experimental de HPLC.



Figura 3.2 – Equipamento de HPLC, *Jasco*, *PU-2080 plus*, *UV-2075 plus*.

O equipamento de HPLC é constituído por uma bomba, *PU-2080 plus intelligent pump* (8) que bombeia o solvente líquido, designado de fase móvel, encontrando-se num frasco (2). No tubo (1) ligado á bomba que capta a fase móvel está um filtro (3) que evita que as partículas suspensas obstruam os capilares ou contaminem a bomba.

A fase móvel deve ser filtrada e consequentemente desgaseificada, de forma a não prejudicar a performance da coluna e do detector, *UV-2075 plus intelligent detector* (9), nunca deixando que esta diminua abaixo do filtro para não haver entrada de ar para a coluna. Se entrar ar deve-se recorrer á sua purga, abrindo a válvula (10) e retirando o ar com uma seringa pelo tubo de purga (6) de modo a que a bomba fique ferrada, isto é, passando nos tubos apenas fase móvel e retirando todo o ar.

Ligando a bomba para um determinado caudal, faz-se uma injeção rápida de 100 μL da amostra na entrada do injetor (13), enchendo na totalidade o tubo que vai desde o injetor até o início da fase estacionária. Como o equipamento tem um *loop* de 20 μL , então, 80 μL da quantidade injectada irá sair pelo tubo de saída (14). Rodando o injetor de *load* para *inject* efectua-se um impulso, onde, a amostra será arrastada pela fase móvel até á fase estacionária (estrutura sólida e porosa de sílica) na coluna (12).

A separação é efectuada na fase estacionária e baseia-se na diferença de tempo com que os solutos se distribuem entre a fase móvel e estacionária. Devido a uma maior ou menor afinidade dos solutos com o adsorvente da fase estacionária, têm consequentemente um maior ou menor tempo de retenção na coluna, como representado na figura 3.3.

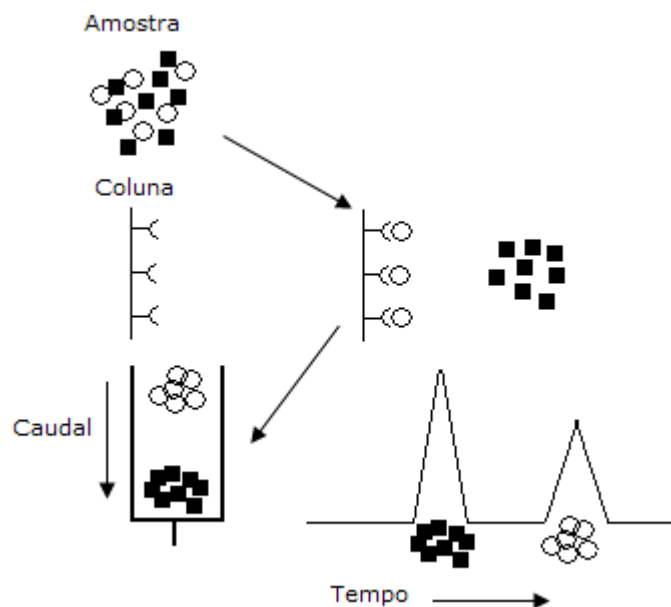


Figura 3.3 – Esquema do processo de separação dos componentes na fase estacionária do HPLC.

Essa diferença de velocidades vai permitir ao detector captar por diferentes ordens de chegada os solutos, medindo a sua absorvância e enviando a informação para o processador de dados, *SRI Peak Simple chromatography data system* (7), que converte a informação para o computador (15) com o software de aquisição de dados.

Através do programa *Peak Simple* obtém-se no monitor (16) um cromatograma, apresentando em forma de picos a quantidade de cada substância por unidade de área.

Após a leitura da absorvância pelo detector a solução percorre pelo tubo (4) até o frasco de restos (5).

3.1.2. Espectrofotômetro

Para a leitura da absorvância das soluções foi utilizado o espectrofotômetro *UV-Visível V-530 da Jasco*, esquematizado na figura 3.4 e ilustrado na figura 3.5. O espectrofotômetro foi utilizado nos métodos espectrofotométricos e no *Método INA*.

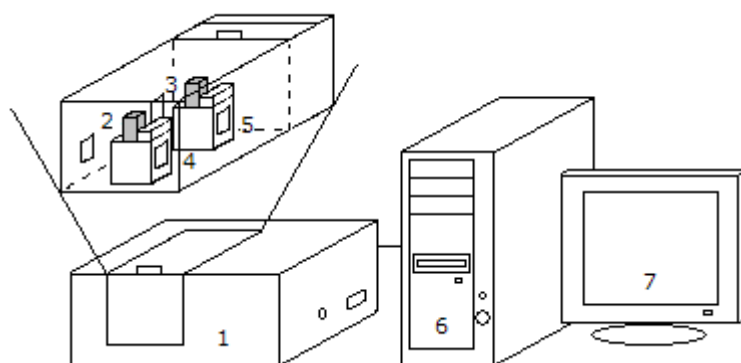


Figura 3.4 – Esquema do espectrofotômetro.



Figura 3.5 – Espectrofotômetro UV-Visível, *Jasco, V-530*.

O espectrofotômetro possui uma lâmpada de deutério com uma luz na gama do UV e Visível (1). Para a análise da solução, esta é colocada numa cuvette (2, 3), podendo ser de vidro, sílica ou quartzo dependendo do λ do feixe de luz incidido. Para os métodos abordados foi utilizada uma *cuvete* de quartzo, visto que, o λ necessário é de 324, 240, 254 e 412 nm.

Para se determinar a absorção da solução, esta é inserida no caminho óptico do aparelho (4 e 5), onde, para um determinado λ o espectrofotômetro mede a quantidade de luz absorvida após se incidir um feixe na solução.

A intensidade da luz antes de passar pela solução é simbolizada por I_0 e após a sua passagem é simbolizada por I . A transmitância da solução é a razão (I / I_0) sendo a absorvância definida pela lei de Beer-Lambert, representada na equação 1.8.

$$Abs = \log_{10} \frac{I}{I_0} = \varepsilon \times c \times L \quad (1.8)$$

Onde, Abs é a absorvância medida, I_0 é a intensidade da luz incidente para um dado λ , I é a intensidade transmitida pela solução, L é o caminho óptico percorrido pela solução (distância que a luz percorreu na solução, cm), ε é absorbtividade molar (constante que varia para cada substância), e c é a concentração da substância na solução, g L⁻¹.

Para a leitura da absorvância de uma amostra é feito inicialmente o *autozero*, que permite colocar a zero a absorvância no espectrofotómetro, sendo realizado através da leitura da absorvância sem as cuvetes (2 e 3).

De seguida é feito um branco, onde se faz a leitura da absorvância com a solução que foi utilizada como solvente na preparação da amostra, isto é, contendo todas as substâncias da amostra excepto a substância a analisar.

Para a análise da amostra é mantida na cuvete (3) a solução considerada o branco, enquanto que na cuvete (2) é colocada a amostra a analisar permitindo a subtracção da absorvância do branco na absorvância total obtida da leitura da amostra. Esta subtracção efectuada pelo espectrofotómetro implica que a absorvância da leitura final seja apenas da substância a analisar. A informação é captada pelo software do computador (6) e obtida no monitor (7) através do programa *Fixed Wavelength Measurement*.

3.1.3. Analisador de humidade *Sartorius*

Para obter uma relação para a passagem da base em alho seco para a base em alho húmido, foi utilizado o aparelho de análise de humidade, *Sartorius MA-45* ilustrado na figura 3.6. O aparelho contém no seu interior um prato onde se coloca o bolbo de alho e regista-se o seu peso antes e depois da sua secagem, após exposto a uma determinada temperatura (neste caso 130°C).

As massas obtidas indicam a conversão da quantidade de alho húmido que corresponde á quantidade de alho seco. O analisador de humidade *Sartorius* foi utilizado para o *Método INA*.



Figura 3.6 – Aparelho de análise de humidade, *Sartorius MA-45*.

3.2. Método PI

A solução de alho foi preparada utilizando como solvente uma solução de padrão interno (PI) com concentração conhecida, permitindo a análise por HPLC da quantidade de PI e alicina por unidade de área.

3.2.1. Reagentes

Os compostos utilizados foram: o metanol para a fase móvel e o p-hidroxibenzoato de etilo como PI, onde, os dados, cuidados de manuseamento e armazenamento se encontram no apêndice A.

A fase móvel utilizada foi uma solução constituída por metanol e água ultra pura, numa proporção de 50:50. Para a preparação das amostras foi utilizado alho do mercado (*alho a*) e alho roxo fresco da marca “Ajos Montejano” (*alho b*).

Preparação da solução de PI

Juntou-se 500 mg de p-hidroxibenzoato de etilo a 20 ml de metanol num balão volumétrico de 1000 ml, misturando-se bem até uma dissolução completa. Aqueceu-se 900 ml de água ultra pura (água destilada e desionizada) até uma temperatura de 80°C e juntou-se á mistura anterior, perfazendo-se o balão volumétrico com água ultra pura á temperatura ambiente.

Preparou-se 1 L da solução de PI com uma concentração de 0.5042 mg/ml, armazenou-se a uma temperatura de 4°C e utilizou-se na preparação das amostras de todas as experiências.

3.2.2. Condições experimentais

Para todas as experiências foram utilizadas as condições experimentais, apresentadas na tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Condições experimentais de todas as experiências do *Método PI*.

Condições experimentais	
Coluna	Gemini, C 18, 5µm
Pré-coluna	C18
Enchimento	Sílica gel
Tamanho da partícula (µm)	5
Detector	UV a 240 nm
Fase móvel	Metanol:H ₂ O ultra pura (50:50)
Fluxo (ml/min)	0.75
Volume de injeção (µL)	100
Volume do <i>loop</i> (µL)	20
Tempo de análise (min)	25
Tempo de limpeza (min)	40

3.2.3. Procedimento

Preparação da amostra

Esmagou-se 3 dentes de alho com um peso aproximado de 5g num esmagador, triturando-se de seguida 10 min num almofariz e 2 min no ultra-turrax com uma rotação de 11000 rpm/min, formando uma pasta de alho. Para a amostra pesou-se 5 g da pasta de alho e adicionou-se 25 ml da solução de PI. Incubou-se a amostra durante 20 min a uma temperatura de 30°C e centrifugou-se durante 5 min a uma rotação de 4000 rpm/min.

Retirou-se cuidadosamente 2 ml de sobrenadante, sem extrair parte sólida e adicionou-se a 8 ml de fase móvel. Filtrou-se a solução para um frasco pequeno utilizando um filtro de seringa com o poro de 0.20 µm e armazenou-se até a sua injeção, numa câmara-de-ar frio a uma temperatura de 4°C devido á instabilidade da alicina. De modo a clarificar o procedimento apresenta-se o esquema 3.7.

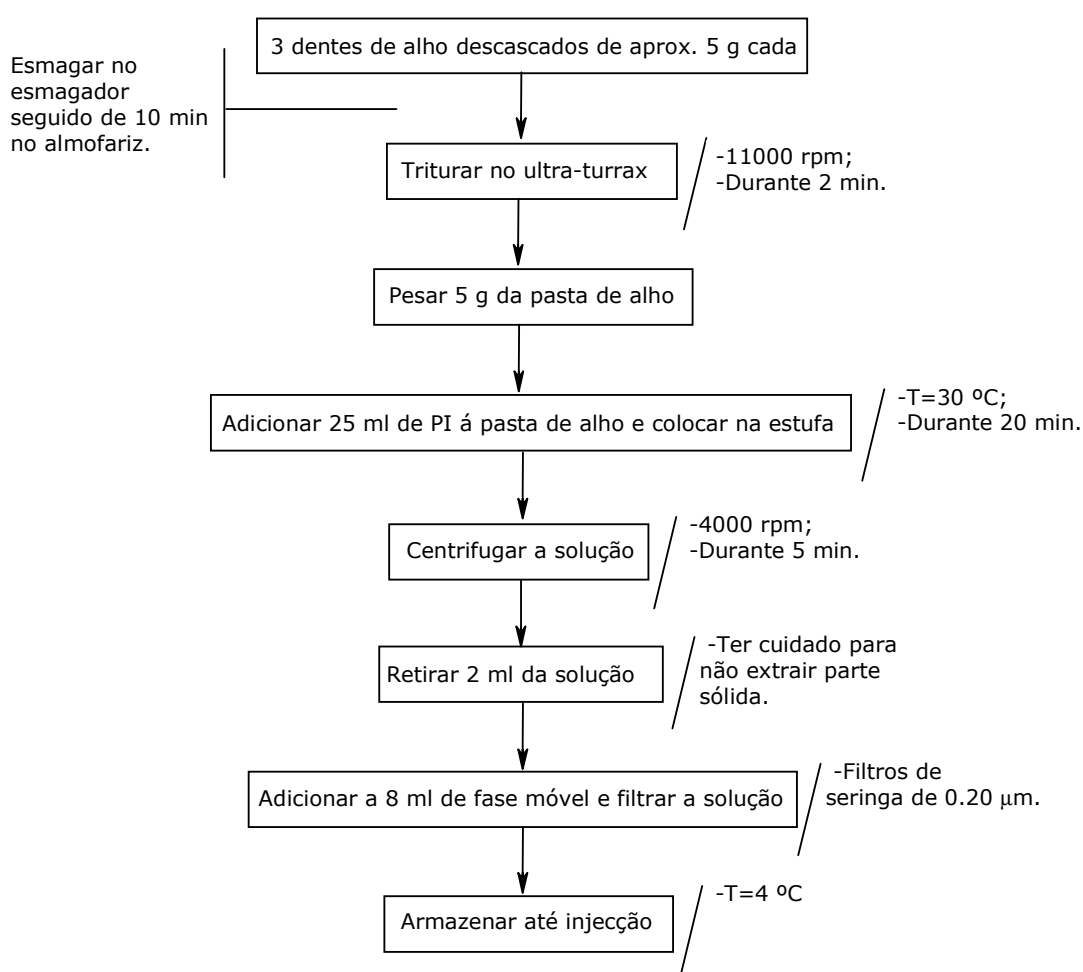


Figura 3.7 – Esquematização da preparação da amostra para o Método PI.

3.2.4. Resultados e discussão

Foram realizadas sete experiências e em cada uma efectuados três ensaios com um intervalo de aproximadamente 75 min, de maneira a testar a fiabilidade dos valores obtidos. Entre cada injeção a amostra armazenou-se numa câmara-de-ar frio a uma temperatura de 4°C.

Análise da amostra

Injectando-se a amostra no HPLC obteve-se um cromatograma, com as áreas correspondentes á quantidade de alicina e PI introduzidos, permitindo o cálculo da concentração da alicina. O cromatograma obtido para o ensaio 1 da experiência 1 apresenta-se na figura 3.8.

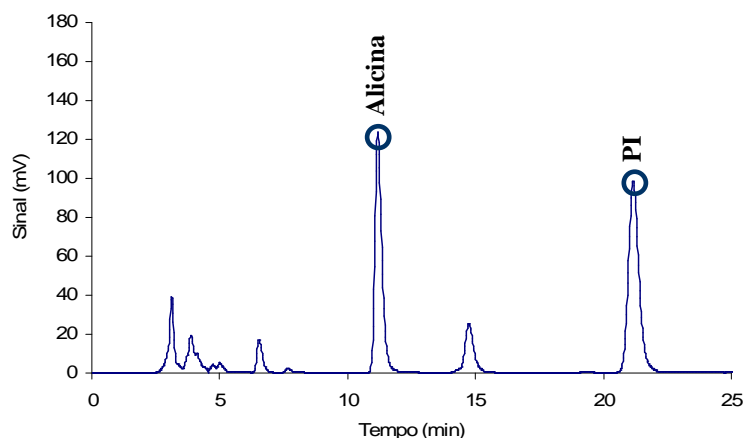


Figura 3.8 – Cromatograma da experiência 1, ensaio1, do *Método PI*.

Na tabela 3.2 mostra-se os tempos de retenção (t_r) e as áreas dos picos para a alicina e PI, obtidos pelo cromatograma da figura 3.8. Contudo, no cromatograma surgem também outros picos não identificados, sendo impurezas.

Tabela 3.2 – Área e tempo de retenção para a experiência 1, ensaio1, do *Método PI*.

Componente	t_r (min)	Á
Alicina	11.1830	2308.4720
PI	21.1660	2811.1935

Utilizando uma massa de pasta de alho de 5.0627 g, o cálculo da concentração de alicina é efectuado com base nos valores da tabela 3.2 e aplicando a equação 1.1, obteve-se 2.0445 mg/g_{alho húm.}

Reprodutibilidade do método

Na tabela 3.3, apresentam-se os valores obtidos para as áreas dos picos, t_r e concentração de alicina para cada ensaio, de modo a comparar resultados e estudar a sua reprodutibilidade.

Nas três primeiras experiências foi utilizada a proporção ($V_{PI}:m_{alho}$) de (25 ml:5g), enquanto que as 4 experiências finais utilizou-se uma proporção de (10 ml:2 g). Houve esta mudança na proporção, para permitir uma melhor comparação deste método com os métodos espectrofotométricos.

Pela análise da tabela pode-se observar que a mudança da marca de alho implicou uma pequena variação nos valores de concentração de alicina, obtendo maior concentração no extracto do *alho a* do que no *alho b*.

Tabela 3.3 – Valores de concentração obtidos para todas as experiências do *Método PI*.

Extracto	Experiência	Ensaio	m_{alho} (g)	V_{PI} (ml)	t_r (alicina) (min)	A_{alicina}	t_r (PI) (min)	A_{PI}	C_{alicina} (mg _{alicina} / g _{alho hum})
<i>Alho a</i> [†]	1	1	5.0627	25	11.1830	2308.4720	21.1660	2811.1935	2.0445
		2			11.1330	1953.0000	20.9000	2361.7150	2.0598
		3			11.3160	2323.4600	21.6500	2836.3095	2.0396
	2	1	5.0638		17.3660	5230.3605	34.3000	5184.5220	2.5112
		2			17.2660	5114.9440	33.4330	5118.8830	2.4873
		3			17.2660	5653.0956	33.1830	5452.4365	2.5808
	3	1	5.0668		11.1660	3219.3200	21.3160	3476.5890	2.3037
		2			11.2000	3169.4275	21.3160	3372.6310	2.3379
		3			10.7000	3245.4520	19.0660	3482.6260	2.3183
<i>Alho b</i> [‡]	4	1	5.0276	10	10.8000	2414.5590	19.4660	3438.6640	1.7605
		2			10.8000	2474.6545	19.4500	3569.5180	1.7381
		3			10.7830	2440.6760	19.3160	3523.9440	1.7365
	5	1	2.0105		10.7000	2191.4460	19.2660	3420.0290	1.6069
		2			10.7330	2199.5005	19.3830	3313.7880	1.6646
		3			10.7000	2231.521	19.2000	3403.9325	1.6436
	6	1	2.0068		10.6660	1436.1610	18.9660	1728.6160	2.0874
		2			10.7000	1431.7775	19.0000	1723.1310	2.0876
		3			10.7160	1433.752	19.1000	1707.0595	2.1102
7	1	2,0322	10.7330	2831.4770	19.1830	4643.3070	1.5129		
	2		10.7330	2978.8885	19.1500	4274.2700	1.7291		
	3		10.7000	2777.372	18.9660	3838.2450	1.7953		
8	1	2.0141	10.8500	3235.8240	19.0830	3306.8610	2.4323		
	2		10.6830	3135.5725	18.8330	3578.1810	2.1782		
	3		10.7000	2945.577	18.9330	3333.2755	2.1966		

Como a concentração de alicina presente no alho depende do cultivo, localização da planta, condições de processamento, armazenamento e manipulação²⁵; era esperado que a mudança do tipo de alho implicasse uma variação nos valores da concentração de alicina.

A mudança na proporção não teve qualquer efeito para a variação da concentração, pois foi realizada uma experiência com *alho b* utilizando 5 g de alho para 25 ml de PI e os valores mantiveram-se semelhantes utilizando o mesmo tipo de alho mas para a outra proporção.

De modo a visualizar melhor os resultados obtidos foram determinadas as concentrações médias de alicina, bem como os seus desvios, apresentando-se na tabela 3.4. Os parâmetros estatísticos da tabela 3.4, são referentes á concentração de alicina em mg_{alicina}/g_{alho hum} da tabela 3.3.

[†] Alho do mercado.

[‡] Alho da marca “Ajo Montejano”.

Tabela 3.4 – Valores para a média de concentração de alicina, variância e desvio padrão no *Método PI*.

	<i>Alho a</i>	<i>Alho b</i>	Total
Média	2.2981	1.8853	2.0401
Variância	0.0439	0.0735	0.1017
Desvio Padrão	± 0.2095	± 0.2712	± 0.3189

Pelo *Método PI* obteve-se uma concentração de alicina média de 2.0 mg/g_{alho húm} ± 0.3189. O valor obtido encontra-se dentro de uma gama típica, como indica um estudo de 200 amostras com vários tipos de alho australiano²⁵, já referido na secção 1.5.1, em que a gama da concentração de alicina variou entre 0.5 até 9 mg/g_{alho húm}, tendo a maioria das amostras uma concentração entre 3 a 6 mg/g_{alho húm}.

3.3. Método INA

Este método é mais complexo que o método anterior e consiste em obter numa primeira etapa uma amostra padrão através da purificação da alicina em solução por SPE, para a representação de uma curva de calibração utilizando HPLC. Com a relação entre a concentração de alicina e a quantidade de alicina por unidade de área obtida pela curva de calibração, determina-se numa segunda etapa a concentração de alicina noutras amostras teste.

3.3.1. Reagentes

Os compostos utilizados foram: o metanol para a fase móvel, onde, os dados, cuidados de manuseamento e armazenamento se encontram no apêndice A. A fase móvel utilizada foi uma solução constituída por metanol e água ultra pura, numa proporção de 50:50.

Para a preparação da amostra padrão foi utilizado alho em pó da marca Margão enquanto que para a preparação das amostras teste foi utilizado alho roxo fresco da marca “Ajos Montejano” (*alho b*) e alho em pó da marca Margão (*alho c*).

3.3.2. Condições experimentais

Para todas as experiências, as análises por HPLC foram sujeitas às condições apresentadas na tabela 3.5.

Tabela 3.5 – Condições experimentais de todas as experiências do *Método INA*.

Condições experimentais	
Coluna	Gemini, C 18, 5 µm
Pré-coluna	C18
Enchimento	Sílica gel
Tamanho de partícula (µm)	5
Detector	UV a 240 nm
Fase móvel	Metanol:H ₂ O ultra pura (50:50)
Fluxo (ml/min)	0.75
Volume de injeção (µL)	100
Volume do <i>loop</i> (µL)	20
Tempo de análise (min)	15
Tempo de limpeza (min)	30

Para a leitura da absorvância a 240 e 254 nm, utilizou-se o espectrofotómetro UV-Visível com a característica *Jasco, V 530*; representado na figura 3.5. Na conversão da base em alho seco para base em alho húmido, através da secagem do alho, foi utilizado o analisador de humidade *Sartorius*, representado na figura 3.6.

3.3.3. Procedimento

1ª Parte

Preparação da amostra Padrão

Para a preparação da amostra padrão foi implementado o procedimento de acordo com o descrito em (Alonso et al, 2006). Colocou-se 1.2 g de alho em pó em 3 tubos cónicos e introduziu-se 30 ml de água ultra pura no tubo 1 da figura 3.9 e após uma forte agitação[§] com a mão durante 1 min, deixou-se de repouso durante 10 min. Retirou-se o sobrenadante com uma seringa filtrando-se a solução com filtros de seringa de poro 0.2 µm e colocou-se o filtrado no tubo 2, como ilustrado na figura 3.9.

De seguida agitou-se o tubo 2 também com a mão durante 1 min e deixou-se em repouso 10 min, retirando o sobrenadante filtrado para o tubo 3.

Após agitar também o tubo 3 durante 1 min e deixar em repouso durante 10 min filtrou-se o sobrenadante do tubo 3, sendo esta solução submetida a uma extracção de fase sólida para purificar a alicina em solução e eliminar o máximo de impurezas possível.



Figura 3.9 – Ilustração da preparação da amostra padrão no *Método INA*.

[§] A agitação efectuou-se com a mão na tampa do tubo, minimizando as trocas de calor da mão para a solução. A centrifugação não foi utilizada para a agitação, por transferir calor para a amostra.

Separação por SPE

Numa primeira fase é necessário um acondicionamento do cartucho de extracção que irá ser utilizado. Após a colocação do cartucho de extracção no *manifold* que se encontra ligado á bomba de sucção, como representado na figura 3.10, o acondicionamento consistiu na introdução de 6 ml de metanol seguido de 18 ml de fase móvel. Após a introdução do metanol, descartou-se até o menisco a um caudal de 1 gota/s. A regulação do caudal é através da manipulação de uma anilha do *manifold* em que a diminuição ou aumento do caudal, consiste em deixar entrar mais ou menos ar no vácuo, respectivamente. Depois deixou-se passar 3 volumes do cartucho de fase móvel (18 ml), sempre a um caudal de 1 gota/s. O acondicionamento introduzindo de metanol permite activar os centros para a extracção.

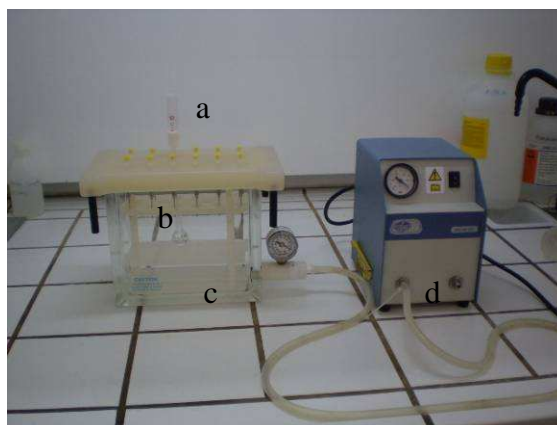


Figura 3.10 – Instalação experimental para a extracção por SPE; a) Cartucho de extracção, b) Balão volumétrico, c) *Manifold*, d) Bomba de sucção.

A separação por SPE consistiu na introdução de 1 ml da solução filtrada do tubo 3 no cartucho de extracção pré-acondicionado e deixou-se descartar até o menisco.

Numa segunda fase introduziu-se 5.2 ml de fase móvel e descartou-se permitindo o *washing*, a lavagem das impurezas por arraste.

Numa terceira fase introduziu-se 2.7 ml de fase móvel no cartucho de extracção até ao menisco e recolheu-se para um balão volumétrico de 5 ml com 1.5 ml de água ultra pura, estando previamente a uma temperatura de 4°C pelo menos durante 15 min.

No final perpez-se o volume do balão volumétrico com água ultra pura, armazenando-se a solução a uma temperatura de 4 °C. De seguida mediu-se a absorvância da solução final no espectrofotómetro para o comprimento de onda de 240 e 254 nm utilizando uma cuvete de quartzo de 1 cm.

Para a solução padrão ser válida teve-se em conta os critérios de aceitabilidade referidos na secção 1.5.2. De modo a clarificar o procedimento apresenta-se a figura 3.11 e 3.12.

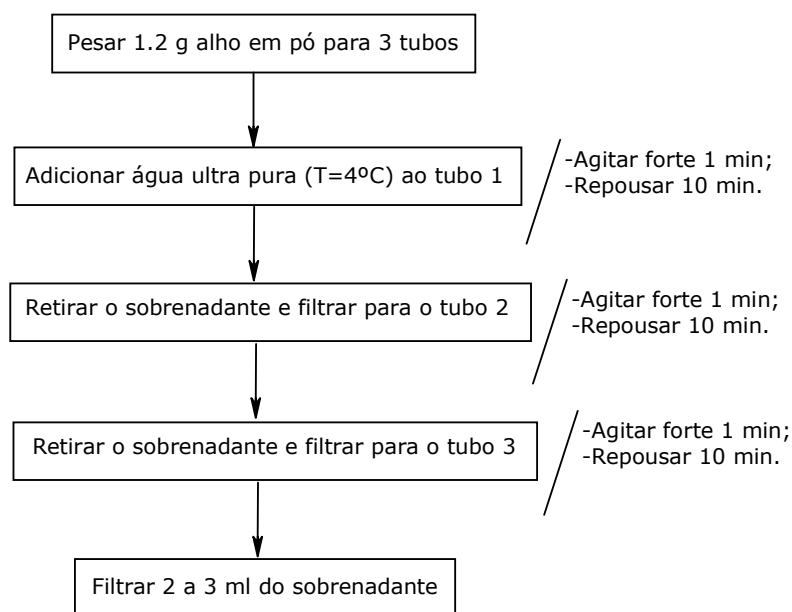


Figura 3.11 – Esquematização da preparação da amostra padrão da 1ª parte do *Método INA*.

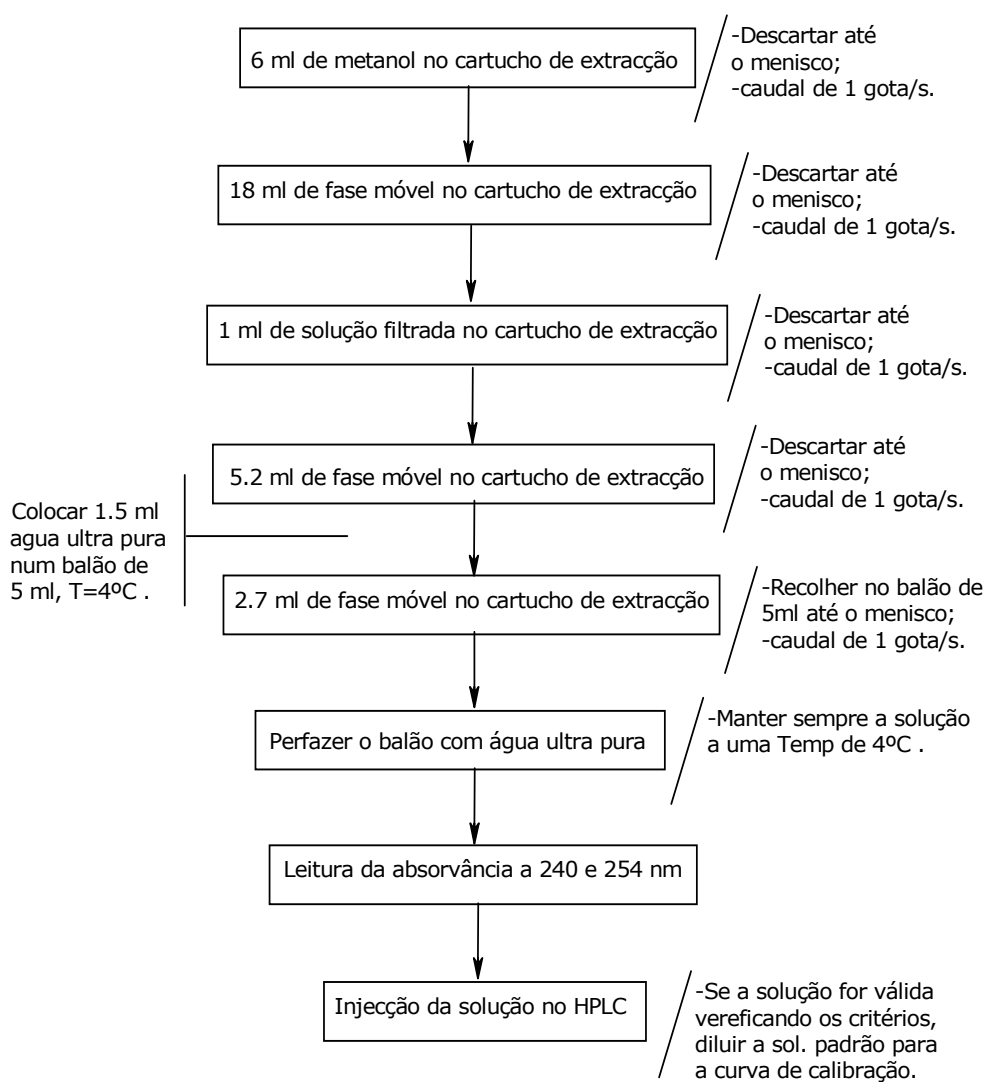


Figura 3.12 – Esquematização da separação da alicina das impurezas por SPE para o *Método INA*.

2ª Parte

Preparação de amostras com alho seco

Colocou-se 0.5 g de alho seco num tubo de 50 ml, e água ultra pura no frigorífico a uma temperatura de 4°C. Adicionou-se 25 ml de água ultra pura fria ao alho seco e agitou-se vigorosamente durante 1 min, para haver um bom contacto entre a água e o pó. Na agitação agarrou-se o tubo pela tampa com o cuidado de não transferir calor para a amostra, através das mãos. De seguida adicionou-se mais 25 ml de água ultra pura fria para diluir a amostra e filtrou-se a solução com um filtro de seringa de poro 0.20 µm, após ter ficado 15 min em repouso. Injectou-se a amostra no HPLC e com o cromatograma obtido retirou-se a quantidade de alicina por unidade de área.

Preparação de amostras com pasta de alho

Pesou-se 0.7 g da pasta de alho e adicionou-se 25 ml de água ultra pura fria á pasta de alho e agitando-se vigorosamente durante 1 min. Na agitação agarrou-se também o tubo pela tampa com o cuidado de não transferir calor para a amostra, através das mãos. De seguida adicionou-se mais 25 ml de água ultra pura fria para diluir a amostra e filtrou-se a solução com um filtro de seringa de poro 0.20 µm, após ter ficado 15 min em repouso. Injectou-se também a amostra no HPLC obtendo-se a quantidade de alicina por unidade de área.

3.3.4. Resultados e discussão

Para este método realizaram-se várias experiências, tentando em cada uma melhorar o rácio das absorvâncias, diminuir a percentagem de impurezas e otimizar a curva de calibração. Para uma boa curva de calibração o objectivo era a obtenção de um coeficiente de correlação, r^2 , igual ou superior a 0.999 e aumentar o máximo possível a concentração da solução padrão, aumentando assim a gama de concentrações da curva. De seguida apresenta-se os valores obtidos através do espectrofotómetro, na tabela 3.6.

Tabela 3.6 – Leitura das absorvâncias obtidas para a amostra padrão do *Método INA*.

	Abs	
	$\lambda = 240 \text{ nm}$	$\lambda = 254 \text{ nm}$
Branco**	0.0897	0.0557
Amostra	1.2875	0.8588

Injectando-se a amostra no HPLC obteve-se um cromatograma, com a área correspondente á quantidade de alicina introduzida, permitindo o cálculo da sua concentração. O cromatograma obtido apresenta-se no gráfico 3.13:

** Água ultra pura.

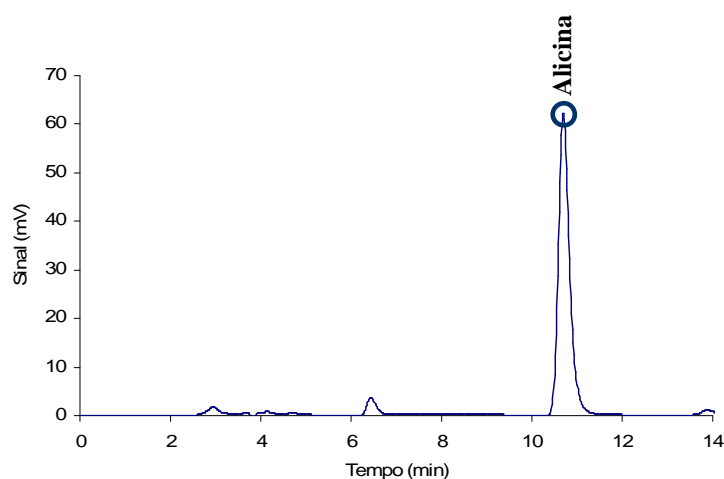


Figura 3.13 – Cromatograma do ensaio 1, experiência 1, do *Método INA*.

Os compostos conhecidos são apenas o metanol e a Alicina. Os restantes componentes são impurezas, que permitem a aceitação da amostra se estas existirem em solução numa quantidade inferior a 12%. Na tabela 3.7 apresenta-se os valores para o tempo de retenção e para as áreas de cada componente obtidos por HPLC.

Tabela 3.7 – Área e tempos de retenção para os componentes no *Método INA*.

Componente	t_r (min)	Área
Impureza	2.95	33.5185
Impureza	3.683	8.5545
Metanol	4.133	24.467
Impureza	6.433	50.557
Alicina	10.7	1096.3625
Impureza	13.883	26.276
total	-	1239.7355

O cálculo da concentração de alicina da solução padrão é efectuado com base no valor de absorvância a 240nm da tabela 3.6 e aplicando a equação 1.4, obtendo-se $88.5488 \mu\text{g}_{\text{Alicina}}/\text{ml}$, para a experiência 1.

Critérios de aceitação da amostra padrão

Mediante os valores obtidos de absorvância e percentagem de impurezas estabeleceu-se na tabela 3.8 a validade da solução, de acordo com o cumprimento ou incumprimento dos dois critérios exigidos, através da equação 1.2 e 1.3.

Tabela 3.8 – Critérios para a aceitação ou rejeição da amostra padrão no *Método INA*.

	Critério	Valores obtidos	Cumprimento dos critérios
R	$1.4 \leq \frac{Abs_{240}}{Abs_{254}} \leq 1.5$	1.4992	Cumpre
Imp (%)	$\frac{A_{total} - A_{\text{Alicina}} - A_{\text{Me tan ol}}}{A_{total}} \times 100 \leq 12$	9.5912	Cumpre

Como ambos os valores respeitam os critérios, a amostra padrão foi aceite para a construção da curva de calibração. Para a curva, diluiu-se a amostra com água ultra pura a uma temperatura de 4 °C criando amostras padrão a várias concentrações e injectando cada solução no HPLC para obter a quantidade de alicina por unidade de área. Foi obtida uma gama de concentrações entre 88.5488 e 11.1420 $\mu\text{g}_{\text{alicina}}/\text{ml}_{\text{sol}}$, estando representada a curva de calibração na figura 3.14.

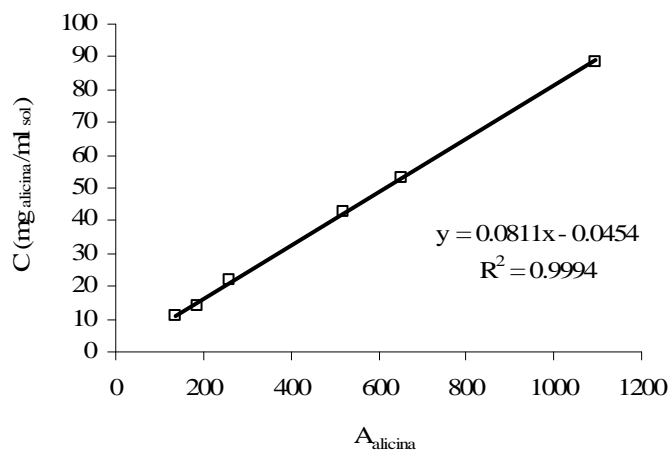


Figura 3.14 – Curva de calibração do padrão de alicina no *Método INA*.

A equação da curva de calibração pela qual se baseou a determinação da quantidade de alicina noutras amostras de alho corresponde á equação 1.9.

$$C_{\text{Alicina}} (\mu\text{g}_{\text{alicina}} / \text{ml}) = 0.0811 A_{\text{Alicina}} - 0.0454 \quad (1.9)$$

Onde, C_{Alicina} é a concentração de alicina e A_{alicina} é a quantidade de alicina por unidade de área do pico obtido no cromatograma.

Preparou-se amostras teste com pasta de alho e alho seco. Tomando como exemplo a experiência 1, foi utilizada uma massa de pasta de alho de 0.5041 g diluído em 50 ml de água ultra pura obteve-se uma área de 897.474, originando uma concentração de 66.7000 $\mu\text{g}_{\text{alicina}}/\text{ml}_{\text{sol}}$, aplicando a equação 1.9. Utilizando a quantidade de alho por solução, a concentração de alicina é cerca de 5.4 $\text{mg}_{\text{alicina}}/\text{g}_{\text{alho hum}}$.

Reprodutibilidade do método

Na tabela 3.9, apresentam-se os valores obtidos da área e concentração de alicina para cada experiência, de modo a comparar resultados obtidos pelo método e estudar a sua reprodutibilidade.

Tabela 3.9 – Valores da concentração de alicina para todas as experiências do *Método INA*.

Tipo de alho	Experiência	m_{alho} (g)	A_{alicina}	C_{alicina} ($\mu\text{g}_{\text{alicina}}/\text{ml}_{\text{sol}}$)	C_{alicina} ($\text{mg}_{\text{alicina}}/\text{g}_{\text{alho hum}}$)
<i>Alho b</i>	1	0.5041	897.4740	72.3311	5.4443
	2	0.5021	1092.4055	88.1401	6.6605
	3	0.5017	902.2135	72.7156	5.0544
<i>Alho c</i> ^{††}	4	0.7117	828.0390	66.7000	4.6860
	5	0.7174	967.0390	77.9729	5.4344
	6	0.7024	861.0390	69.3763	4.9385

Analisando a tabela 3.9 pode-se verificar que se obtém valores mais elevados utilizando o *alho c* do que utilizando o *alho b*.

Os valores da concentração de alicina para o *alho c* não são obtidos directamente, necessitando de uma conversão da base em alho seco ($\text{mg}_{\text{alicina}}/\text{g}_{\text{alho seco}}$) para base em alho húmido ($\text{mg}_{\text{alicina}}/\text{g}_{\text{alho hum}}$) com o objectivo da comparação de valores entre a pasta de alho e o alho em pó. Para tal foi utilizada uma conversão obtida experimentalmente, pesando-se um bolbo e secando-o no analisador de humidade *Sartorius* da figura 3.6, a uma temperatura de 130°C até evaporar toda a água. O resultado obtido indica que 3.952 g de alho húmido correspondem a 2.999 g de alho seco.

Esta conversão introduz erros na obtenção do valor de concentração de alicina no alho em pó, pois a percentagem contida no bolbo utilizado na secagem, pode ser diferente á percentagem contida nos bolbos utilizados na execução das experiências.

Os parâmetros estatísticos da tabela 3.10 são referentes á concentração de alicina em $\text{mg}_{\text{alicina}}/\text{g}_{\text{alho hum}}$ da tabela 3.9 para o *alho a* e *alho b*.

Tabela 3.10 – Valores para a média de concentração de alicina, variância e desvio padrão no *Método INA*.

	<i>Alho b</i>	<i>Alho c</i>	Total
Média	5.0196	5.7198	5.3697
Variância	0.1450	0.7019	0.4858
Desvio Padrão	± 0.3808	± 0.8378	± 0.6970

Pelo *Método INA* obteve-se uma concentração de alicina média para o *alho b* de $5.0 \text{ mg}_{\text{alicina}}/\text{g}_{\text{alho hum}} \pm 0.38$ e para o *alho c* de $5.7 \text{ mg}_{\text{alicina}}/\text{g}_{\text{alho hum}} \pm 0.84$ numa média global de $5.4 \text{ mg}_{\text{alicina}}/\text{g}_{\text{alho hum}} \pm 0.70$.

Estes valores de concentração são superiores aos obtidos pelo *Método PI* e também se encontram dentro da gama típica de valores esperados de concentração de alicina obtida no estudo realizado, já descrito na secção 1.5.1.

Comparando com os resultados obtidos para o mesmo método num estudo realizado no LSRE, abordado na secção 1.5.2, pode-se verificar que estes são bastante superiores, sendo obtido nesse estudo um valor máximo de $3.8 \text{ mg}/\text{g}_{\text{alho h m}} \cdot$

^{††} Alho em pó da marca Margão.

3.4. Método Cisteína

Este método espectrofotométrico consiste numa primeira etapa na reacção da cisteína com o DTNB formando NTB, para quantificar a cisteína. Numa segunda etapa faz-se reagir a cisteína com a alicina e o que não reagiu de cisteína reage com DTNB, lendo-se a absorvância do NTB formado. O decréscimo da absorvância do NTB formado da primeira para a segunda etapa indica a quantidade de alicina presente em solução.

3.4.1. Reagentes

Os compostos utilizados foram o DTNB, *Hepes*, L-cisteína e NaOH, onde, os dados, cuidados de manuseamento e armazenamento se encontram no apêndice A.

Preparação da solução tampão (*Hepes*), 50 mM, pH 7.5

Preparou-se uma solução de *Hepes* com uma concentração de 50 mM, tendo a solução um pH de aproximadamente 5.4 houve necessidade do seu acerto, como ilustrado na figura 3.15, Para elevar o pH da solução utilizou-se NaOH com uma concentração de 0.5 M; foram utilizadas outras concentrações para a solução de NaOH, mas este era o que permitia boa sensibilidade para o acerto e a adição de pouco volume, não se diluindo muito a solução de *Hepes*.



Figura 3.15 – Instalação experimental para o acerto do pH da solução de *Hepes* no Método Cisteína.

A solução de DTNB foi preparada utilizando como solvente a solução tampão de *Hepes* com 50 mM de concentração e um pH de 7.5.

Para a preparação das amostras foi utilizado alho roxo fresco da marca “Ajos Montejano” (*alho b*).

3.4.2. Condições experimentais

Para a leitura da absorvância foi utilizado o espectrofotómetro Jasco, V 530, UV–Visível; representado na figura 3.5. A temperatura a que decorreram as reacções foi a temperatura ambiente, sendo registada para cada experiência.

3.4.3. Procedimento

1ª Parte

Preparou-se uma solução de L-cisteína com uma concentração de 20 mM e adicionou-se 5 ml a 1ml de água destilada. Diluiu-se 1 ml desta solução em 100 ml de água destilada e colocou-se 4.5 ml desta solução num balão volumétrico de 5 ml perfazendo-se com solução de DTNB com uma concentração de 1.5 mM.

Após a junção da solução diluída com o DTNB deixou-se á temperatura ambiente durante 15 min. Após esse período leu-se a absorvância da solução para um comprimento de onda de 412 nm, correspondendo este valor a Abs_0 .

2ª Parte

Preparou-se uma pasta de alho, esmagando inicialmente no esmagador e triturando-se muito bem o alho no almofariz, durante 10 min, seguido de 2 min de trituração no ultra-turrax. Segundo descrito em ¹⁹, a proporção ($m_{\text{alho}}: V_{\text{Hepes}}$) a utilizar é de (1 g:5 ml), então pesou-se 2 g de pasta de alho e adicionou-se 10 ml de *Hepes*, deixando-se 10 min á temperatura ambiente para permitir uma conversão enzimática completa. De seguida filtrou-se a solução com papel de filtro e adicionou-se 1 ml desta solução a 5 ml de solução de cisteína, deixando-se 15 min á temperatura ambiente. De seguida diluiu-se 1 ml desta solução em 100 ml de água destilada, retirando-se 4.5 ml para um balão volumétrico de 5 ml e perfazendo-se com solução de DTNB, deixando-se á temperatura ambiente durante 15 min. Após o decorrer da reacção leu-se a sua absorvância para um comprimento de onda de 412 nm, correspondendo este valor a Abs_y .

De modo a clarificar o procedimento apresentam-se as figuras 3.16 e 3.17 para a 1ª e 2ª parte, respectivamente.

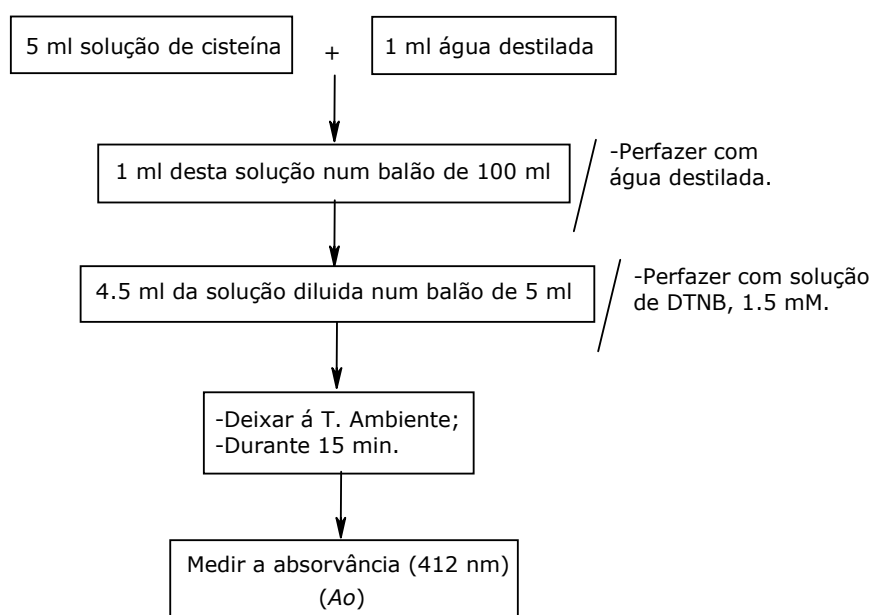


Figura 3.16 – Esquematização da 1ª parte do procedimento do método cisteína.

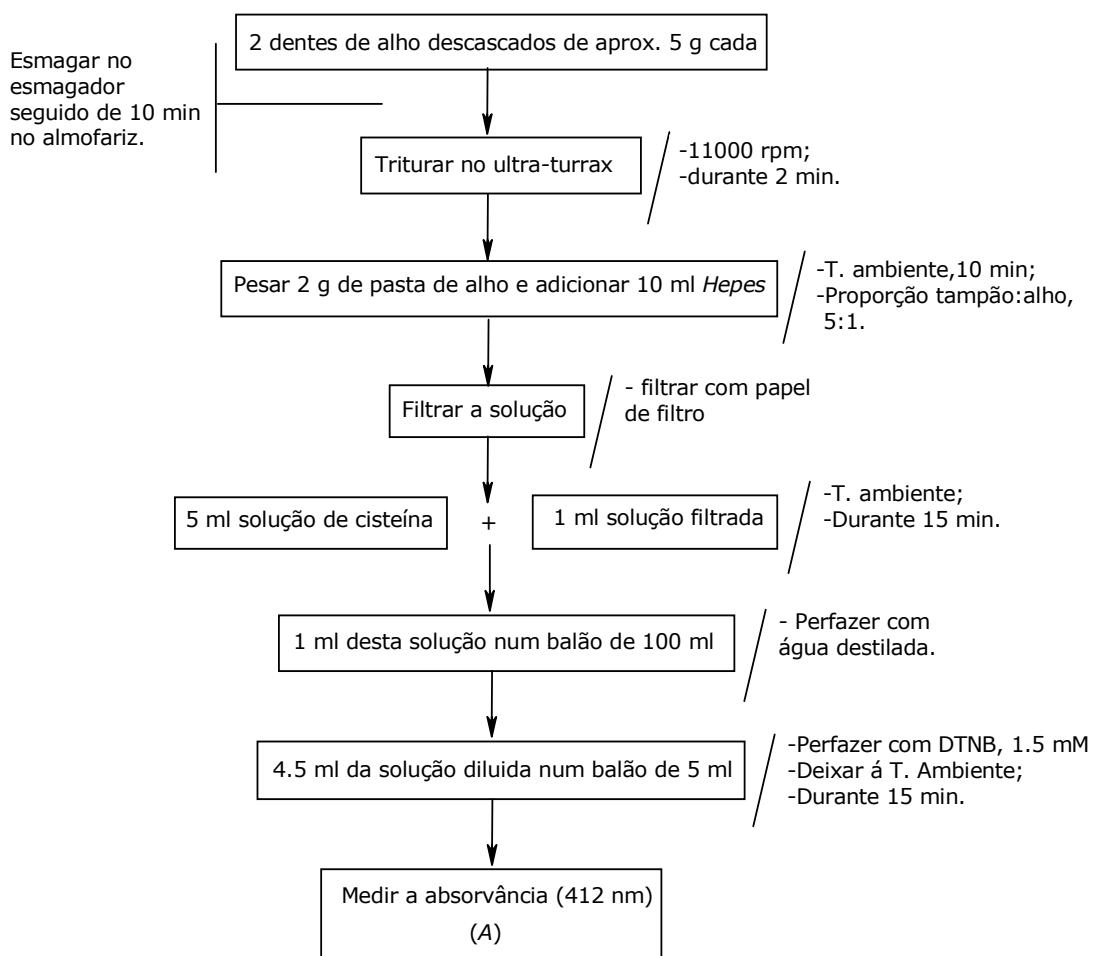


Figura 3.17 – Esquematização da 2ª parte do procedimento do *Método Cisteína*.

3.4.4. Resultados e discussão

Para este método o solvente utilizado na preparação da amostra e compostos, foi uma solução tampão com pH de 7.5, para diminuir a instabilidade da alicina. A adição de NaOH á solução tampão para o acerto do pH de 5.80 até 7.50 pode provocar reacções laterais ou a não ocorrência das reacções teoricamente esperadas e solução tampão ao ser básica implica também a facilidade da L-cisteína se converter em L-cistina.

Logo o facto do *HEPES* para uma concentração de 50 mM ter um pH ácido de aproximadamente 5.80 pode ser vantajoso, pois pode diminuir a conversão de L-cisteína em L-cistina, como explicado no apêndice B. Então, para além da aplicação do método para um pH de 7.5, aplicou-se também para um pH de 5.40, verificando a sua importância.

Para pH = 7.5

Após a leitura das absorvâncias obtidas na 1ª e 2ª parte, utilizando a solução tampão para um pH de 7.5, obtiveram-se os valores de 1.9141 e 1.4465, respectivamente, para a experiência 1. O cálculo da concentração de alicina efectuou-se com base nestes valores de absorvância e aplicando a equação 1.5 obteve-se $1.4841 \text{ mmol}_{\text{alicina}}/\text{ml}_{\text{sol}}$. Utilizando a quantidade de alho por solução de $2.0076 \text{ g}/10\text{ml}$ e a massa molecular da alicina de $162.2764 \text{ g}/\text{mol}$, a concentração de alicina no alho é cerca de $1.2 \text{ mg}_{\text{alicina}}/\text{g}_{\text{alho hum}}$.

Para pH = 5.80

Utilizando a solução tampão com um pH de 5.80, os valores de absorvância oscilavam bastante após os 15min de reacção. Então registou-se a absorvância ao longo do tempo até estabilizar, como se representa na figura 3.18 e 3.19 a evolução do valor de absorvância para a 1ª e 2ª etapa, respectivamente.

Após a estabilização de valores, a absorvância final foi de 0.4335 e 0.3636 na 1ª e 2ª parte, respectivamente, para a experiência 1. O cálculo da concentração de alicina efectuou-se com base nesses valores de absorvância e aplicando a equação 1.5 obteve-se $0.2470 \text{ mmol}_{\text{alicina}}/\text{ml}_{\text{sol}}$.

Utilizando a quantidade de alho por solução de $2.0036 \text{ g}_{\text{alho}}/10 \text{ ml}_{\text{sol}}$ e a massa molecular da alicina de 162.2764 g/mol a concentração de alicina é cerca de $0.2 \text{ mg}_{\text{alicina}}/\text{g}_{\text{alho hum}}$.

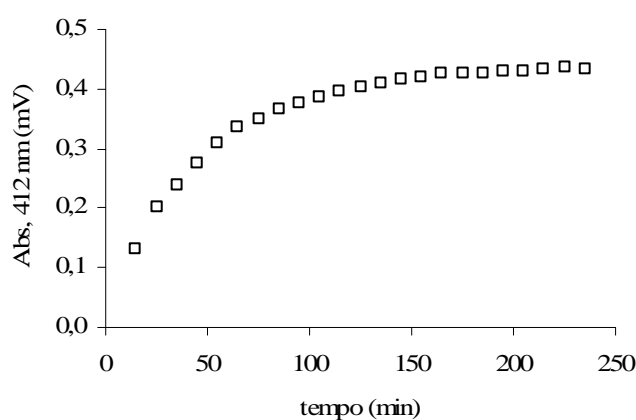


Figura 3.18 – Gráfico da evolução do valor de absorvância com o tempo, da 1ª parte da experiência 1 do *Método Cisteína*

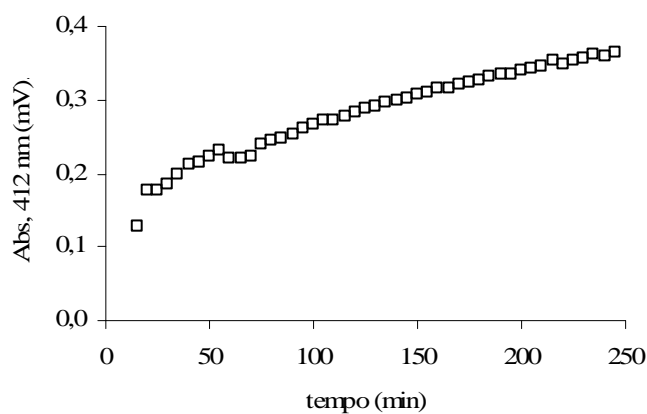


Figura 3.19 – Gráfico da evolução do valor de absorvância com o tempo, da 2ª parte da experiência 1 do *Método cisteína*.

Nas experiências realizadas utilizando a solução tampão com pH de 5.80 obteve-se em todas semelhante oscilação na absorvância, onde, se apresentam os valores obtidos na tabela 3.11.

Tabela 3.11 – Valores de concentração de alicina no *Método Cisteína*, para pH = 5.80.

Experiência	m_{alho} (g)	$T_{\text{Amb 1}^{\text{a}} \text{ parte}}$ (°C)	$T_{\text{Amb 2}^{\text{a}} \text{ parte}}$ (°C)	Abs_0	Abs_f	ΔAbs_{412}	C_{Alicina} (mM)	C_{Alicina} ($\text{mg}_{\text{alicina}}/\text{g}_{\text{alho hum.}}$)
1	2.0036	23.9	23.5	0.4335	0.3636	0.0699	0.2470	0.2000
2	2.0076	22.5	22.7	0.6437	0.5417	0.1020	0.3606	0.2914
3	2.0058	22.3	22.2	0.5672	0.4765	0.0907	0.3205	0.2593

Os valores de concentração obtidos utilizando esta solução tampão com este pH são mais baixos do que utilizando um pH de 7.5. Não se realizou mais experiências utilizando esta solução tampão porque como houve mais oscilação dos valores de absorvância, não é tão vantajoso, nem é objectivo deste estudo testar as diferentes formas de realizar cada método, mas sim a concordância dos valores de concentração de alicina através dos diferentes métodos. Esta oscilação indica que a solução tampão não estabiliza tão facilmente com um pH ácido do que com um pH básico, implicando que a reacção seja mais lenta. Logo, o estudo incidiu então na aplicação do método utilizando um pH de 7.5, como indicado no método.

Reprodutibilidade do método

Na tabela 3.12, apresentam-se os valores obtidos para as absorvâncias e concentração de alicina para cada experiência, utilizando a solução tampão com um pH de 7.5 de modo a comparar resultados obtidos pelo método e estudar a sua reprodutibilidade.

Tabela 3.12 – Valores de concentração de alicina no *Método 4MP*, para pH = 7.50.

Experiência	m_{alho} (g)	$T_{\text{Amb 1}^{\text{a}} \text{ parte}}$ (°C)	$T_{\text{Amb 2}^{\text{a}} \text{ parte}}$ (°C)	$Abs_{0,412}$ (mV)	Abs_f (mV)	ΔAbs_{412}	C_{Alicina} (mM)	C_{Alicina} ($\text{mg}_{\text{alicina}}/\text{g}_{\text{alho hum.}}$)
1	2.0076	22.2	22.3	1.9698	1.5498	0.4200	1.4841	1.1996
2	2.0063	23.4	23.9	1.7961	1.6554	0.1407	0.4972	0.4021
3	2.0063	23.0	22.3	1.7875	1.5754	0.2121	0.7495	0.6062
4	2.0064	22.2	22.3	2.2409	1.7108	0.5301	1.8731	1.5150
5	2.0079	22.3	22.3	1.8553	1.7139	0.1414	0.4996	0.4038
6	2.0623	22.2	22.3	1.9074	1.4785	0.4289	1.6522	1.2239

Pela análise da tabela 3.12, pode observar-se uma grande variabilidade entre os valores de concentração de alicina obtidos. Além disso, pelo *Método Cisteína* resultaram também concentrações negativas, as quais foram rejeitadas uma vez que não faziam sentido fisicamente. Devido aos factos relatados pode dizer-se que este método apresenta pouca consistência, evidenciando uma fraca reprodutibilidade.

A tabela 3.13 consolida o referido anteriormente, podendo-se observar a grande variância e desvio padrão para as concentrações obtidas no *Método Cisteína*. Os parâmetros estatísticos da tabela 3.12 são referentes á concentração de alicina em $\text{mg}_{\text{alicina}}/\text{g}_{\text{alho hum.}}$ da tabela 3.11 e 3.12.

Tabela 3.13 – Valores para a média de concentração de alicina, variância e desvio padrão do *Método Cisteína*.

	pH 5.80	pH 7.5
Média	0.2503	0.8918
Variância	0.0021	0.2306
Desvio Padrão	± 0.0464	± 0.4802

Pelo método cisteína obteve-se uma concentração de alicina média, utilizando uma solução tampão com pH 5.80, de $0.3 \text{ mg/g}_{\text{alho hum}} \pm 0.05$ e utilizando uma solução tampão com pH 7.5 de $0.9 \text{ mg/g}_{\text{alho hum}} \pm 0.48$.

3.5. Método 4MP

Este método espectrofotométrico é menos complexo que o método anterior pois envolve apenas uma reacção. Numa primeira etapa mede-se a absorvância do 4MP sem a presença de alicina. Numa segunda etapa faz-se reagir o 4MP com a alicina e mede-se a absorvância do 4MP que não reagiu. O decréscimo da absorvância do 4MP da primeira para a segunda etapa indica a quantidade de alicina presente em solução.

Este método só é credível para concentrações de alicina entre 10^{-6} e 10^{-5} M através de um método estático e entre 1.2×10^{-5} e 7.5×10^{-4} M através de um método cinético.

3.5.1. Reagentes

Os compostos utilizados foram o 4MP, o fosfato de sódio e o EDTA, onde, os dados, cuidados de manuseamento e armazenamento se encontram no apêndice A.

Preparação da solução tampão (Hepes A), 2 mM EDTA, 50 mM fosfato de sódio, pH 7.2

Preparou-se 250 ml de uma solução de EDTA com concentração de 4 mM e 250 ml de uma solução de fosfato de sódio com concentração de 100 mM, devido ao efeito de diluição, juntando-se ambas as soluções. Na preparação da solução de EDTA houve dificuldade da sua dissolução em água ultra pura, devido ao valor da massa por ml ser maior do que o valor máximo de solubilidade^{‡‡}. Então para uma boa homogeneização deixou-se em agitação durante toda a noite cerca de 12 h, como se mostra na figura 3.20. Para uma experiência realizando 3 ensaios é necessário 1500 ml de solução de Hepes A, 500 ml para cada ensaio.



Figura 3.20 – Ilustração da agitação das soluções de Hepes A para o Método 4MP.

^{‡‡} A solubilidade do EDTA é de 0.5 mg/mL e a massa introduzida para a preparação de uma solução de 250 ml é de 1.1808mg/ml.

Como a solução de *Hepes A* para uma concentração de 2 mM de EDTA e 50 mM de fosfato de sódio tem um pH de aproximadamente 3.18, então fez-se um acerto de pH, onde, na figura 3.15 se encontra representada a instalação experimental. Para o acerto utilizou-se NaOH com uma concentração de 1 M, sendo este valor de concentração o que permitia uma boa sensibilidade para o acerto, e não era necessário a adição de grandes volume de NaOH.

A solução de 4MP para uma concentração de 0.1 mM preparou-se usando a solução de *Hepes A* como solvente. Para a preparação das amostras de pasta de alho foi utilizado alho roxo fresco da marca “Ajos Montejano” (*alho b*).

3.5.2. Condições experimentais

Para a leitura da absorvância foi utilizado o espectrofotômetro Jasco, V 530, UV–Visível; representado na figura 3.5. A temperatura a que decorreu a reacção em cada experiência **foi** a temperatura ambiente, sendo registada para cada experiência.

3.5.2. Procedimento

1ª Parte

Preparou-se uma solução de 100 ml de 4MP com concentração de 0.1 mM e mediu-se a absorvância para um λ de 324 nm, correspondendo este valor a Abs_0 . Agitou-se muito bem a solução antes da leitura da absorvância.

2ª Parte

Preparou-se a pasta de alho, esmagando-se 1 dente de alho e triturando-se uma pequena quantidade no almofariz, durante 10 min. De seguida pesou-se 0.1352 g de pasta de alho e colocou-se em 500 ml de *Hepes*, deixando-se a solução em agitação durante 10 min á temperatura ambiente, para permitir uma conversão enzimática completa. Esta proporção foi determinada através de um estudo para o rácio ($m_{\text{alho}}/V_{\text{Hepes}}$), de forma á concentração final de alicina estar dentro dos limites impostos pelo método, como descrito no apêndice C.

De seguida filtrou-se a solução com papel de filtro e retirou-se 0.02 ml desta solução juntando-se a 0.98 ml de solução de 4MP, de modo a obter 1 ml de solução reactiva. Após 30 min de reacção leu-se o valor da absorvância para um λ de 324 nm, correspondendo este valor a Abs_f .

De modo a clarificar o procedimento apresenta-se o esquema 3.21 e 3.22 da 1ª e 2ª parte, respectivamente.

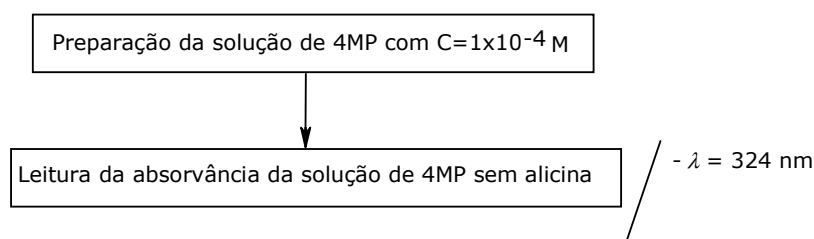


Figura 3.21 – Esquematização da 1ª parte do procedimento do Método 4MP.

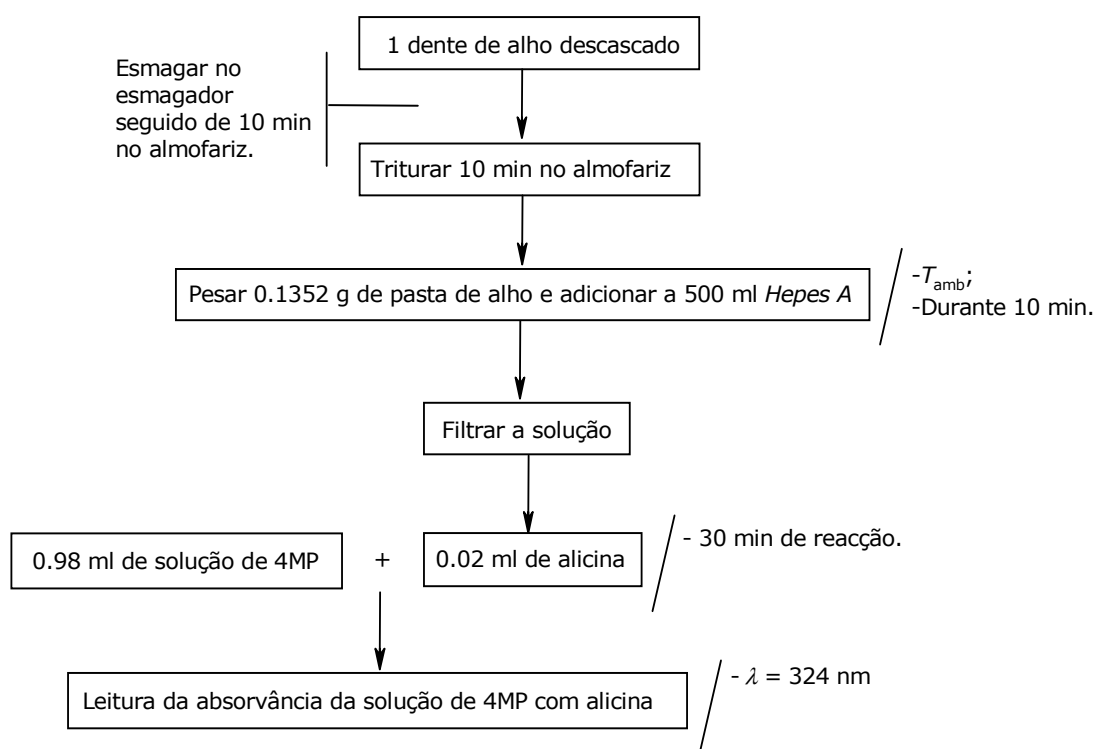


Figura 3.22 – Esquematização da 2ª parte do procedimento do Método 4MP.

3.5.3. Resultados e discussão

Registando a leitura das absorvâncias da 1ª e 2ª parte calculou-se os valores da concentração de alicina utilizando a equação 1.6, obtendo-se os valores apresentados na tabela 3.14.

Tabela 3.14 – Valores obtidos para a concentração na aplicação do Método 4MP.

Experiência	Ensaio	$T_{Amb, 1^{ª} parte}$ (°C)	$T_{Amb, 2^{ª} parte}$ (°C)	m_{alho} (g)	C_{4MP} (M)	Abs_0 (mV)	Abs_f (mV)	ΔAbs_{324}	$C_{alicina}$ (mol/L)	$C_{alicina}$ (mg _{alicina} /g _{alho hum})
1	1	23	22.7				2.1591	0.0955	2.41E-06	2.8808
	2	22.5	22.5	0.1358		2.2546	2.1730	0.0816	2.06E-06	2.4634
	3	23.5	23				2.1834	0.0712	1.80E-06	2.1485
2	1	24.3	24.2				2.1714	0.0832	2.10E-06	2.5116
	2	25	24.6	0.1358	10^{-4}	2.2546	2.1696	0.0850	2.15E-06	2.5660
	3	24	24.1				2.1561	0.0985	2.49E-06	2.9713
3	1	23	23.1				2.3401	0.0688	1.74E-06	2.0761
	2	22.5	22.5	0.1358		2.4089	2.3199	0.0890	2.25E-06	2.6847
	3	22	22.2				2.3222	0.0867	2.19E-06	2.6152

Através da tabela 3.14 pode-se verificar que existe uma pequena variação entre os valores de concentração de alicina podendo esta dever-se a vários factores externos que podem influenciar a quantidade de alicina. Os factores da temperatura ambiente, trituração e agitação são factores minimamente controláveis, mas um pequeno desvio pode originar grandes variações na concentração final, neste e nos restantes métodos.

Os parâmetros estatísticos da tabela 3.15 são referentes á concentração de alicina em $\text{mg}_{\text{alicina}}/\text{g}_{\text{alho hum}}$ da tabela 3.14.

Tabela 3.15 – Valores para a concentração média de alicina, variância e desvio padrão do *Método 4MP*.

	<i>Alho b</i>
Média	2.5464
Variância	0.0880
Desvio Padrão	± 0.2967

Pelo *Método 4MP* obteve-se uma concentração de alicina média de $2.5 \text{ mg}_{\text{alicina}}/\text{g}_{\text{alho hum}} \pm 0.30$. Este valor médio tem uma aproximação ao valor médio obtido pelo *Método PI*, sendo esta de $2.0 \text{ mg}_{\text{alicina}}/\text{g}_{\text{alho hum}} \pm 0.32$. Na figura 3.23 apresenta-se a comparação entre os valores obtidos pelo *Método PI* e pelo *Método 4MP*, observando-se alguns valores obtidos bastante próximos.

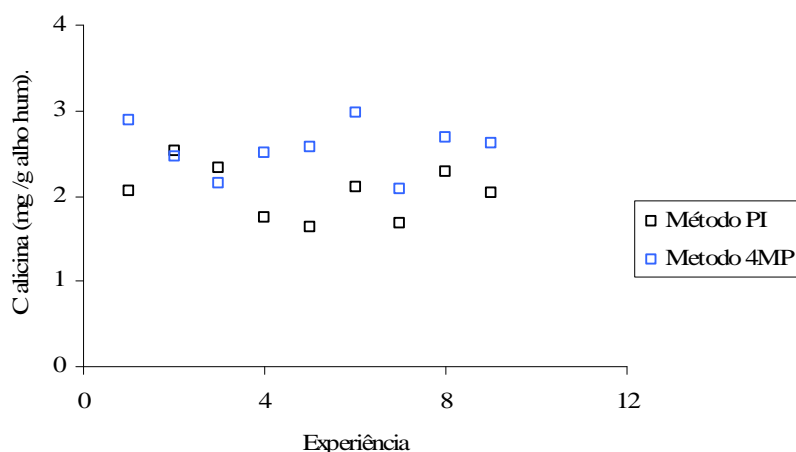


Figura 3.23 – Gráfico comparativo dos valores da concentração de alicina médios para o *Método PI* e para o *Método 4MP*.

4. Conclusões

Através da aplicação experimental dos quatro métodos em estudo pode-se concluir que existe uma variação entre os valores da concentração média de alicina obtida para cada método. O valor de concentração média obtida corresponde a $2.0401 \text{ mg/g}_{\text{alho húm}} \pm 0.3189$ para o *Método PI*, $5.0196 \text{ mg/g}_{\text{alho húm}} \pm 0.3808$ para o *Método INA*, $0.8918 \text{ mg/g}_{\text{alho húm}} \pm 0.4802$ para o *Método Cisteína* e $2.5464 \text{ mg/g}_{\text{alho húm}} \pm 0.2967$ para o *Método 4MP*.

Utilizando o *Método INA* obteve-se o valor mais elevado da concentração de alicina nas amostras de alho. No entanto este método seria mais rigoroso e mais eficaz se fossem utilizados padrões de alicina pura, em vez da utilização da extracção de soluções aquosas de alho em pó, por SPE.

Pelo *Método Cisteína* foram obtidos valores bastante baixos em comparação com os restantes métodos, havendo também uma grande oscilação de valores dentro do próprio método e experiências com concentração de alicina negativa, não sendo estas contabilizadas por não terem significado lógico. Pode-se então concluir que este método além de mais complexo em relação aos restantes; é mais frágil a factores externos e menos reprodutível o que leva a depositar menos credibilidade neste método.

Contudo foram obtidos valores para a concentração de alicina bastante semelhantes entre dois métodos: o *Método PI* e o *Método 4MP*. Esta convergência de valores entre dois métodos permite concluir que dos métodos cromatográficos já estudados anteriormente no LSRE/IPB, o *Método PI* poderá ser o qual fornece dados da concentração de alicina mais próximo da contida numa determinada massa de alho.

Como conclusão final a determinação do teor de alicina em alho é bastante sensível e não muito precisa, pois depende de vários factores externos como a temperatura, maturação do alho, tempo que decorre nas várias etapas, agitação das soluções, volatilização da alicina e quantidade de alicina que varia entre os vários bolbos usados; por isso a dificuldade do seu estudo.

Apêndice A

Na tabela A.1.1 e A.1.2 apresentam-se os dados, estabilidade, cuidados de manuseamento e armazenamento a ter em conta para os compostos utilizados nas experiências realizadas.

Tabela A.1.1 – Dados e cuidados a ter em conta para os compostos utilizados.

Compostos	Formula Molecular	M (g/mol)	Pureza (%)	Solubilidade em água (25°C) (mg/ml)	Estabilidade	Cuidados de Manuseamento	Cuidados de Armazenamento
Metanol	CH ₃ OH	32.04	99.9	-	Estável sob as condições recomendadas de armazenamento.	Evitar contacto com a pele, olhos e inalação do vapor ou névoa. Manter afastado de qualquer fonte de ignição.	Guardar o recipiente hermeticamente fechado em lugar seco, fresco, bem ventilado e direito para evitar dispersão.
p-hidrixibenzoato de etilo,	HOC ₆ H ₄ CO ₂ C ₂ H ₅	166.18	99	Solúvel	Estável. Evitar: agentes oxidantes fortes bases fortes.	Não respirar a poeira. Evitar o contato com olhos, pele e vestimentas e exposição prolongada ou repetida.	Manter hermeticamente fechado.
L-cisteína	C ₃ H ₇ NO ₂ S	121.16	97	280	Em contacto com oxigénio, soluções aquosas neutras ou alcalinas, converte-se em L-cistina.	Não respirar a poeira, evitando exposição prolongada. Evitar contacto com os olhos, pele e vestimenta.	Manter hermeticamente fechado.
Ácido 5,5'-Ditiobis(2-nitrobenzoico)(DTNB)	[SC ₆ H ₃ (NO ₂)CO ₂ H] ₂	396.35	99	Solúvel	Estável sob as condições recomendadas de armazenamento.	Evitar contacto com os olhos e pele. Evitar formação de pó e aerossóis, utilizando ventilação adequada.	Manter hermeticamente fechado num local fresco, seco, escuro e bem ventilado.
Hepes	C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S	238.31	99.5	100	Estável sob as condições recomendadas de armazenamento.	Utilizar ventilação adequada, quando se formarem poeiras.	Manter hermeticamente fechado; num local fresco, seco e bem ventilado.

Tabela A.1.2 – Continuação da tabela anterior.

Compostos	Formula Molecular	M (g/mol)	Pureza (%)	Solubilidade em água (25°C) (mg/ml)	Estabilidade	Cuidados de Manuseamento	Cuidados de Armazenamento
4-Mercaptopiridina	C ₅ H ₅ NS	111.16	95	Solúvel	Estável. Evitar agentes oxidantes fortes e bases.	Evitar contacto com os olhos, pele e vestimenta.	Manter hermeticamente fechado. Armazenar entre 2 e 8 °C.
Ácido Etilenodiamino-tetracético (EDTA)	(HO ₂ CCH ₂) ₂ NCH ₂ CH ₂ N(CH ₂ CO ₂ H) ₂	292.2	99	0.5	Estável. Evitar agentes oxidantes fortes.	Não respirar a poeira, evitando exposição prolongada e contacto com os olhos, pele e vestimenta.	Manter hermeticamente fechado; num local fresco, seco e bem ventilado.
Fosfato de Sódio Monobásico	NaH ₂ PO ₄	119.98	99	Solúvel	Estável sob as condições recomendadas de armazenamento.	Utilizar ventilação adequada, quando se formarem poeiras. Higroscópio.	Manter hermeticamente fechado; num local seco, fresco e bem ventilado.
Hidróxido de sódio	NaOH	40	98	1,09E+03	Estável sob as condições recomendadas de armazenamento. Evitar agentes oxidantes fortes, ácidos fortes e materiais orgânicos	Armazenar em local fresco. Guardar o recipiente hermeticamente fechado em lugar seco e bem ventilado.	Evitar a formação de pó e aerossóis. Providenciar uma adequada ventilação em locais onde se formem poeiras.

Apêndice B

No *Método Cisteína* um factor importante a ter em conta é que a L-cisteína sofre oxidação na presença de ar ou em solução aquosa neutra e alcalina convertendo-se em L-cistina²⁶, como se indica na figura B.1. e B.2.

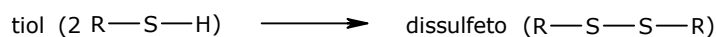


Figura B.1 – Representação geral da oxidação de um tiol na presença de ar convertendo-se num dissulfeto.

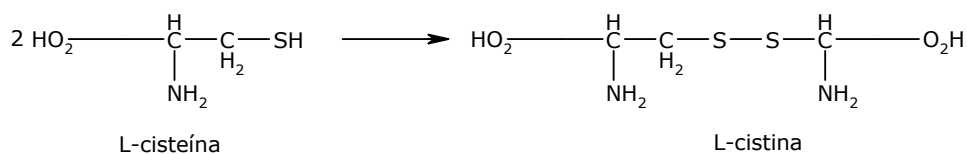


Figura B.2 – Representação da oxidação da L-cisteína (tiol) convertendo-se em L-cistina (dissulfeto).

Então o facto de se utilizar um pH de 7.50, como indica no método, pode facilitar a conversão de L-cisteína em L-cistina, não sendo esse o objectivo, será necessário a preparação da solução de cisteína no próprio dia para cada experiência e ter cuidado para não deixar em exposição ao ar.

Apêndice C

Como o *Método 4MP* utilizado é válido para concentrações de alicina entre 10^{-6} e 10^{-5} mol/L, através da equação C.1 foi calculado o rácio máximo entre a massa de alho e o volume de solução ($m_{\text{alho}}/V_{\text{Hepes}}$), isto é, a quantidade máxima de alho por litro de solução, para que, supondo uma concentração teórica de alicina no alho numa gama típica, a concentração de alicina em solução não ultrapasse os 10^{-5} mol/L. Os valores obtidos apresentam-se na tabela C.1.

$$C_{\text{alicina}} (\text{mol} / \text{L}) = \frac{C_{\text{alicina}} (\text{mg} / \text{g}_{\text{alho}})}{M_{\text{alicina}} \times 10^3 (\text{mg} / \text{mol})} \text{rácio} (\text{g}_{\text{alho}} / \text{L}_{\text{Hepes}})$$

$$\text{rácio} (\text{g}_{\text{alho}} / \text{L}_{\text{Hepes}}) = \frac{10^{-2} M_{\text{alicina}}}{C_{\text{alicina}} (\text{mg} / \text{g}_{\text{alho}})} \quad (\text{C.1})$$

Tabela C.1 – Valores máximos do rácio ($m_{\text{alho}}/V_{\text{Hepes}}$) para várias concentrações teóricas de alicina no alho.

$C_{\text{alicina}} \text{ teórica}$ ($\text{mg}_{\text{alicina}}/\text{g}_{\text{alho hum}}$)	Rácio ($\text{mg}_{\text{alho}}/\text{L}_{\text{Hepes}}$)	$C_{\text{alicina}} \text{ teórica}$ ($\text{mg}_{\text{alicina}}/\text{g}_{\text{alho hum}}$)	Rácio ($\text{mg}_{\text{alho}}/\text{L}_{\text{Hepes}}$)
0.3	5.4092	4.8	0.3381
0.6	2.7046	5.1	0.3182
0.9	1.8031	5.4	0.3005
1.2	1.3523	5.7	0.2847
1.5	1.0818	6	0.2705
1.8	0.9015	6.3	0.2576
2.1	0.7727	6.6	0.2459
2.4	0.6762	6.9	0.2352
2.7	0.6010	7.2	0.2254
3	0.5409	7.5	0.2164
3.3	0.4917	7.8	0.2080
3.6	0.4508	8.1	0.2003
3.9	0.4161	8.4	0.1932
4.2	0.3864	8.7	0.1865
4.5	0.3606	9	0.1803

De modo a escolher o rácio mais razoável, determinou-se para cada um a concentração de alicina em solução que teria, dependendo da quantidade de alicina que poderia estar contida no alho. Como o método impõe que a concentração de alicina varie entre 10^{-6} e 10^{-5} mol/L em solução, obteve-se um intervalo de valores da concentração de alicina no alho para o qual o método é válido, estando os valores representados na tabela B.2.

Os valores a cinza saem fora da gama de concentração estipulada pelo método, pelo que convém escolher um rácio não muito pequeno e que abrangesse uma boa parte das concentrações de alicina que poderá estar contida no alho.

Quanto maior for a quantidade de alicina contida no alho, menor será a massa de alho a pesar numa solução de modo a ter uma concentração de alicina em solução dentro dos limites necessários, menor então será o rácio.

Para um rácio menor, as possibilidades para a quantidade de alicina no alho aumentam; como se pode verificar na tabela C.2, foi utilizado do menor ao maior rácio obtendo um intervalo válido para a quantidade de alicina no alho do maior ao menor, respectivamente.

Tabela C.2 – Valores de concentração de alicina em solução para cada rácio, dependendo da quantidade de alicina contida no alho.

$C_{\text{alicina teórica}}$ ($\text{mg}_{\text{alicina}}/\text{g}_{\text{alho}}$)	$\text{Rácio (mg}_{\text{alho}}/V_{\text{Hepes}})$										
	0.1803	0.1932	0.2080	0.2254	0.2459	0.2705	0.3005	0.3381	0.3864	0.4508	0.5409
	$\text{Concentração (mol}_{\text{alicina}}/L_{\text{Hepes}})$										
0,3	3.33E-07	3.57E-07	3.85E-07	4.17E-07	4.55E-07	5.00E-07	5.56E-07	6.25E-07	7.14E-07	8.33E-07	1.00E-06
0,6	6.67E-07	7.14E-07	7.69E-07	8.33E-07	9.09E-07	1.00E-06	1.11E-06	1.25E-06	1.43E-06	1.67E-06	2.00E-06
0,9	1.00E-06	1.07E-06	1.15E-06	1.25E-06	1.36E-06	1.50E-06	1.67E-06	1.88E-06	2.14E-06	2.50E-06	3.00E-06
1,2	1.33E-06	1.43E-06	1.54E-06	1.67E-06	1.82E-06	2.00E-06	2.22E-06	2.50E-06	2.86E-06	3.33E-06	4.00E-06
1,5	1.67E-06	1.79E-06	1.92E-06	2.08E-06	2.27E-06	2.50E-06	2.78E-06	3.13E-06	3.57E-06	4.17E-06	5.00E-06
1,8	2.00E-06	2.14E-06	2.31E-06	2.50E-06	2.73E-06	3.00E-06	3.33E-06	3.75E-06	4.29E-06	5.00E-06	6.00E-06
2,1	2.33E-06	2.50E-06	2.69E-06	2.92E-06	3.18E-06	3.50E-06	3.89E-06	4.38E-06	5.00E-06	5.83E-06	7.00E-06
2,4	2.67E-06	2.86E-06	3.08E-06	3.33E-06	3.64E-06	4.00E-06	4.44E-06	5.00E-06	5.71E-06	6.67E-06	8.00E-06
2,7	3.00E-06	3.21E-06	3.46E-06	3.75E-06	4.09E-06	4.50E-06	5.00E-06	5.63E-06	6.43E-06	7.50E-06	9.00E-06
3	3.33E-06	3.57E-06	3.85E-06	4.17E-06	4.55E-06	5.00E-06	5.56E-06	6.25E-06	7.14E-06	8.33E-06	1.00E-05
3,3	3.67E-06	3.93E-06	4.23E-06	4.58E-06	5.00E-06	5.50E-06	6.11E-06	6.88E-06	7.86E-06	9.17E-06	1.10E-05
3,6	4.00E-06	4.29E-06	4.62E-06	5.00E-06	5.45E-06	6.00E-06	6.67E-06	7.50E-06	8.57E-06	1.00E-05	1.20E-05
3,9	4.33E-06	4.64E-06	5.00E-06	5.42E-06	5.91E-06	6.50E-06	7.22E-06	8.13E-06	9.29E-06	1.08E-05	1.30E-05
4,2	4.67E-06	5.00E-06	5.38E-06	5.83E-06	6.36E-06	7.00E-06	7.78E-06	8.75E-06	1.00E-05	1.17E-05	1.40E-05
4,5	5.00E-06	5.36E-06	5.77E-06	6.25E-06	6.82E-06	7.50E-06	8.33E-06	9.38E-06	1.07E-05	1.25E-05	1.50E-05
4,8	5.33E-06	5.71E-06	6.15E-06	6.67E-06	7.27E-06	8.00E-06	8.89E-06	1.00E-05	1.14E-05	1.33E-05	1.60E-05
5,1	5.67E-06	6.07E-06	6.54E-06	7.08E-06	7.73E-06	8.50E-06	9.44E-06	1.06E-05	1.21E-05	1.42E-05	1.70E-05
5,4	6.00E-06	6.43E-06	6.92E-06	7.50E-06	8.18E-06	9.00E-06	1.00E-05	1.13E-05	1.29E-05	1.50E-05	1.80E-05
5,7	6.33E-06	6.79E-06	7.31E-06	7.92E-06	8.64E-06	9.50E-06	1.06E-05	1.19E-05	1.36E-05	1.58E-05	1.90E-05
6	6.67E-06	7.14E-06	7.69E-06	8.33E-06	9.09E-06	1.00E-05	1.11E-05	1.25E-05	1.43E-05	1.67E-05	2.00E-05
6,3	7.00E-06	7.50E-06	8.08E-06	8.75E-06	9.55E-06	1.05E-05	1.17E-05	1.31E-05	1.50E-05	1.75E-05	2.10E-05
6,6	7.33E-06	7.86E-06	8.46E-06	9.17E-06	1.00E-05	1.10E-05	1.22E-05	1.38E-05	1.57E-05	1.83E-05	2.20E-05
6,9	7.67E-06	8.21E-06	8.85E-06	9.58E-06	1.05E-05	1.15E-05	1.28E-05	1.44E-05	1.64E-05	1.92E-05	2.30E-05
7,2	8.00E-06	8.57E-06	9.23E-06	1.00E-05	1.09E-05	1.20E-05	1.33E-05	1.50E-05	1.71E-05	2.00E-05	2.40E-05
7,5	8.33E-06	8.93E-06	9.62E-06	1.04E-05	1.14E-05	1.25E-05	1.39E-05	1.56E-05	1.79E-05	2.08E-05	2.50E-05
7,8	8.67E-06	9.29E-06	1.00E-05	1.08E-05	1.18E-05	1.30E-05	1.44E-05	1.63E-05	1.86E-05	2.17E-05	2.60E-05
8,1	9.00E-06	9.64E-06	1.04E-05	1.13E-05	1.23E-05	1.35E-05	1.50E-05	1.69E-05	1.93E-05	2.25E-05	2.70E-05
8,4	9.33E-06	1.00E-05	1.08E-05	1.17E-05	1.27E-05	1.40E-05	1.56E-05	1.75E-05	2.00E-05	2.33E-05	2.80E-05
8,7	9.67E-06	1.04E-05	1.12E-05	1.21E-05	1.32E-05	1.45E-05	1.61E-05	1.81E-05	2.07E-05	2.42E-05	2.90E-05
9	1.00E-05	1.07E-05	1.15E-05	1.25E-05	1.36E-05	1.50E-05	1.67E-05	1.88E-05	2.14E-05	2.50E-05	3.00E-05

Para se tirar uma conclusão do melhor rácio, teve-se em conta a concentração máxima obtida em cada um dos restantes métodos em estudo, apresentadas na tabela C.3.

Tabela C.3 – Valores de concentração média obtidos para o *Método PI, INA e Cisteína*.

	<i>Método PI</i>	<i>Método INA</i>	<i>Método Cisteína</i>
C _{alicina} média (mg _{alicina} /g _{alho})	2.0401	5.0196	0.8981
Desvio padrão	± 0.3189	± 0.3808	± 0.4857
Rácio (g _{alho} /L _{Hepes})	0.6879	0.3005	1.1727

Como o valor de concentração média de alicina máximo foi cerca de 5.5 mg_{alicina}/g_{alho} e de mínimo 0.42 mg_{alicina}/g_{alho} então tentou-se escolher um rácio que incluísse ambos os extremos obtidos.

Mediante os intervalos da quantidade de alicina no alho válidos, o qual abrange o limite superior e mais se aproxima do inferior é utilizando um rácio de 0.2705, sendo este válido para concentrações de alicina de 0.6 a 6 mg_{alicina}/g_{alho}.

O intervalo maior anterior seria utilizando um rácio de 0.2459 mas era válido para concentrações de alicina de 0.9 a 6.6 mg_{alicina}/g_{alho} afastando-se mais do limite inferior.

De modo a incluir o limite inferior teria de se utilizar o rácio 0.5409, onde seria válido para concentrações de alicina de 0.3 a 3.3 mg_{alicina}/g_{alho} limitando muito mais a quantidade de alicina presente no alho, pois o intervalo é muito menor e não inclui o limite superior obtido. Como a concentração média mínima obtida adveio do método cisteína, sendo este método não muito reprodutível, não foi dada tanta importância ao limite inferior, sendo escolhido o rácio 0.2705 pois abrange quantidades de alicina em alho mais prováveis.

Bibliografia

- (1) Eagling, D.; Sterling, S. A cholesterol-lowering extract from Garlic. In *Rural Industries Research and Development Corporation*: Australia.
- (2) Allicin by High-Performance Liquid Chromatography INA Method 110.001; fonte: www.nsf.org/business/ina/garlic.asp?program=INA#revisions.
- (3) Han, J.; Lawson, L.; Han, G. A spectrophotometric method for quantitative determination of allicin and total garlic thiosulfinates. *Analytical Biochemistry* **1995**, *225*, 157–160.
- (4) Miron, T.; Shin, I.; Feigenblat, G.; Weiner, L.; Mirelman, D. et al. A Spectrophotometric assay for allicin, alliin, and alliinase (alliin lyase) with a chromogenic thiol: reaction of 4-mercaptopyridine with thiosulfinates. *Analytical Biochemistry* **2002**, *307*, 76–83.
- (5) Coppi, A.; Cabinian, M.; Mirelman, D.; Sinnis, P. Antimalarial activity of allicin, a biologically active compound from garlic cloves. *American Society for Microbiology* **2006**, *50*, 1731–1737.
- (6) Miron, T.; Bercovici, T.; Rabinkov, A.; Wilchek, M.; Mirelman, D. [³H] Allicin: preparation and applications. *Analytical Biochemistry* **2004**, *331*, 364–369.
- (7) Arnault, I.; Christidès, J. P.; Mandon, N.; Haffner, T.; Kahanec, R. et al. 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 Chromatography A* **2003**, *991*, 69–75.
- (8) Harunobu, A.; Brenda, L. P.; Hiromichi, M.; Shigeo, K.; Yoichi, I. Recent advances on the nutritional effects associated with the use of garlic as a supplement. *American Society for Nutritional Sciences* **2001**, 955–962.
- (9) Rabinkov, A.; Miron, T.; Konstantinovski, L.; Wilchek, M.; Mirelman, D. et al. The mode of action of allicin: trapping of radicals and interaction with thiol containing proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* **1998**, *1379*, 233–244.
- (10) Miron, T.; Rabinkov, A.; Mirelman, D.; Wilchek, L.; Weiner, M. The mode of action of allicin: its ready permeability through phospholipid membranes may contribute to its biological activity. *Biochimica et Biophysica Acta* **2000**, *1463*, 20–30.
- (11) Cavallito, C. J.; Bailey, J. H. *Am. Chem. Soc* **1944**, *66*, 1950–1951.

- (12) Ross, Z. M.; O’Gara, E. A.; Hill, D. J.; Sleightholme, H. V.; Maslin, D. J. Antimicrobial properties of garlic oil against human enteric bacteria: evaluation of methodologies and comparisons with garlic oil sulfides and garlic powder. *American Society for Microbiology* **2001**, *67*, 475–480.
- (13) O’Gara, E. A.; Hill, D. J.; Maslin, D. J. Activities of garlic oil, garlic powder, and their diallyl constituents against *Helicobacter Pylori*. *American Society for Microbiology* **2000**, *66*, 2269–2273.
- (14) Yin, M.; Cheng, W. Antioxidant and antimicrobial effects of four garlic-derived organosulfur compounds in ground beef. *Meat Science* **2003**, *63*, 23–28.
- (15) Roger, H.; Mino, C.; Nashia, S. Thiosulfinate Allicin from Garlic. *New York Academy of Sciences* **2005**, 234–241.
- (16) Junior, E. A. Estudo Clínico do Alho Fresco em Voluntários Sadios: Avaliação da Agregação Plaquetária in Vitro e in Vivo e Comportamento da Pressão Arterial através da MAPA in Vivo; Universidade Estadual de Campinas: Campinas, 2004.
- (17) Williams, D.; Pant, C. Process for the production of allicin; Neem Biothech Ltd: United States Patent, 2007.
- (18) Miron, T.; Rabinkov, A.; Mirelman, D.; Weiner, L.; Wilchek, M. A spectrophotometric assay for allicin and alliinase (alliin lyase) activity: reaction of 2-nitro-5-thiobenzoate with thiosulfates. *Analytical Biochemistry* **1998**, *307*, 317–325.
- (19) Lawson, L. D.; Wood, S. G.; Hughes, B. G. HPLC analysis of allicin and other thiosulfates in garlic clove homogenates. *Planta Med.* **1991**, *57*, 263–270.
- (20) Lanzotti, V. The analysis of onion and garlic (review). *Journal of Chromatography A* **2006**, *1112*, 3–22.
- (21) Farmacopeia, C. P. d. R. B. In *Diário Oficial da União*: Brasília, 2005; pp 1–80.
- (22) Eagling, D.; Sterling, S. A cholesterol-lowering extract from Garlic; Rural Industries Research and Development Corporation: Australia, 2000.
- (23) Alonso, S.; Pais, L. S.; Barreiro, F. F.; Silva, J. A. C. Determination of allicin (Diallyl Thiosulfate) in garlic (*Allium Sativum L.*) by High-Performance Liquid Chromatography; Laboratory of Separation and Reaction Engineering Polytechnic Institute of Bragança, 2006.

- (24) Li, Y.; Xu, S.; Sun, D. Preparation of garlic powder with high allicin content by using combined microwave–vacuum and vacuum drying as well as microencapsulation. *Journal of Food Engineering* **2007**, *83*, 76–83.
- (25) Sterling, S. J.; Eagling, D. R. Agronomics and allicin yield of Australian grown garlic (*Allium Sativum*). *Proceedings of the Second International Symposium on Edible Alliaceae* **2001**, 63–73.
- (26) Solomons, T. W. G. *Solomons Química Orgânica*; 6ª edição ed., 1996; 456.