

TRABAJO DE TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO
DE DOCTOR EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA

POTENCIAL BENÉFICO PARA LA
SALUD DE HORTALIZAS DE LA
REGIÓN CUYO. ANÁLISIS DE
COMPUESTOS BIOACTIVOS Y
EMPLEO DE HERRAMIENTAS
QUIMIOMÉTRICAS

LIC. DANIELA ANDREA RAMIREZ

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
Y NATURALES, UNIVERSIDAD
NACIONAL DE CUYO

- 2022 -



UNCUYO
UNIVERSIDAD
NACIONAL DE CUYO

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA

**“POTENCIAL BENÉFICO PARA LA SALUD DE
HORTALIZAS DE LA REGIÓN CUYO. ANÁLISIS DE
COMPUESTOS BIOACTIVOS Y EMPLEO DE
HERRAMIENTAS QUIMIOMÉTRICAS”**

Tesista: DANIELA ANDREA RAMIREZ

Directora: Dra. Alejandra Camargo

Co-Directora: Dra. Jorgelina Altamirano

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CUYO

- Mendoza, 2022

Agradecimientos

A todos los que hicieron posible la realización del presente trabajo de Tesis,

- ~ A mi hijo Ignacio y mi pareja Patxi, por toda la paciencia, ayuda y por enseñarme las verdaderas cosas importantes de la vida.
- ~ A mi familia, Eduardo, Norma y Adrián, a quienes debo todo, por su amor, paciencia y apoyo incondicional a lo largo de toda mi vida. Sin ellos ninguno de mis logros sería posible.
- ~ A mis amigos por su cariño, incansable apoyo, consejos y paciencia, a lo largo de toda mi carrera y mi vida.
- ~ A mi directora de Tesis, Dra. Alejandra B. Camargo, quien me supo guiar desde el primer día con dedicación, cariño y amabilidad, ayudándome a crecer tanto a nivel académico como personal, brindando siempre su ayuda y consejos, por lo cual estaré eternamente agradecida.
- ~ A mi co-directora, Dra. Jorgelina C. Altamirano, por su colaboración, orientación y ayuda en momentos claves.
- ~ Al Dr. Juan María Luco, de la Universidad Nacional de San Luis, un agradecimiento especial por su enseñanza, generosidad y sabiduría brindada, aún en tiempos de pandemia y con distancia de por medio.
- ~ A todos mis colegas y compañeros de laboratorio a lo largo de estos años, por su constante colaboración y compañerismo, por su cariño y principalmente por su amistad incondicional.
- ~ A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Cuyo por la formación profesional recibida, y a la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cuyo, una mención especial por darme el espacio y los recursos para llevar a cabo mi trabajo diario.

Resumen

Las tendencias actuales de consumo, demandan un abordaje comprensivo e integral de los alimentos funcionales y/o productos nutraceuticos para dar validez científica a las afirmaciones sobre las propiedades benéficas para la salud asociadas a los mismos. A la hora de buscar fuentes naturales altamente bioactivas, el ajo se destaca de otras hortalizas debido a que asociado a su ingesta pueden enumerarse importantes propiedades biológicas. Además existe un interés comercial, y de valor agregado de los productos a base de ajo en nuestra región, lo que determina que esta especie sea el objeto de estudio en la presente tesis.

Un estudio pormenorizado de productos con compuestos bioactivos, debe incluir tanto la caracterización físico-química de las matrices alimentarias o nutraceuticas, así como también estudios de biodisponibilidad, que determinen el destino fisiológico de los compuestos bioactivos en el organismo. Siguiendo estos preceptos en cuanto a la visión de estudiar al ajo y su sub-productos desde una perspectiva comprensiva e integral, en un primer abordaje, en el presente Trabajo de Tesis, se comenzó con la determinación de los componentes que aportan los atributos de calidad y bioeficacia a dichos productos.

Tradicionalmente se ha medido una familia particular de fitoquímicos, ya sean los compuestos organoazufrados, flavonoides o inulina, considerando cada grupo de manera individual. A diferencia de lo anterior, en la presente Tesis se propuso evaluar la calidad funcional de los productos a base de ajo integrando en una misma metodología analítica la determinación de fitoquímicos de diferentes familias químicas. En este apartado, en primer lugar se optimizaron las variables instrumentales y las variables de la etapa de preparación de la muestra. Aquí resultaron útiles los modelos multivariados de superficie de respuesta que permitieron llegar a las condiciones óptimas de extracción, (tiempo de ultrasonido de 16 minutos, adicionando 0,22 mL de metanol a las muestras y a un pH de 6,33); y a su vez mediante estos diseños experimentales se logró resolver en una misma corrida cromatográfica los flavonoles e hidratos de carbono de interés. Luego se procedió a la combinación de diferentes técnicas analíticas, tales como Extracción Asistida por Ultrasonido (UAE) y Microextracción Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME), centrifugaciones y separación de fracciones, acopladas a Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) con detección de Arreglo de Diodos. Esto con el fin de determinar los compuestos organoazufrados (OSCs), alicina, E-Z-ajoeno, 2-vinil-4-H-1,3-ditiina, y dialil sulfuro; los flavonoles, miricetina, quercetina y campferol; y el fructano de características prebióticas, inulina. La evaluación de la performance del método desarrollado analizando las figuras analíticas de mérito, mostró que la metodología aquí propuesta resultó ser robusta y confiable. Se obtuvo una adecuada linealidad en el rango de concentraciones estudiado, una alta selectividad para los analitos de interés, valores de repetibilidad apropiados y recuperaciones cuantitativas aceptables. Finalmente,

la aplicación del método analítico mostró ser confiable sobre distintos tipos de muestras. La extracción y determinación de OSCs, flavonoles e inulina fue posible aún incluso en presencia de matrices complejas, con diferente composición y estados.

Por otra parte, la mera presencia de los compuestos bioactivos en las fuentes vegetales o galénicas, no es suficiente para garantizar que las propiedades biológicas que se les atribuyen logren verificarse. Para hablar acabadamente de los efectos biológicos de los fitoquímicos debe considerarse la capacidad de los mismos de sortear las barreras biológicas propias del proceso gastrointestinal una vez ingeridos. Aquí, la permeabilidad intestinal es clave en la disposición final de compuestos para alcanzar sus sitios target en el organismo. En el caso del ajo, existen estudios biológicos que dan información primaria sobre el pasaje de compuestos organoazufrados, pero resta aún esclarecerse información mecanística acerca de las interacciones compuestos-membranas celulares. En esta línea, se propuso el desarrollo y evaluación de modelos *in vitro-in silico* apoyados en Cromatografía basada en Columnas de Membranas Artificiales Inmovilizadas (IAM), respaldada por el uso de métodos estadísticos como los Estudios de Relación Estructura - Actividad Cuantitativos (QSAR), para replicar los procesos biológicos implicados en la permeabilidad de compuestos organoazufrados, y a su vez dilucidar los mecanismos moleculares y celulares que están involucrados en dichos procesos.

En esta instancia, los factores de capacidad cromatográfica ($\log k'$) para 28 compuestos organoazufrados se determinaron mediante IAM-HPLC. En paralelo, se calcularon diferentes descriptores moleculares para caracterizar a los analitos bajo estudio. Seguido, con el fin de estudiar la capacidad de la fase IAM sobre la lipofilicidad de los OSCs, se derivaron varias Relaciones Cuantitativas Estructura-Retención (QSRR) a partir de la exploración de interacciones intermoleculares fundamentales que gobiernan la retención de compuestos. Las propiedades hidrofóbicas resultaron de primordial importancia para la retención de estos compuestos en fase IAM. A su vez, la flexibilidad molecular y varios descriptores electrónicos (carga negativa relativa, RNCG y electronegatividad de Mulliken), demostraron tener un rol importante en las interacciones polares específicas. También se investigó la capacidad de la fase IAM para evaluar varios parámetros ADME de los OSCs de interés, utilizando datos *in silico* (SwissADME y preADMET web servers). La absorción gastrointestinal humana (HIA), la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BBB) y la permeabilidad en piel se investigaron mediante modelos QSAR, utilizando varios enfoques quimiométricos.

A partir del conjunto de la información resultante de estas estrategias metodológicas se logró aportar información a cuestionamientos de larga data que están relacionados con la forma y cantidad apropiada de consumo de esta hortaliza y sus preparaciones, o de las dosis efectivas de los productos nutraceuticos, para asegurar la bioeficacia de los fitoquímicos a largo plazo en la prevención de enfermedades crónicas.

Summary

Current trends demand a full and comprehensive approach of functional foods and / or nutraceutical products to scientifically validate their "*health-claims*". When considering highly bioactive natural sources, garlic stands out from other vegetables because associated with its intake, important biological properties can be listed. There is also a commercial interest of garlic-based products in our region, which justify this vegetable as the object of study in this Thesis. A detailed study of products healthy products must include both, the food or nutraceutical physico-chemical characterization, as well as bioavailability studies, to determine the physiological fate of the bioactive compounds within the body. Following these guidelines, this Thesis work began with the determination of those components that contribute to the quality attributes and bioefficacy of garlic preparations.

Traditionally, a particular phytochemical family has been measured, whether they were the organosulfur compounds, flavonoids or inulin, considering each group individually and separately. Unlike the above, in the present study, the functional quality of garlic-based products was evaluated, integrating in the same analytical methodology multiple phytochemicals determination from different chemical families. To do so, first, the instrumental and sample prep working conditions were optimized. Here, multivariate response surface models were useful. They allowed reaching the optimal extraction conditions (16 minutes of ultrasound extraction time, adding 0.22 mL of methanol to the samples, at a pH of 6.33); in turn, by using these multivariate experimental designs, target flavanols and carbohydrates were resolved in a same chromatographic run. Then we proceeded to combine different analytical techniques, such as Ultrasound Assisted Extraction (UAE) and Dispersive Liquid-Liquid Microextraction (DLLME), as well as centrifugations and fractions' separations, coupled to High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with Diode Array Detector. This in order to determine the organosulfur compounds, allicin, E-Z-ajoene, 2-vinyl-3-dithiin, and diallyl sulfide; the flavanols, myricetin, quercetin and campferol; and inulin, a fructan with prebiotics properties. The analytical figures of merit showed the method performance, which turned out to be robust and reliable. Adequate linearity was obtained in the concentrations' range studied, a high selectivity for the analytes of interest, appropriate repeatability values, and acceptable quantitative recoveries. Finally, the application of the analytical method proved to be reliable on different types of samples. The extraction and determination of OSCs, flavanols and inulin was still possible even in the presence of complex matrices, with different composition and states.

On another note, the mere presence of bioactive compounds in vegetable or galenic sources is not enough to guarantee that their biological properties can be verified. To fully discuss the phytochemicals' biological

effects, it is necessary to address their ability to overcome the biological barriers of the gastrointestinal process once ingested. In this regard, intestinal permeability is key in the final disposition of compounds to reach their target sites in the body. If we focus on garlic, there are biological studies that provide primary information on the organosulfur compounds absorption, but mechanistic information about compound-cell membrane interactions remains to be clarified. In this line, the development and evaluation of *in vitro-in silico* models based on Immobilized Artificial Membrane (IAM) Chromatography was proposed, supported by the use of statistical methods such as Quantitative Structure-Activity Relationship Studies (QSAR). This, to replicate the biological processes involved in the permeability of organosulfur compounds, and in turn to elucidate the molecular and cellular mechanisms implied in these processes.

In this instance, the chromatographic capacity factors ($\log k'(IAM)$) for 28 organosulfur compounds were determined by IAM-HPLC. In parallel, different molecular descriptors were calculated to characterize the analytes under study. Next, in order to evaluate the ability of the IAM phase in assessing lipophilicity of the compounds under study, several Quantitative Structure-Retention Relationships (QSRR) were derived from exploring fundamental intermolecular interactions that govern the retention of OSCs on the IAM phases. The hydrophobic factors were of prime importance for the IAM-retention of these compounds. The molecular flexibility and specific polar interactions expressed by several electronic descriptors (relative negative charge, RNCG, and Mulliken electronegativity) were also involved. The ability of the IAM phase to evaluate several ADME parameters was also studied using *in silico* data (SwissADME and preADMET web servers). The human gastrointestinal absorption (HIA), blood-brain barrier (BBB) permeation and skin permeability were investigated through QSAR modeling, using several chemometrics approaches.

The information resulting from these methodological strategies, serve to provide an approximation to long-standing questions in terms to the appropriate intake form and amount of these vegetables, and their preparations, as well as the effective doses of nutraceutical products, to ensure long-term the bioefficacy of phytochemicals in preventing chronic diseases.

Publicaciones

El desarrollo de este Trabajo de Tesis Doctoral culminó en la publicación de dos artículos científicos en revistas con referato y de prestigio internacional:

Ramirez, D.; Altamirano, J.; Camargo, A. “*Multi-phytochemical determination of polar and non-polar garlic bioactive compounds in different food and nutraceutical preparations.*” *Food Chemistry*. (2021). Volume 337, 127648, ISSN 0308-8146, (doi: 10.1016/j.foodchem.2020.127648).

Ramirez, D. A.; Federici, M. F.; Altamirano, J. C.; Camargo, A. B.; Luco, J. M. “*Permeability Data of Organosulfur Garlic Compounds Estimated by Immobilized Artificial Membrane Chromatography: Correlation Across Several Biological Barriers*”. *Frontiers in Chemistry*. (2021) (doi: 10.3389/fchem.2021.690707).

A su vez, las técnicas introducidas en el capítulo II, dieron sustento a otros Trabajos colaborativos, también relacionados con el estudio de los alimentos funcionales y de la biodisponibilidad de compuestos bioactivos:

Torres-Palazzolo, C; **Ramírez, D.;** Beretta, V.; Camargo, A. “*Matrix effect on phytochemical bioaccessibility. The case of organosulfur compounds in garlic preparations*”. *LWT* (2021) 136 (1) (doi: 10.1016/j.lwt.2020.110301)

Ramirez, D.; Abellán-Victorio, A.; Beretta, V.; Camargo, A.; Moreno, D.A. “*Functional Ingredients From Brassicaceae Species: Overview and Perspectives*”. *Int. J. Mol. Sci.* (2020), 21, 1998. (doi: 10.3390/ijms21061998)

Ramirez, D.; Marchevsky, E.; Luco, J.M.; Camargo, A. “*Quantitative structure-activity relationship to elucidate human CYP2A6 inhibition by organosulfur compounds*”. *ADMET & DMPK. IAPChem* (2019) 196-209; (doi: 10.5599/admet.678)

Fusari, C.; **Ramirez, D.;** Camargo, A. “*Simplified analytical methodology for glucosinolates hydrolysis products: Miniaturized extraction technique and multivariate optimization*”. *ANALYTICAL METHODS*. England: RSC. (2019) (doi: 10.1039/c8ay02442a)

Torres Palazzolo, C., **Ramirez, D.**, Locatelli, D., Manucha, W., Castro, C., & Camargo, A. “*Bioaccessibility and permeability of bioactive compounds in raw and cooked garlic*”. *Journal of Food Composition and Analysis*, (2018). 70(March), 49–53. (doi: 10.1016/j.jfca.2018.03.008)

Índice

Agradecimientos.....	iii
Resumen	iv
Summary.....	vi
Publicaciones.....	viii
Índice de Tablas.....	xiv
Índice de Figuras.....	xvi
Lista de abreviaturas	xviii
INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	1
I.1. ALIMENTOS FUNCIONALES	1
I.1.1. Fitoquímicos	2
I.1.2. El género <i>Allium</i> y sus aspectos benéficos para la salud.....	4
I.1.2.1. Origen e Historia	5
I.1.2.2. Consumo a nivel regional.....	6
I.1.2.3. Composición Química y Compuestos Bioactivos del Ajo	7
I.1.2.3.1. <i>Compuestos Organoazufrados</i>	8
I.1.2.3.2. <i>Compuestos Fenólicos</i>	10
I.1.2.3.3. <i>Fructanos (inulina)</i>	12
I.1.2.4. Preparaciones Gastronómicas y Productos Nutracéuticos a base de ajo.....	14
I.1.2.5. Propiedades biológicas asociadas al ajo y sus preparaciones.....	16
I.2. ABORDAJE DEL ESTUDIO DE ALIMENTOS FUNCIONALES DESDE UNA PERSPECTIVA BIOLÓGICA-ANALÍTICA.....	17
I.2.1. ASPECTOS ANALÍTICOS RELACIONADOS CON LA DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS	17
I.2.1.1. Técnicas de Preparación de Muestras.....	18
I.2.1.1.1. <i>Técnicas de extracción tradicionales</i>	18
I.2.1.1.2. <i>Técnicas modernas de extracción</i>	19
I.2.1.2. Técnicas de Separación e Identificación de analitos en alimentos	22
I.2.1.2.1. Principios básicos de Cromatografía.....	22
I.2.1.2.2. Cromatografía Líquida de Alta Performance aplicada a la determinación de compuestos bioactivos	23
I.2.1.2.2.1. Fases estacionarias y modos de elución	23

I.2.1.2.2.2. Detectores.....	24
I.2.1.3. Metodologías analíticas empleadas para la determinación de compuestos bioactivos presentes en ajo y productos a base de ajo	25
I.2.2. CINÉTICA EN EL ORGANISMO HUMANO DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS PRESENTES EN PRODUCTOS A BASE DE AJO.....	27
I.2.2.1. Biodisponibilidad de compuestos bioactivos y propiedades LADME.....	27
I.2.2.2. Antecedentes acerca de la biodisponibilidad de compuestos bioactivos de productos a base de ajo	29
I.2.2.3. Importancia de la permeabilidad de los compuestos en los estudios de biodisponibilidad ...	31
I.2.2.3.1. Estructura de las membranas celulares.....	31
I.2.2.3.2. Mecanismos de permeación.....	32
I.2.2.3.2.1. Difusión Pasiva	33
I.2.2.4. Modelos experimentales para estudiar la permeabilidad	34
I.2.2.5. Antecedentes de la permeabilidad de compuestos bioactivos del ajo y sus productos.....	36
I.2.3. QSAR: RELACIONES CUANTITATIVAS DE ESTRUCTURA-ACTIVIDAD	37
I.2.3.1. Fundamentos y Objetivos de los modelos QSAR	37
I.2.3.2. Componentes y metodología de los estudios QSAR	39
I.2.3.3. Modelos QSAR para estudiar propiedades LADME.....	41
I.2.3.4. Cromatografía Biomimética basada en membranas artificiales y modelos QSAR.....	42
I.3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	44
I.4. HIPÓTESIS.....	47
I.5. OBJETIVOS.....	47
- Objetivo General:	47
- Objetivos Específicos:	47
METODOLOGÍA ANALÍTICA MULTI-FITOQUÍMICA PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN DIFERENTES PRODUCTOS A BASE DE AJO.....	48
II.1. INTRODUCCIÓN.....	49
II.2. OBJETIVOS.....	51
II.3. DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA.....	51
II.3.1. MATERIALES Y MÉTODOS.....	53
II.3.1.1. Reactivos, Estándares Analíticos y Solventes.....	53
II.3.1.2. Muestras	54
II.3.1.2.1. Muestras de Ajo	54
II.3.1.3. Preparación de muestras y fraccionamiento de analitos.....	55
II.3.1.3.1. Preparación de muestras blanco.....	55

II.3.1.3.2.	<i>Procedimiento de Microextracción Líquido-Líquido Dispersiva para determinación de OSCs</i>	56
II.3.1.4.	Condiciones cromatográficas.....	57
II.3.1.5.	Procedimiento de trabajo para el desarrollo de la metodología analítica	58
II.3.1.5.1.	<i>Optimización de las condiciones cromatográficas para la separación de flavonoles e hidratos de carbono.</i>	58
II.3.1.5.2.	<i>Optimización de las condiciones de extracción</i>	58
II.3.1.6.	Software estadístico.....	59
II.3.2.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	59
II.3.2.1.	Optimización de las condiciones cromatográficas para flavonoles e hidratos de carbono.....	59
II.3.2.2.	Optimización de las condiciones de extracción	64
II.4.	CIFRAS ANALÍTICAS DE MÉRITO DE LA METODOLOGÍA PROPUESTA	68
II.4.1.	IDENTIFICACIÓN DE LOS ANALITOS Y ESPECIFICIDAD	68
II.4.1.1.	Materiales y Métodos	69
II.4.1.1.1.	Metodología de Trabajo.....	69
II.4.1.1.2.	<i>Preparación de solución a partir de estándares de referencia</i>	69
II.4.1.1.3.	<i>Preparación de la muestra blanco para el estudio de la especificidad</i>	70
II.4.1.2.	Resultados y Discusión.....	70
II.4.2.	CONSTRUCCIÓN DE CURVAS DE CALIBRACIÓN Y DETERMINACIÓN DEL RANGO LINEAL.....	71
II.4.2.1.	Materiales y Métodos	71
II.4.2.1.1.	Metodología de Trabajo.....	71
II.4.2.2.	Resultados y Discusión.....	72
II.4.3.	DETERMINACIÓN DEL LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	74
II.4.3.1.	Materiales y Métodos	74
II.4.3.1.1.	Metodología de Trabajo.....	74
II.4.3.2.	Resultados y Discusión.....	75
II.4.4.	DETERMINACIÓN DE LA REPETIBILIDAD.....	76
II.4.4.1.	Materiales y Métodos	76
II.4.4.1.1.	Metodología de Trabajo.....	76
II.4.4.2.	Resultados y Discusión.....	77
II.4.5.	DETERMINACIÓN DE RECUPERACIONES CUANTITATIVAS	79
II.4.5.1.	Materiales y Métodos	79
II.4.5.1.1.	Metodología de Trabajo.....	79
II.4.5.2.	Resultados y Discusión.....	80

II.5. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE DIFERENTES PRODUCTOS DE AJO EN RELACIÓN A SU CONTENIDO DE FITOQUÍMICOS. ESTUDIO COMPARATIVO DE SU POTENCIAL NUTRACÉUTICO GLOBAL.....	83
II.5.1. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE PRODUCTOS A BASE DE AJO	84
II.5.1.1. Materiales y Métodos	84
II.5.1.1.1. Muestras	84
II.5.1.1.2. Muestras de Ajo	84
II.5.1.2. Preparación de muestras y fraccionamiento de analitos.....	85
II.5.1.2.1. Preparación de muestras de diferentes productos a base de ajo	85
II.5.1.3. Resultados y Discusión	85
II.6. CONCLUSIONES CAPÍTULO II	93
ESTUDIOS <i>IN SÍLICO</i> DE RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD CUANTITATIVOS (QSAR) ACERCA DE LA BIODISPONIBILIDAD DE COMPUESTOS ORGANOAZUFRADOS	94
III.1. INTRODUCCIÓN.....	95
III.2. OBJETIVOS.....	96
III.3. EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES OPERACIONALES CROMATOGRÁFICAS BASADA EN EL USO DE COLUMNAS DE MEMBRANAS ARTIFICIALES INMOBILIZADAS	96
III.3.1. MATERIALES Y MÉTODOS.....	98
III.3.1.1. Reactivos, Estándares y Solventes	98
III.3.1.2. Instrumentación y Condiciones Cromatográficas	99
III.3.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	100
III.4. MODELADO Y CÁLCULO <i>IN SÍLICO</i> DE PARÁMETROS ESTRUCTURALES ASOCIADOS A LAS MOLÉCULAS DE OSCs	104
III.4.1. MATERIALES Y MÉTODOS.....	109
III.4.1.1. Organoazufrados estudiados, modelado de las estructuras moleculares y optimización conformacional	109
III.4.1.2. Cálculo de descriptores moleculares	109
III.4.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	110
III.5. EVALUACIÓN DE LA LIPOFILICIDAD DE LOS OSCs Y MODELADO QSRR PARA EVALUAR LAS INTERACCIONES IAM-OSCs.....	114
III.5.1. MATERIALES Y MÉTODOS.....	119
III.5.1.1. Métodos estadísticos y programas empleados	120
III.5.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	120
III.5.2.1. Determinación de la lipofilicidad de los OSC mediante IAM y parámetros fisicoquímicos ...	120
III.5.2.2. Modelos QSRR para evaluar las interacciones de los OSC con la fase IAM	123
III.6. MODELOS QSAR PARA EVALUAR PARÁMETROS DE PERMEABILIDAD DE LOS OSCs EN ESTUDIO .	127

III.6.1.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	128
III.6.1.1.	Descriptores moleculares y datos ADME.....	128
III.6.1.2.	Métodos estadísticos y programas empleados	129
III.6.2.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	129
III.6.2.1.	Capacidad de la fase IAM para evaluar la Absorción Intestinal Humana (HIA%) de los OSCs	129
III.6.2.2.	Modelado QSAR para evaluar la permeación en la barrera hematoencefálica (BBB) de los OSCs	134
III.6.2.3.	Evaluación de la capacidad de la fase IAM en la permeación en piel de los OSCs.....	136
III.7.	CONCLUSIONES CAPÍTULO III.....	140
	CONCLUSIONES GENERALES	142
	BIBLIOGRAFÍA	147
	ANEXOS	162
VI.1.	SECCIÓN A: DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS ORGANOAZUFRADOS EN MUESTRAS DE AJO MEDIANTE MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA ACOPLADA A HPLC-UV	163
VI.2.	SECCIÓN B: ESPECTROS EN EL RANGO ULTRAVIOLETA-VISIBLE DE LOS COMPUESTOS ORGANOAZUFRADOS Y COMPUESTOS FENÓLICOS ANALIZADOS.....	168
VI.3.	SECCIÓN C: ESTUDIO DE REPORTES ACERCA DE LOS EFECTOS BIOLÓGICOS ASOCIADOS A DIFERENTES PREPARACIONES Y COMPUESTOS DEL AJO.....	174
VI.4.	SECCIÓN D: ESTUDIO DE LA BIOACCESIBILIDAD DE COMPUESTOS ORGANOAZUFRADOS DERIVADOS DEL AJO Y SUS PREPARACIONES.....	177
VI.5.	SECCIÓN E: FUNDAMENTO Y CÁLCULO DE DESCRIPTORES TOPOLÓGICOS	184
VI.6.	SECCIÓN F: DOMINIO DE APLICABILIDAD DE LOS MODELOS Y DATOS DE ABSORCIÓN INTESTINAL HUMANA (HIA) CALCULADA A PARTIR DE <i>preADMET</i>	187
VI.7.	SECCIÓN G: DOMINIO DE APLICABILIDAD DE LOS MODELOS Y DATOS DE PERMEABILIDAD A TRAVÉS DE LA BARRERA HEMATO-ENCEFÁLICA (BBB) CALCULADA A PARTIR DE <i>SwissADME</i>	191
VI.8.	SECCIÓN H: DOMINIO DE APLICABILIDAD DE LOS MODELOS Y DATOS DE PERMEACIÓN EN PIEL (K_p) CALCULADA A PARTIR DE <i>SwissADME</i>	194

Índice de Tablas

Tabla I.1. Principales fitoquímicos encontrados en productos alimenticios o nutraceuticos.....	3
Tabla I.2. Composición Química del ajo	7
Tabla I.3. Principales compuestos bioactivos del ajo y sus propiedades funcionales.....	16
Tabla I.4. Ejemplo de algunos compuestos bioactivos extraídos mediante diferentes solventes.....	19
Tabla I.5. Resumen de los principales modelos experimentales para evaluar permeabilidad	35
Tabla I.6. Generalizaciones acerca de los propósitos y aplicaciones de los modelos QSAR	38
Tabla II.1. Condiciones cromatográficas para la determinación de OSCs, flavonoles y azúcares.....	57
Tabla II.2. Niveles y factores evaluados mediante el diseño de superficie de respuesta para separación de monosacáridos	60
Tabla II.3. Niveles y factores evaluados en el modelo Box-Behnken para optimización de condiciones UAE	66
Tabla II.4. Tiempos de retención (promedio) y pureza de pico de los compuestos bajo estudio.....	70
Tabla II.5. Estimadores de regresión para cada analito	73
Tabla II.6. Linealidad de inulina vs. fructosa	73
Tabla II.7. Límites de detección y límites de cuantificación de los compuestos de interés utilizando la metodología propuesta	75
Tabla II.8. Medias, Desviaciones estándar y Desviaciones estándar relativas de las áreas de los compuestos bajo estudio (n=6)	78
Tabla II.9. Criterios de aceptación.....	78
Tabla II.10. Recuperaciones, Factores de enriquecimiento, CV% y t_{exp} para OSCs	81
Tabla II.11. Recuperaciones, Factores de enriquecimiento, CV% y t_{exp} para flavonoles e inulina	82
Tabla II.12. Concentraciones de OSCs, flavonoles e inulina que se encuentran en diferentes formas de preparación de ajo	87
Tabla III.1. Estructura química y nombre de los organoazufrados bajo estudio en el Capítulo III.....	100
Tabla III.2. Resumen de los valores de descriptores moleculares seleccionados para el modelado QSRR y QSAR	113
Tabla III.3. Factores de capacidad cromatográfica de los OSCs en fase IAM	120
Tabla III.4. Parámetros estadísticos del modelo PLS resultante de las interacciones de los OSCs en fase IAM	124
Tabla III.5. Datos de permeabilidad calculados <i>in silico</i> para los OSCs bajo estudio	130
Tabla III.6. Parámetros estadísticos del modelo PLS resultantes de la permeabilidad cutánea $\log K_p$ de OSCs con fase IAM y parámetros físico-químicos.	136
Tabla III.7. Coeficientes de regresión PLS de la permeabilidad cutánea de OSCs.....	137



UNCUYO
UNIVERSIDAD
NACIONAL DE CUYO



**FACULTAD DE
CIENCIAS EXACTAS
Y NATURALES**
Naturaleza, Ciencia y Humanismo

TESIS DOCTORAL EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA | DANIELA RAMIREZ

Índice de Figuras

Figura I.1. Esquema de formación y síntesis de los compuestos organoazufrados	8
Figura I.2. Corte transversal de un diente de ajo mostrando la localización de aliina y alinasa. Fuente: Kamel, 2006.....	9
Figura I.3. Clasificación de los compuestos fenólicos y principales estructuras químicas.	12
Figura I.4. Estructura química de fructanos tipo inulina.	13
Figura I.5. Productos a base de ajo comercializados en Argentina	15
Figura I.6. Esquema de las principales microextracciones líquidas.....	22
Figura I.7. Esquema de las etapas involucradas en la biodisponibilidad de compuestos	28
Figura I.8. Modelo de la estructura de las membranas celulares	32
Figura I.9. Esquema resumido con los pasos involucrados en el desarrollo de modelos QSAR/QSPR	41
Figura I.10. Esquema de la estructura de una monocapa de fosfatidilcolina sobre sílica (IAM.PC.MG)	44
Figura II.1. Esquema del diseño de investigación para el desarrollo de la metodología multi-fitoquímica	52
Figura II.2. Diagrama esquemático del procedimiento a seguir en la metodología multi-fitoquímica propuesta ...	56
Figura II.3. Gráfico 3D de la función de deseabilidad global para la optimización en la resolución cromatográfica de monosacáridos	61
Figura II.4. Resolución cromatográfica entre fructosa y glucosa cambiando la proporción de acetonitrilo en la fase móvil.....	61
Figura II.5. Cromatogramas correspondientes a una solución mix de los patrones de referencia de flavonoles en diferentes condiciones cromatográficas (K, campferol; M, miricetina; Q, quercetina).....	63
Figura II.6. Gráfico de contorno de la función deseabilidad global de las variables tiempo de ultrasonido vs. pH, manteniendo el volumen de metanol constante para la optimización de UAE	65
Figura II.7. Análisis Exploratorio basado en Componentes Principales para estudiar la funcionalidad potencial de preparaciones a base de polvo de ajo crudo	90
Figura II.8. Análisis Exploratorio basado en Componentes Principales para estudiar la funcionalidad potencial de preparaciones a base de ajo cocido	91
Figura III.1. Estructura de diferentes fases estacionarias IAM	97
Figura III.2. Estructura de los factores y niveles evaluados para la adecuada separación de OSCs en la fase IAM	103
Figura III.3. Descriptores 3D y su clasificación	107
Figura III.4. Estructura tridimensional de la isoaliina obtenida en Hyperchem	111
Figura III.5. Esquema de funcionamiento del análisis PLS.....	116

Figura III.6. Relación entre $\log k'(IAM)$ e $iLOGP$ para los 28 OSCs.....	122
Figura III.7. Relación entre los valores observados y calculados utilizando el enfoque PLS para $\log k' IAM$	125
Figura III.8. Gráfico de N-probabilidad de los residuos del modelo PLS (QSRR-IAM)	126
Figura III.9. Modelo QSAR no lineal que muestra la relación entre $\log k'(IAM)$ y HIA (%).	132
Figura III.10. Diagrama de dispersión y Fitted Line Plot de OSC ionizables que muestra la relación de HIA vs TPSA_1.....	133
Figura III.11. Diagrama de dispersión que muestra la relación entre $\log k'(IAM)$ vs. TPSA considerando la distribución de OSCs usando la permeación BBB como la variable de clasificación de agrupamiento.	135
Figura III.12. Relación entre los valores de permeabilidad cutánea $\log K_p$ reales y calculados utilizando el enfoque PLS	138
Figura III.13. Gráfico de N-probabilidad de los residuos del modelo PLS (K_p piel-IAM)	138
Figura VI.1. Estructura de diferentes fases estacionarias IAM.....	97
Figura III.2. Estructura de los factores y niveles evaluados para la adecuada separación de OSCs en la fase IAM	103
Figura III.3. Descriptores 3D y su clasificación	107
Figura III.4. Estructura tridimensional de la isoaliina obtenida en Hyperchem	111
Figura III.5. Esquema de funcionamiento del análisis PLS.....	116
Figura III.6. Relación entre $\log k'(IAM)$ e $iLOGP$ para los 28 OSCs.....	122
Figura III.7. Relación entre los valores observados y calculados utilizando el enfoque PLS para $\log k' IAM$	125
Figura III.8. Gráfico de N-probabilidad de los residuos del modelo PLS (QSRR-IAM)	126
Figura III.9. Modelo QSAR no lineal que muestra la relación entre $\log k'(IAM)$ y HIA (%).	132
Figura III.10. Diagrama de dispersión y Fitted Line Plot de OSC ionizables que muestra la relación de HIA vs TPSA_1.....	133
Figura III.11. Diagrama de dispersión que muestra la relación entre $\log k'(IAM)$ vs. TPSA considerando la distribución de OSCs usando la permeación BBB como la variable de clasificación de agrupamiento.	135
Figura III.12. Relación entre los valores de permeabilidad cutánea $\log K_p$ reales y calculados utilizando el enfoque PLS	138
Figura III.13. Gráfico de N-probabilidad de los residuos del modelo PLS (K_p piel-IAM)	138

Lista de abreviaturas

2D, Dos dimensiones
2-VD, 2-vinilditiina
3D, Tres dimensiones
ACN, Acetonitrilo
ACSOs, Alquenil-cisteín-sulfóxidos
AD, Dominio de Aplicabilidad
AGCC, Ácidos grasos de cadena corta
AGE, Extracto de ajo añejo
AITC, Alil Isotiocianato
AM, Alil Mercaptano
AMS, Alil Metil Sulfuro
AMSO, Alil Metil Sulfóxido
AMSO₂, Alil Metil Sulfona
ANMAT, Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica
AOAC, Association of Official Agricultural Chemists
BBB, Barrera Hematoencefálica
BITC, Bencil Isotiocianato
Caco-2, Línea cel. intestinales tumorales humanas
CE, Electroforesis Capilar
CV%, Coeficiente de variación o desviación estándar relativa
CV, coeficiente de validación cruzada (cross-validation)
DADS, Dialil disulfuro
DAS, Dialil sulfuro
DATS, Dialil trisulfuro
DLLME, Microextracción Líquido-Líquido Dispersiva
DMDS, Dimetil Disulfuro
EDS, Etil disulfuro
ES, Etil sulfuro
FDA, Administración de Alimentos y Medicamentos de EEUU
FE, Fase Estacionaria
FID, Detector Fotométrico de Llama
FITC, Fenetil Isotiocianato
FLD, Detector de Fluorescencia
FM, Fase Móvil
FOS, Fructooligosacáridos
FTI, Fructano de Tipo Inulina
FuDS, Furfuril Disulfuro
GC, Cromatografía Gaseosa
GI, Gastrointestinal

HIA, Absorción Intestinal Humana
HILIC, Cromatografía Líquida de Interacción Hidrofílica
HOMO, Energía del orbital molecular ocupado más alto
HPLC, Cromatografía Líquida de Alta Performance
I3C, Indol-3-carbinol
IAM, Membranas Artificiales Inmovilizadas
iLOGP, Log P implícito
ITCs, Isotiocianatos

K_p, Coeficiente de permeación en piel
LADME, Liberación, Absorción, Distribución, Metabolización y Excreción
LDA, Análisis Discriminante Lineal
LOD, Límite de Detección
LOQ, Límite de Cuantificación
LUMO, Energía del orbital molecular desocupado más bajo
MDCK, Madin-Darby canine kidney cells (cel. riñón caninas)
MeOH, Metanol
MG, End-capping de Metil glicidol
MLC, Cromatografía Líquida Micelar
MLR, Regresión Lineal Múltiple
MM+, Método de Campo de fuerza de Mecánica Molecular
MPTS, Metil Propil Trisulfuro
MS, Detector Espectrómetro de Masas
MW, Peso Molecular
NP, Cromatografía Líquida en Fase Normal
ODS, Octadecil silano
OSCs, Compuestos Organoazufrados
PAMPA, Parallel artificial membrane permeability assay (ensayo de permeabilidad basado en memb. Artificiales)
PBPK, physiology based pharmacokinetic (Farmacocinética basada en fisiología humana)
PC, Fosfatidil Colina
PCA, Análisis de Componentes Principales
PDS, Propil Disulfuro
Pe_{eff}, Permeabilidad Efectiva
PITC, Fenil Isotiocianato
PLS, Análisis de Mínimos Cuadrados Parciales
PM3, Método Paramétrico-3
PRESS, Suma de Cuadrados del Error de Predicción
PVPA, Phospholipid vesicle-based permeation assay (ensayo de permeación basado en vesículas de fosfolípidos paralelas)
QSAR, Relación Estructura-Actividad Cuantitativa
QSPR, Relación Estructura-Propiedad Cuantitativa
QSRR, Relación Estructura-Retención Cuantitativa
RID, Detector de Índice de Refracción
RMSS, Desviación Estándar

RNCG, Carga Relativa Negativa
ROS, Especies Reactivas del Oxígeno
RP, Cromatografía Líquida en Fase Rversa
RPCG, Carga Relativa Positiva
RSM, Metodología de Superficie de Respuesta
SAC, S-alil cisteína
SAMC, S-alil mercaptocisteína
SE, Sulforafeno
SF, Sulforafano
SH, Sulfhidrilo
SPE, Extracción en Fase Sólida
SPME, Microextracción en Fase Sólida
T₀, Tiempo muerto de las corridas cromatográficas
TPSA, Área de Superficie Polar Topológica
TPSA_1, Área de Superficie Polar Total
Tr, Tiempo de retención cromatográfico
UAE, Extracción Asistida por Ultrasonido
US, Ultrasonido
UV, Detector espectrofotométrico en el rango Ultravioleta
UV-VIS, Detector espectrofotométrico en el rango ultravioleta y visible
Vm, Volumen Molar
WHIM, Descriptor molecular invariante holístico ponderado



CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

I. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

I.1. ALIMENTOS FUNCIONALES

Los beneficios medicinales de los alimentos se han estudiado desde la antigüedad. Hoy en día, los consumidores son cada vez más conscientes de los beneficios para la salud de una dieta equilibrada, y existe una tendencia creciente, centrada en el consumo de productos alimenticios que no solo aporten los componentes nutricionales básicos, sino que también aporten sustancias que promuevan la salud. Estas variaciones en los patrones de alimentación generaron una nueva área de desarrollo en las ciencias de los alimentos y de la nutrición que corresponde a la de los **alimentos funcionales**.

El término “Alimento Funcional” fue propuesto por primera vez en Japón a fines de la década de los 80’s y principios de los 90’s con la publicación de la reglamentación para los “Alimentos para uso específico de salud” (“*Foods for specified health use*” o FOSHU)(Ruano et al., 2018). El calificativo de funcional se relaciona con el concepto bromatológico de “propiedad funcional”, o sea la característica de un alimento, en virtud de sus componentes químicos y de los sistemas físico-químicos de su entorno, sin referencia a su valor nutritivo (Alvídrez & Gonzalez, 2002).

En los países occidentales la historia de este tipo de alimentos se remonta a las primeras prácticas de fortificación con vitaminas y minerales, así como también a la práctica de incluir ciertos componentes en los alimentos procesados para complementar alguna deficiencia de la población. Recientemente, el Centro de Alimentos Funcionales Europeo introdujo una nueva definición de alimentos funcionales como: “Alimentos naturales o procesados que contienen compuestos biológicamente activos conocidos o desconocidos; que, en cantidades definidas, eficaces y no tóxicas, proporcionan un beneficio para la salud clínicamente probado y documentado para la prevención, el manejo o el tratamiento de enfermedades crónicas”(Ruano et al., 2018). La búsqueda de terapias alternativas para algunas enfermedades, el envejecimiento de la población mundial, los avances en la tecnología, así como los cambios reglamentarios de diversos países han provocado un gran interés en el desarrollo de los alimentos funcionales alrededor del mundo. Sin embargo, no existe un consenso acerca de la definición de la denominación de “alimentos funcionales” entre los diferentes países y organizaciones internacionales. En Argentina es el ANMAT (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica) el organismo que ha emitido un comunicado sobre Alimentos Funcionales, el cual especifica una definición y ejemplos de ciertos productos, aunque no se ha categorizado formalmente bajo una disposición institucional.

Más allá de la falta de consistencia acerca del empleo de términos y definiciones, y a su vez de los aspectos regulatorios de los mismos, se considera en líneas generales que un producto alimenticio se puede definir como un alimento funcional si tiene componentes con funciones benéficas, saludables o que previenen una enfermedad, y si dicho alimento cumple alguna de las siguientes descripciones: a) es un alimento natural; b) es un alimento al que se le ha agregado un componente; c) es un alimento del que se ha eliminado un componente; d) es un alimento en el que se ha modificado la naturaleza de uno o más de sus componentes; e) es un alimento en el que se ha modificado la biodisponibilidad de uno o más de sus componentes o, f) cualquier combinación de las posibilidades antes mencionadas (Márquez Fernández & Márquez Fernández, 2019).

Por otro lado, aunque se usen muchas veces indistintamente, los términos “alimentos funcionales” y “nutracéuticos” pueden diferenciarse. El primero, es similar en apariencia a, o puede ser, un alimento convencional, que se consume habitualmente en la dieta y para el cual se ha demostrado que tiene beneficios fisiológicos y/o reduce el riesgo de enfermedad crónica. El nutracéutico es un producto elaborado a partir de alimentos, pero que se comercializa en polvos, píldoras y otras formas medicinales que generalmente no se asocian con los alimentos, y que se ha demostrado que tienen beneficios fisiológicos o que brindan protección contra enfermedades crónicas. El alimento funcional puede categorizarse entonces de manera diferente a un nutracéutico, un alimento farmacéutico o un suplemento dietético. Es un alimento, no un fármaco, ya que tiene efectos beneficiosos para la salud, generalmente propiedades preventivas de enfermedades, y no terapéuticas (Ruano et al., 2018).

En relación a los beneficios fisiológicos aportados por los alimentos funcionales o productos nutracéuticos numerosos trabajos científicos han puesto en evidencia que ciertos componentes naturales de los alimentos resultan ventajosos para la prevención de enfermedades e incluso para su tratamiento terapéutico (Adefegha, 2018). Entre las propiedades benéficas relacionadas a estos productos podemos nombrar: la prevención de distintos tipos de cáncer, prevención de enfermedades cardiovasculares y diabetes, mejora de la capacidad inmunológica, mejora del funcionamiento digestivo y prevención de disfunciones metabólicas (S. Kumar & Krishnan, 2017).

1.1.1. Fitoquímicos

Como se mencionó en la sección anterior, la ingesta adecuada y crónica de algunos alimentos funcionales, o suplementos nutracéuticos, puede ayudar a reducir el riesgo de prevalencia e incidencia de enfermedades crónicas relacionadas con el estilo de vida. Estos efectos biológicos se atribuyen a compuestos activos de origen natural presentes en la matriz del producto alimenticio o nutracéutico (Adefegha, 2018).

Dentro de la gama de componentes bioactivos que podemos encontrar en los alimentos o nutraceuticos, los compuestos **fitoquímicos** son metabolitos vegetales secundarios que se encuentran principalmente en frutas y verduras con funcionalidad fisiológica no nutritiva. El espectro de fitoquímicos que se pueden encontrar en los alimentos funcionales y los suplementos dietéticos es enorme (Schieber & Lopes-Lutz, 2011). En la **Tabla I.1.** se presentan algunos ejemplos de fitoquímicos de alimentos funcionales.

Tabla I.1. Principales fitoquímicos encontrados en productos alimenticios o nutraceuticos

Clase/Componente	Origen	Beneficio potencial
Carotenoides		
<i>Beta caroteno</i>	Zanahoria	Neutraliza los radicales libres que podrían dañar a las células
<i>Luteína</i>	Vegetales verdes	Contribuye a una visión sana
<i>Licopeno</i>	Tomate	Reduce el riesgo de cáncer de próstata
Fibras dietéticas		
<i>Fibra insoluble</i>	Cáscara de trigo	Reduce el riesgo de cáncer de colon
<i>Beta glucano</i>	Avena	Reduce el riesgo de enfermedad cardiovascular
Ácidos grasos		
<i>Omega 3, ácido graso DHA</i>	Aceites de peces	Reducen el riesgo de enf. cardiovasculares y mejoran funciones mentales y visuales
<i>Ácido linoléico</i>	Queso, productos cárnicos	Mejora la composición corporal, reduce el riesgo de ciertos tipos de cáncer
Flavonoides		
<i>Catequinas</i>	Té	Neutraliza radicales libres, podría reducir el riesgo de cáncer
<i>Flavonas</i>	Cítricos	Neutraliza radicales libres, podría reducir el riesgo de cáncer
Esteroles vegetales		
<i>Ester etílico</i>	Maíz, soya, trigo	Reduce los niveles de colesterol sanguíneo
Prebióticos		
<i>Fructooligosacáridos</i>	Achicoria, cebolla	Mejoran la salud gastrointestinal
Fitoestrógenos		
<i>Isoflavonas</i>	Alimentos con soya	Reducen los síntomas de la menopausia
Compuestos azufrados		

<p><i>Organoazufrados, Tiosulfinatos, Isotiocianatos</i></p>	<p>Cebolla, ajo, brócoli, coliflor</p>	<p>Mejoran la composición corporal, reducen el riesgo de ciertos tipos de cáncer, antioxidantes, antitrombóticos entre otros.</p>
--	--	---

Fuente: Alvírez 2002, con modificaciones

Se ha establecido que estos metabolitos tienen baja potencia como compuestos bioactivos en comparación con los fármacos sintéticos. Sin embargo, dado que se pueden consumir regularmente con la dieta, pueden ejercer efectos fisiológicos a largo plazo (Bernal, Mendiola, Ibáñez, & Cifuentes, 2011). Cabe señalar que se espera que los productos a base de fitoquímicos sean sustancialmente más seguros, con efectos secundarios menores que los medicamentos farmacéuticos; sin embargo, todavía hay una falta de legislaciones estandarizadas sobre sus recomendaciones de producción, fabricación y consumo.

Los efectos biológicos de estos fitoquímicos presentes en alimentos y productos relacionados con los alimentos pueden estar asociados con su afinidad por ciertas proteínas, a través de la inhibición o modulación de algunas enzimas y procesos metabólicos, principalmente los relacionados con el estrés oxidativo (Adefegha, 2018).

1.1.2. El género *Allium* y sus aspectos benéficos para la salud

La familia de las *Alliaceas* tiene más de 600 especies, distribuidas a lo largo de Europa, Norte América, Norte de África y Asia. Además de los aspectos botánicos morfológicos que caracterizan a cada una, también se diferencian en cuanto al *flavor* el cual es resultado de complejas reacciones bioquímicas, aunque todas son semejantes en relación al contenido de compuestos químicos, especialmente aquellos con actividad biológica (fitoquímicos) (Benkeblia & Lanzotti, 2007; Martins, Petropoulos, & Ferreira, 2016).

El ajo (*Allium sativum*. L) y la cebolla (*Allium cepa*. L) son dos de los miembros de esta familia más utilizados en gastronomía y son por esta razón considerados unas de las hortalizas más comercializadas a nivel global (Martins et al., 2016). A lo largo de la historia, el ajo ha gozado de una gran variedad de aplicaciones. Sus demostradas propiedades terapéuticas y promotoras de la salud, lo convierten en uno de los alimentos naturales más efectivos para prevenir distintos tipos de enfermedades. Es por esta razón que el ajo se ha convertido en el vegetal más citado en trabajos científicos.

En particular, la ciencia moderna ha encontrado que en el ajo existen diferentes compuestos que presentan efectos terapéuticos en el campo de las enfermedades cardiovasculares y del cáncer. La mayoría de los investigadores considera que la clave de los beneficios para la salud debido al ajo, reside en su alto contenido

en compuestos azufrados. Aunque muchos alimentos también los poseen, el ajo, no obstante, contiene proporcionalmente más de estos compuestos que ningún otro vegetal (tres veces más que sus seguidores más próximos: la cebolla y el brócoli). Hasta el presente, han sido identificados cerca de 30 componentes en el ajo con efecto beneficioso potencial sobre la salud, los cuales manifiestan un amplio abanico de acciones metabólicas (Gómez & Sánchez-Muniz, 2000).

Además de la forma fresca o cruda de esta hortaliza, existen numerosas preparaciones a partir del ajo. La preparación de las extracciones de ajo se puede realizar en forma líquida y sólida. La composición y bioactividad de la extracción dependen del cultivar, grado de desarrollo de la planta, su estado fisiológico, las condiciones de conservación poscosecha, al igual que el método de preparación y método de consumo. Cuando se extraen y se aíslan, los compuestos bioactivos del ajo muestran una amplia gama de efectos beneficiosos para la salud para tratar diversas enfermedades infecciosas, enfermedades no transmisibles, así como trastornos metabólicos y genéticos (Amarakoon & Jayasekara, 2017).

I.1.2.1. Origen e Historia

El ajo, la cebolla, el puerro y la cebolla de verdeo son hortalizas del género *Allium* valoradas desde la antigüedad. Se ha indicado que el lugar de origen del ajo es Asia Central, desde donde se extendió hacia el Este hasta alcanzar China y hacia el Oeste en dirección a Europa (Gómez & Sánchez-Muniz, 2000).

Ya desde los comienzos de la escritura que se registra su uso, y se ha encontrado evidencia de su consumo en pirámides egipcias y templos griegos antiguos. Se habla de estos bulbos en la Biblia y en el Corán y se han apreciado desde la época de los sumerios. Antiguos textos médicos de China e India prescribieron aplicaciones médicas para el ajo. En muchas culturas, el ajo era administrado para proporcionar fuerza y aumentar la capacidad de trabajo de los trabajadores (Rivlin, 2001). Alrededor del 2300 a.C. el ajo alcanzó gran importancia en Sumeria y que llegó incluso a formar parte de algunas cervezas que se usaban para reducir inflamaciones o eliminar parásitos.

Hipócrates (s. V-IV a.C.) padre de la Medicina, hizo del ajo una parte de su arsenal terapéutico, defendiendo su uso para problemas pulmonares, como agente limpiador o purgante, y para crecimientos abdominales, particularmente uterinos (Rivlin, 2001).

En la medicina árabe de la Edad Media, el ajo era un remedio especialmente valorado. Los médicos árabes contribuyeron en gran medida a la expansión del uso del ajo como remedio. Este conocimiento del uso terapéutico de las plantas, especialmente el ajo, fue adquirido y transmitido a través de los monjes. El ajo se

cultivaba en los monasterios europeos. Se creía que aliviaba numerosos padecimientos como afecciones gástricas, resfrío, fiebre y diarrea cuando se consumía con bebidas (Petrovska & Cekovska, 2010).

Los antecedentes denotan que si bien el ajo ha sido utilizado en la medicina tradicional desde hace siglos, la investigación científica sobre estas plantas se inició en la segunda mitad del siglo XIX, con la obra de Louis Pasteur, que en 1858 observó por primera vez las propiedades antibacterianas del ajo. (Block, 1985). Las propiedades antisépticas del ajo se confirmaron en la lucha contra el cólera (en 1913), la fiebre tifoidea y la difteria (en 1918) en Beirut (Petrovska & Cekovska, 2010). A pesar de la existencia de la penicilina, en la segunda guerra mundial, cobró relevancia el uso del ajo para el tratamiento de heridas de los soldados ya que era utilizado como antiséptico (Amagase et al., 2001).

En los estudios más recientes existe evidencia epidemiológica que demuestra las funciones terapéuticas y preventivas del ajo, atribuidas a diferentes componentes presentes en el vegetal y/o sus productos nutracéuticos. Ahora bien, aunque se ha demostrado que el ajo y sus productos pueden tener un potencial clínico significativo, ya sea por derecho propio o como terapia adyuvante en diferentes trastornos, debido a algunos problemas, como falta de información sobre la justificación de la dosis, variación entre ensayos de eficacia y efectividad, la ausencia de un comparador de placebo o la falta de grupos de control se necesitan más experimentos e investigaciones estándar para confirmar el efecto beneficioso del ajo a nivel clínico en diversas enfermedades. (Bayan et al., 2014).

I.1.2.2. Consumo a nivel regional

Las aliáceas comestibles representan uno de los cultivos de hortalizas más importante a nivel mundial. El ajo es la segunda aliacea de consumo más extendido, con una popularidad en crecimiento debido a los crecientes conocimientos de sus beneficios para la salud. A nivel local, el ajo constituye la principal hortaliza fresca exportable de Argentina, ocupando el tercer puesto como productor y abastecedor a nivel mundial, ocupando el primer lugar China seguido de España (López et al., 2019).

Las provincias que presentan las condiciones climáticas más favorables para la producción de ajo son Mendoza y San Juan las cuales aportan el 95 % del producido en el país. De lo producido en nuestro país, el 70% es exportado, el 20 % es para consumo interno y aproximadamente un 10% se destina para ajo semilla. El país exporta anualmente más de 80.000 toneladas siendo Brasil el principal comprador, con una participación del 80% en el total comercializado. La provincia de Mendoza continúa liderando la superficie cultivada del país con esta hortaliza. La superficie estimada para esta temporada 2019/2020 fue de 11.323,38 ha de ajo (Fernandez, 2020).

Considerando, que la provincia de Mendoza es la principal productora de ajo (*Allium sativum L.*) de la Argentina y que nuestro país se posiciona como el segundo exportador de ajo a nivel mundial, es que esta especie se propone como objeto de estudio en el presente trabajo.

I.1.2.3. Composición Química y Compuestos Bioactivos del Ajo

A pesar del uso frecuente del ajo en la cocina de muchas culturas, su importancia nutritiva es prácticamente insignificante debido a que es utilizado como un saborizante, consumido en pequeñas cantidades, y no como un alimento. El agua es el componente mayoritario del ajo fresco (aproximadamente 62-68%), seguido por los hidratos de carbono, correspondiendo al 26-30% de su peso seco, consistiendo los mismos mayoritariamente por fructanos, los cuales presentan ciertas propiedades biológicas. Luego siguen en cantidad los compuestos organoazufrados (11-35 mg g⁻¹ de ajo fresco), proteínas, fibra y aminoácidos libres (**Tabla I.2.**). También pueden encontrarse otros compuestos bioactivos como vitaminas C y E y minerales como el selenio, entre otros. Casi todos los compuestos presentes en el ajo son solubles en agua (97%) con una pequeña cantidad de compuestos solubles en aceite (0,15 a 0,7%) (Mardomi, 2017; Qiu, Zheng, Zhang, Sun-Waterhouse, & Qiao, 2020; K. Rahman, 2003).

Además, pueden encontrarse en su composición polifenoles como flavonoides, antocianinas, flavonoles y taninos. La mayoría de los investigadores considera que los beneficios para la salud, residen en su alto contenido en compuestos azufrados. Aunque muchos alimentos también los poseen, el ajo, contiene tres veces más compuestos organoazufrados que cualquier otra hortaliza (Corzo-Martinez y col., 2007).

Tabla I.2. Composición Química del ajo

Análisis Proximal	Cantidad (peso fresco %)
Agua	62-68
Carbohidratos	25-30
Proteínas	1,5-2,1
Aminoácidos esenciales	1-1,5
Lípidos	0,1-0,2
Fibra dietaria	1,5
Minerales	0,7
Vitaminas	0,015
Compuestos Bioactivos	Cantidad (peso fresco %)
Compuestos azufrados totales*	1,1-3,5
Saponinas	0,04-0,11
Compuestos fenólicos	0,1-0,5

Lectinas	0,004-0,028
Aminoácidos: cisteína sulfóxidos	0,6-1,9
γ- Glutamilcisteína	0,5-1,6
Fructanos	4,6-6

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

Fuente: Rahman, 2003; Mardomi, 2017; Qiu et al., 2020

1.1.2.3.1. Compuestos Organoazufrados

Los principales compuestos bioactivos, responsables de las funciones biológicas de las especies *Allium*, son los compuestos organoazufrados. Los bulbos de ajo intactos contienen aminoácidos azufrados, entre los que se incluyen cisteína y metionina (trazas). Además se encuentran presentes en esta matriz *γ*-glutamil péptidos, los cuales, mediante la intervención de enzimas tales como *γ*-glutamiltanspeptidasa y oxidasa, son biotransformados en alquencil-cisteín-sulfóxidos (ACSOs), también llamados compuestos precursores del *flavor*, entre los que se encuentra la *alliina* (S-alil-cisteín-sulfóxido) (Rabinowitch & Brewster, 1990; Ramirez et al., 2016). La **Figura I.1.** muestra de manera esquemática la formación de los organoazufrados en el ajo, a su vez se muestran las principales vías bioquímicas para su producción y síntesis.

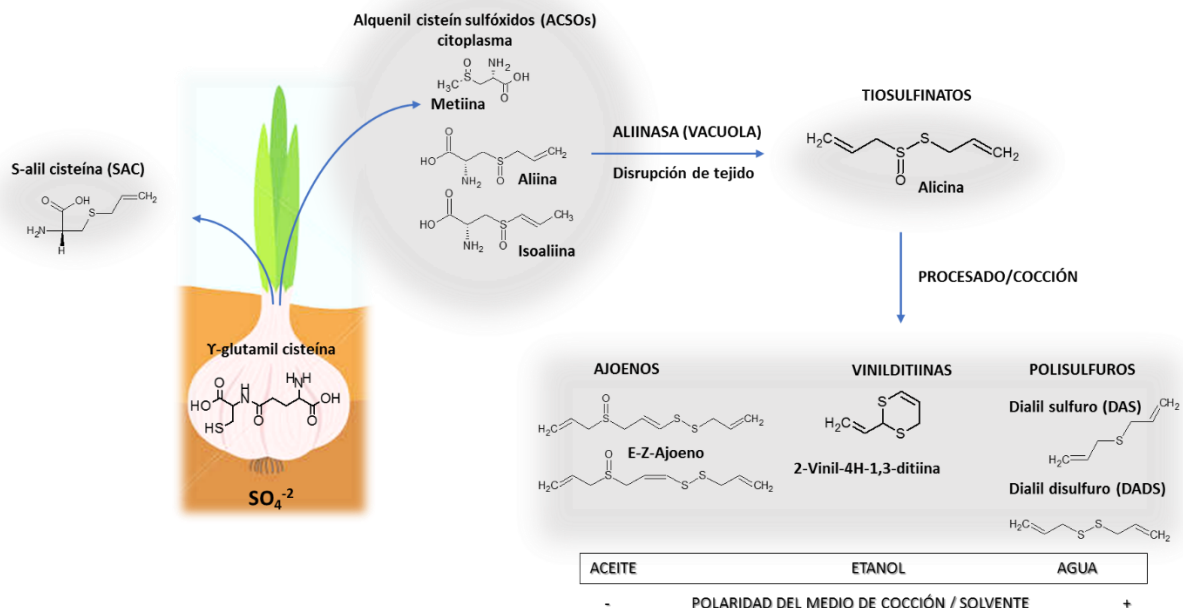


Figura I.1. Esquema de formación y síntesis de los compuestos organoazufrados

Fuente: Ramirez et al., 2016

Los tiosulfatos (TS) se forman tras la hidrólisis enzimática de los ACSOs, ubicados en el citoplasma, por la enzima vacuolar **aliinasa**, cuando hay ruptura de los tejidos del ajo (**Figura I.2.**) (Lancaster & Collin, 1981). La alicina (dialil tiosulfato) es el TS del ajo más abundante y representa el 70 a 80% del total de los tiosulfatos. La actividad de la enzima aliinasa se ve influenciada por varios factores tales como: presencia de cofactores, pH y temperatura. En cuanto al pH, la enzima se activa a pH 4,5-9, pero se inactiva rápidamente y de forma irreversible a pH 1.5-3. En lo que respecta a la influencia de temperatura sobre la actividad de la enzima, en 1999, Krest y Keusgen, determinaron que la actividad enzimática decrece rápidamente a 42°C, indicando que la temperatura óptima de activación se encuentra entre 35-37°C y la inactivación se da entre 42-60°C. A temperaturas mayores de 60°C la actividad enzimática se anula (Amagase, 2006).

A su vez la alicina es un compuesto inestable y sufre degradación y transformaciones dando compuestos organoazufrados volátiles, entre ellos ajoeno, vinilditiinas, thioacroleina y alil sulfuros. En medios más polares se obtendrá una mayor proporción de ajoeno, mientras que en medios menos polares prevalecerá la formación de vinilditiinas, sobre una pequeña cantidad de ajoeno (Soto, Camargo, & Galmarini, 2007). Cuando la alicina se deja a temperatura ambiente por 20 horas, se descompone espontáneamente en dialil disulfuro (DADS) (66%), dialil sulfuro (DAS) (14%) y dialil trisulfuro (DATS) (9%) (Amagase, 2006).



Figura I.2. Corte transversal de un diente de ajo mostrando la localización de aliina y aliinasa. Fuente: Kamel, 2006.

Además de la biosíntesis de los tiosulfintos a través de la interacción ACSOs-aliinasa, los γ -glutamil péptidos se convierten en *S-alil cisteína* (SAC) a través de una vía diferente. La *S-alil-L-cisteína* y *trans-S-1-propenil-L-cisteína*, junto con una pequeña cantidad de *S-metil-L-cisteína*, se encuentran en el extracto de ajo añejado (AGE). Estos derivados de cisteína son cristales incoloros, inodoros y estables en estado sólido o en solución acuosa bajo condiciones neutras o ligeramente ácidas. El SAC ofrece protección contra la oxidación, los radicales libres, el cáncer y las enfermedades cardiovasculares. Además, en AGE también se encuentra *S-alil mercaptocisteína* (SAMC) que presenta efecto hepatoprotector, anticancerígeno y antioxidante (Amagase, 2006).

1.1.2.3.2. Compuestos Fenólicos

En general se relaciona al ajo y sus productos en relación a sus beneficios para la salud con el contenido de compuestos azufrados en sus matrices. Sin embargo, existen también componentes adicionales del ajo que incluyen una amplia gama de biomoléculas primarias y secundarias sin azufre, tales como los compuestos fenólicos asociados con diversas propiedades bioactivas, principalmente aquellas relacionadas con la actividad antioxidante (Bozin et al., 2008).

Se considera que los compuestos fenólicos en las plantas tienen un papel clave como compuestos de defensa cuando la planta es sometida a un estrés ambiental, como luz alta, bajas temperaturas, infección por patógenos, y la deficiencia de nutrientes, que pueden conducir a una mayor producción de radicales libres y otras especies oxidativas en las plantas (Lattanzio, 2013). Están presentes generalmente en forma de glucósidos en los extractos de las frutas, hierbas, vegetales, cereales y otros materiales de plantas ricos en polifenoles lo que ha permitido su utilización por la industria alimentaria (Muñoz Jauregui & Ramos Escudero, 2007).

La característica estructural básica de los compuestos fenólicos es un anillo aromático que lleva uno o más grupos hidroxilo. Los compuestos fenólicos vegetales se clasifican como fenoles simples o polifenoles según el número de unidades de fenol en la molécula. Así, los fenólicos vegetales comprenden fenoles simples, ligninas, lignanos, taninos condensados e hidrolizables, ácidos fenólicos y flavonoides (Bozin et al., 2008; Lattanzio, 2013; Muñoz Jauregui & Ramos Escudero, 2007). La **Figura I.3.** resume la clasificación y principales estructuras de los compuestos fenólicos que pueden encontrarse en la naturaleza.

Diferentes compuestos químicos y elementos físicos, como los rayos ultravioleta, son fuente de estrés oxidativo al generar especies reactivas de oxígeno (ROS) en las células. En el cuerpo humano, los ROS incluyen al peróxido de hidrógeno, radical peroxi, radicales hidroxilo, radical aniónico superóxido, ácido hipocloroso,

radical óxido nítrico y oxígeno singlete. La producción excesiva de estas especies reactivas puede causar fácilmente daños a las células y los tejidos (Khan, Qureshi, Jabeen, & Shakeel, 2016). Sin embargo, los compuestos fenólicos presentes en los alimentos han demostrado ejercer un efecto antioxidante sobre las ROS mediante diferentes mecanismos tales como el secuestro de radicales libres, donación de moléculas de hidrógeno, barriendo moléculas de superóxido, quelación de metales de transición; propiedades que son atribuidas principalmente al grupo hidroxilo presente en su anillo estructural (Muñoz Jauregui & Ramos Escudero, 2007). En el ajo, particularmente, sus propiedades antioxidantes son atribuidas principalmente a flavonoides (de Queiroz et al., 2014).

Si se analiza el contenido de compuestos fenólicos totales, el ajo se posiciona en segundo lugar en una clasificación que incluye 23 vegetales de consumo habitual. Además, se ha descubierto que algunos productos de ajo, como el extracto de ajo añejado (AGE) o el ajo negro, contienen un mayor nivel de polifenoles en comparación con el ajo crudo (Beato et al., 2011). Diversos trabajos han reportado perfiles y niveles variables de compuestos fenólicos en el ajo. Miean y Mohamed, en el año 2001, encontraron concentraciones relativamente altas de los flavonoides miricetina, quercetina y apigenina en el ajo. Por otro lado, Gorinstein et al., 2008, encontraron solo quercetina y campferol, y que la suma de ácidos hidroxicinámicos (ácidos cafeico, p-cumárico, ferúlico y sinápico) era hasta dos veces mayor en el ajo que en la cebolla. Los factores genéticos, agronómicos y ambientales tienen un papel importante en la composición fenólica de los cultivos. Sin embargo, se desconocen las influencias de estos factores sobre la concentración de compuestos fenólicos en el ajo (Beato et al., 2011). Además, muchos de estos componentes funcionan sinérgicamente para proporcionar diferentes beneficios para la salud pero su importancia real en la explicación de los beneficios para la salud del ajo aún no se ha resuelto (Bozin et al., 2008).

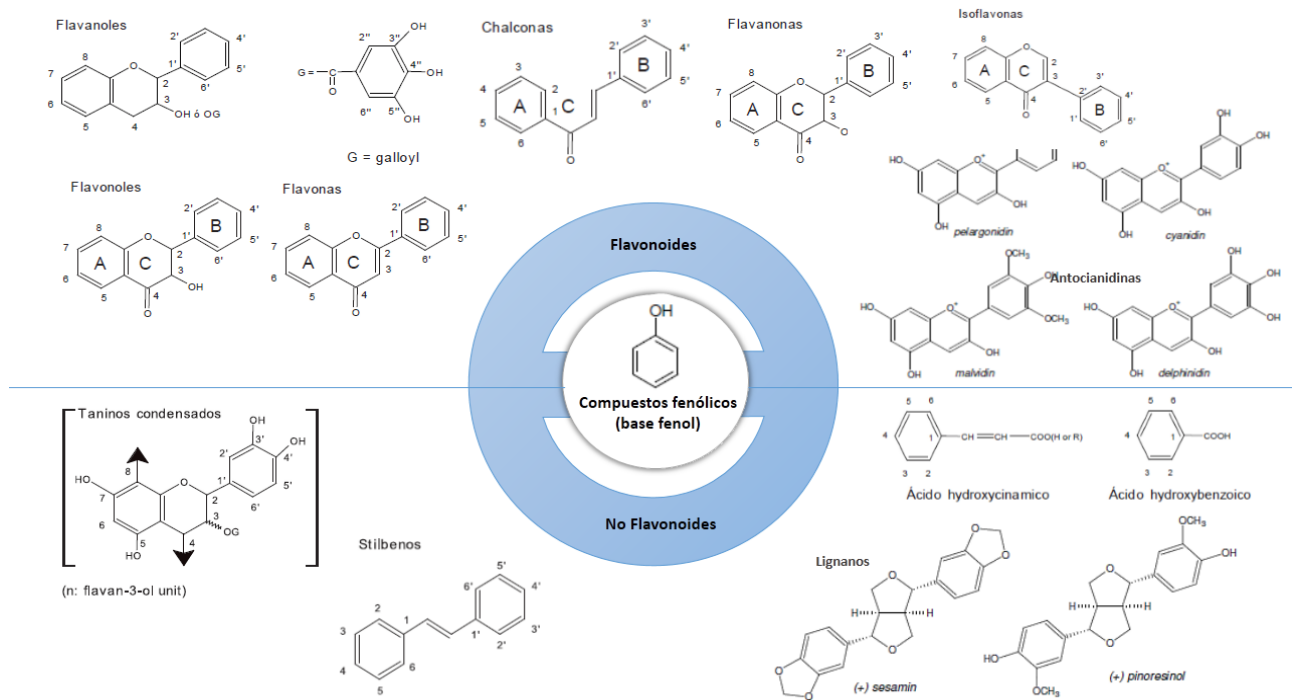


Figura I.3. Clasificación de los compuestos fenólicos y principales estructuras químicas.
*cada número representa una posición de sustituyentes -OH

Fuente: (Muñoz Jauregui & Ramos Escudero, 2007)

1.1.2.3.3. Fructanos (inulina)

Una de los beneficios asociados al consumo de ajo o de algunos de sus productos consiste en la prevención de trastornos gastrointestinales. Como uno de los componentes principales del ajo, los fructanos pueden contribuir a la protección contra enfermedades gastrointestinales mejorando el entorno gastrointestinal microbiano (Zhang et al., 2013).

Los fructanos son oligosacáridos de reserva que se encuentran en aproximadamente el 15 % de especies de plantas de floración, especialmente de climas templados y áridos. Algunos alimentos en los que se pueden encontrar son: las cebollas, los ajos, la achicoria, el camote y la alcachofa (Chandrashekar, Prashanth, & Venkatesh, 2011). Los fructanos se caracterizan por el hecho de que tienen como estructura general a la glucosa unida exclusivamente por enlaces β 2-1 a múltiples residuos de fructosa (Schaafsma & Slavin, 2015). En la **Figura I.4.** podemos observar su estructura. Respecto a su destino fisiológico se considera que los fructanos son no digeribles, con un grado de polimerización de 3-10 que resisten la hidrólisis de las enzimas digestivas humanas. El fructano más estudiado y vendido mundialmente es el fructano del tipo inulina (FTI). La Inulina es un término genérico asociado a fructanos extraídos de plantas con agua caliente y que no se ha

sometido a ningún tratamiento químico posterior (Álvarez-Borroto, Ruano-Nieto, Calle-Miñaca, & Lara-Fiallos, 2015; N. Zhang et al., 2013).

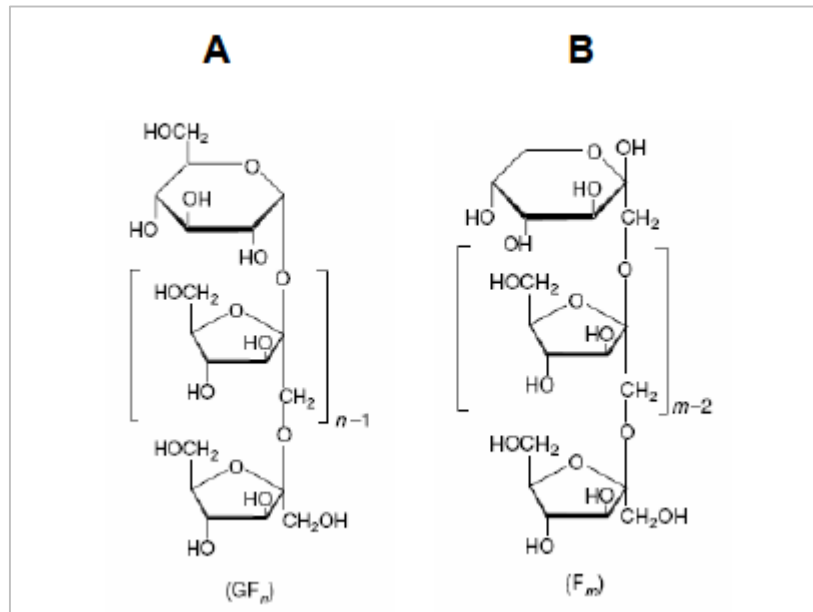


Figura I.4. Estructura química de fructanos tipo inulina.
A: Con una molécula terminal de glucosa y B: con una molécula terminal de fructosa.
Fuente: Madrigal & Sangronis, 2007

Respecto a las propiedades bioactivas asociadas a estos compuestos, se considera que principalmente la inulina y los fructooligosacáridos (FOS) son una gran fuente de prebióticos. En el colon, algunos fructanos se fermentan rápidamente para producir ácidos grasos de cadena corta (AGCC), este hecho explica algunos de los efectos sistémicos de los fructanos. Las bifidobacterias (y posiblemente algunos otros géneros) se estimulan preferentemente para crecer en presencia de fructanos en el colon, lo que resulta en cambios significativos en la composición de la microflora intestinal al aumentar la cantidad de bacterias potencialmente promotoras de la salud y reducir la cantidad de bacterias potencialmente dañinas (N. Zhang et al., 2013). Asimismo, al mantener los colonocitos protegidos de la adhesión de bacterias patógenas, disminuye el desarrollo de células cancerosas. Además, favorecen la producción de la hormona conocida como GLP1, responsable de la producción de insulina, por lo tanto, puede ayudar a regular la diabetes. Por otro lado, ayuda con problemas de sobrepeso, ya que aumenta los niveles reguladores del apetito, pues genera una sensación de saciedad y, por lo tanto, disminuye el consumo de alimento (Loyo Ruíz, Cruz Ramírez, & Arciga Pedraza, 2020).

En el ajo, después del agua, los carbohidratos son los segundos componentes más abundantes, los cuales representan más del 30 % en base húmeda. Estos carbohidratos son principalmente fructanos y representan más del 80 % de la materia seca del ajo.

La cantidad de fructanos, como la de otros metabolitos, está fuertemente influenciada por factores genéticos y ambientales, que incluyen: factores de crecimiento como luz, temperatura, humedad y fertilizantes; daños causados por microorganismos e insectos, estrés inducido por radiación ultravioleta, metales pesados y pesticidas (Lisciani et al., 2017). Espinosa-Martos, 2006 reportó niveles de aproximadamente 13,54 g de inulina % p/p seco de ajo, mientras que Madrigal & Sangronis, 2007, encontraron cantidades mayores de inulina en ajo fresco (29 % p/p seco). Guevara-Figueroa et al., 2015, reportaron niveles de FOS de 4-12 mg%g ajo fresco. Además se ha estudiado la presencia de FOS e inulina en otros productos de ajo como el ajo negro y extractos de ajo (Yuan, Sun, Chen, & Wang, 2016). La variación en los grados de polimerización de los FOS y los niveles encontrados en los distintos reportes hace difícil establecer cantidades fijas de niveles de inulina encontrados en el ajo o en sus productos, y se necesita ahondar en esta problemática.

I.1.2.4. Preparaciones Gastronómicas y Productos Nutraceuticos a base de ajo

En los últimos años, el ajo se encuentra entre las especies hortícolas más comercializadas en el sector de productos procesados debido al desarrollo de tecnologías de procesamiento de alimentos. Este creciente interés en los productos procesados del ajo se debe a que muchos consumidores consideran poco atractivo su fuerte pungencia y olor/sabor. Lo anterior conlleva a que no se alcancen las cantidades de consumo de ajo fresco recomendadas para alcanzar sus efectos benéficos (2 gramos por día). De manera que a través del procesamiento del ajo fresco se busca obtener productos a base de ajo que se usen con fines culinarios y/o fines nutraceuticos.

Respecto a las preparaciones culinarias, el ajo se puede encontrar como seco, en polvo, puré, jugo de ajo y aceite esencial, salsa y encurtidos. Mientras que como productos nutraceuticos se comercializa como aceite de ajo encapsulado, tabletas de ajo en polvo inodoro, aceite de ajo y extracto de ajo añejado (AGE) (Akan & Yanmaz, 2017). En la **Figura I.5.** se presentan algunos ejemplos de productos comerciales a base ajo disponibles en el mercado argentino.



Figura I.5. Productos a base de ajo comercializados en Argentina
Fuente: mercadolibre.com.ar; ar.iherb.com

Como puede verse en los productos comerciales disponibles en el mercado, ajo se procesa dando productos en forma sólida y líquida. La forma sólida se puede utilizar como polvo seco o masa blanda (salsas o purés). La forma líquida se puede preparar como una formulación acuosa, aceite o una extracción utilizando disolventes como el alcohol. Sin embargo, la composición y el efecto de su bioactividad dependen de la cepa de ajo, la edad, las condiciones de almacenamiento, el método de procesamiento y el consumo (Amarakoon & Jayasekara, 2017).

Respecto a los componentes de cada preparación, el macerado de aceite de ajo se compone de compuestos de azufre solubles en aceite, tales como vinilditiinas y ajoenos, y aliina. No contiene alicina (Quesada et al., 2020).

El ajo en polvo, por otro lado, se genera a partir de dientes de ajo que se liofilizan y se pulverizan en polvo. Contiene aliina y una pequeña cantidad de compuestos de azufre solubles en aceite. Como todos los productos comerciales de ajo, no contiene alicina, sin embargo, si se someten a una hidratación, este polvo de ajo tiene alicina potencial (de Diego, Avello, Mennickent, Fernández, & Fernández, 2007).

Los extractos de ajo se producen al remojar los dientes de ajo en rodajas o picados en una solución de extracción durante un tiempo específico. Luego, después de la separación de la solución, se concentra el extracto. De los diferentes extractos de ajo, el llamado "extracto de ajo envejecido o añejado" (AGE, Kyolic) merece una atención especial. AGE es un producto inodoro de una extracción prolongada de ajo fresco a temperatura ambiente. El ajo cortado o triturado se almacena en una solución de etanol al 15-20% en agua durante 20 meses. Luego, el extracto se filtra y se concentra. Durante tanto tiempo, los compuestos responsables del sabor característico y los componentes pungentes se transforman naturalmente en compuestos de azufre estables y seguros. El AGE contiene SAC y SAMC, y pequeñas cantidades de sulfuros de alilo solubles en aceite. Estos compuestos de azufre solubles en agua, formados durante el envejecimiento del extracto de ajo, tienen un enorme potencial antioxidante (Kwiecien, Iciek, & Wlodek, 2009).

Aparte de estos productos, el "ajo negro" es un producto que se encuentra en auge de comercialización. El ajo negro es una fermentación de ajo fresco. Como resultado, el sabor y el olor característicos del ajo desaparecen o disminuyen, y aparecen otros compuestos predominando los azúcares, dando un sabor similar al almíbar y al vinagre. Se afirma que el ajo negro tiene un fuerte efecto anticancerígeno y tiene una mayor actividad antioxidante en comparación con el ajo fresco debido a la presencia de SAC en su matriz (Akan & Yanmaz, 2017).

I.1.2.5. Propiedades biológicas asociadas al ajo y sus preparaciones

Tradicionalmente, se ha afirmado que el ajo y sus compuestos relacionados tienen varias actividades biológicas que incluyen actividades anticancerígenas, promotoras del sistema cardiovascular, antioxidantes, antidiabéticas, renoprotectoras, antiateroscleróticas, antibacterianas, antifúngicas y antihipertensivas (Amagase, 2006; Beshbishy et al., 2020; Lanzotti, 2006; Shang et al., 2019). Además, el ajo se ha utilizado en la medicina tradicional para tratar la indigestión, las infecciones del tracto respiratorio y urinario y los trastornos cardíacos y mostró efectos carminativos, antipiréticos, sedantes, afrodisíacos y diuréticos. La **Tabla I.3.**, resume los principales compuestos bioactivos presentes en el ajo así como sus potenciales acciones biológicas.

Tabla I.3. Principales compuestos bioactivos del ajo y sus propiedades funcionales

Compuestos organoazufrados	
Aliina	Hipotensora, hipoglucemiante
Ajoeno	Previene la formación de coágulos, ayuda a disolverlos. Antiinflamatorio, vasodilatador, hipotensor, Antibiótico
Alicina	Antibiótica, antifúngica, antiviral

Alil mercaptano	Hipocolesterolemiante, previene la aterosclerosis, antitumoral, antidiabética
DAS y otros polisulfuros	Hipocolesterolemiante. Aumento la producción de enzimas detoxificantes. Anticancerígeno
S-alil cisteína y gamma glutamil péptidos	Hipocolesterolemiantes, antioxidantes, quimioprotectores frente al cáncer.
Compuestos no azufrados	
Adenosina	Vasodilatadora, hipotensora, miorelajante. Estimula la síntesis de hormonas esteroídicas
Fructanos (Escorodosa)	Efectos cardioprotectores. Prebióticos
Fracción proteica F-4	Estimula el sistema inmune por medio de macrófagos y células esplénicas
Quercetina	Estabiliza los mastocitos. Ejerce efectos beneficiosos en el asma y la alergia. Antioxidante
Saponinas	Hipotensoras. La Gitonina F, es antivírica, el Erubósito, B antifúngico. Hipotensora en conejos y perros. Factor de crecimiento en dosis elevadas
Compuestos organoselénicos	Antioxidantes. Antiinflamatorios.
Compuestos fenólicos	Antioxidantes. Antiinflamatorios. Antivíricos y antibacterianos

Fuente (Gómez & Sánchez-Muniz, 2000)

1.2. ABORDAJE DEL ESTUDIO DE ALIMENTOS FUNCIONALES DESDE UNA PERSPECTIVA BIOLÓGICA-ANALÍTICA

1.2.1. ASPECTOS ANALÍTICOS RELACIONADOS CON LA DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS

El desarrollo de métodos analíticos confiables es obligatorio para caracterizar adecuadamente cada producto natural a base de ajo. Las metodologías analíticas también ayudan a comprender mejor los efectos beneficiosos para la salud de los compuestos bioactivos. Con el fin de desarrollar adecuadamente los suplementos nutracéuticos o hacer recomendaciones de consumo, se emplean ensayos *in vitro*, *in vivo* y clínicos para evaluar la exposición corporal una vez ingeridos los fitoquímicos. En este sentido, se suelen emplear diferentes herramientas analíticas para estimar los niveles de compuestos activos o sus metabolitos (Moreno & Ilic, 2018; Quintin, Garcia-Gomez, Ayuso, & Sanmartin, 2019). En breve, la mayoría de los análisis de productos naturales implican la preparación de muestras (extracción y purificación), la separación de los componentes activos de la planta, de concomitantes en su matriz, y su cuantificación final empleando detectores analíticos altamente sensibles. La naturaleza química de los compuestos, junto con la matriz alimentaria o nutracéutica, ambas determinan el procedimiento de preparación de la muestra (extracción a base de solventes, destilación, extracción asistida por ultrasonidos, entre otros), el mecanismo de separación

(Cromatografía de gases -GC-, Cromatografía de líquidos -LC- Electroforesis Capilar -CE-) y el tipo de detector a utilizar (Detector Ultravioleta -UV-, Detector de Fluorescencia -FLD-, Detector de Ionización de Llama -FID-, Espectrómetro de Masas -MS-) (Bernal et al., 2011; Ren et al., 2013; Schieber & Lopes-Lutz, 2011).

1.2.1.1. Técnicas de Preparación de Muestras

1.2.1.1.1. Técnicas de extracción tradicionales

Los compuestos bioactivos de vegetales se pueden extraer mediante diversas técnicas de extracción clásicas. La mayoría de estas técnicas se basan en el poder de extracción de diferentes solventes (orgánicos / agua), y la aplicación de calor y / o alguna otra fuente física de manipulación. Para obtener compuestos bioactivos a partir de plantas, las técnicas clásicas existentes son: (1) Extracción por Soxhlet, (2) Extracciones con solventes (maceración), (3) Extracción líquido-líquido o sólido-líquido e (4) Hidrodestilación.

En la extracción por Soxhlet, se coloca una pequeña cantidad de muestra seca en un dedal. A continuación, el dedal se coloca en un matraz de destilación que contiene el disolvente de particular interés. Después de alcanzar un nivel de desbordamiento, la solución del porta-dedales se aspira mediante un sifón. Sifón descarga la solución nuevamente en el matraz de destilación. Esta solución transporta los solutos extraídos al líquido a granel. El soluto permanece en el matraz de destilación y el solvente vuelve al lecho sólido de la planta. El proceso se ejecuta repetidamente hasta que se completa la extracción. Este tipo de extracción es común principalmente para analitos de baja polaridad como los carotenos y ácidos grasos (Azmir et al., 2013).

Por otro lado en las extracciones con solventes, los analitos son extraídos de una muestra sólida o líquida mediante un disolvente apropiado que permite mayoritariamente la disolución de los mismos y no la de otros componentes de la muestra. La muestra sólida pesada, preferiblemente finamente dividida, o la muestra líquida se pone en contacto con un solvente orgánico de extracción en un recipiente adecuado y habitualmente es mezclada o agitada durante un cierto período de tiempo de tal manera que el analito se extraiga de la muestra y se disuelva en el líquido. Hay diversos factores que afectan la capacidad del analito de ser liberado por la matriz y difundir en el medio, como la polaridad del compuesto y la composición de la matriz, el pH, la temperatura, las características del solvente, entre otros. Después de la extracción, el material sólido no disuelto se filtra o centrifuga, y el filtrado finalmente se analiza. Si bien esta técnica es la más utilizada para la extracción de los compuestos bioactivos del ajo, la misma presenta ciertas desventajas: consumen tiempo, requieren grandes cantidades de reactivos y solventes orgánicos, generan numerosos residuos, y pueden dar lugar a una distorsión de los resultados debido tanto a las impurezas presentes en los reactivos y/o por la manipulación prolongada de los compuestos involucrados (Biniecka & Caroli, 2011). La

Tabla I.4., que se presenta a continuación, muestra algunos de los solventes que normalmente se emplean para realizar la extracción de compuestos bioactivos en matrices alimentarias.

Tabla I.4. Ejemplo de algunos compuestos bioactivos extraídos mediante diferentes solventes

Agua	Etanol	Metanol	Cloroformo	Diclorometano	Éter	Acetona
Antocianinas	Taninos	Antocianinas	Terpenoides	Terpenoides	Alcaloides	Flavonoides
Taninos	Flavonoides	Terpenoides	Organoazufrados	Organoazufrados	Terpenoides	
Saponinas	Alcaloides	Flavonoides	Glucosinolatos	Carotenos	Vitaminas Liposolubles	
Terpenoides	Fructanos	Taninos		Glucosinolatos		
Fructanos		Organoazufrados		Vitaminas liposolubles		
Azúcares simples						

Fuente: Azmir et al., 2013, con modificaciones

La destilación es uno de los procedimientos más fáciles para separar compuestos volátiles a partir de las matrices de alimentos. Esta técnica se ha empleado con anterioridad para algunos compuestos del ajo, particularmente para los organoazufrados. Sin embargo, debido a que estos compuestos son altamente reactivos, se debe siempre considerar la posibilidad de una descomposición térmica. La destilación por alto vacío se ha empleado para reducir la formación potencial de “artifacts” que corresponden a compuestos no originales de las muestras, productos de reordenamiento, oxidación y/o descomposición enzimática que resultan de reacciones sufridas por los OSCs durante su extracción y análisis (Iranshahi, 2013; Locatelli et al., 2015).

1.2.1.1.2. Técnicas modernas de extracción

Para superar las limitaciones de los métodos de extracción convencionales, se han propuesto nuevas y prometedoras técnicas de extracción. Algunas de las técnicas modernas de extracción son: la extracción asistida por ultrasonido (*ultrasound-assisted extraction*), la extracción asistida por microondas, extracción con fluidos supercríticos, y las técnicas de extracción miniaturizadas, ya sea en fase sólida o líquida. Las mismas se consideran que son más respetuosas con el medio ambiente debido a la reducción de productos químicos sintéticos y orgánicos en sus procesos, y al tiempo de extracción que también es reducido (Azmir et al., 2013). Adentrándonos en UAE, se sabe que el ultrasonido es un tipo especial de onda de sonido que sobrepasa el oído humano. Por lo general, en química se emplean ondas de 20 kHz a 100 MHz. Como otras ondas, pasa a

través de un medio creando compresión y expansión. Este proceso produce un fenómeno llamado cavitación, que significa producción, crecimiento y colapso de burbujas. El principal beneficio de la UAE se puede observar mayormente en muestras vegetales sólidas porque la energía de ultrasonido facilita la lixiviación de compuestos orgánicos e inorgánicos de la matriz de la planta. El contenido de humedad de la muestra, el grado de molienda, el tamaño de las partículas y el disolvente son factores muy importantes para obtener una extracción eficiente y eficaz. Así como la temperatura y el tiempo de extracción (Azmir et al., 2013; Chemat et al., 2017). Este tipo de extracción ha sido utilizada y con resultados favorables para extraer diversos compuestos bioactivos tales como compuestos fenólicos, compuestos volátiles y aromáticos, (Altemimi, Lakhssassi, Baharlouei, Watson, & Lightfoot, 2017; Chemat et al., 2017) . En el ajo, la extracción asistida por ultrasonido ha mostrado ser una técnica superior para la extracción de compuestos térmicamente lábiles, en particular, compuestos organoazufrados, en comparación con la destilación convencional y la extracción por hidrodestilación asistida por microondas (Poojary et al., 2017).

Por otro lado, las técnicas miniaturizadas de preparación de muestras proporcionan varias ventajas: alta velocidad de análisis con gran eficiencia, bajos costos de operación ya que el consumo de disolvente es muy bajo, los procedimientos analíticos son amigables con el medio ambiente, y el análisis es altamente selectivo, además de proporcionar un efecto de pre-concentración de analitos (Viñas, Campillo, López-García, & Hernández-Córdoba, 2014).

Las microextracciones en fase sólida (SPME) son muy utilizadas en análisis de alimentos. Basicamente, utiliza una fibra de sílice fundida recubierta en la parte exterior con una fase estacionaria adecuada. El analito en la muestra se extrae directamente sobre el recubrimiento de la fibra. La técnica de SPME se puede utilizar de forma rutinaria en combinación con cromatografía de gases (GC), GC-espectrometría de masas (GC-MS) o cromatografía líquida de alta performance (HPLC). Sin embargo estas técnicas dependen del uso de material adsorbente, el cual suele ser costoso, requieren tiempos de extracciones mayores de 30 minutos (sólo en la etapa de adsorción) y tienen un uso limitado sobre todo a especies químicas volátiles (Kataoka, Lord, & Pawliszyn, 2000).

Particularmente, las técnicas de microextracción en fase líquida consisten en procedimientos de pretratamiento de muestras, en el que sólo se requieren varios microlitros de disolvente para concentrar analitos a partir de diversas muestras, en lugar de cientos de mililitros empleados normalmente en las extracciones líquido-líquido tradicional. Son compatibles con la cromatografía de gases capilar (GC), electroforesis capilar (CE) y HPLC. En estas técnicas, la extracción tiene lugar normalmente en una pequeña cantidad de un disolvente inmiscible en agua (fase aceptora o extractante) a partir de una muestra acuosa que contiene analitos (fase donante) (Sarafraz-Yazdi & Amiri, 2010).

Las principales técnicas utilizadas son: microextracción de gota directamente suspendida (SDME) microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) y microextracción en fase líquida de fibra hueca (HF-LPME).

La DLLME fue introducida por primera vez en el año 2006 (Rezaee y col., 2006). Fue concebida originalmente como un sistema ternario de disolventes formado por una muestra acuosa que contiene los analitos, un disolvente de extracción inmiscible en agua, y un disolvente dispersante miscible tanto en agua, como en el extractante. La mezcla de los disolventes de extracción (la cual se encuentra en microlitros) y dispersión se inyecta rápidamente con una jeringa en la muestra acuosa. Los solutos hidrófobos, se enriquecen en el disolvente de extracción, que se dispersa en el seno de la solución acuosa. Lo que sucede a lo largo del proceso de extracción se puede resumir de la siguiente forma: la mezcla del solvente orgánico extractante y el dispersante al inyectarse rápidamente en la muestra produce turbulencia lo que provoca la formación de gotitas finas del extractante, que se dispersan a través de la muestra acuosa. Las gotitas emulsionadas tienen una gran área superficial y, en consecuencia, el equilibrio con los analitos se alcanza rápidamente y la extracción es casi instantánea. Después de la extracción, la mezcla turbia se centrifuga y las finas gotitas de la fase extractante decantan en la parte inferior del tubo. Finalmente la fase decantada se inyecta en el sistema cromatográfico, o es sometida a un proceso de secado para eliminar los solventes que no sean compatibles a HPLC y luego se redisuelve en metanol o fase móvil.

Al igual que en las extracciones líquido-líquido tradicionales, la microextracción con solvente se basa en la distribución del analito entre la fase que contiene la muestra (generalmente acuosa), y la fase extractante. El balance de masas establece que en todo momento el analito presente en la fase acuosa y orgánica debe ser igual a la cantidad inicial de analito en la muestra: $C_i.V_{aq} = C_{org}.V_{org} + C_{aq}.V_{aq}$. Donde:

- C_i : Concentración inicial del analito en la muestra acuosa
- V_{aq} : Volumen fase acuosa
- C_{org} : Concentración del analito en fase orgánica
- V_{org} : Volumen de fase orgánica

En el equilibrio la concentración del o los analitos tanto en la fase acuosa como orgánica es constante. Esto se puede determinar con el siguiente cociente: $K_d = C_{org}/C_{aq}$

Donde:

- K_d : Coeficiente de distribución del analito

La **figura 1.6.** muestra de forma esquematizada cada una de estas técnicas.

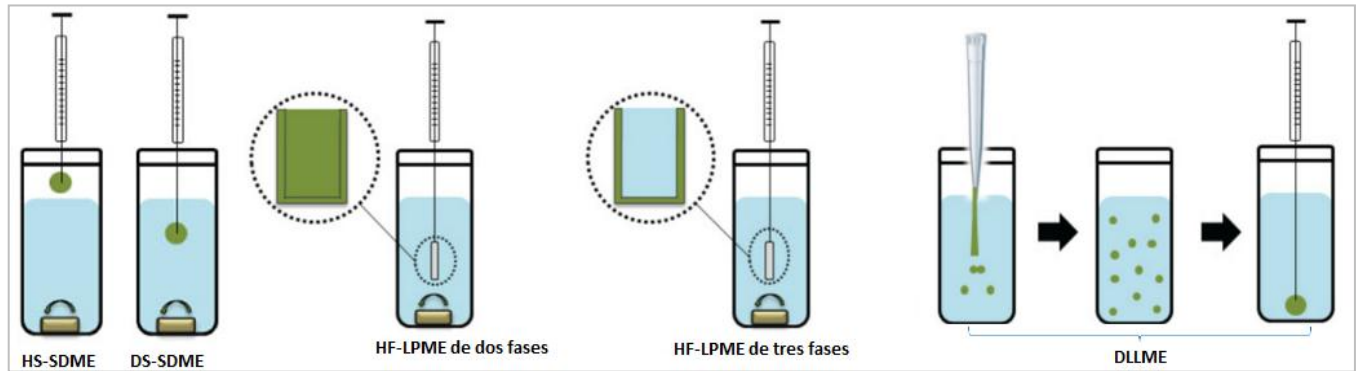


Figura I.6. Esquema de las principales microextracciones líquidas.

HS-SDME: *Head-Space Single Drop Microextraction* –Microextracción de gota en espacio de cabeza- ; **HF-LPME:** *Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction* –Microextracción en fase líquida con fibra hueca-; **DLLME:** *Dispersive Liquid Liquid Microextraction*

Como se ha mencionado anteriormente estas nuevas y eficientes técnicas de microextracción líquidas presentan grandes ventajas frente las técnicas de preparación de muestras que tradicionalmente se han utilizado y son numerosos los estudios en el área de alimentos que han aprovechado estas mejoras en sus análisis (Viñas y col., 2014), trabajando tanto con matrices líquidas (como jugos de frutas, vino, cerveza), y matrices sólidas (frutas y vegetales frescos, productos nutraceuticos).

1.2.1.2. Técnicas de Separación e Identificación de analitos en alimentos

Hay muchos métodos altamente sensibles y sofisticados para separar e identificar compuestos bioactivos presentes en alimentos o nutraceuticos. Los métodos más empleados de separación incluyen diferentes métodos cromatográficos, como cromatografía de gases (GC) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Las técnicas de identificación acopladas a estos instrumentos, por lo general incluyen espectroscopía y espectrofotometría, incluyendo espectrofotómetros de luz ultravioleta (UV), espectrómetros de masa (MS), fluorescencia, y además son posibles de encontrar detectores electroquímicos como los amperométricos (Iranshahi, 2013).

1.2.1.2.1. Principios básicos de Cromatografía

La cromatografía es esencialmente un método físico-químico de separación en el que los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una inmóvil (fase estacionaria), y otra móvil (fase móvil) la cual percola a través de la primera. El proceso cromatográfico se da como resultado de repetidas interacciones de

diferente naturaleza durante el movimiento de los componentes de la mezcla arrastrados por la fase móvil a lo largo del lecho estacionario (elución), produciéndose la separación debido a las diferencias en las constantes de distribución de los componentes de la mezcla entre la fase estacionaria y la móvil. Finalmente se obtiene un cromatograma que es el resultado gráfico de la cromatografía. En el caso de separación óptima, los diferentes picos o manchas del cromatograma se corresponden a los componentes de la mezcla separada (Quattrocchi, Abelaira de Andrizzi, & Laba, 1992).

1.2.1.2.2. Cromatografía Líquida de Alta Performance aplicada a la determinación de compuestos bioactivos

Los compuestos bioactivos pueden pertenecer a varias clases químicas. Sin embargo, su diversidad química y presencia en matrices complejas, como los alimentos, hacen que sea un desafío tanto para su aislamiento como para su caracterización. Para abordar este problema, se necesitan sistemas de separación eficientes, que se basan principalmente en la cromatografía (Cavaliere et al., 2018).

En este tipo de cromatografía la fase móvil es un disolvente o mezcla de disolventes y la fase estacionaria un sólido que interactúa con las sustancias que se desea separar (cromatografía líquido-sólido), o bien un líquido inmisible con la fase móvil, depositado en la superficie de un sólido (cromatografía líquido-líquido). La cromatografía líquida de alta performance (HPLC) se encuadra dentro de la cromatografía de líquida. En ésta, un líquido (fase móvil) circula en íntimo contacto con un sólido u otro líquido inmisible (fase estacionaria); al introducir una mezcla de sustancias (analitos) en la corriente de fase móvil, cada analito avanzará a lo largo del sistema con una velocidad diferente que dependerá de su afinidad por cada una de las fases. Una vez separados los diferentes compuestos pasan por un detector espectrofotométrico (UV por lo general) o de masas, emitiendo una señal acorde a cada analito, finalmente como resultado se obtiene un cromatograma (Moldoveanu & David, 2002).

1.2.1.2.2.1. Fases estacionarias y modos de elución

El principio básico de la separación cromatográfica es la migración diferencial de los analitos como consecuencia de sus diferentes afinidades con la fase estacionaria y la fase móvil. Se encuentran disponibles varios modos de cromatografía líquida, utilizando diferentes tipo de fase estacionaria, y los más utilizados en el estudio de compuestos bioactivos son **fase reversa** (RP, por sus siglas en inglés), intercambio iónico (IEC), afinidad, exclusión por tamaño (SEC) y **cromatografía líquida de interacción hidrofílica** (HILIC, por sus siglas en inglés). La mayoría de estos enfoques de separación se utilizan en la etapa final de identificación/cuantificación del analito, sin embargo, la aplicación en la etapa preparativa también es posible, para la reducción de la complejidad de la matriz, la

purificación del analito o el fraccionamiento de mezclas complejas (Cavaliere et al., 2018).

La cromatografía de afinidad y de exclusión por tamaño, quedan relegadas a analitos muy específicos y aminoácidos/proteínas. Lo que hace que la cromatografía en fase reversa y la cromatografía HILIC sean de las más usadas.

El mecanismo de retención de RP (modelo de adsorción y partición) se ha investigado en profundidad y se basa principalmente en interacciones hidrofóbicas entre las moléculas eluyentes y la fase estacionaria. Generalmente, se utilizan octadecilo (C18), octil (C8) u otras fases estacionarias de alquilo con enlaces de sílice o con enlaces poliméricos como fase estacionaria. Como fase móvil se emplean solventes de carácter polar o buffers, junto con modificadores orgánicos (mayormente metanol y acetonitrilo) (Cavaliere et al., 2018; Quattrocchi et al., 1992).

Entre los compuestos bioactivos no peptídicos, los fenoles son los más abundantes e investigados en los alimentos vegetales. Para la separación de estos compuestos naturales, las columnas con fase estacionaria C18 son las más utilizadas (Cavaliere et al., 2018). Sin embargo, dentro de los fenoles, muchos compuestos tienen la misma fórmula molecular o son isómeros posicionales, por lo que para una correcta identificación es importante obtener una adecuada separación cromatográfica que muchas veces no es alcanzada con fase reversa, y es por eso que en los últimos años se han tratado de proponer otras fases estacionarias para su separación como las fases HILIC (H. Zhang, Guo, Zhang, Xu, & Liang, 2008).

En el caso de los compuestos organoazufrados, este tipo de cromatografía aplicada al análisis de muestras de ajo se puede utilizar tanto fase reversa, como fase normal (fase móvil no polar con una columna de sílice). Pero es el modo en fase reversa lo más empleado (Ramirez et al., 2016).

Por otro lado, la cromatografía de interacción hidrófila (HILIC) se refiere a un modo alternativo de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para separar compuestos polares como azúcares, alcoholes y ácidos orgánicos mediante el empleo de una fase estacionaria polar (p. Ej., Amino, ciano, sílice) eluída con solución acuosa / orgánica (Buszewski & Noga, 2012). En consecuencia, las investigaciones en esta área coinciden en que las fases amino estacionarias, trabajando en modo HILIC, conducen a una separación óptima de azúcares simples (Karkacier, Erbas, Uslu, & Aksu, 2003; López Hernandez, González-Castro, Naya Alba, & de la Cruz García, 1998; Neue, Hudalla, & Iraneta, 2010).

Entre las hipótesis del mecanismo de retención en HILIC, la más acreditada propone la partición de solutos entre la fase móvil, y una capa de agua y parcialmente inmovilizada en la superficie de la fase estacionaria. Sin embargo, el mecanismo de separación real es más complejo, porque las diferencias en la selectividad cromatográfica de varios compuestos polares indican que la adsorción en los centros polares de la superficie de la fase sólida también puede contribuir a la retención (Cavaliere et al., 2018).

1.2.1.2.2. Detectores

La identificación de compuestos por HPLC es una parte crucial de cualquier determinación de analitos por esta técnica. Para la identificación, primero se debe seleccionar un detector. Esta selección depende de la naturaleza química del compuesto a identificar, la matriz en que se encuentra y el modo cromatográfico en que se eluye (Bernal et al., 2011; Sasidharan, Chen, Saravanan, Sundram, & Yoga Latha, 2011). Los detectores espectrofotométricos ultravioleta (UV) son los más populares entre todos los detectores, en análisis alimentos y nutraceuticos, porque ofrecen una alta sensibilidad y también porque la mayoría de los compuestos naturales encontrados tienen alguna absorbancia UV a longitudes de onda bajas (190-210 nm). La alta sensibilidad de la detección UV es una ventaja si un compuesto de interés solo está presente en pequeñas cantidades dentro de la muestra. Además de los rayos UV, también se están empleando otros métodos de detección para detectar fitoquímicos entre los que se encuentra el detector de arreglo de diodos junto con el espectrómetro de masas (MS). La cromatografía líquida junto con la espectrometría de masas (LC/MS) también es una técnica poderosa para el análisis de extractos botánicos complejos. Proporciona abundante información para la elucidación estructural de los compuestos cuando se aplica la espectrometría de masas en tándem (MS/MS) (Sasidharan et al., 2011). Sin embargo, esta técnica de detección no es asequible a todos los laboratorios analíticos, y además en el caso de los OSCs no siempre se encuentran disponibles datos en la bibliotecas de espectros de masas para confirmar su identificación.

1.2.1.3. Metodologías analíticas empleadas para la determinación de compuestos bioactivos presentes en ajo y productos a base de ajo

Como se ha discutido anteriormente, el ajo y sus productos son fuente numerosos compuestos bioactivos. Debido a las importantes y variadas propiedades asociadas a los compuestos organoazufrados, es que los mismos han sido objeto de estudio de la gran mayoría de publicaciones en cuanto a caracterización analítica de las matrices alimentarias o galénicas (Packia Lekshmi N.C.J, Viveka S, Jeeva S, 2015).

En algunos casos, los resultados de los análisis de los OSCs han generado una discusión controvertida, a menudo como resultado de una selección inadecuada del método o técnica utilizada para su determinación. Podría parecer que la mejor técnica para medir los compuestos volátiles del ajo es la cromatografía gaseosa (GC) en condiciones cuidadosamente controladas. Los componentes individuales pueden separarse mediante GC e identificarse mediante MS. Sin embargo, esta técnica puede arrojar resultados poco fiables, especialmente cuando el compuesto es inestable al calor, como los son los tiosulfatos. Por esta razón, la cromatografía líquida de alta performance (HPLC) se suele elegir para separar los compuestos susceptibles a cambios de temperatura (Packia Lekshmi N.C.J, Viveka S, Jeeva S, 2015). La separación, cuantificación y la variación en las cantidades de todos los tiosulfatos detectables presentes en homogeneizados de dientes de ajo se informó por primera vez en 1990

junto con un método estándar para la cuantificación de la alicina utilizando un patrón externo. En este método la preparación de la muestra fue relativamente simple e incluyó la homogeneización, filtrado e inyección directamente en el HPLC. La fase móvil para RP-C18 consistía en una mezcla 50:50 de metanol y agua (v/v). Este método posteriormente se amplió por Lawson (Lawson, 1993) para identificar y cuantificar una serie de tiosulfatos y además los productos de degradación que incluyen polisulfuros, vinilditiínas y ajoenos. En los siguientes años estas metodologías basadas en HPLC empleando fase reversa han sido mejoradas y empleadas para diversos análisis (Ramirez et al., 2016).

Respecto a los precursores del sabor en ajo, Kubec & Dadáková, en 2009 desarrollaron y validaron un nuevo método mediante HPLC para la determinación de una amplia variedad de derivados sulfo-sustituídos en especies de *Allium*. Este método permite la separación y cuantificación simultánea de S-alquencilisteína, γ -glutamyl-S-Alquencilisteínas y γ -glutamyl-S-Alquencilisteína sulfóxidos en una sola corrida (Lekshmi et al., 2015).

Por otro lado, se han reportado diversos análisis cuantitativos de flavonoides en ajo y/ sus productos, tanto en forma libre como conjugada, mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa, encontrando grandes variaciones en la eficacia según el tipo de columna empleada. Los mejores resultados se obtuvieron con las columnas C18 (Lanzotti, 2006). Los flavonoles han sido reportados como los compuestos fenólicos más abundantes en ajo (Beato et al., 2011). Los compuestos fenólicos generalmente se extraen de alimentos y suplementos dietéticos utilizando solventes orgánicos como acetona o metanol. Su purificación se realiza mediante extracción líquido-líquido con acetato de etilo o extracción en fase sólida mediante fases estacionarias C18. Se pueden fraccionar mezclas muy complejas que constan de ácidos fenólicos y flavonoides para simplificar la posterior separación cromatográfica. Para ello, la fase acuosa se ajusta a pH 7, lo que deja los ácidos fenólicos aniónicos insolubles en acetato de etilo, mientras que los flavonoides se extraen fácilmente (Schieber & Lopes-Lutz, 2011).

Para cuantificar el contenido de inulina en ajo los métodos analíticos empleados son amplios. En su mayoría se basan en cromatografía líquida, ya sea HPLC o HPAEC-PAD (*High Performance Anion-Exchange Chromatography equipped with Pulsed Amperometric Detection*). Previa a la determinación cromatográfica, los fructanos son sometidos a una hidrólisis para su correcta determinación. Aunque es una técnica oficial, no son muchos los trabajos que informan el uso de hidrólisis enzimática, siguiendo lineamientos del protocolo establecido por la AOAC (*Association of Official Agricultural Chemists*) número 999.03, o con modificaciones (Álvarez-Borroto et al., 2015; Mc Cleary, Murphy, & Mugford, 2000; Petkova & Denev, 2015), a excepción de Lisciani et al., 2017.

Lo que se puede destacar en relación a las metodologías analíticas reportadas para la determinación de los diferentes grupos de fitoquímicos presentes en ajo, es que el abordaje se realiza para cada grupo de compuestos bioactivos considerados por separado, y que los niveles informados en cada caso son muy

variables (Packia Lekshmi N.C.J, Viveka S, Jeeva S, 2015). Podemos decir que los estudios tradicionales de productos a base de ajo no han considerado un enfoque multi-fitoquímico para abordar integralmente sus actividades de promoción de la salud y que aún se puede trabajar más en la actualización de las metodologías empleadas para estar acorde a parámetros relacionados con química verde.

I.2.2. CINÉTICA EN EL ORGANISMO HUMANO DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS PRESENTES EN PRODUCTOS A BASE DE AJO

I.2.2.1. Biodisponibilidad de compuestos bioactivos y propiedades LADME

La determinación del contenido de compuestos bioactivos directamente de los alimentos no es suficiente para predecir el potencial de efectos *in vivo* de dichos compuestos, ya que para realizar tal aseveración, es necesario establecer además si los compuestos estarán biodisponibles, y en qué medida (Moreno & Ilic, 2018). El término **biodisponibilidad** tiene varias definiciones dependiendo del área de investigación que se aplica. Desde el punto de vista nutricional, la biodisponibilidad se refiere a la fracción de un compuesto o nutriente bioactivo ingerido que se encuentra disponible para su uso en funciones fisiológicas. Otra definición establece la biodisponibilidad como la proporción de un nutriente o compuesto bioactivo en un alimento o suplemento dado, que el cuerpo puede utilizar realmente. La biodisponibilidad es un concepto clave para una eficiente nutrición, con independencia del tipo de alimento considerado (ya sea funcional o no). Sólo ciertas cantidades de todos los nutrientes y componentes bioactivos en alimentos se utilizarán efectivamente por el organismo. Desde un punto de vista farmacológico, la Administración de Alimentos y Medicamentos de EEUU (FDA) define biodisponibilidad como la velocidad y extensión a la cual una fracción terapéutica se absorbe y se convierte en disponible en el sitio de acción del fármaco. El término "biodisponibilidad" incluye la liberación de del compuesto de su matriz alimentaria o de sus excipientes farmacológicos, la disponibilidad para la absorción, el metabolismo, distribución tisular, la excreción (LADME), y según el autor consultado, también puede incluirse la bioactividad (Fernández-García, Carvajal-Lérida, & Pérez-Gálvez, 2009; Rein et al., 2013). La **Figura I.7.** muestra un esquema con cada una de las etapas involucradas en la cinética de los compuestos bioactivos una vez que son ingeridos.

Considerando una ingesta oral, en primer lugar, deben ocurrir una serie de procesos que permitan la accesibilidad de los fitoquímicos, para que una vez liberados de la matriz alimentaria (o de excipientes farmacológicos) sean absorbidos, y a su vez deben superar una serie de "barreras" relacionadas con su solubilidad. En este caso, los compuestos deben disolverse en los fluidos del tracto gastrointestinal y sobrevivir a los diferentes rangos de pH ambientales, desde extremadamente bajo en el estómago hasta

ligeramente básico en algunos segmentos del intestino delgado. También pueden estar sometidos a degradación y metabolismo por enzimas intestinales, como las glicosidasas, esterasas, oxidasas e hidrolasas, que se originan tanto en el hospedador como en la miríada de microbiota que habita el tracto gastrointestinal (Y. Li & Paxton, 2010; Lutz, 2013). Un fitoquímico que pueda existir en una forma estable para sobrevivir en el entorno gastrointestinal (GI) y que tiene propiedades físico-químicas óptimas para penetrar la pared GI, es más probable que posea una biodisponibilidad oral aceptable y llegue al torrente sanguíneo, donde será luego distribuido hasta los tejidos donde realizará su acción biológica (Abourashed, 2013).

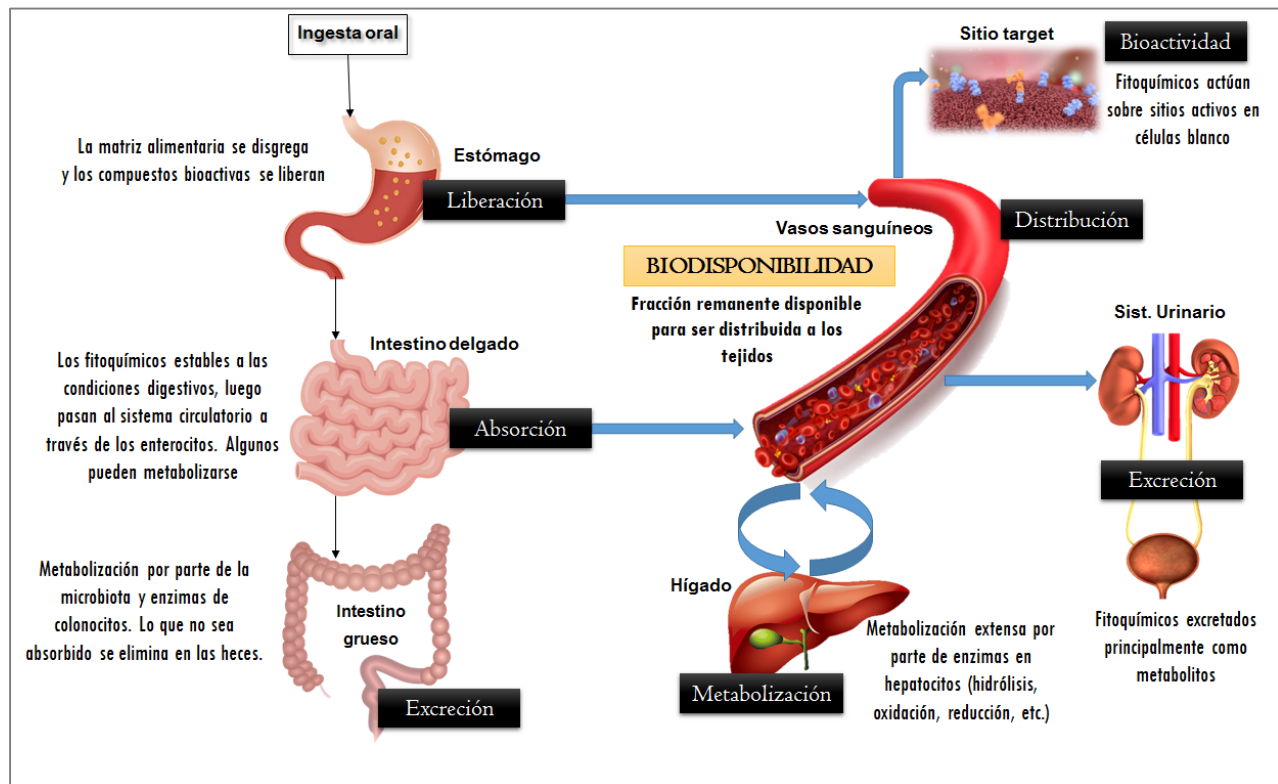


Figura I.7. Esquema de las etapas involucradas en la biodisponibilidad de compuestos

Fuente: Li & Paxton, 2010

Existen diferentes enfoques biológicos que pueden ser aplicados para medir la biodisponibilidad de nutrientes y compuestos bioactivos, los estudios *in vivo* e *in vitro* son los más usados y ambos poseen tanto fortalezas como inconvenientes. Dentro de los estudios *in vivo* podemos encontrar estudios de balance, medición tisular de la concentración de un compuesto y ensayos biológicos entre otros. Estos últimos permiten determinar la cantidad de un compuesto o metabolito que ha sido absorbido y/o metabolizado. Los estudios de balance, determinan la cantidad absorbida de un analito midiendo la diferencia entre lo ingerido y las cantidades excretadas del nutriente o compuesto bioactivo. La concentración tisular consiste en el seguimiento del incremento en el plasma/suero de la concentración del compuesto bioactivo, el cual puede estar marcado

para su seguimiento. Estos enfoques se han aplicado ya sea con sujetos animales o humanos para determinar la absorción de hidratos de carbono, minerales, vitaminas, fitoquímicos, y otros. La digestión y absorción implican varios pasos diferentes, y cada uno podría causar un efecto sobre el nutriente o compuesto bioactivo de modo que no se obtiene una imagen detallada con los estudios de balance y los bioensayos (Fernández-García et al., 2009).

También se desarrollan estudios *in vitro* para simular condiciones fisiológicas correspondientes a la secuencia de eventos que se producen durante el pasaje de los fitoquímicos en el tracto gastrointestinal humano. Entre estos modelos se incluyen: digestión gastrointestinal simulada, membranas artificiales, cultivos de células Caco-2, membranas celulares aisladas / reconstituidas y *ussing chambers*. Por otro lado son comunes de encontrar técnicas *ex vivo* (basadas en el uso de órganos gastrointestinales operando bajo condiciones de laboratorio) y ensayos *in situ* (perfusión intestinal en animales) (Fernández-García et al., 2009; C. Torres-Palazzolo et al., 2018).

1.2.2.2. Antecedentes acerca de la biodisponibilidad de compuestos bioactivos de productos a base de ajo

Respecto al ajo y sus productos, la determinación de la biodisponibilidad de sus compuestos biológicamente activos es esencial. Sin embargo, si bien existen miles de artículos publicados en relación a ensayos preclínicos y clínicos sobre los compuestos organoazufrados del ajo, el metabolismo de los mismos y la cinética de estos compuestos detrás de sus efectos beneficiosos para la salud aún no se conocen bien (Cuicui, Xiaoyan, Haina, Zhongxi, & Weihong, 2013). Más aún la biodisponibilidad de otros grupos de fitoquímicos como los flavonoides y los fructanos en esta matriz, es aún más desconocida.

Entre los compuestos organoazufrados del ajo, se han realizado estudios de farmacocinética, biodisponibilidad y distribución tisular sobre aliina, alicina, dialil disulfuro (DADS), dialil trisulfuro (DATS), vinilditiinas y ajoenos. Freeman y colaborador (Freeman & Kodera, 1995) informaron de que al ingerirse la alicina la misma sufre transformaciones químicas y terminan apareciendo sus metabolitos en sangre. Se encontró que la alicina desapareció rápidamente de la sangre dentro de unos pocos minutos, mientras que se formaron DADS y **alil mercaptano** (AM) como metabolitos principales. Es notable también que la alicina actúa como oxidante en la sangre. Cuando ésta se mezcla con sangre *in vitro*, casi toda la alicina desaparece a los pocos minutos, ya que se une a proteínas de los eritrocitos y los oxida inmediatamente (C. Torres-Palazzolo et al., 2018). Rosen junto con otros investigadores, indicaron que la alicina se descompone en el ácido del estómago para liberar DAS, DADS, y otros compuestos volátiles que se postulan son metabolizados por el glutatión o S-adenosilmetionina para formar alil metil sulfuro y alil metil sulfóxido ambos medidos en

respiración humana después del consumo de ajo crudo. Egen-Schwind y col. (Egen-Schwind, Eckard, & Kempfer, 1992) informaron de un efecto de primer paso notable de alicina en hígado de rata. Se verificó que se forma rápidamente DADS después de la perfusión del hígado con alicina en una concentración baja. Más tarde, se observó la formación de alil mercaptano en la bilis recogida así como en el tejido hepático. Sin embargo no se pudo detectar alicina en el hígado (Amagase, 2006). En un estudio reciente de nuestro grupo de trabajo (C. Torres-Palazzolo et al., 2018), encontramos que la alicina presentó alta bioaccesibilidad, indicando, en coincidencia con otros autores (Freeman & Kodera, 1995), que el pH gástrico o intestinal puede no ser el factor clave que afecta la descomposición de la alicina, pero sí afectan su biodisponibilidad etapas posteriores como el pasaje a través de los enterocitos o su interacción con diferentes componentes de la sangre (Cuicui et al., 2013).

DAS y las vinilditiinas son los principales componentes de preparaciones de aceite de ajo y aceite macerado. 2-vinil-4H-1,3-ditiina y 3-vinil-4H-1,2-ditiina, han logrado ser detectados en el suero, riñón y tejido graso 24h después de la ingestión oral, mientras que sólo las 1,3-vinilditiinas fueron encontradas en el hígado. No se han encontrado metabolitos de vinilditiinas en hígado perfundido de rata o bilis. Un estudio logró mostrar información acerca del destino metabólico de DADS marcado con ³⁵S después de inyección intraperitoneal en ratas. La concentración máxima de DADS marcado con ³⁵S en hígados se produjo 90 minutos después del tratamiento. El setenta por ciento de la radioactividad se distribuyó en el citosol del hígado, de los cuales el 80% del compuesto se metabolizó a sulfato. Por otro lado, la incubación de los analitos en sangre a 37°C demostró la rápida disminución de ajoeno (vida media, 1 min) y DATS (vida media, 4 min), mientras que 1,2-vinilditiina (vida media, 15 min) y DADS (vida media, 60 min) disminuyeron más lentamente (Amagase y col., 2001). En todos los casos el metabolito encontrado en sangre luego de la incubación con los distintos analitos fue alil mercaptano (Lawson, 1993). A su vez se supone que el alil mercaptano es sólo un metabolito intermediario, ya que éste luego termina transformándose en alil metil sulfuro (AMS) y luego por reacciones de oxidación son transformados en alil metil sulfóxido (AMSO) y alil metil sulfona (AMSO₂), ambos medidos en sangre y en aliento (Cuicui y col., 2013).

Un estudio farmacocinético de SAC en humanos se realizó mediante la administración oral de una preparación de ajo conteniendo este compuesto. El SAC del consumo de ajo se absorbió rápidamente en el tracto gastrointestinal. La vida media de SAC en humanos después de la administración oral fue de más de 10 horas y el tiempo de aclaramiento se estimó en más de 30 horas (Cuicui et al., 2013).

Debido a que los compuestos alicina, ajoenos, vinilditiinas y DADS han sido encontrados en bajas concentraciones en sangre o en orina después del consumo de ajo, es probable que estos no sean los compuestos activos *per se* sino que son sus metabolitos los que terminen ejerciendo los efectos biológicos

que se le atribuyen al ajo. Respecto a estos compuestos resta aún esclarecerse si la concentración eficiente de compuestos organosulfurados utilizados en cultivos *in vitro* se puede lograr en humanos; evaluar los metabolitos activos apropiados para determinar los efectos sinérgicos entre ellos y los objetivos terapéuticos; establecer la relación entre la farmacocinética y la farmacodinamia de los compuestos organoazufrados en modelos animales y humanos apropiados; y por último, profundizar en los mecanismos moleculares involucrados en las distintas etapas del proceso de biodisponibilidad de los compuestos para eventualmente emplear esos datos en el diseño de fármacos o en recomendaciones adecuadas de consumo de alimentos.

1.2.2.3. Importancia de la permeabilidad de los compuestos en los estudios de biodisponibilidad

Cuando se analizan opciones durante el diseño de preparaciones galénicas, la evaluación de la idoneidad de los compuestos candidatos generalmente se basa en la detección temprana de las propiedades de LADME. Dentro de estas, la permeabilidad celular de las sustancias químicas es uno de los parámetros fisicoquímicos clave que se deben considerar al seleccionar los compuestos. Para ser absorbido, un fármaco tiene que difundirse a través de una serie de compartimentos separados y, entre ellos, la capa única de células epiteliales es la barrera más importante para la absorción del fármaco (Gozalbes, Jacewicz, Annand, Tsaion, & Pineda-Lucena, 2011). A continuación se discutirán las implicancias y retos que están involucrados en la etapa de permeabilidad.

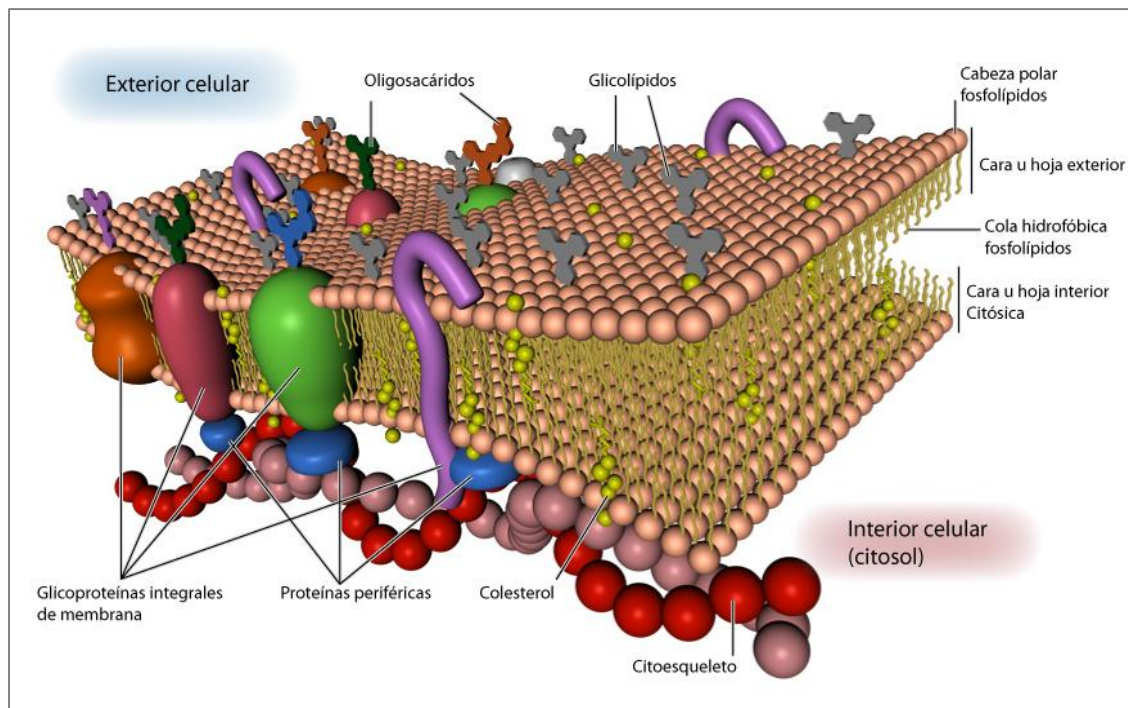
1.2.2.3.1. Estructura de las membranas celulares

Las sustancias con potencial principios activos se pueden administrar por dos vías principales, enteral y parenteral. La vía enteral implica que el compuesto sea administrado a través del tracto gastrointestinal (GI), también incluye bucal, sublingual y rectal. Parenteral se aplica a drogas y principios activos administrados por otras vías, es decir, inyecciones intravenosas e intramusculares, absorción a través de la piel (inyecciones percutáneas, intradérmicas y subcutáneas), inhalación, entre otros. Independientemente de la vía de exposición, la absorción del fármaco es un requisito para que una sustancia sea capaz de producir un efecto biológico en algún tejido target.

La absorción de una sustancia química, cualquiera sea su vía de ingreso, implica su paso a través de las membranas celulares. A pesar de la diversidad de funciones de las membranas, existe un consenso sobre su estructura básica. La membrana celular básica comprende un complejo de múltiples especies de lípidos y proteínas de membrana. Tres clases principales de lípidos están incluidos en las membranas, glicerofosfolípidos, esfingolípidos y colesterol, formando una bicapa de aproximadamente 5 nm de ancho.

Espacialmente, estos lípidos se distribuyen asimétricamente a través de la bicapa con ésteres de ácidos grasos orientados con sus porciones hidrófobas en el interior y sus porciones hidrofílicas orientadas hacia el entorno acuoso exterior. Asociadas con las moléculas de lípidos hay moléculas de proteína globulares incrustadas en la membrana o que la atraviesan (Escuder-Gilabert, Martínez-Pla, Sagrado, Villanueva-Camañas, & Medina-Hernández, 2003; Yang & Hinner, 2015). La **Figura I.8.** muestra el modelo propuesto por Sigel & Nicolson de la membrana celular.

Figura I.8. Modelo de la estructura de las membranas celulares



Fuente: Oltra Noguera, 2010, adaptado de
http://212.170.234.76/wikiEducared/images/5/5b/Membrana_con_elementos.jpg

El interior no polar de una bicapa lipídica impide el paso directo de cualquier sustancia soluble en agua a través de esta membrana, siendo esta barrera al flujo descontrolado de compuestos moleculares un beneficio para la supervivencia de la célula. Existen, sin embargo, algunos pasajes de conexión entre el exterior y los compuestos interiores de la célula, pasajes que están conformados principalmente por proteínas dispersas aleatoriamente a lo largo de toda la membrana.

1.2.2.3.2. Mecanismos de permeación

Los compuestos pueden atravesar las membranas celulares de varias formas: **permeación pasiva** (difusión) a través de la bicapa lipídica, **transporte pasivo**, a través de canales de membrana o poros, **transporte activo** (con gasto de energía), **transporte facilitado** (transporte mediado por portadores) y **fagocitosis**. Sin embargo, la mayoría de las sustancias con principios activos atraviesan las células por permeación pasiva. En este proceso, una sustancia se disuelve en la bicapa lipídica de la membrana, penetra a través de la membrana y entra en el citoplasma de la célula. Para establecer un gradiente de concentración adecuado para la permeación, la sustancia no solo debe ser afín a fases lipídicas, sino que también debe ser suficientemente soluble en agua debido a la naturaleza acuosa de los espacios extracelulares e intracelulares (Escuder-Gilabert et al., 2003).

El **coeficiente de permeabilidad** P_m expresa cuantitativamente la permeabilidad de una molécula dada (típicamente en unidades de cm/s), y aporta una medida de qué tan rápido puede atravesar una membrana tal compuesto (Yang & Hinner, 2015). Este coeficiente P_m está relacionado linealmente con el coeficiente de partición del compuesto en la membrana, K_m , y su coeficiente de difusión de la membrana o difusividad, D_m :

$$P_m = \frac{K_m D_m}{L}$$

siendo L , el espesor de la membrana bicapa. K_m es la principal fuente de variación de la permeabilidad del compuesto químico que desea ingresar a las células. Este coeficiente muchas veces se reporta como **P_{eff} , permeabilidad efectiva**, referida exclusivamente a permeabilidad intestinal, que tiene en cuenta la velocidad aparente de absorción de los compuestos y el radio del lumen intestinal. Las propiedades físico-químicas de los compuestos son las que determinarán la capacidad de permeación de una sustancia (Escuder-Gilabert et al., 2003).

1.2.2.3.2.1. Difusión Pasiva

Como se mencionó en la sección anterior, el transporte por difusión pasiva de los compuestos con principios activos, es el tipo de pasaje más común de las sustancias hacia y desde el interior de las células, es por esta razón que nos enfocaremos en la discusión de este tipo de mecanismo de permeación, que es clave en la disponibilidad final de los fitoquímicos en el organismo humano.

Este tipo de transporte consta de dos vías: la **vía paracelular**, en la que el principio activo difunde a través de los poros acuosos en las uniones estrechas que se presenten entre las células, y la **vía transcelular** (lipofílica), que requiere la difusión del compuesto químico a través de la bicapa lipídica que forma las membranas celulares. En la difusión paracelular, las moléculas del principio activo, ya sean fitoquímicos o fármacos, que se absorben a través de esta vía son moléculas pequeñas (p. Ej., Peso molecular menor a 250 g/mol) y de naturaleza hidrofílica ($\log P < 0$) (El-Kattan & Varma, 2016). Debido a que el complejo de unión tiene una carga neta negativa, las moléculas cargadas positivamente pasan más fácilmente, mientras que las moléculas cargadas negativamente son repelidas. La vía transcelular, por otro lado, es la principal vía de absorción de la

mayoría de las moléculas de fármacos o compuestos bioactivos naturales (Yang & Hinner, 2015). Los compuestos que se absorben a través de esta vía son limitados, sólo permean aquellos con una lipofilicidad equivalente a $\text{Log } P > 0$ y peso molecular menor a 300 g/mol. La membrana plasmática es prácticamente impermeable contra moléculas polares no cargadas más grandes y todas las moléculas cargadas, incluidos los iones. De hecho, a pesar de su pequeño tamaño, el Na^+ y el K^+ tienen coeficientes de permeabilidad extremadamente bajos (aproximadamente 10^{-14} cm/s) (El-Kattan & Varma, 2016). En este sentido, se afirma entonces que son los parámetros físico-químicos propios de cada molécula los que determinan las interacciones de cada compuesto con los componentes de la membrana, y por ende su pasaje.

1.2.2.4. Modelos experimentales para estudiar la permeabilidad

El conocimiento del grado de permeación de fármacos y compuestos naturales es especialmente importante para predecir con precisión el potencial bioactivo de ese compuesto. La mayoría de los estudios que se llevan a cabo en relación a permeación de compuestos están enfocados en la absorción intestinal, pero en algunos casos dichos modelos pueden extrapolarse o adecuarse a otros tejidos.

Respecto a la información disponible, podemos decir que existen numerosos modelos de absorción GI que investigan: (a) los mecanismos de transporte, (b) determinación el P_{eff} , y (c) predicen el perfil farmacocinético plasmático de cada compuesto. Estos modelos a menudo se aplican en el siguiente orden: *in silico*, *in vitro*, *in situ* y, lo más importante, *in vivo* (Tabla 1.5). Los modelos *in silico* del proceso de absorción del tracto gastrointestinal se han utilizado recientemente para optimizar la tasa de liberación de compuestos de su matriz alimentaria o de excipientes en preparaciones galénicas, y a su vez para determinar la dosis y la distribución de las diversas fracciones liberadas (Dahlgren & Lennernäs, 2019). La predicción *in silico* precisa y confiable llega de forma alternativa desde la química medicinal para complementar otros modelos experimentales, y permite no sólo comenzar con la selección de entidades químicas propicias para ciertos efectos biológicos durante las primeras etapas del desarrollo de fármacos, sino que también permiten adentrarse en los mecanismos moleculares implicados en las interacciones entre compuestos químicos-barreras fisiológicas. (Gozalbes et al., 2011; Sjögren et al., 2013)

Los modelos de evaluación *in vivo* de permeabilidad emplean por lo general mamíferos (p. Ej., ratones, ratas, perros y monos), no mamíferos (p. Ej., artrópodos) y ensayos clínicos en humanos. Aunque la evaluación *in vivo* es más relevante, los modelos *in vitro* (y *ex vivo*) de permeabilidad son frecuentes y se basan en el uso de órganos aislados o monocapas de células cultivadas como membrana de barrera. En el primer caso, se usan comúnmente preparaciones intestinales aisladas de diversos orígenes de mamíferos, mientras que las líneas celulares de cáncer de colon humano tipo 2 (Caco-2) se usan comúnmente para el último (Abourashed, 2013).

Tabla I.5. Resumen de los principales modelos experimentales para evaluar permeabilidad

Modelos experimentales de permeabilidad		
Tipo de Ensayo	Características	Referencias
<i>In Vivo</i>	<p>Soluciones o formulaciones de compuestos se administran por vía oral o directamente en el estómago o el intestino de ratas u otros mamíferos.</p> <p>Implican grandes desafíos a la hora de analizar resultados y son complejos en cuanto a la aplicación de protocolos de uso de animales y tejidos humanos. Son costosos y largos en relación a otros modelos</p>	Dahlgren & Lennernäs, 2019
<i>Ex Vivo/In Situ</i>	<p>Modelos tisulares; Perfusión intestinal en ratas <i>in situ</i>; <i>ussing chambers</i>; sacos no evertidos (<i>ex vivo</i>)</p> <p>Los modelos <i>in situ</i> se basan en la desaparición del compuesto analizado en un segmento de intestino perfundido.</p> <p>En <i>Ussing Chambers</i>, se monta tejido intestinal de rata o humano entre 2 medias cámaras, para investigar las diferencias en la absorción regional de fármacos, el transporte mediado por portadores y el impacto del metabolismo intestinal en el transporte de fármacos.</p> <p>Los modelos <i>ex vivo</i>, se basan en la extracción de secciones del intestino de ratas o ratones, y bajo condiciones de laboratorio que simulan el entorno de dichos órganos, se mide el pasaje del contenido de los sacos a diferentes tiempos.</p> <p>Desventajas: emplean tejidos vivos por lo que implican protocolos éticos de manejo de material biológico y en algunos casos el sacrificio del animal</p>	Berben et al., 2018; Dahlgren & Lennernäs, 2019; Torres-Palazzolo et al., 2018
	<p>Modelos Celulares</p> <p>Caco-2; MDCK</p> <p>Basados en cultivos de células soportadas en cámaras de crecimiento permeables que permiten el pasaje de compuestos de un lado a otro de la cámara.</p> <p>Muestran características estructurales y biológicas propias de los epitelios intestinales (p. Ej., microvellosidades y <i>tight junctions</i>)</p> <p>Permiten estudiar permeabilidad mediada por transportadores y metabolismo enzimático (más información que la difusión pasiva)</p> <p>Desventajas: sólo usan un tipo de células, tiempos de cultivos extensos, laboriosos, y costosos</p>	
<i>In Vitro</i>	<p>Modelos No Celulares</p> <p>PAMPA; PVPA; cromatografía biomimética</p> <p>Se basan en membranas artificiales para estudiar permeabilidad transcelular.</p> <p>Las barreras PAMPA generalmente consisten en un filtro (por ejemplo, fluoruro de polivinilideno (PVDF) empapado con fosfolípidos disueltos en un solvente orgánico.</p> <p>Las barreras PVPA usan material poroso en el que se ubican liposomas de fosfolípidos pero disueltos en buffer.</p> <p>Se mide el pasaje de compuestos de un lado y del otro de membranas.</p>	Berben, Brouwers, & Augustijns, 2018; Buckley, Fischer, Fricker, & Brandl, 2012; Ermondi, Vallaro, & Caron, 2018

	La cromatografía biomimética busca emular los procesos dinámicos propios de la permeación. Están basadas en columnas con fases estacionarias de membranas inmobilizadas o cromatografía micelar.	
<i>In Sílico</i>	SIMULACIONES; QSAR; PBPK	Dahlgren & Lennernäs, 2019; Gozalbes et al., 2011; Sjögren et al., 2013
	<p>Se emplean en las primeras etapas del diseño de fármacos</p> <p>Basado en métodos computacionales soportados por estadística multivariada</p> <p>Aportan información propicia para: (a) seleccionar compuestos permeables; (b) inferir acerca de las características fco-químicas de las moléculas que limitan su pasaje</p> <p>Modelos más complejos incluso simulan procesos globales de biodisponibilidad a partir de ingesta oral</p>	

MDCK = *Madin-Darby canine kidney cells* (cel. riñón caninas); PAMPA = *Parallel artificial membrane permeability assay* (ensayo de permeabilidad basado en memb. Artificiales); Caco-2 = línea cel. intestinales tumorales humanas; PVPA = *Phospholipid vesicle-based permeation assay* (ensayo de permeación basado en vesículas de fosfolípidos paralelas); QSAR = *Quantitative Structure-Activity Relationship*; PBPK, *physiology based pharmacokinetic* (Farmacocinética basada en fisiología humana)

1.2.2.5. Antecedentes de la permeabilidad de compuestos bioactivos del ajo y sus productos

En relación con los datos de permeabilidad reportados sobre los fitoquímicos del ajo, las publicaciones disponibles se enfocan exclusivamente en los compuestos organoazufrados. En esta tesis seguiremos esta tendencia y ahondaremos en la permeabilidad de estos compuestos. En relación a estos, se ha argumentado que la alicina, uno de los principales compuestos bioactivos relacionados con el ajo y sus productos, puede penetrar fácilmente las membranas celulares de las bicapas fosfolipídicas, allí realiza su actividad intracelular e interactúa con grupos sulfhidrilos (SH). A pesar de esta alta permeabilidad, la alicina se metaboliza rápidamente y se transforma en otros compuestos activos. Otros OSCs como SAC, dialil disulfuro y dialil trisulfuro también han mostrado una alta permeabilidad celular, aunque su rango de permeabilidad entre cada compuesto y tejido (M. S. Rahman, 2007). En otra nota, se investigaron las propiedades farmacocinéticas de las vinilditiinas. La 1,3-vinilditiina parece ser menos lipofílica y se eliminó rápidamente del suero, los riñones y el tejido graso, mientras que la 1,2-vinilditiina es más lipofílica y mostró una tendencia a acumularse en el tejido graso (Egen-Schwind et al., 1992).

En un trabajo de nuestro grupo de investigación (C. Torres-Palazzolo et al., 2018), demostramos que la alicina, el DAS y las 2VD podrían penetrar menos del 5% a través del intestino, usando como modelo experimental sacos evertidos a partir de ratas. Algo que se ha discutido ampliamente es la rápida reacción de los OSCs con los componentes sanguíneos, dando lugar a diferentes metabolitos con posibles efectos bioactivos en el organismo (Gao, Wang, & Jiang, 2013; Lawson & Gardner, 2005).

Más allá de la información disponible, datos *in vivo* acerca de absorción intestinal y a través de otras barreras biológicas aún no son posibles de encontrar. A su vez, es necesario profundizar en la base estructural de los mecanismos de la etapa de permeabilidad a nivel molecular, hecho que podría estudiarse mediante modelos *in silico*, que combinen información *in vitro* junto con información molecular.

I.2.3. QSAR: RELACIONES CUANTITATIVAS DE ESTRUCTURA-ACTIVIDAD

I.2.3.1. Fundamentos y Objetivos de los modelos QSAR

Como se mencionó en párrafos anteriores, cuando se consideran los métodos computacionales o *in silico*, un tipo particular de modelo destaca por sus grandes aplicaciones en la química medicinal y en la industria farmacéutica. Dichos estudios se basan en la premisa de que puede establecerse la relación existente entre la estructura química de compuestos diana, y la actividad/propiedad objeto de interés. Normalmente son denominados con los acrónimos QSAR/QSPR (de sus siglas en inglés: *Quantitative Structure- Activity Relationships/Quantitative Structure-Property Relationships*) (Gozalbes et al., 2011).

Los orígenes de esta metodología de modelación quimioinformática se remontan hasta mitad del siglo pasado en la práctica farmacéutica y toxicológica, con utilidad además en la agroquímica y la química medioambiental. Inicialmente apareció la Teoría de Crum- Brown, representando el primer sistema de representación gráfica de compuestos químicos, preludio de los que hoy se conocen como descriptores moleculares. Con ellos comenzó la idea de que podía existir una relación entre las actividades biológicas y las estructuras de moléculas. Pero se considera como padre del concepto QSAR (/QSPR) a Herman Hansch, quien definió una correlación cuantitativa entre características físico-químicas de las moléculas con actividades biológicas. Actualmente, los modelos QSAR son tan requeridos y utilizados que múltiples trabajos científicos enfocan sus esfuerzos en esta área (Cajamarca, 2015; Goya-Jorge, Julián-Ortiz, & Gozalbes, 2020; Leszczynski, 2010).

Si de definiciones hablamos, los modelos QSAR pueden entenderse como una **metodología de análisis que busca relacionar matemáticamente las características fisicoquímicas de una serie de compuestos, y su actividad biológica cuantificada**; lo cual permite explicar la actividad de esos compuestos e incluso predecir la de aquellos que aún no han sido sintetizados o probados, evitando pasar por el proceso a prueba y error de síntesis orgánica (Cajamarca, 2015; Lozano-Aponte & Scior, 2012). Siguiendo los conceptos introducidos por Hansch, 1969, en los modelos más simples de QSAR, la actividad biológica se ve representada como una función de las características surgidas de la estructura química de la molécula, lo cual matemáticamente puede expresarse de la siguiente manera:

$$A = f (X_1; X_2; X_3; \dots; X_n)$$

Donde A, es la respuesta biológica a modelar (variable dependiente), la cual es función de X_n , que son las variables independientes surgidas a partir de las características estructurales de las moléculas.

En los modelos más complejos, que en sí son la mayoría, se requieren tres tipos de información para armar un modelo: (A) la estructura molecular de diferentes compuestos, que se consideran como ligandos ante una diana biomolecular común (o un efecto físico-químico, parámetro cromatográfico, etc.); (B) datos de una actividad biológica (o propiedad), de cada uno de los ligandos incluidos en el estudio (p. Ej., DE_{50} , DL_{50} , K_i , P_{eff} , $\log P_{exp}$, entre otros); y (C) características físico-químicas (descriptores numéricos) de los ligandos, calculados por medios computacionales a partir de la estructura molecular generada *in silico* (Lozano-Aponte & Scior, 2012). Con los datos a modelar (variables) se arman matrices – se denomina matriz X al conjunto de **variables independientes** conformada por los **descriptores**, y matriz Y, a la/s **variable/s dependiente** constituida por la **respuesta** a modelar. A partir de dichas matrices, se pueden obtener varios tipos de relación por medios estadísticos u otros (redes neuronales, *machine learning*).

La **Tabla I.6.**, que se presenta a continuación, resume los objetivos con los que se emplean los modelos QSAR, y sus principales usos.

Tabla I.6. Generalizaciones acerca de los propósitos y aplicaciones de los modelos QSAR

Objetivos
Predecir una actividad biológica y/o prop. fco-químicas por medios racionales.
Comprender los mecanismos de acción dentro de una serie de compuestos químicos.
Ahorrar el costo de desarrollo de productos, principalmente farmacéuticos.
Reducir y/o evitar grandes requerimientos de uso de animales en ensayos.
Promover qca verde aumentando la eficiencia y reduciendo la eliminación de residuos.
Aplicaciones
La identificación racional de nuevas entidades químicas con actividad farmacológica, biocida o pesticida.
La optimización de la actividad farmacológica, biocida o pesticida.
La predicción de la toxicidad para los seres humanos a través de la exposición ocupacional, ocasional y deliberada.
La identificación de compuestos peligrosos en las primeras etapas del desarrollo de productos o la selección de inventarios de compuestos existentes.
La predicción de una variedad de propiedades físico-químicas de un conjunto de moléculas.

La selección de compuestos con propiedades farmacocinéticas óptimas, ya sea estabilidad o disponibilidad en sistemas biológicos.

Fuente: LESZCZYNSKI, 2010

1.2.3.2. Componentes y metodología de los estudios QSAR

El desarrollo de los modelos QSAR está continuamente actualizándose y presenta diversas variaciones según la información que buscan analizar y aportar. Sin embargo, existen una serie de pasos generalmente comunes al considerar la sistemática de estos estudios (Goya-Jorge et al., 2020). En la **Figura I.9.** se resume la metodología a seguir. Se parte de un set de compuestos parientes químicos.

Un paso clave en el desarrollo de los modelos, es la parametrización cuantitativa o descripción numérica de las moléculas. En otras palabras, el cálculo de **descriptores moleculares** obtenidos mediante un proceso lógico-matemático de transformación de la información química contenida en la representación simbólica de una molécula (Cajamarca, 2015; Todeschini & Consonni, 2009).

Estos descriptores se dividen en dos grupos: aquellos basados en medidas experimentales (p. Ej. polarizabilidad, log P, refractividad molar), y los derivados de la representación simbólica de las moléculas, también conocidos como descriptores teóricos (índices surgidos de leyes y teorías, o resultados de algoritmos computacionales). Los descriptores teóricos, además, se clasifican en descriptores de 0-3D dependiendo de la información estructural que contienen. En los descriptores 0D tiene en cuenta únicamente la fórmula química de los compuestos (peso atómico, número de átomos). Los descriptores 1D consideran fragmentos estructurales de las moléculas, pero sin tener en cuenta la estructura molecular en su conjunto (conteo de grupos funcionales, o de sustituyentes de interés). Los descriptores 2D (o topológicos) consideran la conectividad de los átomos, así como las interacciones intra/intermoleculares. Los descriptores 3D (o geométricos) tienen en cuenta elementos estereoquímicos de los átomos (Goya-Jorge et al., 2020).

Para evaluar, luego, estos datos multivariados, la **quimiometría** aporta un set de herramientas matemáticas y estadísticas. Según la propiedad o actividad considerada como respuesta, se pueden distinguir dos tipos de modelos: de **regresión**, cuando la variable respuesta es cuantitativa, y los de **clasificación**, cuando se modelan categorías o clases. Estos modelos pueden, o no, ser lineales. Los métodos estadísticos lineales que tradicionalmente se usan para relacionar la estructura con la actividad de los compuestos son el análisis discriminante lineal (LDA) -para datos categóricos- y la **regresión lineal múltiple** (MLR) para los datos cuantitativos (Goya-Jorge et al., 2020; Júnior et al., 2017).

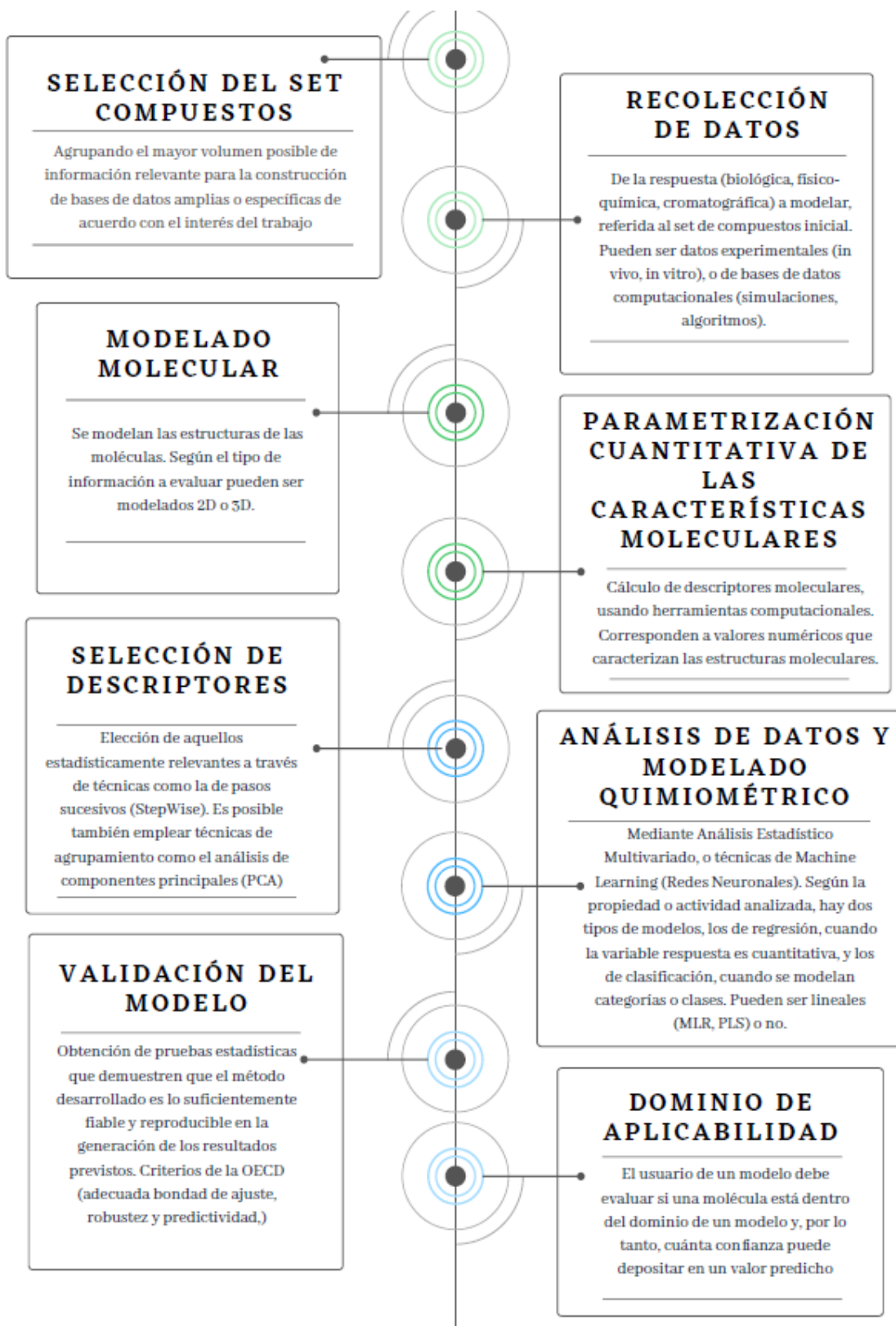


Figura I.9. Esquema resumido con los pasos involucrados en el desarrollo de modelos QSAR/QSPR

Fuente: (Goya-Jorge et al., 2020; Leszczynski, 2010).

Una profunda discusión acerca de los descriptores moleculares y la quimiometría asociada con los modelos QSAR se presenta en el capítulo III.

I.2.3.3. Modelos QSAR para estudiar propiedades LADME

Entre las muchas aplicaciones de los modelos de Relación Estructura-Actividad Cuantitativos (QSAR), se encuentra la predicción y/o evaluación de propiedades farmacocinéticas. Mayormente, los modelos *in silico* en esta área se han enfocado en la determinación de permeabilidad intestinal, ya que principalmente es la industria farmacéutica la que emplea este tipo de herramientas para el desarrollo de fármacos administrados de forma oral que representa más del 80% de las formas farmacéuticas en el mercado mundial (J. Wang & Hou, 2015). A esto se le suma los intereses más recientes en los alimentos funcionales y suplementos nutracéuticos, que también buscan identificar y analizar las propiedades LADME de sus compuestos bioactivos.

Como se indicó en la sección I.2.2.4. los modelo *in silico*, particularmente los modelos QSAR, han dado respuesta al abordaje del estudio de la absorción y otras propiedades farmacocinéticas. Los mismos permiten complementar información experimental (ya sea *in vitro* o *in vivo*) para profundizar en los mecanismos involucrados en estos procesos biológicos.

Existen numerosos reportes que han enfocado sus objetivos en estudiar mediante QSAR la absorción de compuestos en el organismo. Por un lado, encontramos trabajos que abordan la permeabilidad desde las características físico-químicas de los compuestos (solubilidad en agua, coeficiente de partición agua-octanol $\log P$, constante de disociación pK_a , entre otros), mientras que otros estudios ahondan en el estudio de la permeabilidad en relación a cuales caracteres moleculares tienen implicancias fisiológicas propias del pasaje transmembrana, en este caso empleando además, datos experimentales o computaciones de ensayos *in vitro* o *in vivo* (P_{Eff} permeabilidad efectiva empleando Caco-2, Porcentaje de Absorción Intestinal Humana –HIA%, $\log K'_{IAM}$ o $\log K'_{MLC}$) (Ermondi, Vallaro, & Caron, 2018a; Gozalbes et al., 2011; Molero-Monfort, Escuder-Gilabert, Villanueva-Camañas, Sagrado, & Medina-Hernández, 2001; Price et al., 2021; J. Wang & Hou, 2015). Uno de los primeros intentos de modelado de propiedades ADME fue propuesta por Lipinski, Lombardo, Dominy, & Feeney, 1997. En este trabajo se propone de manera cualitativa un grupo de 5 reglas para caracterizar la biodisponibilidad oral de compuestos. Esta “regla de 5” de Lipinski, basada en teorías de *Drug-likeness*, establece que compuestos con:

- peso molecular > 500:
- número de donantes de puente H > 5:
- número de aceptores de enlaces hidrógeno > 10:
- $C \log P > 5$:

tendrán una baja absorción intestinal. Este tipo de herramienta encontró una rápida aceptación entre los usuarios debido a su simplicidad y fácil interpretación (Leszczynski, 2010; Zhao et al., 2001). Este sencillo modelo, luego ha ido perfeccionándose y complejizándose, adaptándose a un número mayor de compuestos, con características físico-químicas diversas. En este sentido, la inclusión de parámetros relacionados con el área superficial de las moléculas y el número de enlaces rotables, han mostrado gran incidencia en la biodisponibilidad de sustancias (Julian-Ortiz, Zanni, Galvez-Llompert, & Garcia-Domenech, 2014).

Particularmente, considerando los modelos QSAR basados en experiencias in vitro que se encuentran disponibles, existen algunos antecedentes que se centran en abordar de desde un enfoque analítico el pasaje a través de las barreras biológicas. En este sentido, se considera que los procesos dinámicos de acción de los compuestos bioactivos tienen mucho en común con los procesos básicos de separaciones cromatográficas. Bajo condiciones experimentales propicias, las mismas propiedades básicas: hidrofóbicas, electrónicas y estéricas; determinan el comportamiento de los compuestos químicos tanto en el medio biológico como en el cromatográfico. Por tanto, la cromatografía pueden utilizarse como técnica para estimar parámetros físico-químicos y actividades biológicas, entre ellas las farmacocinéticas (Escuder-Gilabert et al., 2003).

1.2.3.4. Cromatografía Biomimética basada en membranas artificiales y modelos QSAR

La aplicación de parámetros de retención cromatográfica para obtener modelos descriptivos y predictivos de respuestas farmacocinéticas da lugar a un nuevo grupo de modelos QSAR, llamados en algunos casos QRAR (Escuder-Gilabert et al., 2003; Stepnik & Malinowska, 2013). En este tipo de estudios la variable respuesta proviene de datos experimentales aportados por técnicas cromatográficas biomiméticas.

El surgimiento de estos modelos se basa en el hecho que no siempre se han encontrado buenas estimaciones de la absorción de las moléculas basadas sólo a partir del coeficiente de partición octanol-agua ($\log P$), lo que cuestiona la capacidad de este parámetro para describir procesos de reparto complejos como los que tienen lugar en las membranas celulares. Esto se puede deber a que, por un lado, las propiedades de un sistema bifásico (como el sistema octanol-agua) formado por dos solventes inmiscibles son uniformes a lo largo de cada una de las fases, mientras que las membranas biológicas tienen propiedades anisotrópicas, lo que

provoca diferencias en el reparto de los solutos en ambos sistemas. A esto se le suma el hecho de que aunque las interacciones hidrófobas de los compuestos con los sistemas biológicos son normalmente las que determinan el pasaje transmembrana, también existen otras interacciones de tipo electrónico y estérico que no siempre pueden despreciarse y que están ausentes en el sistema octanol-agua. Por ende, otros sistemas de reparto, pueden proporcionar modelos mejores que den un panorama más completo del pasaje a través de las barreras biológicas (Gilabert, 2005; Valko, 2019). Como alternativa se propone entonces, la cromatografía basada en fases estacionarias de fosfolípidos.

Particularmente, para emular las bicapas fosfolipídicas de las membranas celulares, se propuso el uso de columnas cromatográficas basadas en **membranas artificiales inmovilizadas (IAM, por sus siglas en inglés)**. Las columnas IAM se preparan mediante la unión covalente de una monocapa de fosfolípidos a partículas de sílice imitando así el entorno lipídico de una membrana celular fluida en una matriz sólida. Se encontraron modelos basados en los datos de retención de IAM, por ejemplo, para la permeabilidad, el volumen de distribución, el riesgo de fosfolipidosis y la mejora de la solubilidad en fluidos intestinales simulados (Ermondi, Vallaro, & Caron, 2018b). Las columnas IAM pueden contener uno o una mezcla de fosfolípidos, principalmente ligandos de fosfatidilcolina (PC, por sus siglas en inglés), fosfatidiletanolamina (PE, por sus siglas en inglés), fosfatidilglicerol (PG, por sus siglas en inglés), ácido fosfatídico (PA, por sus siglas en inglés) y fosfatidilserina (PS, por sus siglas en inglés). La más comercializada son las que tienen *end-capping* de metil glicidol, para aumentar la vida útil de la columna (IAM.PC.MG). La **Figura I.10**. muestra la estructura de una fase estacionaria conformada por membranas artificiales inmovilizadas de fosfatidilcolina, sobre un soporte de sílica.

Las fases móviles utilizadas usualmente con estas fases estacionarias, son soluciones acuosas de buffer fosfato salino ajustadas al pH fisiológico de interés (p. ej., pH 7.4). En estos casos, el parámetro cromatográfico utilizado para la construcción de modelos QSAR o QRAR es el logaritmo del factor de retención ($\log K_{IAM}$). Este parámetro nos da información acerca del grado de interacción de los analitos con las fases estacionarias, por lo que en este caso resulta de primordial interés. Para la elución de compuestos muy hidrófobos es necesaria la adición de pequeñas cantidades de modificador orgánico (usualmente metanol o acetonitrilo) a la fase móvil (Barbato, 2006; Gilabert, 2005; Valko, 2019).

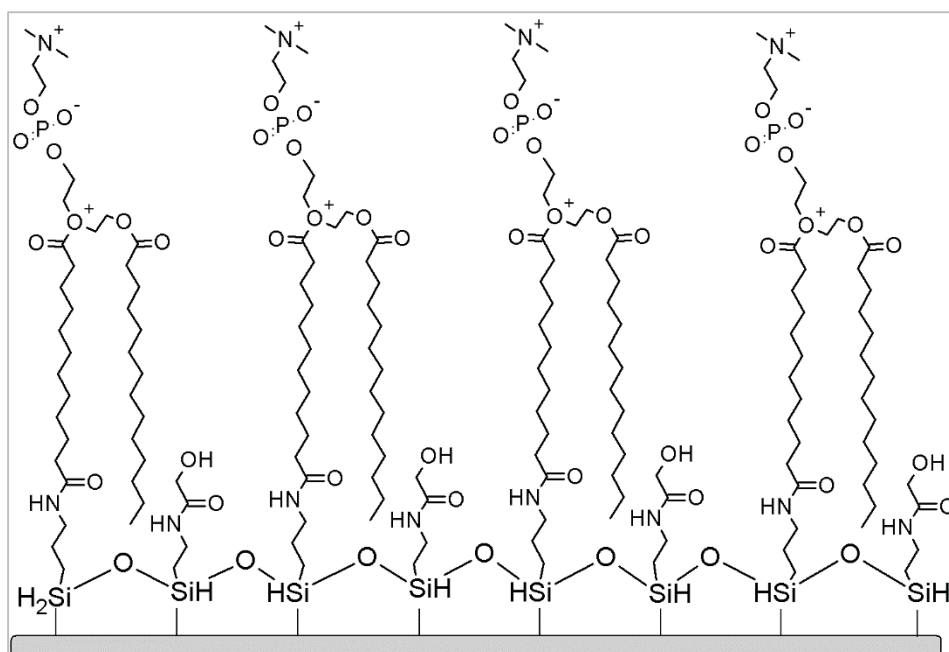


Figura I.10. Esquema de la estructura de una monocapa de fosfatidilcolina sobre sílica (IAM.PC.MG)
Imagen propia, adaptada de Barbato, 2006

Respecto a estudios QSAR empleando fases IAM haciendo foco en la permeabilidad de diversas entidades químicas, podemos decir que la bibliografía disponible es abundante en relación a xenobióticos y drogas farmacéuticas (Ermondi et al., 2018b; Grumetto, Russo, & Barbato, 2015a; J. M. Luco et al., 2003; Pidgeon et al., 1995; Russo, Grumetto, Barbato, Vistoli, & Pedretti, 2017; Stepnik & Malinowska, 2013; Yen, Agatonovic-Kustrin, Evans, Nation, & Ryand, 2005), pero son más escasos los reportes respecto a compuestos bioactivos naturales. En publicaciones recientes se puede encontrar trabajos respecto a la permeabilidad de flavonoides (Tsopeles et al., 2018), fitoestrógenos (Lasić, Bokulić, Milić, Nigović, & Mornar, 2019) y saponinas (Stępnik, 2021). Otros compuestos bioactivos quedan pendientes de evaluación con estas fases estacionarias. Esta tecnología aplicada a fitoquímicos permitiría la predicción del comportamiento *in vivo* y la selección de compuestos con el mejor potencial de atravesar las barreras propias del proceso de biodisponibilidad, reduciendo así el número de experimentos con animales, aportando además información mecanística de los procesos subyacentes.

I.3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Como se ha mencionado en las secciones anteriores, investigaciones recientes y tendencias actuales de consumo, demandan un abordaje comprensivo e integral de los alimentos funcionales y/o productos

nutracéuticos para dar validez científica a las afirmaciones sobre las propiedades benéficas para la salud asociadas a los mismos.

A la hora de buscar fuentes naturales altamente bioactivas, el ajo se destaca de otras hortalizas debido a que asociado a su consumo pueden enumerarse importantes propiedades biológicas, principalmente influyentes en la prevención de enfermedades crónicas. Además del interés funcional de estos productos, coincide que el ajo, constituye la principal hortaliza fresca exportable de nuestro país, siendo la provincia de Mendoza la mayor productora. Este interés comercial, y la posibilidad de valor de los productos a base de ajo, es lo que determina que esta especie en particular sea el objeto de estudio en la presente tesis.

Para encarar un estudio pormenorizado de alimentos funcionales y/o productos con compuestos bioactivos, se debe incluir una secuencia que implica la integración de diversos aspectos tales como, el empleo de técnicas de extracción y separación adecuadas para obtener el perfil cuali-cuantitativo de dichos compuestos; mediciones de estabilidad de los componentes; estudios de biodisponibilidad; además por supuesto, del estudio de las propiedades benéficas para la salud. En este sentido, el desarrollo de metodologías analíticas robustas y sensibles es menester, tanto para caracterizar correctamente los productos analizados, como también para evaluar el destino fisiológico una vez que se ingieren los fitoquímicos.

Si hablamos de determinaciones analíticas relacionadas al estudio de los componentes del ajo y sus sub-productos, los trabajos de investigación en esta área se han centrado en purificar, identificar y cuantificar fitoquímicos individuales. Sin embargo, no se ha realizado un abordaje analítico de múltiples analitos bioactivos y de distinta naturaleza química en una misma matriz, hecho que permitiría evaluar adecuadamente el potencial funcional real y global de los productos a base de ajo. Por otro lado, los antecedentes en esta área muestran un mayor énfasis en el estudio de compuestos organoazufrados (OSCs), por sus características distintivas en cuanto a *flavor* y potencial bioactivo, mientras otros grupos de fitoquímicos, como los fructanos y los flavonoides, han sido evaluados en menor grado. A su vez, vemos que las técnicas analíticas tradicionalmente empleadas para la caracterización de preparaciones a base de ajo en su mayoría no siguen lineamientos de la química verde, ni apuntan a la mejora de la eficiencia del proceso analítico. Por lo anterior se plantea entonces la necesidad de implementar métodos analíticos actualizados para determinar de manera selectiva multi-componentes en diversas matrices de productos de ajo, que logren ser una ventaja competitiva no sólo en términos de practicidad y eficiencia, sino que además permitan realizar una caracterización cuali-cuantitativa más amplia y completa del perfil de fitoquímicos en las matrices que se encuentran, y que permita aportar una visión integral de la funcionalidad de cada producto.

Por otro lado, se ha estudiado que la mera presencia de los compuestos bioactivos en las fuentes vegetales o galénicas, no es suficiente para garantizar que las propiedades biológicas que se les atribuyen logren

verificarse. Las limitaciones de esta aseveración se sustentan en diversas razones: deben considerarse los cambios estructurales que pueden sufrir los compuestos una vez que ingresan en el organismo humano, y a su vez debe analizarse si los mismos son capaces de sortear las barreras biológicas propias del proceso gastrointestinal una vez ingeridos. Aquí, la permeabilidad intestinal es clave en la disposición final de compuestos para alcanzar sus sitios target en el organismo. En el caso del ajo, estudios acerca de los mecanismos moleculares implicados en la permeabilidad de los compuestos bioactivos aún no han sido explicados. Si bien pueden encontrarse en bibliografía estudios biológicos que dan información primaria sobre el pasaje de compuestos organoazufrados, resta aún esclarecerse información mecanística acerca de las interacciones compuestos-membranas celulares. Datos que resultarían de gran interés no sólo a la hora de explicar lo que ocurre durante el transporte transmembrana de los analitos, sino que también sentaría precedentes para la predicción del comportamiento de otros compuestos similares. Para responder estos interrogantes aún pendientes, la química analítica y medicinal proporciona varias herramientas experimentales y quimiométricas, que permiten abordar de manera complementaria a los ensayos biológicos, la disponibilidad de los bio-compuestos. En esta línea, la cromatografía basada en columna de membranas artificiales inmovilizadas (IAM), respaldada por el uso de métodos estadísticos como los estudios de Relación Estructura - Actividad Cuantitativos (QSAR), ha demostrado ser un modelo replicable de procesos biológicos implicados en la permeabilidad de compuestos orgánicos, y que en conjunto estas herramientas además logran dilucidar los mecanismos moleculares y celulares que están implicados en dichos procesos.

En base a lo expuesto, es que se propuso, en primer lugar, desarrollar una metodología analítica multifitoquímica que combina técnicas de extracción tales como Ultrasonido y Microextracción Dispersiva Líquido-Líquido (DLLME), acoplado a Cromatografía Líquida con detector de arreglo de diodos, para la determinación de flavonoides, OSCs y fructanos de tipo inulina, respectivamente. Esto con el fin de lograr un análisis de alto rendimiento y fiabilidad de productos a base de ajo, ponderando el potencial funcional real de los mismos. En una segunda instancia, se planteó la construcción de modelos de Relaciones Estructura- Actividad Cuantitativos (QSAR) apoyados en datos experimentales surgidos de la cromatografía biomimética, como es la Cromatografía de Membranas Artificiales Inmovilizadas (IAM), para estudiar el transporte pasivo de compuestos bioactivos provenientes de ajo a través de las membranas celulares. En este caso buscando anteponer un enfoque químico que permita profundizar en las características moleculares que optimizan el proceso de permeabilidad, y por ende la biodisponibilidad final de los fitoquímicos de interés.

A partir del conjunto de información resultante de estas estrategias metodológicas buscamos dar luz a cuestionamientos de larga data que están relacionados con la forma y cantidad apropiada de consumo de estas hortalizas y sus productos gastronómicos, o de las dosis efectivas de los productos nutracéuticos, para asegurar la bioeficacia de los fitoquímicos a largo plazo en la prevención de enfermedades crónicas.

I.4. HIPÓTESIS

“El desarrollo de una adecuada caracterización de los fitoquímicos de interés y el empleo de modelos QSAR permite obtener información sobre la biodisponibilidad de dichos compuestos para ejercer los efectos biológicos que se les atribuyen.

I.5. OBJETIVOS

- **Objetivo General:**

Investigar el potencial beneficioso para la salud de alimentos funcionales del género *Allium* sp. analizando los principios bioactivos involucrados y empleando recursos quimiométricos

- **Objetivos Específicos:**

- Desarrollar una metodología analítica tipo “*screening*” para caracterizar cuali-cuantitativamente diferentes grupos de fitoquímicos (organoazufrados -OSCs-, polifenoles, hidratos de carbono), mediante el empleo de cromatografía líquida de alta performance (HPLC).
- Evaluar y dilucidar los mecanismos moleculares involucrados que operan en sistemas biológicos mediante la construcción de modelos de relación estructura-actividad cuantitativa (QSAR).
- Identificar y evaluar los parámetros moleculares con mayor relevancia informativa para la construcción de dichos modelos.
- Predecir la biodisponibilidad de los compuestos bioactivos analizados a partir de los resultados obtenidos del estudio QSAR.
- Formación de recurso humano altamente calificado en el área de la Química de los Alimentos y Química Analítica.
- Promover y fomentar la vinculación interinstitucional y trabajo grupal.
- Difusión científica mediante publicaciones internacionales con referato y presentaciones a congresos.



CAPÍTULO II

**METODOLOGÍA ANALÍTICA MULTI-FITOQUÍMICA
PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS
BIOACTIVOS EN DIFERENTES PRODUCTOS A BASE
DE AJO**

II. DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA ANALÍTICA MULTI-FITOQUÍMICA PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN DIFERENTES PRODUCTOS A BASE DE AJO

II.1. INTRODUCCIÓN

El actual interés de las industrias alimentarias y farmacéuticas por los compuestos bioactivos naturales ocasiona a una creciente demanda de métodos de análisis y aislamiento, nuevos y más eficaces (Ivanović, Razboršek, & Kolar, 2020). Los mismos conllevan diversos desafíos relacionados no sólo con la propia naturaleza química de los analitos y de las matrices en que se encuentran, sino también con los requerimientos actuales de control de productos finales y el interés en la protección ambiental. Siguiendo estos lineamientos, y considerando en nuestro caso como objetos de análisis a diferentes productos de ajo, el reto analítico en el presente trabajo de investigación fue el de desarrollar una metodología actualizada y completa para el manejo y medición con alta selectividad de múltiples fitoquímicos en diversas matrices, que logre aportar una visión global del potencial funcional real de cada producto.

La implementación de metodologías analíticas basadas en la combinación de técnicas de análisis para determinar multi-componentes resulta en una ventaja competitiva en términos de practicidad, reducción de costos, materiales y tiempo, logrando además la obtención de información más amplia y fácil de comparar. En este caso además, no sólo se busca mejorar la eficiencia del procedimiento analítico, sino que buscamos también obtener datos acerca de diferentes familias de compuestos bioactivos, y de esta manera tener en cuenta el efecto sinérgico de los fitoquímicos sobre las actividades biológicas reportadas. Juntos en una misma matriz, ya sea un producto vegetal o farmacéutico, los fitocompuestos de diferente origen pueden incrementar un efecto bioactivo una vez consumidos, o mostrar interacción antagónica reduciendo eficiencias de actividad biológica específica (Kocabas, 2017). Por lo tanto, las combinaciones de fitoquímicos deben considerarse cuidadosamente a la hora de evaluar el potencial funcional real de un alimento o suplemento.

En lo que respecta a desarrollo de la metodología analítica propuesta, en primer lugar se debe estudiar la selección de las técnicas de extracción y aislamiento (o purificación) de los compuestos bioactivos. Estas técnicas dependerán del tipo de matriz, la volatilidad, la inestabilidad frente a cambios de pH, temperatura o solventes, y la polaridad de los compuestos de interés (McGorin, 2011). Los métodos tradicionales para la extracción y aislamiento de los analitos de interés de los tejidos vegetales, presentan algunas desventajas, debido a que requieren largos tiempos de extracción, grandes cantidades de solventes, y algunas veces, son poco eficientes. Además, según la naturaleza química de los compuestos, propia de cada familia de metabolitos secundarios, se presentan diversas complejidades que deben ser abordadas particularmente. En

el caso de los compuestos organoazufrados, como ya se mencionó en el capítulo I, son inestables y reactivos, se oxidan fácilmente, y también sufren modificaciones durante los procesos térmicos. Por esta razón, las técnicas preparativas para su aislamiento deben ser selectivas, de costo moderado, y evitar transformaciones química y térmicas de los analitos de interés (Rouseff, 2002). Por su parte, los flavonoides al ser ionizables, son sensibles al pH del medio extractante, y al tipo de solvente de extracción. Sumado a esto, se ha demostrado que el tiempo y la temperatura de extracción son claves a la hora de maximizar los rendimientos de recuperación de compuestos fenólicos (Khoddami, Wilkes, & Roberts, 2013). La extracción de azúcares también presupone desafíos. Para lograr una correcta cuantificación de la inulina, primero la misma debe aislarse de manera eficiente y precisa de otros hidratos de carbono simples y fibras. Para lo cual se requiere introducir un fraccionamiento de los azúcares riguroso, basado en diferentes etapas de hidrólisis química o enzimática, que permitan medir fructosa y/o glucosa como productos finales (Mc Cleary et al., 2000).

En respuesta a estas complejidades en la determinación de compuestos bioactivos, en la presente tesis se propuso emplear técnicas de extracción modernas que sean amigables con el medio ambiente y que aporten mayor rendimiento al proceso de extracción. La **Extracción Asistida por Ultrasonido (UAE)**, por sus siglas en inglés), ha mostrado ser altamente útil en cuánto a análisis de productos naturales. Existen antecedentes de su uso para extraer múltiples componentes de matrices vegetales (Chemat et al., 2017), por lo que resultó lógico emplear la misma para extraer y purificar luego los analitos de interés. Siguiendo en tema de preparación de muestra y extracción/aislamiento, en relación a los compuestos organoazufrados es posible mejorar aún más la eficiencia del análisis empleando una de las técnicas de microextracción líquida propuestas en el capítulo anterior. La literatura sobre microextracción en fase líquida muestra una gran variedad de procedimientos que cada analista puede elegir y aprovechar según la matriz que posee y los analitos que desea extraer y purificar. Con este objetivo hemos elegido una **Microextracción Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME)** a fin de mejorar la etapa de preparación de muestra. La misma se encuentra previamente validada y publicada por nuestro grupo de investigación (Ramirez et al., 2016).

Estas técnicas de preparación de muestras combinadas con la **Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC)** sirven para caracterizar y determinar los diferentes fitoquímicos presentes en la matriz del producto objeto de estudio. Dado que las muestras consideradas son mezclas multi-componente de compuestos con un amplio rango de polaridad, se necesitan diferentes técnicas de separación instrumentales, por ejemplo, cromatografía líquida en fase reversa (RP-LC) y cromatografía de líquida de interacción hidrofílica (HILIC) para abarcar esta diversidad química (Petruczynik & Waksmundzka-Hajnos, 2013).

Como consecuencia de lo anterior, y con el fin de lograr un análisis de alto rendimiento de productos a base de ajo, desarrollamos entonces una metodología multi-fitoquímica que combina técnicas extractivas como

Extracción Asistida por Ultrasonido y Microextracción Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME), acopladas a Cromatografía Líquida con detectores de arreglo de diodos, para la determinación de flavonoides, OSCs y fructanos tipo inulina, respectivamente.

En cuanto al desarrollo de la metodología propuesta, las condiciones óptimas de extracción se obtuvieron mediante un diseño experimental de superficie de respuesta. La metodología de superficie de respuesta es una colección de técnicas matemáticas y estadísticas basada en el ajuste de una ecuación polinómica a los datos experimentales que surgen de una serie de experimentos determinados por un software estadístico (Bezerra et al., 2008).

Luego de la extracción, los analitos deben poder ser separados e identificados. Por esta razón, en una etapa preliminar del desarrollo de la metodología, se definieron los parámetros cromatográficos que permitieran una eficiente separación y determinación analítica de los compuestos bajo estudio.

II.2. OBJETIVOS

- Seleccionar, evaluar y optimizar las variables instrumentales de modo tal de poder alcanzar una adecuada sensibilidad y selectividad de los compuestos de interés (OSCs, inulina, polifenoles) mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).
- Optimizar las técnicas para la extracción de los diferentes grupos de fitoquímicos presentes en las matrices bajo estudio empleando diseño experimental multivariado.
- Combinar las técnicas de preparación de muestras y cromatográficas para la determinación de multi-componentes.
- Evaluar las figuras analíticas de mérito propias del método analítico desarrollado, tales como linealidad, repetibilidad, recuperación cuantitativa de los analitos y límite de detección.
- Evaluar la aplicabilidad de la metodología en el análisis de diversos productos comerciales a base de ajo.

II.3. DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA

El término optimización se ha utilizado en química analítica como un medio para descubrir las variables experimentales que se deben aplicar en un procedimiento para lograr la mejor respuesta posible. Tradicionalmente, la optimización se ha realizado mediante la evaluación de la influencia de un factor a la vez, frente a una respuesta experimental (metodología univariada). Si bien este método es válido, en algunos casos se sugiere que en la optimización de los procedimientos analíticos, sobre todo de aquellos en los que

intervienen muchas variables, se lleve a cabo el uso de técnicas estadísticas multivariadas para reducir el número de experiencias y además para observar la interacción de las variables entre sí. Dentro de las técnicas multivariadas más relevantes utilizadas en la optimización de las etapas analíticas se encuentra la **metodología de superficie de respuesta (RSM)**.

Las variables a optimizar en el presente desarrollo analítico fueron, por un lado, las implicadas en el proceso de separación cromatográfica, y por otro, las influyentes en el proceso de extracción de los analitos durante la etapa de preparación de muestra.

Los analitos que se buscaron determinar fueron: los organoazufrados, alicina, E-Z-ajoeno, 2-vinilditiina y DAS, elegidos por representar un ejemplo de cada tipo de OSCs (un tiosulfinato, un producto de degradación polar y otro apolar de la alicina, y un sulfuro, respectivamente); los flavonoles, quercetina, miricetina y campferol, elegidos en base a reportes previos que constatan su presencia en niveles significativos en diferentes matrices de ajo; y la inulina, representante de los fructanos, y como compuesto prebiótico.

En la **Figura II.1.** se muestra un diagrama a modo de resumen de la estrategia de trabajo y las tareas involucradas en esta sección.

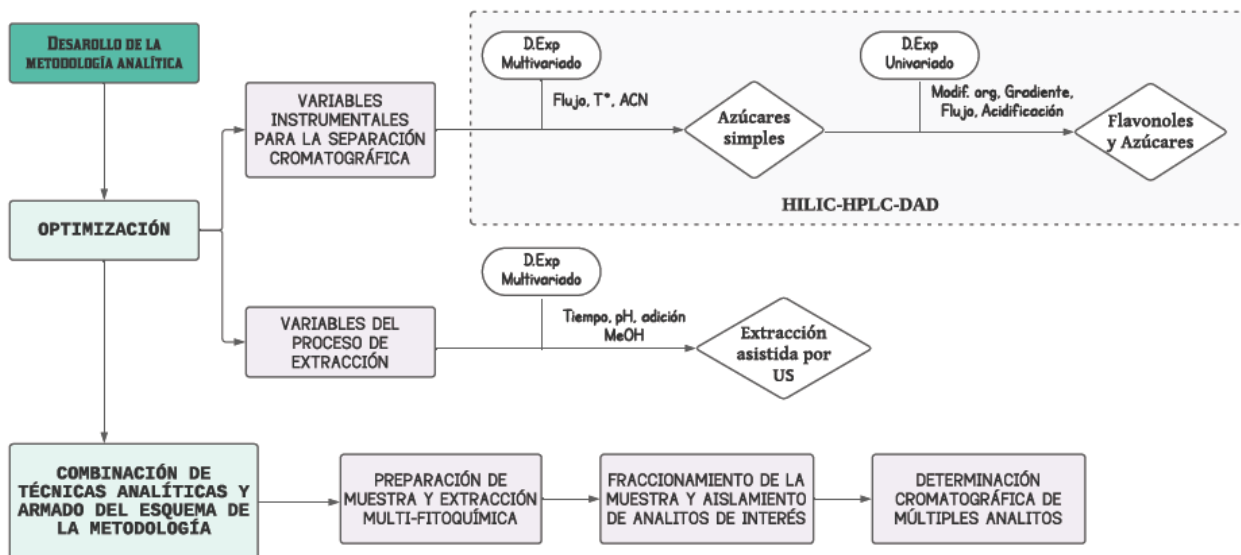


Figura II.1. Esquema del diseño de investigación para el desarrollo de la metodología multi-fitoquímica

Respecto a la etapa de optimización de variables instrumentales y de preparación de muestra, en primer lugar se estudiaron los parámetros operacionales de separación cromatográfica para lograr una adecuada resolución de los analitos de interés. Para tal fin, se realizó un diseño experimental multivariado buscando

una adecuada separación de hidratos de carbono simples (fructosa, glucosa), surgidos de la hidrólisis de inulina; y luego teniendo en cuenta esos resultados, junto con información reportada en cuanto a la separación cromatográfica de flavonoides, mediante un diseño experimental univariado se probaron las condiciones óptimas para separar en una misma corrida cromatográfica tanto los hidratos de carbono así como flavonoles, empleando cromatografía HILIC.

Los organoazufrados se consideraron de manera independiente a flavonoles e hidratos de carbono, a la hora de discriminar técnicas de aislamiento y separativas, dada la diferencia marcada en términos de polaridad respecto a los otros compuestos considerados en esta sección. Para este grupo de fitoquímicos particularmente el aislamiento/purificación de los compuestos organoazufrados, basado en DLLME, y su separación cromatográfica, mediante RP-HPLC, fueron previamente optimizados y validados, en un trabajo de propia autoría (Ramirez et al., 2017). Dichas técnicas fueron entonces adoptadas y acopladas al método aquí propuesto, para lograr el fraccionamiento de este grupo de compuestos y su determinación analítica.

Una vez optimizadas las variables instrumentales que permitieron determinar selectivamente cada analito a partir de HPLC-DAD, luego se optimizaron las variables asociadas al proceso de extracción de los analitos. Para esto se empleó un diseño experimental multivariado de superficie de respuesta para encontrar las condiciones de trabajo óptimas de una técnica de extracción asistida por ultrasonido.

Bajo las condiciones de trabajo optimizadas previamente discutidas, luego se combinaron las técnicas de preparación de muestra, fraccionamiento/aislamiento y separación cromatográfica dentro de una misma metodología de análisis para caracterizar productos a base de ajo ponderando el contenido de los organoazufrados, flavonoles e inulina.

II.3.1.MATERIALES Y MÉTODOS

II.3.1.1. Reactivos, Estándares Analíticos y Solventes

- Dialil Sulfuro - DAS - (97%) y Dialil Disulfuro - DADS - (80%) se compraron a Sigma Aldrich (Buenos Aires, Argentina).
- La alicina fue sintetizada por oxidación de dialil disulfuro con peróxido de hidrógeno siguiendo lo reportado previamente por el grupo (González et al., 2007).
- Para obtener isómeros de E-Z Ajoeno, la alicina sintetizada se calentó mientras se agitaba en acetona / agua (40:60 v / v) (Block, Ahmad, Catalfamo, Jain, & Apitz-castrozd, 1986).
- Los compuestos de vinilditiina se sintetizaron calentando alicina en acetona / metanol (60:40 v / v) siguiendo el procedimiento descrito por Iberl, Winkler, & Knobloch, 1990; con ligeras modificaciones.

Los OSCs sintetizados se aislaron adicionalmente mediante recolección de fracciones después de la separación por HPLC. Se purificaron alicina y E- y Z-ajoeno usando una columna de HPLC Waters Spherisorb S5W de fase normal y hexano / isopropanol (92: 8 v / v) como fase móvil. La 2-vinilditiina (2-VD) se purificó mediante HPLC de fase reversa utilizando las condiciones cromatográficas descritas en la sección "Condiciones cromatográficas" de esta sección. La purificación de 3-VD no tuvo éxito, por lo que no se incluyó en el estudio de validación. Luego, los OSCs sintetizados se concentraron y se caracterizaron por espectroscopía UV y análisis GC-MS. Los espectros UV se obtuvieron utilizando un espectrofotómetro UV-Vis Cary 50 de Varian y la cuantificación se llevó a cabo utilizando el coeficiente de extinción (Lawson, 1992). Para los análisis de GC-MS se utilizó un Perkin Elmer Clarus 500. Las 2-VD, así como E- Z-ajoeno se confirmaron mediante espectros de masas. La alicina fue confirmada por UV y espectros de masas; el último a través de la confirmación de vinilditiinas formadas. Los espectros de masa y UV obtenidos concuerdan con la bibliografía (Ilić et al., 2012; Lawson, 1992).

- Los estándares químicos de flavonoides, miricetina (96%), kaempferol (> 90%) y quercetina (96%) se compraron a Sigma Aldrich (Buenos Aires, Argentina).
- El estándar de inulina se compró a Orafiti (Saporiti SA, Argentina). La mezcla de fructanasa para la hidrólisis de la inulina se adquirió de Megazyme (Granotec, Argentina). Los estándares de D-glucosa, D-fructosa y sacarosa fueron adquiridos de Biopack.
- Acetonitrilo (ACN), metanol (MeOH), acetona, hexano, isopropanol, cloroformo y diclorometano (DCM) fueron de calidad cromatográfica y adquiridos a Merck (EE. UU.).
- Finalmente, se obtuvo agua ultrapura (18 MΩcm) de un sistema de purificación de agua Milli-Q (Millipore, Francia).

II.3.1.2. Muestras

II.3.1.2.1. Muestras de Ajo

- Material Vegetal: Para todos los ensayos se utilizó el clon de ajo rojo "Rubí" de la colección de germoplasma del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) La Consulta, Mendoza. El ajo se cultivó en el campo experimental del INTA ubicado en La Consulta, Mendoza, Argentina (33° 44 ' S, 69° 07 ' W) en 2014.
- Muestras Blanco: en el desarrollo y validación del método se utilizaron dientes de ajo sin triturar que carecían de los OSCs de interés. Las muestras blanco se prepararon inactivando la aliinasa mediante

la aplicación de un proceso térmico, que consistió en hervir suavemente dientes de ajo enteros durante 30 minutos, según Locatelli et al., 2015. Luego, se analizaron las muestras y se pudo confirmar que no se pudieron detectar compuestos organosulfurados. No fue posible eliminar la inulina y los flavonoides de las muestras en blanco. Por tanto, las cantidades iniciales de cada analito se cuantificaron antes del análisis.

II.3.1.3. Preparación de muestras y fraccionamiento de analitos

II.3.1.3.1. Preparación de muestras blanco

De las muestras en blanco, se homogeneizaron y reservaron 5 g de submuestra. Luego, en un tubo de 15 mL con fondo cónico, se tomó una alícuota de 0,15 g de ajo con alinasa inactivada y se agregaron cinco (5) mililitros de agua destilada. A continuación, se les añadió concentraciones conocidas (25 mg L^{-1}) de alicina, E-Z ajoeno, 2-VD y DAS; 20 mg L^{-1} de kaempferol, quercetina y miricetina y 10 mg L^{-1} de inulina. En este punto, se chequeó el pH del medio y en caso de ser necesario se corrigió para que el valor final fuera 6,33. A continuación, se agregaron 0,22 mL de MeOH para ayudar al proceso de extracción, y las muestras fueron ultrasonificadas durante 16,3 min. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 10000 rpm durante 30 min. Después de la centrifugación, se separaron los diferentes grupos de fitoquímicos. Se sometió una alícuota de 3 mL de sobrenadante al procedimiento de DLLME con el fin de separar los OSCs de otros analitos, mientras que se separó una alícuota de 2 mL de sobrenadante para realizar el análisis de flavonoides y realizar la enzimólisis de azúcares. Para realizar la hidrólisis de inulina, se agregaron 60 μL de fructanasa a 1,5 mL de sobrenadante junto con 1,5 mL de buffer acetato (pH 6 – 5,5). Esta mezcla se incubó luego a 60°C durante 30 min. Al mismo tiempo, con el fin de cuantificar adecuadamente la inulina, se determinó la fructosa libre presente en las muestras en blanco. El procedimiento fue exactamente el mismo que antes, pero sin la adición de fructanasa. Tanto los flavonoides como los azúcares presentes en las muestras se analizaron mediante el modo cromatográfico HILIC, mientras que los OSCs de la DLLME se analizaron mediante RP-HPLC. En la **Figura II.2.** se muestra un breve esquema del procedimiento de preparación de la muestra.

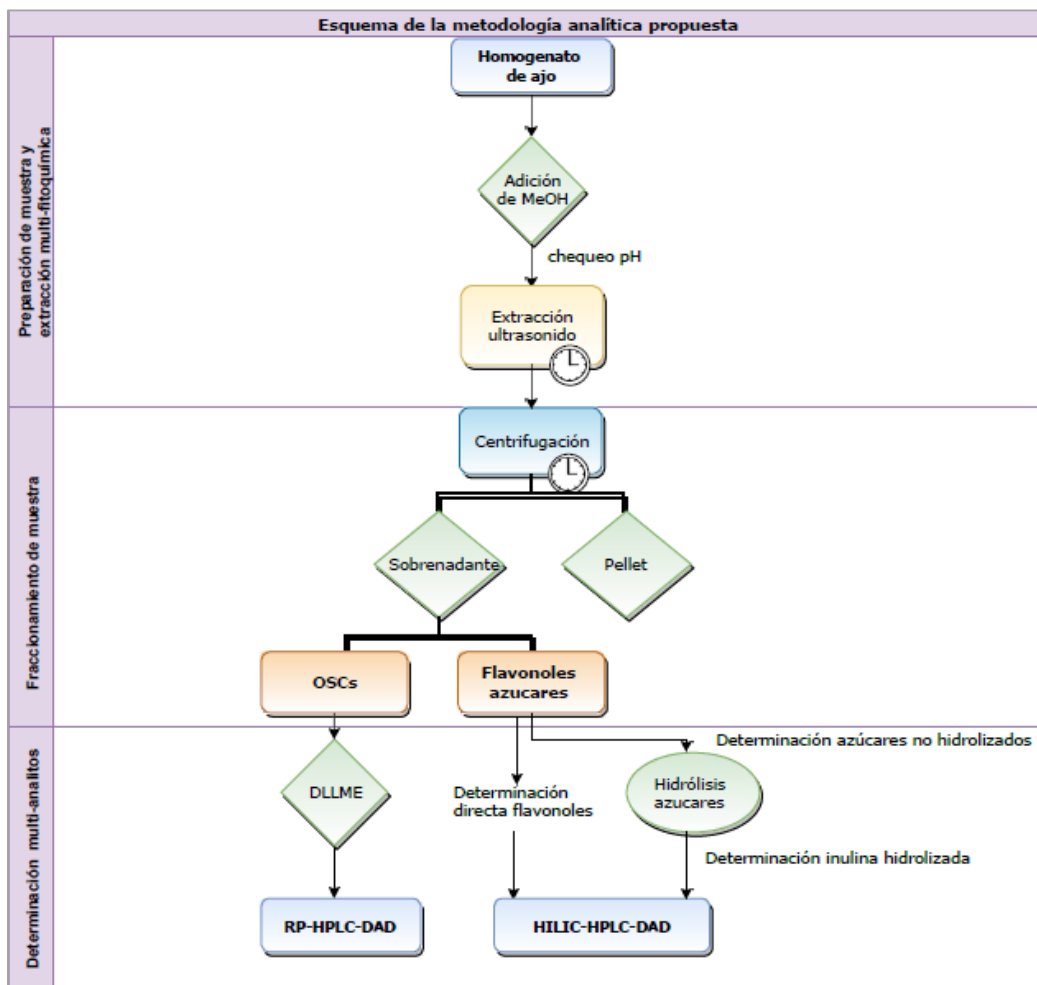


Figura II.2. Diagrama esquemático del procedimiento a seguir en la metodología multi-fitoquímica propuesta

II.3.1.3.2. Procedimiento de Microextracción Líquido-Líquido Dispersiva para determinación de OSCs

La extracción de OSCs se realizó, como se mencionó antes, siguiendo una técnica optimizada y previamente reportada en un trabajo de propia autoría (Ramirez et al., 2017). Se inyectó rápidamente una mezcla constituida por un mililitro de acetonitrilo (disolvente dispersivo), junto con 600 µl de cloroformo (disolvente de extracción) en cada solución de muestra (3 mL del sobrenadante producto del proceso explicado en II.3.1.3.1.) utilizando una jeringa. Posteriormente, la mezcla se centrifugó durante 3 min a 2000 rpm, y la fase extractante se retiró mediante una jeringa. La fase de cloroformo se secó bajo una corriente de nitrógeno y luego se disolvió en 500 µl de MeOH, esto se filtró y se inyectó en RP-HPLC-DAD para su análisis, bajo las condiciones que se detallarán a continuación.

II.3.1.4. Condiciones cromatográficas

Los análisis cromatográficos se realizaron utilizando un cromatógrafo Shimadzu LC 20A acoplado a un detector de arreglo de diodos que permite analizar longitudes de onda en el rango ultravioleta/visible (UV/VIS). Cada una de las muestras fue inyectada por triplicado. De los cromatogramas obtenidos se consideraron las áreas de los compuestos de interés, identificando a cada uno de los mismos comparando los tiempos de retención con los estándares de referencia. Las columnas de HPLC utilizadas fueron una columna Waters C18 (254 x 4,6 mm I: D. Tamaño de partícula de 5 μ m) (EE. UU.) Y una columna Shodex HILIC pak (VG 50 4E, fase amino estacionaria, 250 x 4,6 mm I: D. 5 tamaño de partícula μ m) (Japón).

Las condiciones de separación de los OSCs en el modo cromatográfico RP-HPLC, se adaptaron de las informadas previamente por Ramirez et al., 2017. Mientras que las condiciones para la separación cromatográfica de flavonoles y azúcares se adaptó de Zhang et al., 2008 con modificaciones resultantes de una optimización multivariada de las condiciones cromatográficas en modo HILIC (**Tabla II.1.**). En ambos casos, el sistema se equilibró utilizando las condiciones iniciales durante 10 minutos antes de la inyección de la siguiente muestra, y la temperatura del horno se fijó en 25°C y se inyectaron 10 μ L de muestra para cada análisis. Antes de su uso, las fases móviles se filtraron a través de un filtro de 0,45 μ m. Particularmente, la longitud de onda del detector se estableció en 194 nm para la identificación de hidratos de carbono (Karkacier et al., 2003), y 270 nm para identificar flavonoles de acuerdo con los espectros UV de los estándares de referencia.

Tabla II.1. Condiciones cromatográficas para la determinación de OSCs, flavonoles y azúcares

Variables	Condiciones para OSCs	Condiciones para hidratos de carbono y flavonoles
Modalidad	Fase reversa ODS C18 de 254 mm de longitud y 0,46 mm d.i	HILIC Amino de 250 mm de longitud y 0,46 mm d.i, T°: 25°C
Fase móvil	Isocrático acetonitrilo:agua:metanol (50:41:9) (V/V)	Gradiente acetonitrilo (a):agua(b) 0,01% ácido fórmico (0 min 98 % A, 5 min 98 % A, 15 min 93 % A, 40 min 70% A)
Flujo	1 mL min ⁻¹	0,6 mL min ⁻¹
Detector	DAD 254nm	DAD 194 nm (hidratos de carbono), 270 nm (flavo)
Tiempo de corrida	30 minutos	40 minutos

II.3.1.5. Procedimiento de trabajo para el desarrollo de la metodología analítica

II.3.1.5.1. Optimización de las condiciones cromatográficas para la separación de flavonoles e hidratos de carbono.

Las condiciones cromatográficas para la separación de OSCs, ya se encontraban optimizadas como se mencionó en los párrafos anteriores (para referencia de la técnicas empleadas para la determinación de estos compuestos, se adjunta la información pertinente al artículo surgido de esta investigación sobre la determinación de OSCs en el capítulo **Anexos, Sección A**. En la presente tesis, entonces, el foco del trabajo de investigación se centró en la optimización de las variables operacionales para separar los flavonoles e hidratos de carbono de nuestro interés.

Dado que una cuantificación adecuada de inulina implica su enzimólisis antes de un análisis cromatográfico, los analitos reales a determinar por HPLC fueron fructosa, glucosa y sacarosa. Este proceso fue puesto a punto mediante una optimización multivariada de 3 variables (flujo cromatográfico, proporción de acetonitrilo y temperatura). Luego en función de esos resultados, y con base a información reportada por Zhang et al., 2008, se optimizó la separación de miricetina, quercetina y campferol, junto con fructosa, glucosa y sacarosa. La optimización del método se llevó a cabo en una columna HILIC (fase estacionaria amino) variando el contenido e identidad del modificador orgánico en la fase móvil, la longitud de onda, el tipo de gradiente, el caudal y el contenido de ácido en la fase móvil.

II.3.1.5.2. Optimización de las condiciones de extracción

Para poder determinar las condiciones óptimas de extracción de los diferentes grupos fitoquímicos a partir de una misma muestra, el efecto de diferentes factores como la concentración de MeOH en la solución de extracción (0 - 1500 μL), el pH de la muestra (4 - 8) y el tiempo de ultrasonido (5-20 min) se probaron utilizando un modelo de superficie de respuesta de Box-Behnken. El rendimiento de extracción de cada analito se investigó como respuestas con el fin de optimizar las variables independientes (factores). La solución utilizada para el análisis se preparó a partir de un homogeneizado de muestras blanco (para evitar la presencia de OSCs), y se agregaron 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada estándar de OSC, 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada estándar de flavonol y 10 mg L^{-1} de estándar de inulina, a la muestra.

Después del proceso de extracción asistida por ultrasonido, las muestras se sometieron a DLLME y posteriormente cada fracción fue analizada mediante HPLC por triplicado.

II.3.1.6. Software estadístico

Se utilizó el software informático Design-Expert 7.0.0 para diseñar los experimentos y modelar y analizar los resultados. Por otro lado, para el tratamiento estadístico de los datos se utilizó el software INFOSTAT y el programa Origin v.6.0.

II.3.2.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

II.3.2.1. Optimización de las condiciones cromatográficas para flavonoles e hidratos de carbono

Primero, se evaluó la fase estacionaria apropiada y el método cromatográfico conducente a una separación eficiente de monosacáridos (fructosa y glucosa). Cabe aclarar que se decidió trabajar en la separación de estos analitos porque una adecuada cuantificación de inulina implica su sometimiento a una etapa de enzimólisis (Quemener & Thibault, 1994). Como la fructosa y la glucosa son el resultado de este proceso, son precisamente estos analitos los que determinamos mediante HPLC.

La cromatografía de interacción hidrófila (HILIC) se refiere a un modo alternativo de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para separar compuestos polares como azúcares, alcoholes y ácidos orgánicos mediante el empleo de una fase estacionaria polar (p. Ej., Amino, ciano, sílice) eluída con una fase móvil conformada por solución acuosa / orgánica (Buszewski & Noga, 2012). En consecuencia, las investigaciones en esta área coinciden en que las fases estacionarias amino, trabajando en modo HILIC, conducen a una separación óptima de azúcares simples (Karkacier et al., 2003; López Hernandez et al., 1998; Neue et al., 2010; Vendrell-Pascuas, Castellote-Bargalló, & López-Sabater, 2000). En este sentido, la mayoría de los métodos cromatográficos informados utilizan elución isocrática con fases móviles de acetonitrilo-agua. Con base en lo anterior y para evaluar la factibilidad del uso de esta técnica en nuestra metodología, con los instrumentos disponibles, realizamos un diseño experimental (superficie de respuesta Box-Behnken), analizando 3 factores numéricos (flujo cromatográfico, proporción de acetonitrilo y temperatura) con 5 puntos centrales. La resolución entre los picos cromatográficos de fructosa-glucosa y glucosa-sacarosa se consideraron las respuestas (**Tabla II.2.**). Los resultados indicaron que la función de deseabilidad óptima se logró utilizando un flujo de 1.2 mL / min, con 85% de acetonitrilo y una temperatura de 40 ° C (**Figura II.3.**). Esta función se basa en más de una respuesta e incluye las prioridades y restricciones del investigador bajo las cuales se construyó el diseño (Jofré et al., 2010). Los valores de deseabilidad varían de $d = 0$ para una respuesta indeseable completa, $ad = 1$, para una respuesta deseable completa.

Además, se observó que generalmente los monosacáridos tenían una resolución cromatográfica adecuada utilizando proporciones de acetonitrilo superiores al 82% en la fase de elución (**Figura II.4.**). Esto concuerda con la bibliografía sobre el tema (Harmita Hayun, 2011; López Hernandez et al., 1998), y se relaciona con el hecho de que en el modo HILIC la fuerza de elución de la fase móvil está determinada por la proporción de agua, y a más agua en la FM, más fuerza de elución. Cuando esto sucede, los picos cromatográficos de los monosacáridos tienen una resolución más baja.

Tabla II.2. Niveles y factores evaluados mediante el diseño de superficie de respuesta para separación de monosacáridos

	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Respuesta 1	Respuesta 2
	A: Flujo	B: Proporción Acetonitrilo	C: Temperatura Horno	Res F-G	Res G-S
Corrida	mL/min		°C		
1	1,1	68	40	2,03	1,64
2	1,4	68	35	1,77	1,79
3	1,4	83	35	1,50	6,15
4	1,1	76	35	0,52	2,34
5	1,1	83	30	1,69	0,00
6	1,1	76	35	0,53	2,29
7	1,4	76	30	0,28	1,34
8	1,1	83	40	1,71	6,48
9	1,1	76	35	0,57	2,35
10	1,4	76	40	0,46	2,02
11	1,1	68	30	1,96	3,13
12	0,8	68	35	2,15	1,60
13	1,1	76	35	0,51	2,31
14	0,8	76	30	0,53	2,50
15	0,8	76	40	0,70	2,96
16	0,8	83	35	1,81	1,71
17	1,1	76	35	0,50	4,02

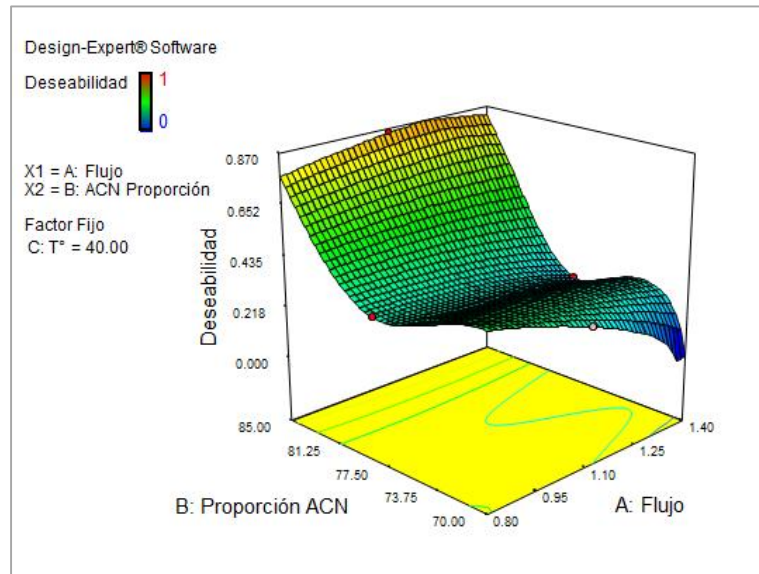


Figura II.3. Gráfico 3D de la función de deseabilidad global para la optimización en la resolución cromatográfica de monosacáridos

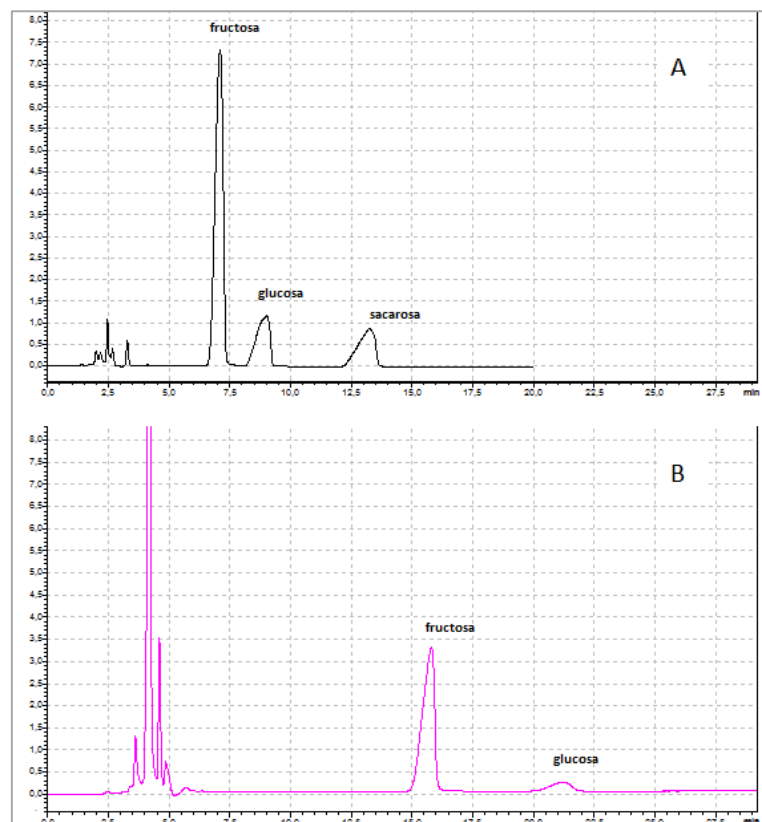


Figura II.4. Resolución cromatográfica entre fructosa y glucosa cambiando la proporción de acetonitrilo en la fase móvil.

El cromatograma A corresponde a una fase móvil constituida por ACN / agua (82:18), mientras que el cromatograma B corresponde a una fase móvil constituida por ACN / agua (90:10)

Por otra parte, teniendo en cuenta la capacidad de la cromatografía HILIC para resolver analitos polares, se evaluó el desempeño de diferentes gradientes de elución acetonitrilo-agua para que los flavonoles campferol, miricetina y quercetina, se separaran adecuadamente en la misma corrida cromatográfica que los hidratos de carbono. Se ha demostrado que HILIC es una alternativa a la RP-HPLC cuando las características poco polares de la fase estacionaria no permiten resolver adecuadamente compuestos como los flavonoides que pueden retenerse apropiadamente pero co-eluyen (Zhang et al., 2008). Este problema de co-elución se observó cuando se trabajaba con una columna Waters Spherisorb C18 y un gradiente de elución empleando agua y acetonitrilo (ambos acidificados con 0,1% de ácido fórmico). Al cambiar la FE, se apreció una mejora en la resolución de los flavonoles cuando se optó por emplear una columna Shodex HILIC pak con grupos funcionales amino, utilizando fases móviles acetonitrilo-agua. Se ensayaron varios cambios en las proporciones de los componentes de la fase móvil, y la velocidad de flujo se varió entre 0,6 y 1,2 ml / min. Un gradiente que consiste en una mezcla de ACN (A) y agua (B) con las siguientes proporciones: 0 min 98% A, 5 min 98% A, 15 min 93% A, 40 min 70% A, a un flujo de 0,6 mL / min, mostró una resolución adecuada tanto de flavonoles como de azúcares, en un período de tiempo más corto. La **Figura II.5.**, muestra los cromatogramas correspondientes a una solución mezcla de patrones de referencia de flavonoles en diferentes condiciones cromatográficas (RP-HPLC y HILIC-HPLC).

Cabe mencionar que aunque se puede lograr mayor sensibilidad para los hidratos de carbono empleando detección por índice de refracción (RID), en el presente trabajo, dado que la intención fue resolver tanto los flavonoles como los hidratos de carbono en la misma corrida cromatográfica, se requería el uso de un gradiente de elución de fase móvil y, la detección por RID no permite este tipo de modo cromatográfico, por lo que no se pudo considerar este detector para el desarrollo metodológico. En su lugar, utilizamos un detector de arreglo de diodos que permitió establecer diferentes longitudes de onda para maximizar la absorbancia de los analitos. Además las concentraciones de los hidratos de carbono en las muestras de interés se encuentran en niveles que superan satisfactoriamente el LOD de cada uno de ellos empleando detección DAD (LOD fructosa 0,01 mg mL⁻¹, LOD glucosa 0,05 mg mL⁻¹, LOD sacarosa 0,08 mg mL⁻¹). Los informes sobre este tema han mencionado que las cantidades de fructosa extraídas con agua y detectadas mediante la detección UV-VIS no fueron significativamente diferentes de las obtenidas mediante la extracción con metanol y la detección de RID (Karkacier et al., 2003). Esto fue verificado en nuestro laboratorio analizando los rendimientos cuantitativos de fructosa, glucosa y sacarosa usando detección UV a 194 nm y detección RID

(40 ° C) a partir de una muestra de manzana, y se concluyó que la técnica de detección UV a 194 nm parece ser adecuada para determinar azúcares cuando se usa un programa de elución en gradiente en modo HILIC.

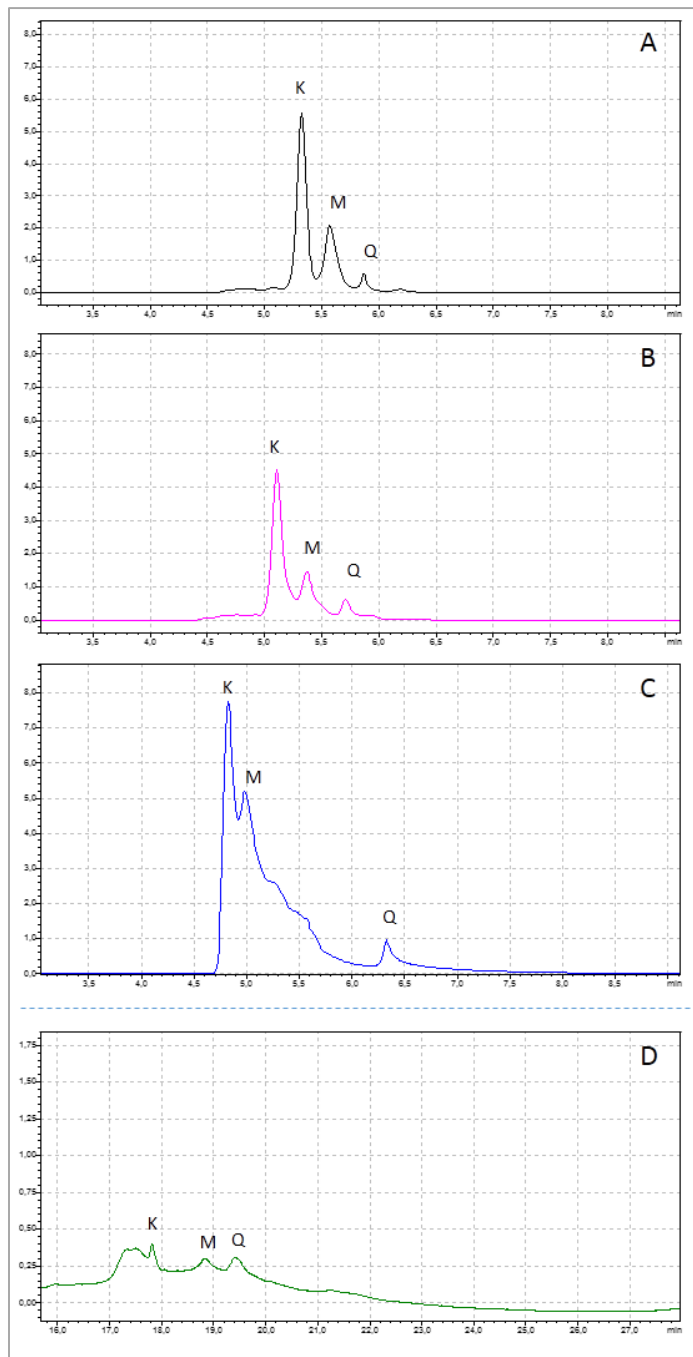


Figura II.5. Cromatogramas correspondientes a una solución mix de los patrones de referencia de flavonoles en diferentes condiciones cromatográficas (K, campferol; M, miricetina; Q, quercetina).

A- Corresponde a las condiciones finales de HILIC-HPLC, utilizando un gradiente de ACN / agua (v/v) y un flujo de fase móvil de 0,6 mL / min. B- Corresponde a HILIC-HPLC, utilizando un gradiente de ACN / agua (v/v) y un flujo de fase móvil de 0,8 mL / min. C- Corresponde a HILIC-HPLC, utilizando un modo isocrático ACN / agua, y un flujo

de fase móvil de 0,6 mL / min. D- Corresponde a RP-HPLC, basado en Kumar et al. (2008) consistente en un gradiente ACN / agua (v/v).

II.3.2.2. Optimización de las condiciones de extracción

La extracción asistida por ultrasonido (UAE) ha demostrado ser una técnica exitosa que ayuda a maximizar la disrupción del tejido vegetal, mejorando la capacidad del solvente para penetrar las células, obteniendo así un mayor rendimiento de extracción de compuestos bioactivos de diferente naturaleza química (Altemimi et al., 2017). En este sentido, para determinar las condiciones óptimas de extracción de los diferentes grupos fitoquímicos a partir de una misma muestra, se probó el efecto de diferentes factores utilizando un modelo de superficie de respuesta de Box-Behnken. La elección de este modelo tuvo sustento en el número de variables a analizar (3) y con la idea de economizar el número de corridas. Los factores se eligieron en base a datos previamente reportados y dadas las propiedades químicas de los diferentes analitos. Se dice que un modelo se ajustará bien a los datos experimentales si presenta una regresión significativa y una falta de ajuste no significativa. En otras palabras, la mayor parte de la observación de la variación debe describirse mediante la ecuación de regresión, y el resto de la variación ciertamente se debe a los residuos. La visualización de la ecuación del modelo predicho se puede obtener a partir de la gráfica de superficie de respuesta. Esta representación gráfica es una superficie n-dimensional en el espacio (n + 1) dimensional. Por lo general, se puede dibujar una representación bidimensional de un gráfico tridimensional. Por lo tanto, si hay tres o más variables, la visualización de la gráfica solo es posible si una o más variables se establecen en un valor constante (Bezerra et al., 2008). En este caso, dado que se realiza una optimización multirrespuesta, se eligió la función de deseabilidad para interpretar los resultados.

Cuando se trabaja con UAE, el tiempo de extracción debe considerarse cuidadosamente ya que un exceso o defecto de tiempo de la técnica puede influir significativamente en el proceso, así como en la calidad de los extractos obtenidos (Tomsik et al., 2016). Por ende, se probó la influencia de esta variable en el desarrollo del método, y el rango estudiado fue de 5 a 20 min. A su vez, la selección de un pH de extracción adecuado es un punto clave en el desarrollo del método, ya que el mismo puede influir en el rendimiento y la estabilidad de los compuestos levemente ionizables presentes en la matriz, especialmente los compuestos fenólicos (Roselló-Soto et al., 2019). Para este propósito, se estudió un rango de pH de la muestra variando de 4 - 8. Además, para examinar el efecto de la adición de un solvente orgánico sobre el rendimiento del procedimiento presentado, se utilizaron diferentes volúmenes de MeOH (0 - 1500 µL) de acuerdo con el diseño experimental. El rendimiento de extracción (% R) de cada analito se investigó como respuestas para optimizar las variables independientes (factores) (**Tabla II.3.**). El rendimiento de la extracción se calculó comparando el área de cada analito frente a las áreas obtenidas de una muestra blanco adicionada con cantidades conocidas de los fitoquímicos, inyectada directamente en el equipo cromatográfico.

En total se optimizaron simultáneamente ocho respuestas, y para maximizar las respuestas individuales (% R), el criterio seleccionado fue asignar más importancia a los analitos con mayor rendimiento de extracción. La **Figura II.6.** ilustra el análisis gráfico de la función de deseabilidad global. Este gráfico de contorno muestra la interacción entre dos factores, mientras que el factor restante se ha mantenido fijo.

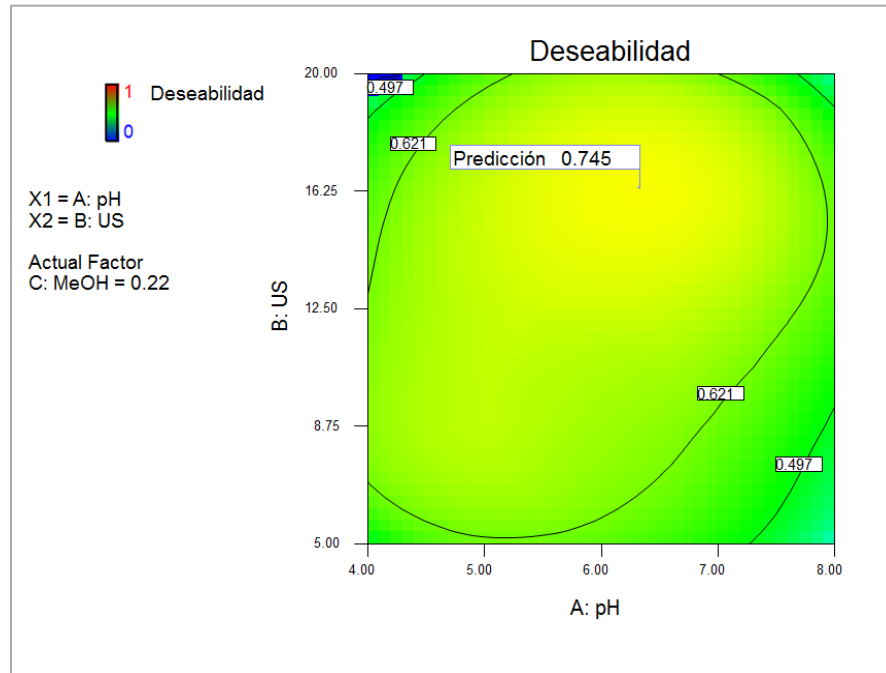


Figura II.6. Gráfico de contorno de la función deseabilidad global de las variables tiempo de ultrasonido vs. pH, manteniendo el volumen de metanol constante para la optimización de UAE

Tabla II.3. Niveles y factores evaluados en el modelo Box-Behnken para optimización de condiciones UAE

Corrida	A: pH	B: US	C: MeOH	Fructosa	Miricetina	Quercetina	Campferol	Alicina	E-Z-ajoeno	2-VD	DAS
1	6	12,5	0,75	65,96	87,15	33,46	100,09	89,74	98,66	88,65	91,10
2	6	12,5	0,75	64,99	82,35	27,73	90,93	82,56	98,24	83,33	86,90
3	6	12,5	0,75	55,36	87,67	28,37	95,12	80,33	97,21	79,39	89,37
4	6	12,5	0,75	65,27	86,98	34,98	92,83	83,12	92,29	93,65	92,23
5	4	12,5	0	60,46	56,09	58,26	93,78	80,33	81,88	65,10	69,09
6	4	20,0	0,75	25,09	45,75	51,23	78,75	77,16	98,34	93,11	98,82
7	6	20,0	0	49,93	48,29	95,7	69,31	86,48	89,95	60,53	47,81
8	8	12,5	0	54,06	55,64	52,33	93,56	97,26	92,35	64,83	83,90
9	6	5,00	0	68,39	47,37	55,59	72,75	77,36	68,15	51,23	31,27
10	6	12,5	0,75	64,99	87,69	40,98	97,23	87,18	97,83	86,88	90,81
11	8	20,0	0,75	32,02	70,22	84,30	90,99	86,77	99,04	31,88	112,9
12	4	12,5	1,50	36,81	52,00	49,06	83,15	91,03	99,54	59,56	75,30
13	6	5,00	1,50	59,45	40,67	26,60	92,01	72,24	90,45	19,09	42,95
14	6	20,0	1,50	45,34	45,75	78,27	70,14	73,42	87,06	81,77	35,68
15	8	5,00	0,75	43,18	55,38	37,71	84,47	73,44	80,92	88,44	110,7
16	4	5,00	0,75	46,12	78,89	64,39	103,38	82,55	98,78	3,600	90,86
17	8	12,5	1,50	49,53	55,75	37,43	81,93	82,46	90,51	97,49	96,63

A: pH de la muestra

B: Tiempo de extracción UAE

C: μL de metanol adicionado a cada muestra previo a la extracción

La recuperación analítica se consideró como respuestas,

Como puede apreciarse en el gráfico de la **Figura II.6.**, la función de deseabilidad alcanza su valor máximo ($d = 0,745$) al agregar 0,22 mL de MeOH con un valor de pH de 6,33, durante 16 min de ultrasonido. A partir de la gráfica, también se destaca que el área con mayor deseabilidad es grande, lo que está relacionado con la robustez del modelo. Si esta área fuera muy restringida, al menor cambio en las condiciones de extracción habría mucha variación en las respuestas. Al evaluar las condiciones óptimas de extracción, se pueden apreciar dos fenómenos principalmente. El rendimiento de extracción de los analitos depende del pH, y los valores de pH superiores a 7,5 y menores a 4 dan como resultado recuperaciones de extracción más bajas, especialmente para flavonoides y compuestos organoazufrados. Todos los flavonoles estudiados en este trabajo de investigación tienen valores de pKa superiores a 6,3 (miricetina 6,63 (Yao et al., 2014); campferol 7,49 (Matei, Tablet, Ionescu, & Hillebrand, 2014); quercetina 7,65 (Lemańska et al., 2004), por lo que un pH menor a estos valores asegura sus estados moleculares, y ayuda a facilitar sus extracciones y posterior determinación. Los OSCs elegidos en este estudio, por su parte, tienen un comportamiento de polaridad diferente, por lo que su estabilidad frente a cambios de pH varía según cada compuesto. La estabilidad de vinilditiinas, por ejemplo, disminuye con valores de pH altos, mientras que las cantidades de DAS y DADS aumentan en estas condiciones. La formación y estabilidad de alicina, por otro lado, parece favorecerse con valores de pH medios a más bajos (Yu, Wu, & Chen, 1989). Dado que la estabilidad de ambos, flavonoles y OSCs, es susceptible a pH extremos, trabajar en valores de pH medios puede ser más propicio para estos compuestos y así evitar su degradación, logrando un mayor rendimiento de extracción. Además, el aspecto que se destaca del estudio de optimización de la extracción es la influencia del tiempo de UAE en el porcentaje de recuperación de analitos. Como ya se mencionó, el tiempo de extracción puede influir positiva y negativamente en el proceso de extracción. Un tiempo de extracción mayor del necesario puede inducir el aumento de los costes energéticos y operativos del proceso. Sumado a esto, los compuestos inestables y reactivos pueden verse afectados por esta alta energía de ultrasonido si se someten a tiempos de extracción más largos induciendo su degradación (Tomsik et al., 2016). Por el contrario, los tiempos de extracción más bajos pueden limitar la ruptura de la estructura celular vegetal y, por lo tanto, la transferencia de masa de la matriz vegetal podría reducirse. Finalmente, la adición de MeOH parece ser un paso necesario durante el proceso de extracción. Este solvente orgánico fue elegido dada su polaridad, que sirve mejor para incrementar la partición de analitos entre sus ambientes naturales y el medio extractante. Además, numerosas investigaciones han empleado este solvente durante la extracción de azúcares (Karkacier et al., 2003; Pontes et al., 2016), flavonoides (Häkkinen, Kärenlampi, Heinonen, Mykkänen, & Törrönen, 1999; Sentkowska, Biesaga, & Pyrzynska, 2016) y OSCs (Arnault et al., 2003; de Diego et al., 2007). Aunque se ha afirmado que no existe una diferencia significativa en el contenido de los OSCs extraídas con agua, metanol-

agua y 50% de agua-etanol (Yoo, Lee, Lee, Seog, & Shin, 2010), una ligera adición de MeOH parece ayudar la extractabilidad de estos compuestos.

II.4. CIFRAS ANALÍTICAS DE MÉRITO DE LA METODOLOGÍA PROPUESTA

La necesidad de mediciones químicas de calidad, las cuales sean comparables y fiables, son cada vez más requeridas, ya que datos analíticos no confiables o resultados distorsionados pueden conducir a decisiones erróneas, conclusiones precipitadas y pérdidas financieras considerables. Siempre que se propone o desarrolla un procedimiento analítico, es necesario determinar si el método tiene un rendimiento adecuado para las condiciones en las que se aplicará (Valderrama y col., 2009). En particular, una vez desarrollado un método de análisis por HPLC, al igual que toda técnica analítica, se debe confirmar y documentar que los resultados producidos por él, son confiables (Quattrocchi y col., 1992).

La performance de un procedimiento analítico puede ser evidenciada por la determinación de parámetros conocidos como figuras o cifras analíticas de mérito. Estas cifras constituyen valores numéricos basados en una o más características de un sistema o dispositivo que representan una medida de su eficiencia o efectividad (Olivieri, 2014).

La selectividad del método, límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), rango lineal, repetibilidad y porcentaje de recuperación, %R fueron los parámetros seleccionados para evaluar el desempeño del método. Cuando los resultados obtenidos se adecuan a los valores preestablecidos por dichos parámetros se puede afirmar que la metodología analítica es confiable.

II.4.1. IDENTIFICACIÓN DE LOS ANALITOS Y ESPECIFICIDAD

La especificidad es la propiedad del método de producir una señal medible debida sólo a la presencia del analito, libre de interferencia de otros componentes en la matriz de la muestra. Estos compuestos pueden ser excipientes de una droga, productos de degradación o transformación, metabolitos de los mismos analitos en un fluido biológico, entre otros (Quattrocchi y col., 1992).

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

- **Tiempo de retención:** tiempo medido entre la inyección y la elución de la concentración máxima del soluto enésimo (máxima señal). Sirve para la identificación del pico. En el caso de disponer de estándares, puede realizarse una co-cromatografía adicionando una cantidad medida del estándar de referencia del

compuesto a la muestra con matriz, y su posterior inyección al cromatógrafo. De esta manera, si al comparar los cromatogramas obtenidos se observa un incremento en el área del pico cuyo tiempo de ocurrencia en la corrida se corresponde al del analito en la corrida cromatográfica del estándar, se confirmaría la identidad del analito.

- Pureza de Pico: Herramienta disponible en el software LabSolutions del cromatógrafo Shimadzu LC 20A y posible gracias a la posibilidad de obtener barridos espectrales en el rango UV/VIS por el detector de arreglo de diodos. Se basa en el cálculo de la pureza de cada pico comparando la forma de los picos y los espectros UV/VIS registrados.
- Caracterización espectral: se realiza un barrido espectrofotométrico en el rango UV/VIS (DAD), el cual pone de manifiesto la presencia de ciertos grupos funcionales de la molécula del analito.

II.4.1.1. Materiales y Métodos

Los reactivos, estándares, solventes, muestras, equipos utilizados y material de laboratorio, al igual que las condiciones cromatográficas fueran los mismos que los utilizados en la sección anterior.

II.4.1.1.1. Metodología de Trabajo

II.4.1.1.2. Preparación de solución a partir de estándares de referencia

Para la preparación de las soluciones de trabajo se partió de estándares adquiridos comercialmente o sintetizados en el laboratorio. A partir de estos se prepararon soluciones madres y con ellas se realizaron diluciones con una mezcla de cada uno de los estándares, separados los OSCs por un lado, flavonoles por otro, y la inulina aparte. En el caso de los estándares de ajoenos, 2-VD y DAS, cada uno con una concentración de 50 mg L⁻¹. Para ello se tomó un volumen conocido de las soluciones madre y se colocó en un matraz de 10 ml el cual se enrasó con MeOH. Por su parte, para la alicina se hizo una dilución hasta llegar a 50 mg L⁻¹. Una vez realizadas estas soluciones, para determinar la especificidad del método cromatográfico, las soluciones se inyectaron por triplicado directamente en el cromatógrafo, siguiendo los pasos detallados en la sección II.3.1.4.

II.4.1.1.3. Preparación de la muestra blanco para el estudio de la especificidad

Las muestras se prepararon como se describió en la sección II.3.1.3.1. en un tubo de 15 mL con fondo cónico, se tomó una alícuota de 0,15 g de ajo con aliinasa inactivada y se agregaron cinco (5) mililitros de agua destilada. Luego se procedió a realizar la metodología propuesta con los pasos esquematizados en la **Figura II.2**. Con ese extracto luego se realizó co-cromatografía, adicionando cantidades conocidas de cada analito, para analizar la especificidad. De las corridas cromatográficas realizadas (por triplicado) se obtuvieron los valores de tiempo de retención, área y pureza de pico de cada analito.

II.4.1.1.2. Resultados y Discusión

Los tiempos de retención y pureza de pico correspondientes a cada uno de los analitos presentes en las muestras inyectadas al HPLC se presentan a continuación (**Tabla II.4**). Como E- y Z-ajoeno co-eluyen se consideran como un solo pico. Valores negativos de Índice de Pureza de Pico indican la presencia de impurezas en los picos, en estos casos no se encontraron impurezas para los tiempos de retención establecidos.

Tabla II.4. Tiempos de retención (promedio) y pureza de pico de los compuestos bajo estudio

Compuestos organoazufrados	Tiempo de retención (minutos) RP-HPLC-DAD	Índice de Pureza de pico
Alicina	4,45	0,96
Ajoeno	6,07	0,75
2-vinil-4H-1,3-ditiina	8,55	0,90
Dialil sulfuro	10,8	0,96
Flavonoles y Azúcares	Tiempo de retención (minutos) HILIC-HPLC-DAD	Índice de Pureza de pico
Campferol	5,15	0,54
Miricetina	5,75	0,13
Quercetina	6,41	0,96
Fructosa	7,10	0,30
Glucosa	9,02	0,56

Del análisis espectral en el rango UV/VIS, el cual se pudo realizar mediante el detector DAD, se coleccionaron los espectros de los analitos para confirmar la identidad de cada uno de ellos comparando los mismos con bibliotecas de espectros o antecedentes reportados. Los mismos se encuentran en el capítulo **Anexos, sección B**. En el caso de la fructosa y glucosa (producto de la hidrólisis de inulina), los espectros UV obtenidos con nuestro equipamiento no lograron ser fácil de analizar, pero se confirmó la identidad de estos analitos mediante co-cromatografía y comparando los tiempos de retención por detección con RID.

A partir del análisis de los datos obtenidos se puede concluir que no se observaron interferencias significativas en los cromatogramas resultantes de la metodología analítica y mediante el análisis por espectrofotometría UV/VIS pudo comprobarse que los espectros obtenidos de cada analito en los cromatogramas corresponden a las estructuras químicas de los estándares bajo estudio.

II.4.2. CONSTRUCCIÓN DE CURVAS DE CALIBRACIÓN Y DETERMINACIÓN DEL RANGO LINEAL

La linealidad corresponde a la capacidad de un procedimiento analítico para proporcionar un resultado directamente proporcional a la concentración de la sustancia de interés dentro de un intervalo específico de concentraciones en las que se aplica el método en la muestra (Valderrama y col., 2009). Para medir esta capacidad es necesario entonces determinar el rango lineal, es decir, el intervalo comprendido entre la concentración mínima y máxima de analito para el cual el método ha sido probado y dentro del cual se puede efectuar el dosaje por interpolación en una curva de calibración considerando la matriz. Una de las formas de hacerlo consiste en la preparación una serie de soluciones de la muestra, que contengan concentraciones conocidas y crecientes de los analitos, se inyectan al menos por triplicado y se determina la curva de regresión $Y = A.X + B$ sobre los puntos individuales sin promediar por el método de los mínimos cuadrados, y finalmente se grafica (Quattrocchi, 2019).

II.4.2.1. Materiales y Métodos

Los reactivos, estándares, solventes, muestras, equipos utilizados y material de laboratorio, al igual que las condiciones cromatográficas fueran los mismos que se enlistaron en la sección II.3.1.

II.4.2.1.1. Metodología de Trabajo

En todos los ensayos, se utilizó una muestra blanco de ajo con aliinasa inactivada, agregando cantidades conocidas de alicina, E-Z-ajoeno, 2-VD, DAS, campferol, miricetina, quercetina e inulina. La cuantificación de los analitos se realizó por el método de adición de estándar. No es posible eliminar flavonoles y azúcares de la muestra blanco por lo que se realizó una cuantificación inicial de esta muestra y se consideraron las cantidades iniciales de estos analitos en todos los cálculos. E- y Z-ajoeno co-eluyen cuando se usa fase reversa, por lo que se consideraron juntos a lo largo del análisis (Iberl et al., 1990). Para todos los compuestos se construyeron curvas de calibración con cinco niveles de concentración por triplicado. Los puntos analizados

para alicina fueron 25, 50, 100, 250 y 500 partes por millón (ppm - $\mu\text{g mL}^{-1}$); para E-Z-ajoeno, 2-VD y DAS 10, 25, 50, 75 y 100 ppm; para miricetina, quercetina y campferol 2,5; 5; 15; 30 y 50 ppm. Luego de adicionadas las muestras con los niveles establecidos de los compuestos bioactivos, se procedió a realizar la metodología de extracción, fraccionamiento y separación como se indicó en la sección II.3.1.3.1.

Por otro lado, es importante resaltar que en el presente estudio nos enfocamos en la cuantificación final de inulina. Pero, dado que la inulina es un polisacárido complejo su cuantificación implica un proceso de enzimólisis que finalmente produce fructosa y glucosa, como ya se mencionó (Quemener y Thibault, 1994). Lo anterior implica un análisis separado de los resultados en cuanto a determinación del rango lineal de fructosa y glucosa ya que los mismos representan los analitos cromatográficos reales medidos una vez que la inulina es hidrolizada por la enzima fructanasa.

II.4.2.2. Resultados y Discusión

Una vez obtenidos los datos, se construyó la curva de regresión $y = a \cdot x + b$ sobre los puntos individuales. En ordenadas se indica el área del pico (variable dependiente), y en abscisas la concentración de cada estándar en ppm (variable independiente).

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

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

En la **Tabla II.5.** donde se muestran los resultados obtenidos de las curvas de calibración de cada analito.

Tabla II.5. Estimadores de regresión para cada analito

Analito	Ecuación de la recta	R ²
Alicina	7.140,44 x + 46.8641,88	0,9930
E- y Z-Ajoeno	36.635,54 x -21.279,68	0,9910
2-VD	15.659,59 x – 105.393,88	0,9910
DAS	1.523,24 x + 23.046,85	0,9940
Campferol	4.324,59 x + 10.3842,72	0,9924
Miricetina	8.189,62 x + 78.313,36	0,9988
Quercetina	68.886,43 x + 79.087,54	0,9921

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

Por otra parte, para estudiar la curva de calibración de la inulina, se debe considerar que la fructosa es el analito final a determinar en el análisis cromatográfico. Sorprendentemente, la proporción de fructosa / glucosa dentro de la inulina fluctúa en la práctica, según el origen del producto crudo del que se obtiene la inulina (Vendrell-Pascuas et al., 2000). Así, evaluamos la cantidad de fructosa obtenida de la inulina hidrolizando la muestra con fructanasa (siempre teniendo en cuenta la cantidad inicial de fructosa libre). Este procedimiento nos permite obtener el factor de conversión de fructosa en inulina. Se puede observar en la **Tabla II.6.**, que la cantidad de fructosa obtenida vs. el rango de inulina agregada (10-35 mg mL⁻¹) mostró una buena linealidad (r = 0,9609).

Tabla II.6. Linealidad de inulina vs. fructosa

	Cantidad de inulina adicionada (mg.mL ⁻¹)	Cantidad de fructosa obtenida luego de la hidrólisis (mg.mL ⁻¹)
Muestra blanco	0	143,17
	10	153,18
	15	164,68
	20	167,13
	25	173,42
	30	179,55

$a^a = 1.2296, b = 143, r = 0.9609$

$^a y = ax+b$

II.4.3.DETERMINACIÓN DEL LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

Los parámetros a definir al evaluar sensibilidad de un método son:

- Límite de detección (LOD): es la menor concentración de analito que puede ser detectado, pero no necesariamente cuantificado, en las condiciones experimentales establecidas. Se expresa en unidades de concentración (% , ppm, ppb, etc).
- Límite de cuantificación (LOQ): es la menor concentración de analito que puede ser determinada cuantitativamente con una adecuada precisión y exactitud bajo las condiciones experimentales establecidas. Se expresa en unidades de concentración (Quattrocchi, 2019)

II.4.3.1. Materiales y Métodos

Los reactivos, estándares, solventes, muestras, equipos utilizados y material de laboratorio, al igual que las condiciones cromatográficas fueran los mismos que se enlistaron en la sección II.3.1.

II.4.3.1.1. Metodología de Trabajo

Para determinar los límites de detección y cuantificación se prepararon muestras blanco de ajo en tubos de 15 mL con fondo cónico, adicionando 5 mL de agua destilada a 0,15 g de ajo con aliinasa inactivada, y luego la misma se enriqueció con los estándares de OSCs, flavonoles e inulina alcanzando la alicina una concentración de 25 mg L⁻¹, 10 mg L⁻¹ el resto de los OSCs, 2,5 mg L⁻¹ los flavonoles, y 5 mg mL⁻¹ para la inulina. A continuación se procedió a realizar la metodología analítica propuesta basada en UAE, con posterior fraccionamiento (detalles sección II.3.1.3.1). La fase extraída se secó con nitrógeno gaseoso y se disolvió en 500 µL de fase móvil, se filtró y finalmente se inyectó por triplicado en el cromatógrafo.

Si bien existen diferentes metodologías para calcular los límites de detección y cuantificación, en nuestro caso se utilizó la siguiente:

- LOD = 3S

- LOQ = 10S

A partir de las corridas cromatográficas se obtuvieron en primer caso las áreas de cada analito y luego las desviaciones estándar (S). Seguidamente se calculan LOD y LOQ y luego estos valores se reemplazaron en la ecuación de la recta de las curvas de calibración de los OSCs, flavonoles y fructosa, para encontrar las concentraciones en ppm. En el caso de la inulina, el LOD y LOQ se definieron en función de los LOD y LOQ de fructosa producto de la hidrólisis.

II.4.3.2. Resultados y Discusión

En la **Tabla II.7.** se muestran los valores obtenidos para determinar la sensibilidad del método.

Se puede observar que en todos los casos los límites de cuantificación se encuentran dentro de parámetros aceptables.

Tabla II.7. Límites de detección y límites de cuantificación de los compuestos de interés utilizando la metodología propuesta

Analito	Área	Desviación estándar (S)	LOD (3S)	LOQ (10S)	LOD (ppm)	LOQ (ppm)
Alicina	495801	7728,32	23184,97	77283,22	1,21	4,02
	485528					
	480663					
Ajoeno	399686	5184,50	15553,50	51845,00	1,01	2,00
	410055					
	404873					
2 vinyl-4H-1,3 ditiina	102276	1890,00	5670,00	18900,00	7,09	7,94
	106056					
	104164					
DAS	46581	1264,16	3792,49	12641,62	2,15	7,17
	45548					
	44066					
Camferol	109078	2813,38	8440,14	28133,79	0,15	0,5
	111376					
	114675					
Miricetina	131076	17156,94	51470,82	171569,39	2,05	6,85

	97014					
	117639					
Quercetina	53669	6481,97	19445,92	64819,73	1,10	3,67
	59872					
	66629					
Fructosa	1488767	19754,03	59262,09	197540,3	0,06	0,21
	1508581					
	1469073					
Glucosa	565176	30270,04	90810,11	302700,35	0,21	2,30
	519216					
	576322					

Estos valores relacionados con la sensibilidad son similares a los encontrados en otras metodologías reportadas para OSCs (Locatelli et al., 2014), flavonoles (Kumar et al., 2008) y fructanos (Petkova et al., 2017).

II.4.4. DETERMINACIÓN DE LA REPETIBILIDAD

La repetibilidad expresa el grado de concordancia entre los resultados de una serie de mediciones para una misma muestra homogénea bajo las mismas condiciones operativas (Quattrocchi, 2019). Se expresa matemáticamente como la desviación estándar, " σ ", estimada analíticamente por " s " o más comúnmente como la desviación estándar relativa o coeficiente de variación (CV%).

II.4.4.1. Materiales y Métodos

Los reactivos, estándares, solventes, muestras, equipos utilizados y material de laboratorio, al igual que las condiciones cromatográficas fueran los mismos que se enlistaron en la sección II.3.1.

II.4.4.1.1. Metodología de Trabajo

Para evaluar la repetibilidad del método analítico, la dispersión de seis repeticiones se determinó y se calculó RSD (desviación típica relativa). Cada muestra se preparó de acuerdo a la sección II.3.1.3.1., adicionando 5 mL de agua destilada a 0,15 g de cada muestra de ajo blanco, y luego la misma se enriqueció con los estándares de OSCs y flavonoles alcanzando cada uno una concentración de 75 mg L⁻¹, y 20 mg L⁻¹ para la inulina. Luego las muestras se extrajeron, fraccionaron y determinaron por HPLC.

La desviación estándar se calculó en base a la siguiente fórmula:

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

Donde:

n= número de medidas

x_i= valor medido en el ensayo i

\bar{x} = valor promedio

Luego la desviación estándar relativa (CV% o RSD) se calculó como sigue:

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

Donde:

S= desviación estándar

\bar{x} = valor promedio

II.4.4.2. Resultados y Discusión

Los resultados de los ensayos para determinar la precisión de seis repeticiones se presentan en la tabla siguiente (**Tabla II.8.**).

Tabla II.8. Medias, Desviaciones estándar y Desviaciones estándar relativas de las áreas de los compuestos bajo estudio (n=6)

Muestra	Alicina	Ajoeno	2-VD	DAS	Campferol	Miricetina	Quercetina	Fructosa	Glucosa
S	403213,3	61001,54	26570,05	3970,63	8185,44	5383,1	3073,15	58703,64	20466,98
Media	1475219,17	1562884,3	595686,67	84756	178847,5	223512,5	74231,5	2752878,5	552385,67
CV%	3,66	3,90	4,46	4,68	4,58	2,41	4,14	2,13	3,71

En la **Tabla II.9.** puede observarse la relación del coeficiente de variación porcentual para una técnica analítica en función de los límites de aceptación y número de repeticiones.

Tabla II.9. Criterios de aceptación.

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

Fuente: Quatrocchi et al., 1992

Para nuestro caso se toma como referencia CV% del método porque se incluye todos los pasos desde preparación de la muestra. De manera que para un límite de aceptación de 90-110% el método es preciso para todos los analitos ya que los valores encontrados de CV% se encuentran dentro del rango de aceptación (menor o igual a 5,5%).

II.4.5. DETERMINACIÓN DE RECUPERACIONES CUANTITATIVAS

Está relacionado con la exactitud de la metodología, que expresa el grado de concordancia entre el valor medido de un analito y un valor considerado verdadero o de referencia. Las formas más utilizadas para evaluar la exactitud de un método son: materiales de referencia, métodos de comparación, experimentos de recuperación y adición estándar. De todas ellas la más usada, es sin dudas la recuperación. Estadísticamente se efectúa un test “t” de Student para ver si el valor hallado y el verdadero no difieren significativamente. Esta diferencia debe ser tan pequeña como sea posible, es decir la recuperación del analito debe tender a alcanzar al 100%. Se calcula el estadígrafo t_{exp} y se compara con el t de tablas para n-1 grados de libertad y para un nivel de significancia $\alpha=0,05$ (Quattrocchi et al., 1992).

II.4.5.1. Materiales y Métodos

Los reactivos, estándares, solventes, muestras, equipos utilizados y material de laboratorio, al igual que las condiciones cromatográficas fueran los mismos que se enlistaron en la sección II.3.1.

II.4.5.1.1. Metodología de Trabajo

Para evaluar la recuperación de la técnica de extracción, se prepararon muestras de acuerdo a la sección II.3.1.3.1. Las mismas se enriquecieron con los estándares de los compuestos a tres niveles, alcanzándola alicina concentraciones de 50, 100 y 250 mg L⁻¹, el resto de los OSCs una concentración de 25, 50 y 75 mg L⁻¹; los flavonoles 5, 15 y 30 mg L⁻¹; y la inulina 10, 15 y 30 mg mL⁻¹. A continuación se procedió a realizar la metodología analítica propuesta basada en UAE, con posterior fraccionamiento (detalles sección II.3.1.3.1). La fase extraída se secó con nitrógeno gaseoso y se disolvió en 500 µL de fase móvil, se filtró y finalmente se inyectó por triplicado en el cromatógrafo.

Para los OSCs, los cálculos se realizaron de acuerdo con Rezaee et al., 2006 y Ramirez et al., 2017, el factor de enriquecimiento (EF) se definió como la relación entre la concentración del analito en la fase sedimentada (C_{sed}) y la concentración inicial de analito (C_0) dentro de la muestra:

$$EF = \frac{C_{sed}}{C_0}$$

La C_{sed} se obtuvo al graficar una curva de calibración de la inyección directa de soluciones con concentraciones conocidas conteniendo una mezcla de los estándares de OSCs. Las concentraciones para armar la curva variaron en rango de 10 a 200 (500 para alicina) mg L⁻¹.

La recuperación de la extracción (ER o %R) se definió como el porcentaje de la cantidad total de analito (n_0) que se extrajo a la fase sedimentada (n_{sed}).

$$ER = \frac{n_{sed}}{n_0} \times 100 = \frac{C_{sed}}{C_0} \times \frac{v_{sed}}{v_{aq}} \times 100$$

Para cuantificar flavonoles e inulina las áreas obtenidas de las muestras se compararon frente a curvas de calibración resultantes de la inyección directa de soluciones con concentraciones conocidas conteniendo una mezcla de los estándares de referencia. No es posible eliminar flavonoles y azúcares de la muestra blanco por lo que se realizó una cuantificación inicial de esta muestra y se consideraron las cantidades iniciales de analitos en todos los cálculos.

Finalmente para determinar si el método es exacto, se calcula el estadígrafo t_{exp} y se compara con el t de tablas para $n-1$ grados de libertad y para un nivel de confianza elegido, $p=0,05$.

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

Donde:

t_{exp} = valor de t experimental

\bar{R} = media de recuperaciones

n = total de repeticiones

CV%: coeficiente de variación porcentual o desviación estándar relativa

II.4.5.2. Resultados y Discusión

Las **Tablas II.10. - II.11.** muestran los resultados obtenidos de los ensayos realizados para determinar la exactitud del método.

Tabla II.10. Recuperaciones, Factores de enriquecimiento, CV% y t_{exp} para OSCs

Concentración inicial	Alicina		Ajoeno			2-VD		DAS	
	Factor de enriquecimiento	%R	Concentración inicial	Factor de enriquecimiento	%R	Factor de enriquecimiento	%R	Factor de enriquecimiento	%R
50	5,5	91,5	25	5,4	90,1	6,2	103,0	2,8	84,0
50	5,6	93,4	25	5,5	91,8	5,9	99,2	2,6	79,2
50	5,6	92,4	25	5,5	90,9	6,1	101,1	2,5	74,2
100	5,9	97,8	50	5,6	93,4	5,7	94,9	2,8	83,7
100	5,9	98,8	50	5,6	93,8	6,3	104,5	3,1	91,6
100	5,9	98,3	50	5,6	93,6	5,9	99,7	2,9	89,1
250	4,9	82,7	75	6,9	114,7	5,9	99,8	3,6	108,7
250	4,5	75,2	75	6,7	111,6	6,1	102,0	3,4	101,9
250	4,7	78,9	75	6,8	113,2	6,1	100,9	3,3	99,9
	Media de las recuperaciones	89,9		Media de las recuperaciones	99,2		100,6		90,3
	S	8,82		S	10,56		2,69		11,36
	CV%	9,81		CV%	10,64		2,67		12,56
	t_{exp}	1,78		t_{exp}	0,22		0,65		2,30

Tabla II.11. Recuperaciones, Factores de enriquecimiento, CV% y t_{exp} para flavonoles e inulina

Concentración inicial	CAMFEROL		MIRICETINA		QUERCETINA		INULINA	
	Concentración inicial – Concentración blanco	%R	Concentración inicial – concentración blanco	%R	Concentración inicial – concentración blanco	%R	Concentración inicial	%R
5	5,08	101,55	4,69	93,7	4,58	91,59	10	101,31
5	4	80,05	4,95	99,03	4,03	80,53	10	100,45
5	4,54	90,8	4,82	96,37	4,3	86,06	10	100,88
15	12,08	80,5	15,83	105,55	12,05	80,31	15	85,74
15	12,45	82,99	16,95	112,99	13,79	91,96	15	93,07
15	12,26	81,75	16,39	109,27	12,92	86,13	15	89,41
30	34,85	116,17	24,28	80,93	28,03	93,43	30	100,15
30	35,07	116,9	26,05	86,84	29,27	97,56	30	107,57
30	34,63	115,44	25,17	83,89	28,65	95,49	30	103,86
	Media de las recuperaciones	96,24	Media de las recuperaciones	96,51	Media de las recuperaciones	89,23	Media de las recuperaciones	98,05
	S	16,3775238	S	11,32	S	6,27	S	7,10872698
	CV%	5,8763561	CV%	8,52	CV%	14,24	CV%	7,2501013
	t_{exp}	1,92	t_{exp}	1,22	t_{exp}	2,26	t_{exp}	0,806

Estos porcentajes de recuperación concuerdan con los valores reportados previamente para alicina, E-Zajoeno, 2-VD y DAS (Locatelli et al., 2014; Weinberg et al., 1993; Yoo et al., 2012) al comparar los resultados de las OSC. Los rendimientos de extracción de flavonoles e inulina encontrados en el presente estudio también concuerdan con otros valores reportados con respecto a las matrices vegetales (Kaliyaperumal, Kumarakurubaran, & Devi K. M., 2013; Petkova et al., 2017; Vendrell-Pascuas et al., 2000).

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

II.5. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE DIFERENTES PRODUCTOS DE AJO EN RELACIÓN A SU CONTENIDO DE FITOQUÍMICOS. ESTUDIO COMPARATIVO DE SU POTENCIAL NUTRACÉUTICO GLOBAL

Los productos naturales, ya sean de interés gastronómico o farmacéutico, pueden considerarse una fuente invaluable de metabolitos secundarios biológicamente activos. Se ha demostrado claramente que el *screening* de productos naturales, en busca de compuestos bioactivos, puede ser un enfoque exitoso para el descubrimiento de nuevos fármacos potenciales. Sin embargo, el proceso de búsqueda de compuestos biológicamente activos es laborioso, lento y costoso. Además, las diferencias de concentración entre diferentes metabolitos secundarios plantean problemas adicionales (Cieśła & Moaddel, 2016).

En general, es esperable que los productos basados en fitoquímicos sean sustancialmente más seguros, con efectos secundarios menores que los medicamentos farmacéuticos sintéticos; sin embargo, todavía hay una falta de normativas estandarizadas sobre sus recomendaciones de producción, fabricación y consumo. Lo anterior se relaciona con el hecho de que el contenido cuali-cuantitativo de fitoquímicos en las fuentes naturales de los fitoquímicos (frutas y verduras) varía según la temporada, clima, regiones, entre otros factores (Bernal et al., 2011). En este sentido, el desarrollo de métodos analíticos avanzados es obligatorio para caracterizar adecuadamente cada producto natural o procesado rico en compuestos bioactivos. Las metodologías analíticas también ayudan a comprender mejor los efectos beneficiosos para la salud de los compuestos bioactivos. Con el fin de desarrollar adecuadamente suplementos dietéticos o hacer recomendaciones de consumo, se emplean ensayos *in vitro*, *in vivo* y clínicos para evaluar la exposición fisiológica una vez ingeridos los fitoquímicos. Para ello, se suelen emplear diferentes herramientas analíticas para estimar los niveles de compuestos activos o sus metabolitos.

Consecuentemente con lo expuesto, se empleó la metodología multi-fitoquímica propuesta para determinar el contenido de compuestos bioactivos polares y apolares en diferentes preparaciones de ajo, para verificar

la idoneidad del método. Finalmente, considerando estos resultados cuantitativos, evaluamos cómo las diferentes preparaciones a base de ajo se relacionan con diferentes propiedades funcionales. Esto con el fin de estudiar la aplicabilidad del método en cuanto al acercamiento del valor funcional real de estos productos teniendo en cuenta los posibles efectos sinérgicos entre las distintas familias de fitoquímicos. Determinar el valor potencial total de los productos de ajo puede conducir a *health-claims* más acertadas de cada preparación, así como a recomendaciones dietarias adecuadas.

II.5.1. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE PRODUCTOS A BASE DE AJO

II.5.1.1. Materiales y Métodos

Los reactivos, estándares, solventes, equipos utilizados y material de laboratorio, al igual que las condiciones cromatográficas fueran los mismos que los utilizados en la sección II.3.1.

II.5.1.1.1. Muestras

II.5.1.1.2. Muestras de Ajo

- Material Vegetal: Para todos los ensayos se utilizó el clon de ajo rojo “Rubi” de la colección de germoplasma del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) La Consulta, Mendoza. El ajo se cultivó en el campo experimental del INTA ubicado en La Consulta, Mendoza, Argentina ($33^{\circ} 44' S$, $69^{\circ} 07' W$) en 2014.
- Muestras cocidas: Dado que el ajo cocido representa la forma más consumida de esta hortaliza, se preparó ajo frito feteado (AFF) Locatelli et al., 2015. Brevemente, se preparó el ajo cocido cortando los dientes en trozos de aprox. 2 mm de espesor y friéndolos en 50 mL de aceite de girasol ($180^{\circ} C$) durante 2 minutos. Posteriormente, las muestras de ajo cocido se liofilizaron a $-58^{\circ} C$ durante 72 h (Freeze Dry Systems LabConco Model Freezone 2.5, Kansas, MO, EE. UU.). El material liofilizado resultante se trituró usando un mortero y se almacenó a $-80^{\circ} C$.
- Muestras de ajo en polvo: para simular una formulación nutracéutica o comercial, dientes de ajo crudos se liofilizaron a $-58^{\circ} C$ durante 72 h (Freeze Dry Systems LabConco Model Freezone 2.5, Kansas, MO, EE. UU.). El material liofilizado resultante se trituró utilizando un mortero y se almacenó a $-80^{\circ} C$.
- Muestras de ajo negro: El ajo negro se compró a QBlack (Agroprimar, Argentina).

- Muestra de ajo líquido: Esta muestra corresponde a un saborizante líquido de jugo de ajo, comercializado por un mercado local en Mendoza, Argentina (Recetas de Entonces[®])

II.5.1.2. Preparación de muestras y fraccionamiento de analitos

II.5.1.2.1. Preparación de muestras de diferentes productos a base de ajo

De cada tratamiento se reservaron y homogeneizaron 5 g de sub-muestra. Luego, en un tubo de 15 mL con fondo cónico, se tomó una alícuota de 0,15 g de ajo en polvo liofilizado, o 0,5 g de ajo cocido, ajo negro y saborizante líquido de ajo, y se agregaron cuatro (4) mililitros de agua destilada. Continuamente, se les añadió un nivel de 25 mg L⁻¹ de alicina, E-Z ajoeno, 2-VD y DAS, 20 mg L⁻¹ de campferol, quercetina y miricetina, y 10 mg mL⁻¹ de inulina. El procedimiento seguido desde este punto es el mismo que se explicó en el apartado II.3.1.3.1. y esquematizado en la **Figura II.1**. Finalmente, tanto los flavonoides como los azúcares presentes en las muestras fueron analizados por modo cromatográfico HILIC, mientras que los OSC de DLLME fueron analizados por RP-HPLC.

II.5.1.3. Resultados y Discusión

Una vez evaluado el rendimiento analítico del método desarrollado, se analizaron cuatro formas de preparación de ajo. Estas muestras representan las formas de productos a base de ajo más consumidas en nuestra región, y constituyen tanto preparaciones de ajo utilizadas como ingredientes culinarios, como productos comercializados como suplementos nutracéuticos. Los resultados se muestran en la **Tabla II.12**.

Con respecto al ajo crudo liofilizado, los resultados cuali-cuantitativos aquí encontrados son consistentes con reportes anteriores. En esta muestra se destacó la alicina del resto de los compuestos (2079,664 µg g⁻¹ muestra), también se encontraron cantidades menores de E-Z-ajoeno y DAS (77,170 y 0,301 µg g⁻¹ muestra, respectivamente). Este alto nivel de alicina concuerda con otros valores reportados para ajo fresco (Locatelli et al., 2014; Wanyika et al., 2010), o formas de preparación de ajo crudo, principalmente ajo en polvo (de Diego et al., 2007; Lawson & Gardner, 2005; Rybak, Calvey, & Harnly, 2004; Wang et al., 2009). Es importante resaltar que en este caso, la muestra liofilizada de ajo crudo se hidrató y se dejó reposar por 15 min para asegurar la formación de alicina. Si no se hiciera este paso, la aliina sería el principal compuesto organosulfurado presente en esta muestra, pero como ya afirmaron otros autores, la alicina es el compuesto bioactivo más potente presente en el ajo crudo (Miron et al., 2002), por lo tanto este paso de hidratación previo al consumo, es necesario para aprovechar al máximo la bioactividad de esta forma de preparación de

ajo. En este sentido, varios meta-análisis basados en Ensayos Controlados Aleatorizados (RCT por sus siglas en inglés) han establecido que la ingesta de preparados de ajo en polvo con altos niveles de alicina han contribuido a una mejora del perfil lipídico plasmático, niveles más bajos de triglicéridos y colesterol total en sangre (Corzo-Martinez et al., 2007; Silagy & Neil, 1994; Zeng et al., 2012), además de evidenciar propiedades anti-hipertensivas (Rohner, Ried, Sobenin, Bucher, & Nordmann, 2015; Xiong et al., 2015).

El segundo compuesto más importante en esta muestra fue la inulina, presente en altos niveles (4,66 % p/p). Cardelle-Cobas, Costo, Corzo, & Villamiel, 2009 y Guevara-Figueroa et al., 2015 también encontraron cantidades de fructanos similares a las cuantificadas en nuestro estudio. Estos hallazgos concuerdan con otros reportes que consideraban al ajo como una fuente importante de FOS e inulina (Espinosa-Martos, 2006; Taylor et al., 1995). La inulina se ha estudiado como un agente prebiótico, y también se ha asociado con efectos de prevención cardíacos, principalmente debido a sus propiedades anti-hiperlipidémicas (Causey, Feirtag, Gallaher, Tunland, & Slavin, 2000; Liu, Prabhakar, Ju, Long, & Zhou, 2016). Por lo tanto, de acuerdo con nuestros resultados, dado que la inulina está presente en cantidades considerables en las muestras liofilizadas de ajo crudo (que representan el ajo en polvo), un consumo a largo plazo de estas muestras contribuiría al variado conjunto de bioactividades asociadas con este compuesto.

A su vez, los niveles de flavonoles en la muestra liofilizada de ajo crudo fueron notablemente altos, en el rango de 951-5.425 $\mu\text{g g}^{-1}$ muestra. Otros autores han reportado altos valores de miricetina, campferol o quercetina en preparaciones de ajo fresco, sin embargo estos niveles varían según el cultivar, la región y la temporada, entre otros factores. La mayoría de los informes coinciden en que los niveles de miricetina en el ajo crudo son más altos que el campferol y la quercetina (Azzini et al., 2014; Mian & Mohamed, 2001), esto es consistente con nuestros hallazgos, pero nuestro método se destaca del resto en que permitió determinar algunos flavonoles que en otros trabajos no pudieron ser detectados con las metodologías analíticas empleadas (de Queiroz et al., 2014; Sultana & Anwar, 2008). No hay disponible información sobre las bioactividades asociadas al consumo de flavonoles presentes en el ajo en polvo, sin embargo existen estudios sobre los efectos plasmáticos antioxidantes atribuidos a los compuestos fenólicos de los extractos de ajo (Banerjee & Maulik, 2002; Bozin et al., 2008; Durak et al., 2004). Con base en lo anterior, y considerando los altos niveles de flavonoles encontrados en nuestro estudio para muestras de ajo crudo, consideramos que sería interesante enfocar más estudios en este grupo fitoquímico en relación al consumo de muestras de ajo en polvo.

Tabla II.12. Concentraciones de OSCS, flavonoles e inulina que se encuentran en diferentes formas de preparación de ajo

Grupo de fitoquímicos	Muestra Analito	Ajo en polvo	Ajo cocido en polvo	Ajo negro	Ajo líquido
OSCs^a	Alicina	2079,900 ± 12,731	nd	2,946 ± 0,316	nd
	Ajoeno	77,170 ± 0,347	28,672 ± 0,402	0,136 ± 0,001	1,191 ± 0,073
	2-VD	nd	26,357 ± 0,440	0,137 ± 0,001	0,127 ± 0,007
	DAS	0,301 ± 0,020	0,768 ± 0,025	nd	nd
Flavonoles^a	Camferol	1169,400 ± 8,983	228,199 ± 2,386	1831,619 ± 14,069	148,415 ± 12,149
	Miricetina	5425,940 ± 25,924	291,768 ± 18,293	nd	nd
	Quercetina	951,596 ± 16,284	108,747 ± 14,088	152,222 ± 19,710	69,780 ± 3,779
Concentración de azúcares en mg g⁻¹					
Azúcares	Inulina	4,663 ± 0,281	4,095 ± 0,275	1,864 ± 0,005	0,740 ± 0,011
	Fructosa	0,034 ± 0,002	nd	0,086 ± 0,001	0,003 ± 0,000
	Glucosa	0,314 ± 0,027	0,154 ± 0,003	0,152 ± 0,001	0,033 ± 0,005

^a Valores promedios (n=3) expresados como $\mu\text{g g}^{-1}$ de muestra \pm SD. ND: no detectado, considerando LOD de la Tabla 2.

Al analizar la muestra liofilizada de ajo cocido notamos en primer lugar que el tratamiento de cocción originó productos de degradación de la alicina, dando como resultado E-Z-ajoeno, 2-vinilditiinas y DAS, en concentraciones de 28,7; 26,4 y 0,8 $\mu\text{g g}^{-1}$ muestra, respectivamente. En Locatelli et al., 2015 encontraron concentraciones similares de OSCs. Como lo indicado en ese estudio, nuestros resultados refuerzan la idea de que, aunque la alicina sufre una transformación química extensa, el perfil de compuestos organoazufrados que resultan del proceso de cocción es particularmente variado, y las cantidades de cada compuesto son considerables desde un punto de vista biológico. Al respecto, informes anteriores han demostrado que la ingesta de preparados de ajo, ricos en productos de degradación de alicina (ajoenos, vinilditiinas y sulfuros de alilo), conduce a numerosas propiedades biológicas como efectos protectores cardiovasculares, efectos anticancerígenos y antioxidantes (Banerjee & Maulik, 2002; Jastrzebski et al., 2007; Locatelli, Nazareno, Fusari, & Camargo, 2017). De acuerdo con esta idea, hemos verificado que las muestras de ajo cocido son fuentes importantes de una variedad de OSCs con propiedades promotoras de la salud.

Los flavonoides asociados con las muestras de ajo cocido no se han estudiado en profundidad. Gorinstein et al., 2008 y de Queiroz et al., 2014 han abordado la determinación de quercetina y diferentes ácidos fenólicos, pero no pudieron lograr la determinación de miricetina y campferol. Favorablemente, nuestra metodología analítica nos permitió determinar campferol, miricetina y quercetina en niveles sustanciales (228,2; 291,8; 108,8 $\mu\text{g g}^{-1}$ muestra, respectivamente). Otros han verificado que los flavonoides presentes en muestras de vegetales cocidos aún ejercen diferentes bioactividades en el organismo, en su mayoría relacionadas con efectos antioxidantes (Gorinstein et al., 2008, 2006), o como moduladores de procesos anticancerígenos (Capasso, 2013). Nuestros resultados sugieren que a pesar de que los niveles de flavonoles disminuyeron en comparación con las muestras de ajo crudo, su contenido aún sería significativo para que se puedan verificar sus bioactividades.

Con respecto a los niveles de azúcares en el ajo cocido, es interesante que la concentración de inulina permanezca casi intacta y en gran proporción (4,09 mg g^{-1} muestra). Esto es bastante notable porque significa que las muestras de ajo procesadas sometidas a tratamientos de cocción todavía tienen niveles valiosos, desde un punto de vista biológico, de inulina. Hasta donde sabemos, no existen otros estudios para comparar nuestros resultados con otros niveles de inulina informados en muestras de ajo cocido. En Moshfegh, Friday, Goldman, & Ahuja, 1999, estudiaron la inulina natural y los FOS presentes en diferentes vegetales que se consumen comúnmente en los Estados Unidos. En esa investigación, se abordó el ajo en su forma cruda y seca, pero otras especies como las cebollas, que también son miembros del género *Allium*, mostraron que sus formas cocidas también eran fuentes importantes de inulina y FOS.

El análisis del ajo negro arrojó resultados interesantes. Cabe destacar que la inulina (1,86 mg g⁻¹ muestra-) y el campferol (1.831,6 µg g⁻¹ muestra) se destacaron sobre los otros fitoquímicos en estudio. Esto es realmente novedoso e interesante, ya que el ajo negro se asocia comúnmente con la S-alil cisteína (SAC), y la mayoría de los estudios de investigación se centran en este fitoquímico (Kimura, Tung, Pan, & Su, 2016). De manera que la información sobre otros compuestos bioactivos presentes en esta preparación de ajo es escasa. Nuestros resultados han demostrado que el ajo negro puede ser una fuente de inulina y flavonoles naturales con importantes bioactividades. Yuan et al., 2016, también encontraron niveles comparables de fructanos en el ajo negro, y a pesar de que Choi, Cha, & Lee, 2014 estudiaron el contenido total de flavonoides en el ajo negro, hasta la fecha no existen estudios sobre el perfil cuali-cuantitativo de los flavonoles en esta matriz. Con respecto a los niveles de OSC, hay pequeñas cantidades de alicina, E-Z-ajoeno y 2VD. Aunque el contenido de OSCs no es comparable a los niveles de SAC, el efecto sinérgico de los múltiples fitoquímicos presentes en esta matriz podría contribuir a las diversas propiedades funcionales asociadas al consumo de esta preparación.

Con la parsimonia de ahondar aún más en los efectos biológicos asociados a las preparaciones de ajo y en búsqueda de relacionar el contenido de fitoquímicos con actividades reportadas es que presentamos a continuación un análisis exploratorio basado en datos de meta-análisis de tipo RCT publicados en los últimos 10 años. Los detalles de la construcción de los modelos exploratorios se presentan en el capítulo **Anexos, sección C**. Los resultados de esta búsqueda bibliográfica, acoplada a la información resultante en cuanto al perfil cuali-cuantitativo encontrado en las muestras analizadas en el presente trabajo se muestran a continuación en la **Figuras II.7. Y II.8**. Cabe aclararse que se trabajó con muestras de ajo en polvo crudo y ajo cocido, por falta de estudios de meta-análisis para ajo negro y ajo líquido. También debemos mencionar el hecho de que se discute la presencia de alicina, haciendo énfasis en la hidratación del polvo de ajo para favorecer su formación.

Principalmente de estos análisis exploratorios podemos identificar el sinergismo potencial de ciertos compuestos bioactivos en relación a una misma actividad biológica.

En las muestras de ajo en polvo crudo, que normalmente son administradas como tabletas en suplementos nutracéuticos, vemos que la alicina y la inulina se destacan frente a otros compuestos, no sólo en términos de mayor concentración de dichos fitoquímicos en esta matriz, sino también en la variedad y número de propiedades funcionales asociadas a su ingesta, mayormente ligadas a la prevención de enfermedades cardíacas. Algo interesante es que estos efectos, normalmente asociados a la alicina, también pueden estar ligados a la actividad producida por la inulina. Por otro lado, los OSCs más lipofílicos en este tipo de preparación son más escasos, como puede verse en la **Tabla II.12**, de manera que podemos decir que no

aportan significativamente a las propiedades benéficas asociadas a esta preparación. Respecto a los flavonoides en esta preparación, no hay abundante evidencia respecto a su consumo proveniente de polvo de ajo crudo, y que relacione esta ingesta con propiedades funcionales. Sin embargo, los resultados de nuestro análisis mostraron niveles considerables de flavonoles en esta preparación, por lo que sería novedoso enfocar investigaciones de tipo RCT sobre este tipo de fitoquímicos ya que presentan múltiples actividades antioxidantes. Sobre esta actividad, particularmente, vemos que la misma no explica la variabilidad de alicina. Esto se puede deber a que si bien hay numerosos reportes que asocian el consumo de polvo de ajo con actividades antioxidante, los mismos manifiestan una contradicción respecto a los compuestos causantes de este efecto. Se cree que son metabolitos de la alicina o productos de degradación los que evidencian el efecto antioxidante in vitro/in vivo (Banerjee & Maulik, 2002), y a su vez no queda clara la dosis influyente.

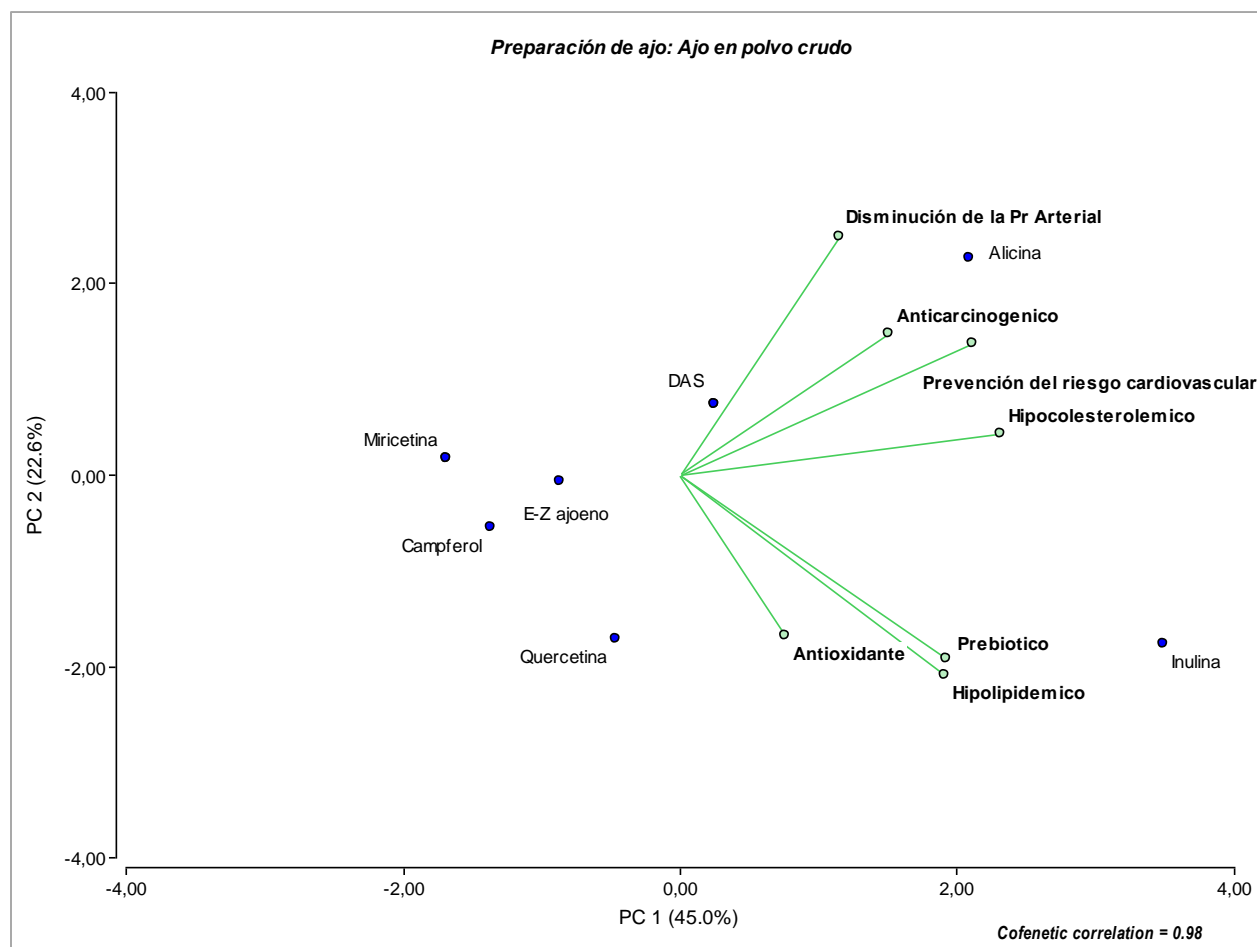


Figura II.7. Análisis Exploratorio basado en Componentes Principales para estudiar la funcionalidad potencial de preparaciones a base de polvo de ajo crudo

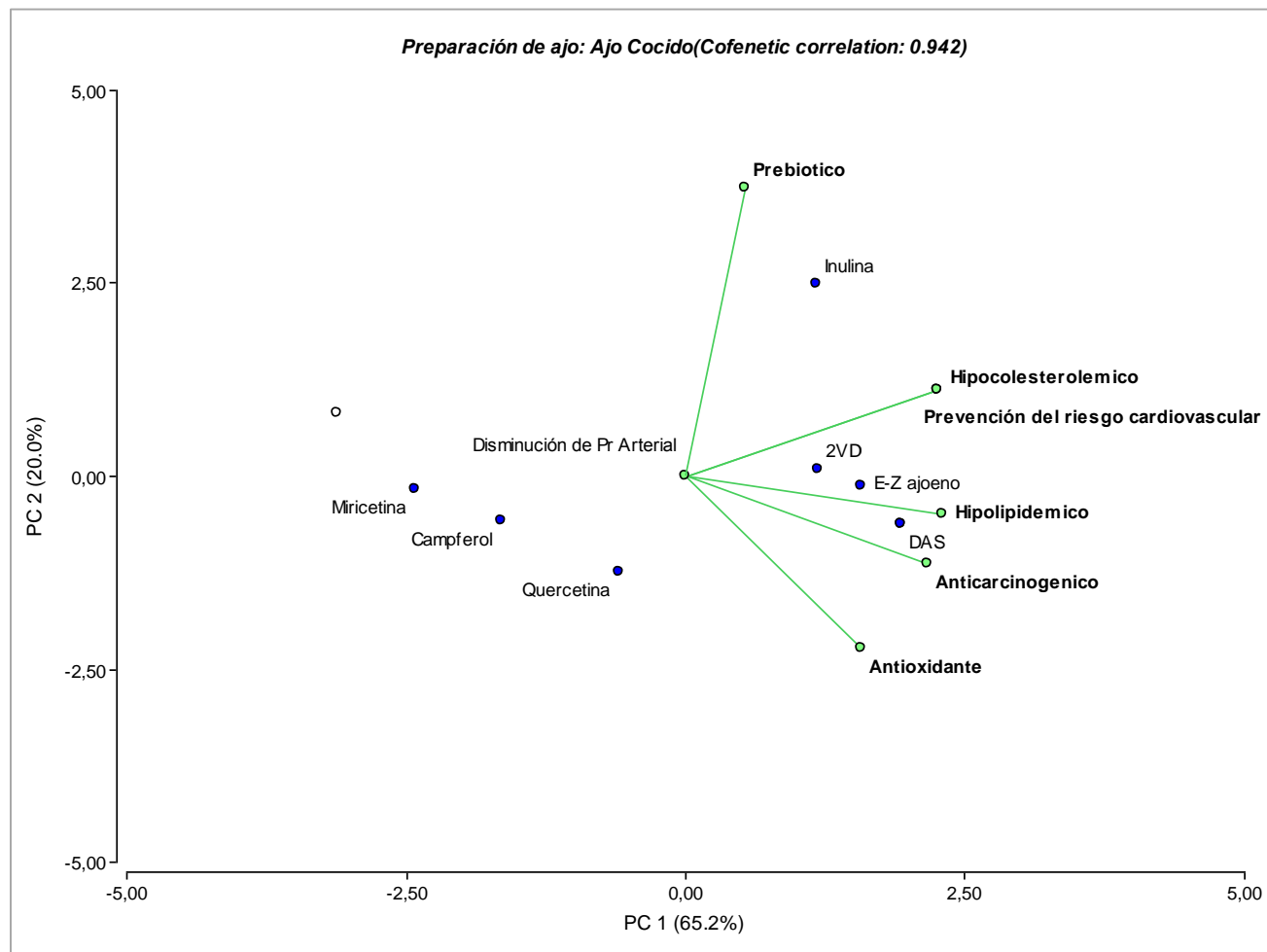


Figura II.8. Análisis Exploratorio basado en Componentes Principales para estudiar la funcionalidad potencial de preparaciones a base de ajo cocido

De nuevo, en la **Figura II.8.** vemos el posible efecto sinérgico de compuestos sobre mismas actividades biológicas, por ejemplo en el caso de la inulina y los OSCs lipofílicos sobre efectos de prevención cardiovasculares, o del DAS y el ajoeno sobre efectos anticancerígenos e hipolipidémicos, entre otros. Mayormente la disminución de la presión arterial podría deberse a una multi-causalidad por influencia de compuestos como el ajoeno, las 2-VD, los flavonoides y por efecto en segundo orden de la inulina.

Lo importante a resaltar es que de manera gráfica y sintética se pudo relacionar la información aportada por la aplicación de nuestra metodología, junto con datos reportados en bibliografía respecto a las propiedades funcionales a nivel clínico del consumo de los compuestos bioactivos en diferentes preparaciones de ajo. En base a estas relaciones podemos acercarnos con más certeza al potencial funcional global de cada preparación y así luego establecer adecuadamente dosis recomendadas de consumo para lograr incidir de



manera eficiente en la prevención de enfermedades crónicas prevalentes. Notablemente, ésta resultó la primera propuesta de un análisis completo y validado de múltiples fitoquímicos sobre una misma matriz.

II.6. CONCLUSIONES CAPÍTULO II

En primer lugar, se logró adecuar las condiciones operacionales para lograr la mejor resolución de los analitos bajo estudio. Los ensayos realizados para mostrar la factibilidad de esta técnica, mostró que los compuestos target se separan totalmente uno del otro, la resolución de los picos cromatográficos es satisfactoria, y lo más importante no aparecen en las corridas cromatográficas '*artifacts*' correspondientes a compuestos organoazufrados no representativos de las muestras o productos interferentes, y además se pudo sortear la dificultad de co-elución de los azúcares fructosa y glucosa entre sí, y entre los flavonoles, todo en una misma corrida cromatográfica.

En otro orden de acciones, los datos obtenidos del estudio de la función deseabilidad para el modelo experimental elegido de preparación de muestra, permitieron encontrar los niveles óptimos de los factores analizados influyentes en la extracción por UAE, y así alcanzar una máxima respuesta (área) para todos los analitos.

Bajo condiciones de trabajo optimizadas, los analitos de interés pudieron detectarse con claridad y eficientemente, y acoplamiento de técnicas extractivas y de fraccionamiento redujo el tiempo de análisis y aumentó la eficiencia y practicidad a la hora de trabajar.

Además, la metodología propuesta representa un procedimiento moderno y respetuoso del medio ambiente, ya que requiere menores volúmenes de solventes orgánicos en comparación con metodologías previamente reportadas que utilizan técnicas de extracción líquidas tradicionales. A su vez, el método desarrollado proporciona una adecuada linealidad, especificidad, precisión y recuperaciones cuantitativas aceptables.

Finalmente, la aplicación del método analítico desarrollado en el presente trabajo mostró ser confiable sobre distintos tipos de muestras. La extracción y determinación de OSCs, flavonoles e inulina es posible aún incluso en la presencia de matrices complejas y de diferente composición y estados.

Además se pudo evaluar, considerando nuestros resultados sobre los diferentes contenidos de analitos polares y apolares en cada producto de ajo, cómo las diferentes preparaciones a base de ajo se relacionaban con las propiedades funcionales reportadas. Esto permitió mostrar la utilidad del método propuesto para estimar el valor potencial total de los productos de ajo.



CAPÍTULO III

**ESTUDIOS *IN SÍLICO* DE RELACIÓN ESTRUCTURA-
ACTIVIDAD CUANTITATIVOS (QSAR) ACERCA DE LA
BIODISPONIBILIDAD DE COMPUESTOS
ORGANOAZUFRADOS**

III. ESTUDIOS *IN SÍLICO* DE RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD CUANTITATIVOS (QSAR) ACERCA DE LA BIODISPONIBILIDAD DE COMPUESTOS ORGANOAZUFRADOS

III.1. INTRODUCCIÓN

Es sabido que una baja biodisponibilidad de compuestos biológicamente activos ocasiona variabilidad terapéutica y deficiencias en la manifestación de propiedades biológicas en los sitios diana dentro del organismo (El-Kattan & Varma, 2016). Particularmente, la biodisponibilidad oral de biocompuestos (productos farmacéuticos, suplementos dietéticos, nutrientes y nutracéuticos) es limitada debido a eventos fisicoquímicos y fisiológicos que ocurren dentro del tracto gastrointestinal (TGI) luego de su ingestión (McClements et al., 2015).

En este capítulo discutiremos desde un enfoque mecanístico, el espacio físico-químico subyacente en la biodisponibilidad de compuestos bioactivos organoazufrados. Para ello el foco del análisis se centrará en la permeabilidad celular de dichos fitoquímicos, como etapa clave en la disposición final de los mismos en el organismo. De la amplia variedad de compuestos bioactivos del ajo, y sus sub-productos, se eligió evaluar la permeabilidad de los organoazufrados particularmente, ya que es el grupo de fitoquímicos distintivo de las aliáceas y con mayor cantidad de efectos biológicos asociados a su consumo. En nuestro grupo de investigación hemos logrado obtener información acerca del comportamiento de los OSCs y de diferentes preparaciones de ajo en fluidos digestivos, hemos analizado también su bioaccesibilidad y efecto de la matriz alimentaria (estos resultados pueden observarse en **Anexos, sección D**). Sin embargo, como se presentó en el Capítulo I, resta profundizar en términos de los parámetros químicos que rigen los mecanismos de permeación de los OSCs.

Desde las muchas aproximaciones al estudio de este proceso biológico, los modelos *in silico*, surgidos de la química medicinal y la química analítica, ofrecen la ventaja de aportar medios cuantitativos y explicativos de las interacciones involucradas entre los compuestos objeto de estudio, y las membranas celulares. Más aún, los modelos basados en membranas artificiales inmovilizadas en conjunto con herramientas quimiométricas aportan un complemento a información *in vitro* / *in vivo* para ahondar en las implicancias de los mecanismos de permeación. En las siguientes secciones emplearemos los métodos previamente citados.

Los modelos QSAR responden de manera matemática a los parámetros físico-químicos determinantes de actividades biológicas, entre ellas los pasajes transmembranas. Para explicar las relaciones complejas que se manifiestan entre las moléculas activas y cantidades observadas, se desarrollaron dos tipos de modelos principales: en primer lugar se intentó descifrar las relaciones entre las propiedades físico-químicas, tales

como la lipofilicidad de las estructuras moleculares de los OSCs, con la información aportada de las membranas artificiales inmovilizadas (IAM) -Relaciones cuantitativas estructura-retención (QSRR); y en segundo lugar, se evaluó las relaciones entre la información obtenida por las columnas IAM y diversos datos de permeación; Relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR). Para llevar a cabo estos modelos se requirió entonces un trabajo instrumental, por un lado, para obtener la información cromatográfica necesaria, mientras que por otro, se necesitó proceder con el trabajo in silico para el modelado estructural de las moléculas, el cálculo de descriptores moleculares, y finalmente, para la construcción de los modelos estadísticos multivariados y su validación. En las secciones subsiguientes se discutirán los pasos seguidos y los conceptos subyacentes en cada uno de los mismos.

III.2.OBJETIVOS

- Seleccionar y evaluar las variables instrumentales para alcanzar una adecuada sensibilidad y selectividad de los compuestos de interés (organoazufrados) mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) empleando columnas de membranas inmovilizadas (IAM).
- Analizar la respuesta cuantitativa de diferentes compuestos organoazufrados, para obtener valores cromatográficos característicos como el factor de capacidad (k').
- Armado de base de datos sobre OSCs y selección de los compuestos para el estudio QSAR
- Identificar, calcular y evaluar diferentes parámetros moleculares (descriptores) en base a los principales compuestos bioactivos presentes en ajo para la construcción de modelos QSAR.
- Realizar un análisis quimiométrico de los resultados mediante la construcción de modelos estadísticos QSRR en base a los descriptores moleculares calculados y las respuestas de retención cromatográficas obtenidas experimentalmente usando columnas IAM
- Estudiar la aplicabilidad de la fase IAM para estimar mediante modelos QSAR varios parámetros ADME, entre ellos la absorción intestinal humana (HIA), y la permeación a través de otras barreras biológicas como piel y barrera hematoencefálica.

III.3.EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES OPERACIONALES CROMATOGRÁFICAS BASADA EN EL USO DE COLUMNAS DE MEMBRANAS ARTIFICIALES INMOBILIZADAS

Los avances en la tecnología de columnas cromatográficas permitieron el desarrollo de la cromatografía de membranas artificiales inmovilizada (IAM), que exhibe la complejidad entre la de la partición de solutos en

medio octanol-agua, y los enfoques de líneas celulares, combinando las ventajas y características de las técnicas cromatográficas con la simulación del entorno en las membranas celulares (Tsantili-Kakoulidou, 2020).

Las columnas IAM están conformadas por único fosfolípido, o bien un conjunto de fosfolípidos, tales como fosfatidilcolina (PC, siglas en inglés de *phosphatidylcholine*), fosfatidiletanolamina (PE, siglas de *phosphatidylethanolamine*) y fosfatidilglicerol (PG, siglas de *phosphatidylglycerol*), entre otros.

Aunque las membranas biológicas contienen diversos tipos de fosfolípidos, PC es el mayor constituyente. De este modo, la mayoría de columnas IAM se preparan a partir de este fosfolípido PC (IAM.PC) o de sus derivados que pueden ser un éster de doble cadena (denominada IAM.PC.DD2), o PC sin el grupo glicerol (también denominada IAM.PC.DD). En la **Figura III.1.** se representan alguna de estas fases estacionarias IAM. Sólo se comercializan tres de ellas, IAM.PC.DD, IAM.PC.DD2 e IAM.PC.MG, en esta última columna el "endcapping" se realiza con metilglicolato, MG por la compañía Regis Technologies (Barbato, 2006; Gilabert, 2005).

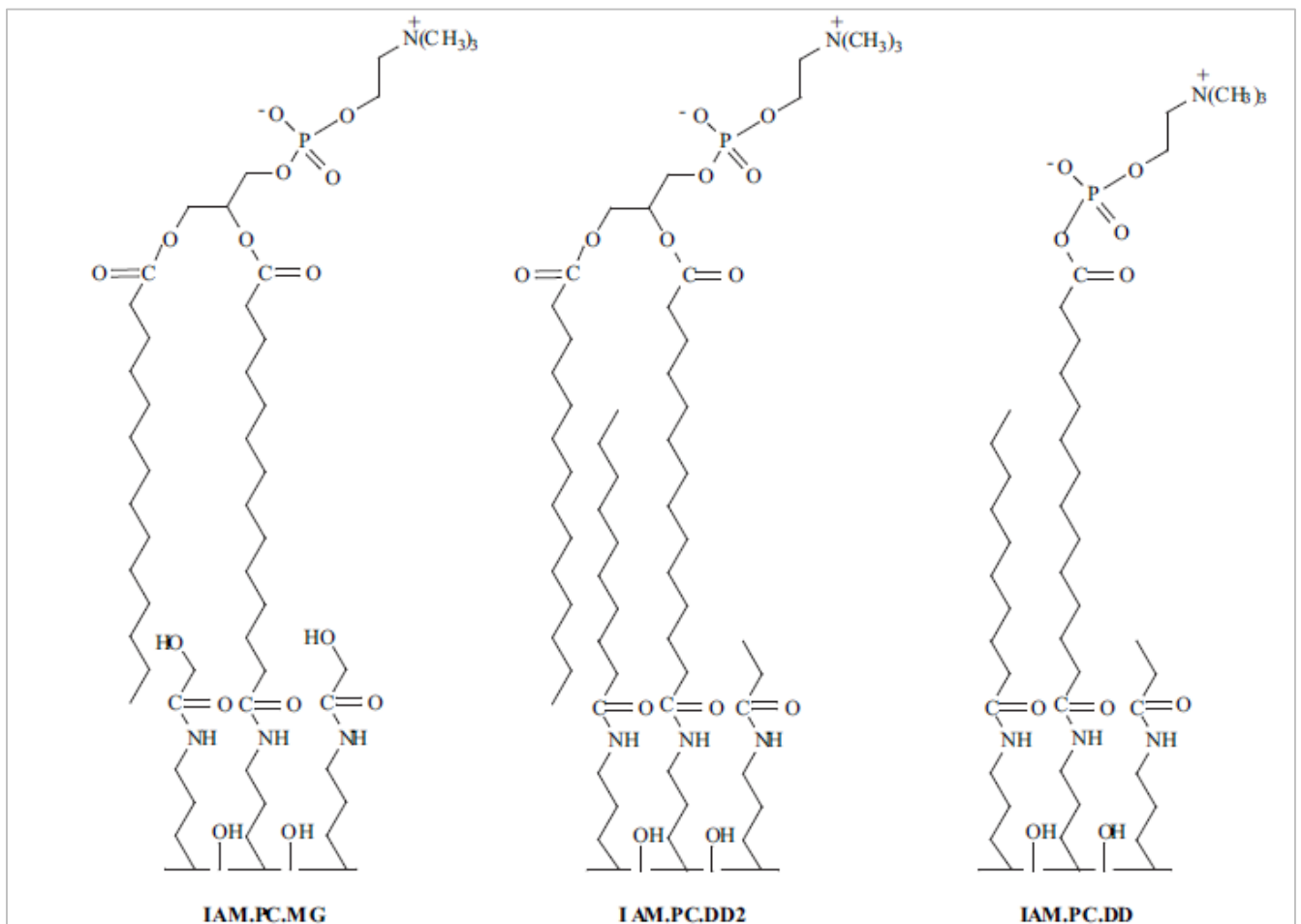


Figura III.1. Estructura de diferentes fases estacionarias IAM

Fuente: Barbato, 2006

Las fases móviles utilizadas usualmente con estas columnas son soluciones acuosas de buffer fosfato salino ajustadas a pH fisiológico de interés (p. Ej., pH 7.4). En estos casos, el parámetro cromatográfico utilizado para la construcción de modelos QSRR o QSAR es el logaritmo del factor de retención ($\log k'_{IAM}$) (Gilabert, 2005).

En las fases IAM, el tiempo muerto de la columna o el volumen vacío (T_0) se determina utilizando un compuesto no retenido, p. Ej. metanol o mejor algún ácido orgánico según lo recomendado por el fabricante (Regis Technology, Morton Grove, IL). Los datos de IAM en la literatura se han obtenido en diversas condiciones experimentales (pH y fuerza iónica del eluyente, porcentaje de modificador orgánico, temperatura, caudal).

Obviamente, diferentes condiciones experimentales pueden afectar los valores de k' reportados. Para compuestos lipofílicos, se observan tiempos de retención muy largos en columnas IAM utilizando fases móviles puramente acuosas. Los valores de T_r demasiados altos no son deseables desde un punto de vista práctico; además, a menudo no son adecuados como índices de lipofilidad porque pueden resultar no sólo de la partición en fosfolípidos sino también de interacciones secundarias con el núcleo de sílice y de fenómenos de difusión. Para evitar este problema, es necesario agregar un modificador orgánico a la fase móvil (Barbato, 2006). Con este fin, en esta sección presentamos el trabajo experimental adaptado para lograr las condiciones óptimas de elución para los OSCs objeto de estudio en la fase IAM.

III.3.1. MATERIALES Y MÉTODOS

III.3.1.1. Reactivos, Estándares y Solventes

- Los compuestos de cisteína del ajo, como S-metil-L-cisteína y S-propil-L-cisteína, se adquirieron de Sigma (St. Luis, MO, EE. UU.), mientras que S-alil-L-cisteína (SAC) se adquirió de LKT Laboratories Inc. (St. Paul, MN, EE. UU.). Los S-alqu(en)il-L-cisteín sulfóxidos (ACSO) tales como (+)-S-Metil-L-cisteín sulfóxido (metiína), (+)-S-trans-1-propenil-L-cisteín sulfóxido (isoalliina), y el tiosulfonato de dialilo (alicina) se sintetizaron en nuestro laboratorio como se describió anteriormente (Thomas y Parkin, 1994). La aliina, (+)-S-alilcisteín sulfóxido, se adquirió de Extrasynthese (Lyon-Nord, Francia).
- Los compuestos a base de sulfuro como dialil sulfuro (DAS), dialil disulfuro (DADS) y dialil trisulfuro (DATS) se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, EE. UU.). El disulfuro de etilo (EDS), el disulfuro de furfurilo (FuDS), el disulfuro de propilo (PDS), el sulfuro de alilmetilo (AMS) y el disulfuro de dimetilo (DMDS) se obtuvieron de Aldrich (EE. UU.). El sulfuro de etilo (ES) se obtuvo de Fluka® (Munich, Alemania). El alil mercaptano se adquirió de Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, EE. UU.).

- Los compuestos E-Z-Ajoeno y vinilditiinas se sintetizaron siguiendo un procedimiento previamente informado por nuestro grupo de investigación (Ramirez et al., 2017). Luego, los OSCs sintetizados se concentraron a presión reducida y se caracterizaron por espectroscopia UV y análisis GC-MS.
- Alil ITC (AITC), Sulforafano (SF), Indole-3-carbinol (I3C) y Fenil ITC (PITC) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, EE. UU.). Se adquirieron fenetil ITC (FITC), S-sulforafeno (SE) y bencil ITC (BITC) de LKT Laboratories Inc. (St. Paul, MN, EE. UU.).
- Fosfato de potasio monobásico y dibásico (anhidro) fueron p.a. grado, y se adquirieron de Biopack.
- El acetonitrilo (ACN) era de calidad cromatográfica y se adquirió de Merck (EE. UU.). Además, se obtuvo agua ultrapura (18 MΩcm) de un sistema de purificación de agua Milli-Q (Millipore, Francia).

III.3.1.2. Instrumentación y Condiciones Cromatográficas

El análisis cromatográfico se realizó usando un cromatógrafo Shimadzu LC 20A acoplado a un detector de arreglo de diodos, operado en un rango de 210-260 nm, dependiendo del compuesto analizado. En todos los experimentos se utilizó una columna bio-mimética disponible comercialmente: IAM.PC.MG 12 μm (150 x 4,6 mm), que se adquirió de Regis Chemical Company (Morton Grove, IL).

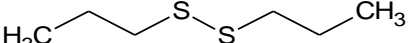
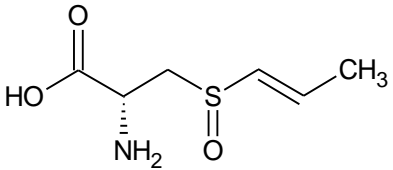
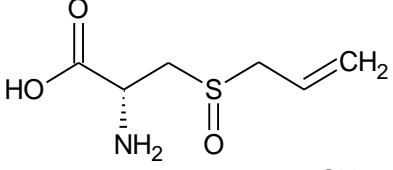
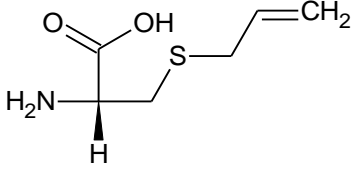
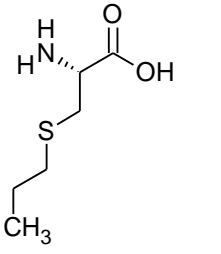
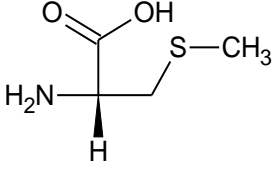
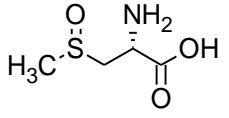
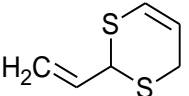
Las condiciones operacionales para la elución de los OSCs, bajo IAM-HPLC se adaptaron de Barbato, Cappello, Miro, La Rotonda, & Quaglia, 1998; Luco et al., 2003, con modificaciones. Las condiciones cromatográficas finales consistieron en una elución isocrática utilizando como fase móvil ACN / buffer fosfato 0,035 M –pH 6,8- (30:70 (v / v)) a 0.5 mL min⁻¹. Se llegó a estas condiciones probando diferentes concentraciones y pH de buffer, fosfato, y diferentes proporciones de ACN, tal como se discutirá en la sección siguiente. El tiempo muerto de la columna (T₀) se estimó a partir del tiempo de retención del ácido ascórbico, medido a 210 nm. Los datos de retención obtenidos se utilizaron para calcular el parámetro cromatográfico correspondiente al factor de capacidad k' como sigue: $k' = (T_r - T_0) / T_0$. Todos los factores de capacidad dados representan la media de 2-4 determinaciones de cada solución de OSCs.

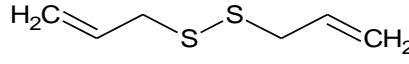
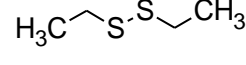
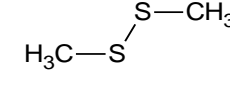
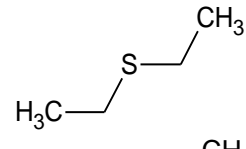
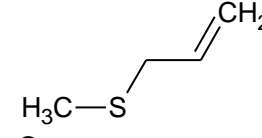
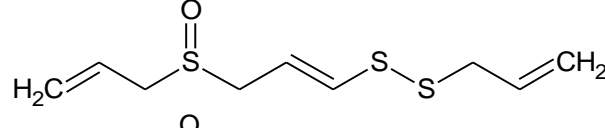
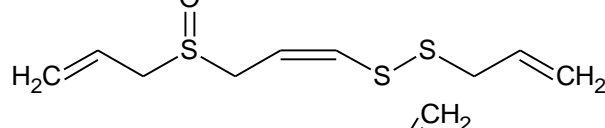
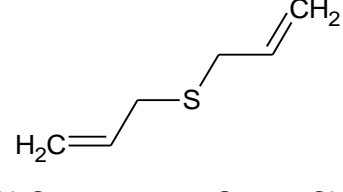
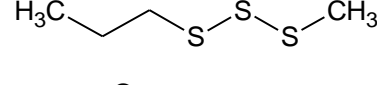
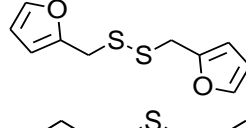
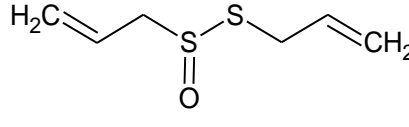
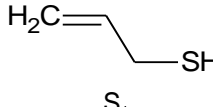
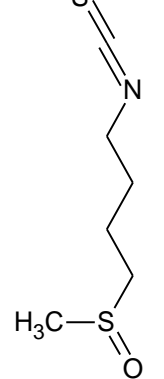
Para este estudio, consideramos 28 compuestos fitoquímicos que contienen grupos azufrados. La **Tabla III.1.** muestra el nombre y estructura química de cada uno de ellos. La mayoría de estos compuestos son sustancias derivadas del ajo con funciones bioactivas. Sin embargo, también incluimos siete fitoquímicos –Sulforafano, Sulforafeno, I3C, Alil ITC, Fenetil ITC, Fenil ITC y Bencil ITC- que corresponden a productos de degradación de glucosinolatos, como isotiocianatos e indol-3-carbinol. Los elegimos por su funcionalidad bioactiva y su metabolismo similar dentro de las plantas y el cuerpo humano. Cada solución madre estándar analítica se preparó en la fase móvil a concentraciones que variaban de 100 a 800 μg mL⁻¹, dependiendo de la solubilidad

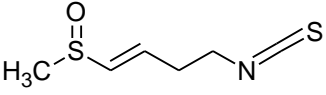
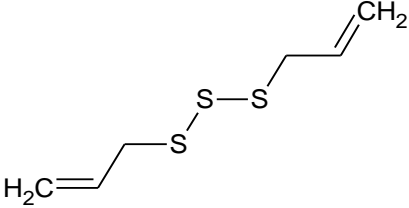
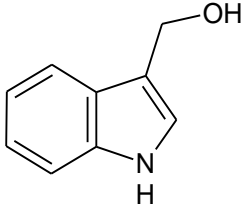
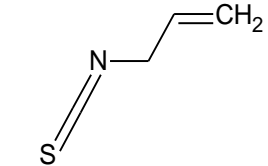
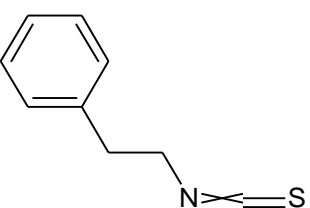
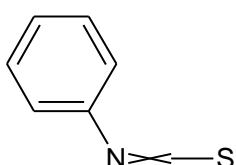
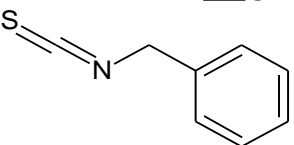
del compuesto y su respuesta del detector DAD. La identificación de los picos en las muestras se llevó a cabo comparando los tiempos de retención con los estándares de referencia.

III.3.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla III.1. Estructura química y nombre de los organoazufrados bajo estudio en el Capítulo III.

N°	Nombre	Estructura Química	Tiempo de retención
1	Propil Disulfuro		33,44
2	Isoaliina		4,31
3	Aliina		3,93
4	S-alil-L-cisteína		3,71
5	S-propil-L-cisteína		3,72
6	S-metil-L-cisteína		3,81
7	Metiina		3,68
8	2-Vinil-4H-1,3-ditiina		9,92

9	Dialil disulfuro		16,68
10	Etil disulfuro		13,21
11	Dimetil disulfuro		7,14
12	Etil sulfuro		6,54
13	Alil metil sulfuro		3,99
14	E-Ajoeno		7,46
15	Z-Ajoeno		7,41
16	Dialil sulfuro		9,71
17	Metil Propil Trisulfuro		27,12
18	Furfuril disulfuro		22,44
19	Alicina		5,06
20	Alil mercaptano		5,95
21	Sulforafano		4,75

22	Sulforafeno		4,74
23	Dialil Trisulfuro		25,6
24	Indol-3-carbinol		5,91
25	Alil Isotiocianato		8,42
26	Fenil Isotiocianato		20,38
27	Fenil Isotiocianato		23,9
28	Bencil Isotiocianato		17,18

Las superficies de fosfatidilcolina (IAM.PC) se fabrican uniendo moléculas de diacilfosfatidilcolina a sílice-propilamina a través de su grupo ω -carboxílico en la cadena de ácidos grasos C-2. Al trabajar con estas fases las condiciones cromatográficas para realizar la elución de los compuestos asegurando la obtención de valores de k' adecuados fiables, están restringidas a ciertas limitaciones.

Para compuestos de carácter lipofílico, como ya fue citado, es necesario trabajar con fases móviles hidro-orgánicas. Sin embargo, las fases móviles que contienen más del 30% (p/p) de acetonitrilo deben evitarse porque alteran la estructura de la FE, y por otro lado, no se recomienda el uso de metanol para la fase estacionaria IAM.PC.MG debido al peligro de metanólisis (Barbato, 2006).

Respecto al pH de trabajo, para imitar de cerca la permeación de la membrana que ocurre *in vivo*, el valor de pH "ideal" sería 7,4, como el pH fisiológico del plasma, aunque deben tenerse en cuenta otros valores (por ejemplo, pH 5,5 para imitar la piel, pH 3,0 para imitar el contenido del estómago). Se han obtenido muchos datos experimentales en la literatura a pH 7,0 porque este valor está muy cerca del pH fisiológico 7,4 pero es más propicio para asegurar la estabilidad de la columna. Se demostró que los eluyentes a pH 5,5 no afectan la estabilidad de la fase IAM, mientras que se observó un envejecimiento prematuro con eluyentes a pH 3,0 (Barbato, 2006).

En base a lo anterior, se realizó la puesta a punto de la elución cromatográfica para el total de OSCs bajo estudio empleando la fase estacionaria IAM.PC.MG. Para ello, se probaron diferentes concentraciones de buffer fosfato a pH cercanos al fisiológico y se probaron además dos proporciones acetonitrilo como modificador orgánico de la FM de manera de asegurar la correcta elución de los OSCs y así obtener k' propicios para el armado posterior de los modelos QSRR y QSAR, en un tiempo adecuado. Las condiciones probadas se muestran en la **Figura III.2**.

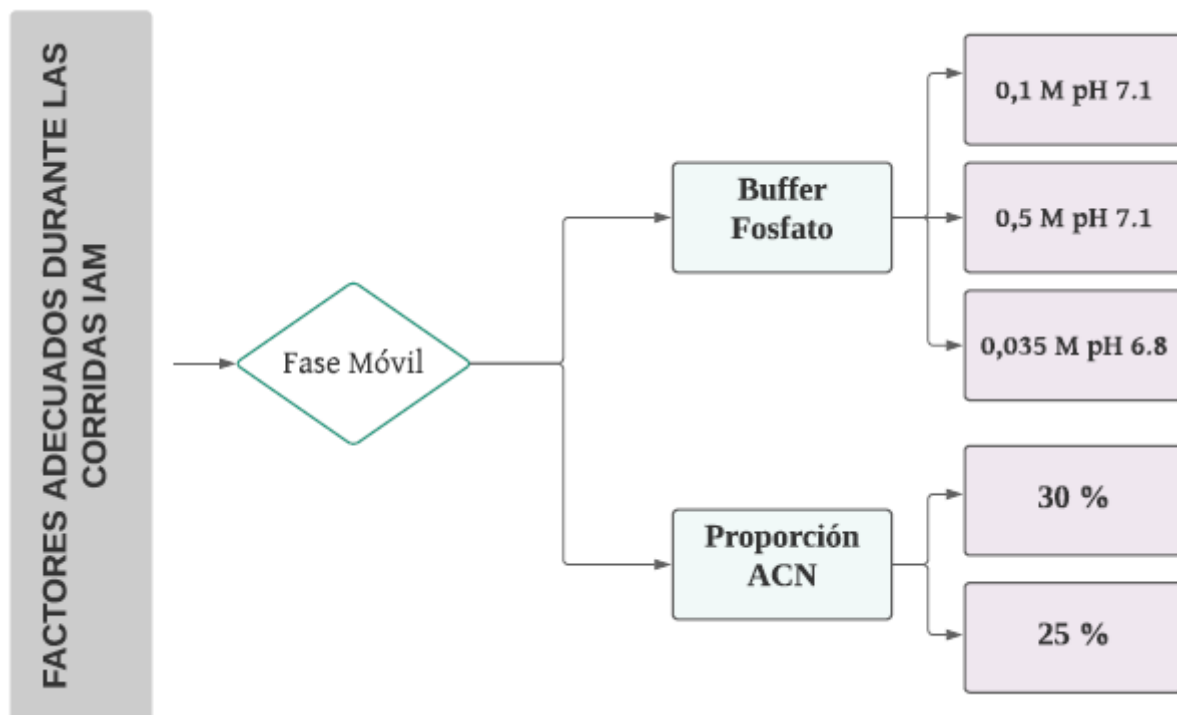


Figura III.2. Estructura de los factores y niveles evaluados para la adecuada elución de los OSCs en la fase IAM

Mientras mayor es el factor de capacidad k' de un compuesto, mayor es la interacción entre él y la FE. En nuestro contexto de estudio, mayor retención podría indicar una mayor afinidad con la membrana biológica y por ende mayor permeabilidad. En la **Tabla III.1.** se pueden observar también los tiempos de retención de las condiciones que se encontraron como adecuadas para la obtención de factores capacidad. Las condiciones propicias para obtener estos k' fueron usando una fase móvil ACN/0,035 M buffer fosfato -pH 6,8- (30:70 (v/v)). De los compuestos analizados, los polisulfuros fueron los que presentaron mayor retención en la fase IAM, siendo el propil disulfuro el más retenido. Luego se encuentran los isotiocianatos aromáticos, seguidos de las 2-VD, los isómeros de ajoeno, luego el tiosulfinato alicina y el alil metil sulfuro, y alil mercaptano. Las moléculas AMS y ES son más pequeñas que el resto de los sulfuros evaluados, lo cual podría explicar la diferencia de retención con ellos. Por último, los compuestos azufrados con grupos cisteínas en sus moléculas fueron los menos retenidos.

Por lo tanto, el grado de permeabilidad de los OSCs evaluados sería similar al orden en que eluyen de la columna IAM, siendo los polisulfuros los más permeables, y los compuestos más hidrofílicos como los ACSOs y los compuestos con cisteínas, presentarían una permeabilidad más baja.

III.4. MODELADO Y CÁLCULO *IN SÍLICO* DE PARÁMETROS ESTRUCTURALES ASOCIADOS A LAS MOLÉCULAS DE OSCs

Como se ha indicado anteriormente, la bondad de ajuste de los modelos QSAR depende de la calidad de los datos biológicos (ya sean obtenidos *in vitro* o *in vivo*) en cuestión, de la relevancia de las variables independientes respecto al proceso físico-químico a modelar, y de la capacidad descriptiva del modelo.

En la actualidad, se utiliza una extensa variedad de parámetros para la construcción de los distintos modelos QSAR. En este sentido, los descriptores o índices moleculares son números obtenidos mediante un proceso lógico-matemático de transformación de la información química contenida en la representación simbólica de una molécula. Para obtener estos datos estructurales, primero es necesario recurrir al modelado y construcción de las moléculas de interés. Hay diferentes formas de representar las moléculas y se pueden clasificar según la información que codifican. El nivel más básico corresponde a representaciones que dependen o están asociadas con el espacio unidimensional (1D), como puede ser el peso molecular. El siguiente nivel corresponde a las representaciones 2D asociadas con la conectividad de las moléculas sin considerar la estereoquímica. En los métodos 3D, la incorporación de estereoquímica transmite no solo la especificación de la quiralidad de los centros estereogénicos, sino también la posible conformación o conformaciones geométricas (Martinez-Mayorga & Medina-Franco, 2009). Una vez constituidas las

estructuras moleculares, teniendo en cuenta las mismas se procede al cálculo de los descriptores, los cuales a su vez se pueden clasificar teniendo en cuenta esta dimensionalidad de las representaciones moleculares.

Descriptores moleculares adimensionales (0D) y unidimensionales

La representación más simple de un descriptor adimensional (0D) es la fórmula química, que permite identificar el tipo y la cantidad de elementos químicos que conforman una molécula. Esta forma de representar un compuesto químico carece de información sobre conectividad atómica o tipos de enlace. Los descriptores 0D más conocidos son: el número de átomos de cualquier elemento químico, el peso molecular (MW), la suma o el promedio de las propiedades atómicas, tal como los volúmenes atómicos de van der Waals o la electronegatividad.

Los descriptores 1D son listas de fragmentos estructurales de las moléculas, pero sin considerar la estructura molecular en su conjunto (ej. conteo de grupos funcionales o de sustituyentes de interés). De acuerdo con un principio simple de aditividad, donde las modificaciones químicas orientadas en la adición o eliminación de grupos sustituyentes alteran el efecto biológico manifestado inicialmente por la molécula; los descriptores 1D permiten cuantificar el grado de contribución que tiene un grupo sustituyente en la respuesta biológica evaluada (Goya-Jorge et al., 2020; Reyes, 2020).

Descriptores moleculares bidimensionales

Estos tipos de descriptores ponderan los átomos con propiedades como la electronegatividad o el volumen, y consideran la conectividad, así como las interacciones intra/intermoleculares (Goya-Jorge et al., 2020). Este grupo de descriptores son también llamados **descriptores topológicos**. La topología molecular es una disciplina que analiza cuales son las posiciones de los átomos dentro de las moléculas. El método topológico utiliza índices para caracterizar estructuralmente a los compuestos (Camargo, 2007). Para poder construirlos y graficarlos se debe generar un **grafo** de la molécula y su matriz topológica. Para ello se dibuja el grafo correspondiente a la molécula estudiada:

- Se representan los átomos de las moléculas por puntos (vértices) y los enlaces por segmentos (ejes).
- Se suprimen los hidrógenos porque su actuación queda determinada por los demás átomos.
- Se numeran aleatoriamente los vértices del grafo; los índices topológicos se denominan “invariantes del grafo” porque su cálculo debe ser independiente del orden de numeración seguido.
- Se construye la “matriz topológica”
- A partir de la matriz y los algoritmos adecuados, se obtienen los índices topológicos

Adicionalmente, los índices topológicos tienen la capacidad de considerar propiedades químicas específicas de los átomos, como la presencia de átomos electroaceptores o electrodonadores, la polarizabilidad y la masa atómica. De todos ellos podemos identificar dos grandes grupos:

- **Índices topoestructurales:** describen la información acerca de la adyacencia y las distancias de enlace directo entre dos átomos.
- **Índices topoquímicos:** describen información topológica de la molécula, pero también detallan aspectos químicos específicos de los átomos, como el estado de hibridación y la identidad química

Algunos de los índices topológicos más utilizados en QSAR son: el índice *W de Wiener*, índice de conectividad *de Kier & Hall*, índices geométricos, y los índices electrotopológicos y de carga (Reyes, 2020). Para una descripción de cada uno de estos descriptores recurrir a **Anexos, sección E**.

Descriptores moleculares tridimensionales

Como su nombre lo indica, derivan a partir de una representación 3D de la estructura molecular, considerando la estereoquímica de los compuestos. Al calcular estos descriptores se debe optimizar la geometría molecular a través de métodos computacionales mecano-cuánticos. Los valores de estos descriptores dependen del tipo de optimización geométrica utilizada, la cual requiere el empleo de softwares sofisticados adaptados para evaluar a su vez la flexibilidad molecular, es decir, considerar los diferentes estados conformacionales en los cuales puede existir un compuesto químico (estudio conformacional) (Mogrovejo Mata & Muñoz Vázquez, 2020), trabajo que se realizó respecto a nuestros compuestos objeto de estudio y que se presentará en esta sección.

A continuación se presentan algunos de los descriptores tridimensionales más empleados en modelos QSAR.

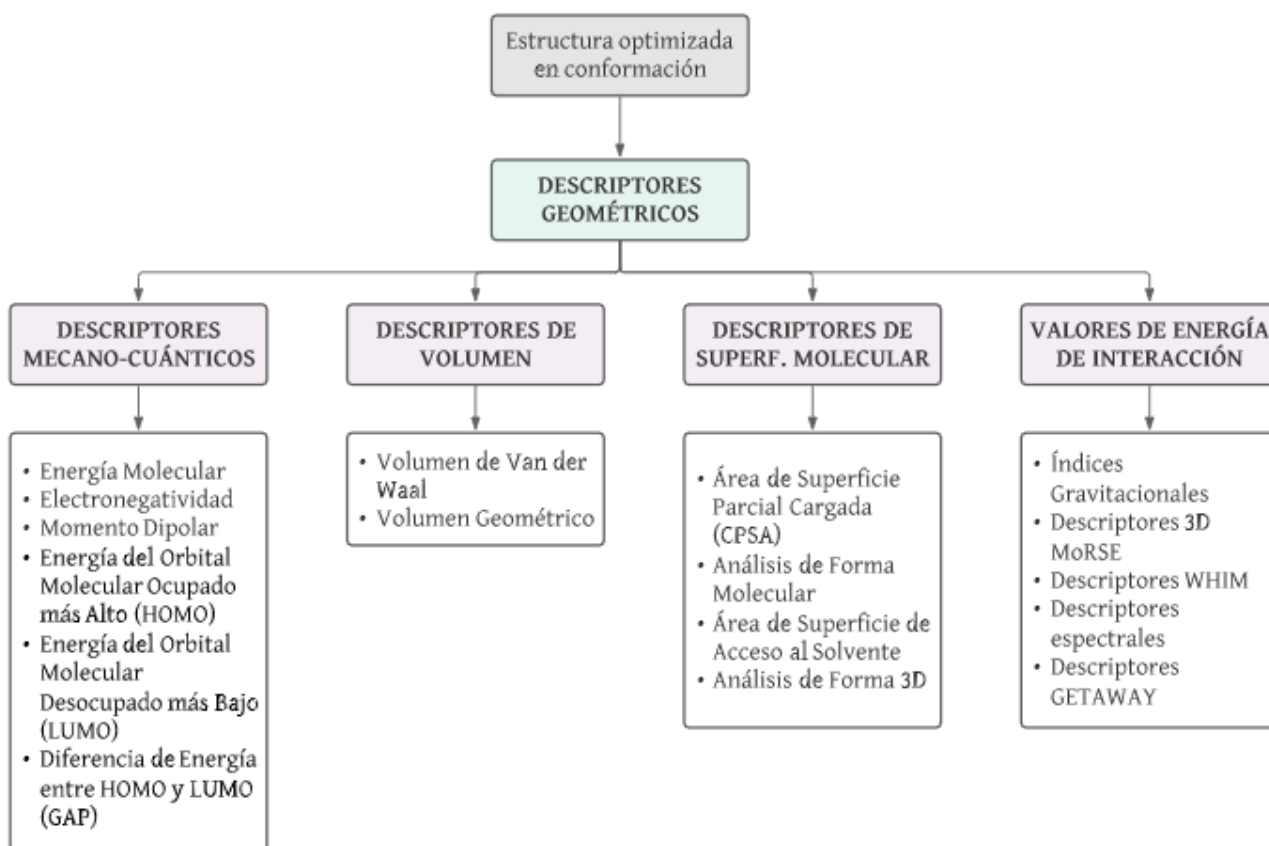


Figura III.3. Descriptores 3D y su clasificación
Fuente: Reyes, 2020; Todeschini & Consonni, 2000

Además de los descriptores aquí presentados, existen descriptores más complejos, que contienen información a través de un enfoque 4D de las moléculas, con el objetivo de identificar y caracterizar cuantitativamente las interacciones entre las mismas y uno o varios sitios activos de un receptor biológico (Reyes, 2020). En esta tesis este tipo de descriptores no han sido abordados.

Otras clasificaciones y distinciones entre los descriptores moleculares también pueden encontrarse. En algunos casos se hace una distinción entre DESCRIPTORES FÍSICO-QUÍMICOS, haciendo referencia a información contenida en las moléculas considerando además la estructura electrónica de los compuestos, y DESCRIPTORES ESTRUCTURALES CONSTITUCIONALES, que reflejan solamente la composición química del compuesto, sin tener en cuenta la geometría.

Respecto a los descriptores físico-químicos, los mismos pueden a su vez dividirse en:

- **Descriptores de hidrofobicidad:** los modelos QSAR han sido realmente posibles después que C. Hansch descubriera en los años 60 que la contribución que hace un determinado sustituyente al

logaritmo del coeficiente de partición *n*-octanol- agua es un valor aproximadamente constante. De esta manera, dicho sistema se estableció rápidamente como el sistema de referencia para la medida y obtención de los valores de log P (lipofilidad) de los compuestos. Con el fin de subsanar las dificultades e inconvenientes que presenta la medida clásica de log P mediante extracción líquido-líquido, se han desarrollado multitud de metodologías para su medida experimental o para su cálculo. En el presente trabajo se ha hecho uso de diferentes softwares para obtener los correspondientes log P_{cal} para los compuestos estudiados.

- **Descriptores electrónicos:** en los estudios QSAR se han utilizado numerosos parámetros electrónicos derivados de las constantes σ de Hammett, basada en la ionización de ácidos benzoicos multi-sustituidos. Estos descriptores reflejan interacciones de tipo intramolecular (p. Ej., la influencia de un sustituyente del anillo bencénico sobre la ionización de la molécula total resultante), y además sirven para caracterizar la interacción parámetros electrónicos intermoleculares (como por ejemplo, la polarizabilidad). Además, a partir de cálculos con técnicas mecano-cuánticas se han derivado multitud de descriptores de este tipo, como por ejemplo, la carga atómica y la energía de los orbitales moleculares. También se han utilizado en numerosos estudios las constantes de protonación o de acidez para los compuestos ionizables, y parámetros relacionados con el carácter dador o aceptor de puentes de hidrógeno de las moléculas. Este tipo de descriptores también han sido abordados en este trabajo (Camargo, 2007; Reyes, 2020).
- **Descriptores estéricos:** tienen en cuenta tanto el tamaño como la forma de las moléculas y los sustituyentes. El término descriptores de volumen se puede utilizar para denotar descriptores estéricos de la molécula completa, refiriéndose a la medida del obstáculo de la molécula cuando se considera como parte de un sistema y ensamblaje denso, cada molécula está restringida por sus vecinas a un espacio limitado (Todeschini & Consonni, 2009).

Para hacer el cálculo de los descriptores moleculares y lograr así la parametrización cuantitativa de las moléculas, existen diversas herramientas computacionales. Reyes, 2020, describe en su trabajo una serie de diversos software disponibles para generar miles de descriptores teóricos, experimentales, semiempíricos o indicadores de fragmentos. Dentro de los más usados se encuentran: ACD/LogP freeware (útil para cálculo de Log P), DRAGON (calcula 5270 descriptores 0D-3D e indicadores fragmentos) y OCHEM (Proporciona información teórica o experimental de varias propiedades fisicoquímicas o biológicas). Estos programas han sido empleados en esta sección para realizar los cálculos correspondientes.

III.4.1. MATERIALES Y MÉTODOS

III.4.1.1. Organoazufrados estudiados, modelado de las estructuras moleculares y optimización conformacional

Los compuestos a modelar fueron los 28 OSCs presentados en la **Tabla III. 1**. 1. Todas estas moléculas fueron dibujadas empleando el software ACD/ChemSketch, para obtener sus codificaciones digitales - Sistema de información MDL de datos moleculares (MOL)-. 3. Luego se trabajó con el programa HyperChem Release 5.11 Pro para Windows, para la obtención de las estructuras de mínima energía a partir de la función de energía potencial de la mecánica molecular (MM+), y por otro lado con el servicio online CORINA Classic, para los cálculos de mecánica molecular y cálculos semiempíricos PM3. En estos programas se trabajó con las estructuras tridimensionales de las moléculas y se realizó la optimización completa de los parámetros geométricos. Para obtener geometrías confiables de las moléculas, se utilizó un límite de convergencia SCF de 0,005 kcal/mol; la optimización fue a relajación total mediante el método de gradientes conjugados de Polak-Ribieri, con un RMS de 0,005 Kcal/Å mol.

III.4.1.2. Cálculo de descriptores moleculares

Para caracterizar cada OSCs, se calculó un conjunto de descriptores moleculares utilizando diferentes paquetes de software, incluido Dragon vs 3.0., y la plataforma web del entorno de modelado químico en línea (OCHEM). En cuanto a los indicadores de tamaño molecular y descriptores estructurales, se consideraron los siguientes: volumen molar (Vm), peso molecular (MW, por sus siglas en inglés), enlaces rotativos, donantes de H, aceptores de H y TPSA (área superficial polar topológica). Para explicar los efectos de la lipofilidad, se obtuvieron varios coeficientes de partición calculados: log D, iLOGP, XLOGP3, WLOGP, MLOGP, Silicos-IT Log P, Consensus Log P. Estos parámetros se obtuvieron de diferentes herramientas web en línea, como SwissADME (desarrollada y mantenida por el Grupo de Modelado Molecular del Instituto Suizo de Bioinformática) y Chemicalize © 1998–2021 (ChemAxon, Ltd).

Otro grupo de descriptores estructurales incluyó índices químicos-cuánticos obtenidos por el paquete HyperChem (versión 7.5 para Windows) y, por otro lado, el servicio en línea CORINA Classic. Se realizó la optimización completa de los parámetros geométricos mediante el método PM3, implementado en la versión estándar de MOPAC 6.0. Se consideraron los siguientes índices obtenidos de cálculos de orbitales moleculares: energía total (E_{total}), calor de formación (ΔH_f), energía del orbital molecular ocupado más alto (HOMO, por sus siglas en inglés), energía del orbital molecular desocupado más bajo (LUMO, por sus siglas en inglés), momento dipolar (μ), carga total absoluta (Q_{total}), las cargas absolutas más positivas y negativas (q_p ,

$q_{n, \max}$ y la carga relativa positiva y negativa (RNCG, RPCG). Además, se consideraron otros descriptores obtenidos del software Dragon como: Electronegatividad Mulliken, $LDip$ y varios descriptores WHIM. Para la inclusión o el rechazo de descriptores en los modelos seleccionados se utilizó un análisis multivariado que incluía el análisis de componentes principales (PCA) y un procedimiento de regresión múltiple escalonada (*Stepwise Regression*), basado en los algoritmos de selección hacia adelante y eliminación hacia atrás. Estos métodos estadísticos se explicarán con detenimiento en el apartado III.5.

III.4.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En Primer lugar, se obtuvieron las estructuras bidimensionales de las moléculas y se codificaron digitalmente empleando los esquemas gráficos MDL de tipo .mol, encargados de identificar y codificar la posición de los átomos de una molécula en el sistema de coordenadas cartesianas. Estas estructuras bidimensionales pueden apreciarse en la **Tabla III.1**. La representación molecular MDL mol logra capturar toda la información acerca de la conectividad, posición y tipo de átomos y enlaces que constituyen una molécula (Reyes, 2020).

A continuación, se construyeron y optimizaron en conformación las estructuras moleculares de los compuestos con el método de Campo de fuerza de Mecánica Molecular (MM+) del software Hyperchem. Las geometrías resultantes se trataron luego por medio del Método Semiempírico PM3 (Método Paramétrico-3), mediante la aplicación del algoritmo de Polak-Ribiere (J. M. Luco et al., 2003; Reyes, 2020).

Los métodos de Mecánica Molecular (MM), son extremadamente rápidos en tiempo de cálculo y permiten obtener de forma sencilla la energía relativa de una determinada geometría molecular. Esto calculando la energía potencial de la molécula mediante una visión práctica que supone que los núcleos están sometidos a un campo de fuerza, que se compone de la suma de una serie de términos que modelan las tensiones de los enlaces, de sus ángulos, sus torsiones, las interacciones de Van der Waals, las electrostáticas y las de los puente hidrógeno:

$$V = V_{\text{enlaces}} + V_{\text{ángulos}} + V_{\text{diedros}} + V_{\text{vdW}} + V_{\text{electr}} + V_{\text{H}}$$

Dichos términos corresponden a distintos aspectos que influyen en la energía molecular en función de su geometría. Cuanto más términos se consideren, mejor será el valor obtenido para la energía.

Para refinar la información de los métodos MM, aparecen los métodos semiempíricos de orbitales moleculares que, al igual que los primeros, utilizan parámetros determinados experimentalmente para simplificar los cálculos usando aproximaciones de naturaleza mecanocuántica. Mediante estos métodos se obtiene no sólo la energía del sistema, sino también una descripción de su estructura electrónica. Los métodos semiempíricos, a diferencia de los *ab initio*, consideran solamente los electrones de la capa de

valencia y además, omiten determinados términos en el cálculo de las interacciones interelectrónicas. Entre los métodos semiempíricos, se encuentran el PM3 (*parametric model 3*) y AM1 (*Austin model 1*) los cuales suprimen parte de dichos términos. El método citado en primer lugar es muy utilizado, y fue el elegido en el presente trabajo junto con el método de mecánica molecular MM, este último usado para encontrar en forma rápida y sencilla un valor aproximado de la mínima energía de las posibles conformaciones de la molécula (Camargo, 2007). En la **Figura III.4.**, se puede observar a modo de ejemplo, como luego de la optimización conformacional cambia la disposición en el espacio de la molécula de isoaliina.



Figura III.4. Estructura tridimensional de la isoaliina obtenida en Hyperchem

En la imagen superior se muestra la molécula de isoaliina sin optimizar en conformación (se puede ver en el valor de E –energía potencial- en la parte inferior izquierda cuyo valor es cero; mientras que en la imagen inferior vemos como cambió la conformación de la molécula al obtener la conformación tridimensional de menor energía, lo cual se observa en el valor de $E = -2036,18$

El establecimiento de la alineación molecular de las estructuras 3D de las moléculas y la obtención de las conformaciones de menor energía es un prerequisite importante para varias metodologías en el diseño de fármacos, por ejemplo, análisis de similitud 3D y predicción de actividades biológicas, es por esta razón que se trabajó luego con estas moléculas optimizadas en conformación para el cálculo adecuado de parámetros mecanocuánticos de interés.

En total se calcularon más de 1800 descriptores moleculares para los OSCs bajo estudio por medio del programa comercial Dragon versión 3.0 el cual genera diferentes descriptores 0D-3D, tal como los Constitucionales, Topológicos, Geométricos, Electrónicos, tipo 3D MoRSE, WHIM, GETAWAY, funciones de distribución radial, grupos funcionales y fragmentos centrados en el átomo, entre muchos otros (Reyes, 2020; Todeschini & Consonni, 2000). Además, se incorporaron descriptores externos al programa Dragon, como se detallaron en la sección III.4.1.2.

Teniendo en cuenta el gran número de descriptores considerados, se trabajó luego en la reducción del número de descriptores. Para evitar sobreestimaciones o dificultades en la interpretación de los modelos resultantes, pares de variables con el Coeficiente de correlación de Pearson (r), $r \geq 0,70$, fueron clasificados como intercorrelacionados, y solo uno de estos se incluyó en la matriz a trabajar. Además, se eliminaron descriptores con valores cero y constantes. Esto para contar con un número de descriptores significativo pero manejable y que a su vez tuvieran relevancia mecanística en relación a la información biológica objeto de estudio. De estos entonces obtuvimos una matriz de 682 descriptores, enfocándonos principalmente en descriptores de lipofilidad, de carga, electrónicos y constitucionales. Luego para reducir el espacio de variables predictoras (descriptores moleculares) en un número tal que se puedan construir modelos matemáticos robustos y coherentes con la variable dependiente (información cromatográfica) se procedió a realizar Stewise Regression y PCA como se explicará en el apartado siguiente. La **Tabla III.2.** muestra los descriptores finales seleccionados para los modelos QSRR y QSAR que se modelaron.

Tabla III.2. Resumen de los valores de descriptores moleculares seleccionados para el modelado QSRR y QSAR

OSCs	pKa1 (ácido)	pKa2 (básico)	Enlaces Rotables	TPSA	iLOGP	RNCG_1	ElecMullk	Tm_1	TE1	TPSA_1
Propil Disulfuro	*	*	5	50,60	2,630	0,221	5,624	7,281	4,149	*
Isoaliina	1,840	8,440	4	99,60	0,880	0,293	4,735	8,189	11,12	177,9
Aliina	2,530	9,140	5	88,62	1,220	0,285	4,581	7,758	6,222	163,7
S-alil-L-cisteína	1,840	8,450	5	99,60	0,550	0,283	5,071	8,386	11,19	172,1
S-propil-L-cisteína	2,620	9,140	5	88,62	1,180	0,283	4,724	9,452	6,656	161,7
S-metil-L-cisteína	2,440	9,150	3	88,62	0,740	0,322	4,745	5,430	5,675	161,7
Metiina	1,610	8,450	3	99,60	0,240	0,314	5,021	5,805	10,05	265,8
2-Vinil-4H-1,3-ditiina	*	*	1	50,60	1,980	0,244	4,695	4,263	3,595	*
Dialil disulfuro	*	*	5	50,60	2,490	0,166	5,630	6,750	3,512	*
Etil disulfuro	*	*	3	50,60	2,170	0,276	5,615	4,424	2,883	*
Dimetil disulfuro	*	*	1	50,60	1,690	0,473	5,688	2,993	1,944	*
Etil sulfuro	*	*	2	25,30	1,920	0,282	4,609	3,649	2,452	*
Alil metil sulfuro	*	*	2	25,30	1,770	0,314	4,520	3,663	2,490	*
E-Ajoeno	14,90	*	8	86,88	2,740	0,285	5,637	16,74	10,29	41,72
Z-Ajoeno	14,90	*	8	86,88	2,740	0,287	5,681	13,94	10,42	36,28
Dialil sulfuro	*	*	4	25,30	2,110	0,17	4,482	6,067	3,223	*
Metil Propil Trisulfuro	*	*	4	75,90	2,330	0,333	5,945	6,979	3,055	*
Furfuril disulfuro	*	*	5	76,88	2,620	0,147	5,504	10,91	4,647	34,28
Alicina	*	*	5	61,58	1,950	0,339	5,686	6,920	6,924	36,45
Alil mercaptano	10,00	*	1	38,80	1,510	0,333	4,643	3,137	1,532	*
Sulforafano	*	0,870	5	80,73	2,110	0,384	4,963	12,92	8,191	67,96
Sulforafeno	*	0,660	4	80,73	2,170	0,379	5,051	12,50	7,732	62,69
Dialil Trisulfuro	*	*	6	75,90	2,650	0,165	5,970	8,334	3,549	*
Indol-3-carbinol	15,10	*	1	36,02	1,360	0,246	4,234	5,623	5,450	78,72
Alil Isotiocianato	*	0,650	2	44,45	1,930	0,409	4,891	6,325	1,620	57,46
Fenil Isotiocianato	*	1,360	3	44,45	2,470	0,167	4,904	11,25	3,006	19,91
Fenil Isotiocianato	*	-1,83	1	44,45	2,09	0,236	4,813	7,947	2,192	53,72
Bencil Isotiocianato	*	0,34	2	44,45	2,19	0,193	4,883	7,262	2,574	19,38

^a Para una explicación de los símbolos referirse al texto; *Compuestos no ionizables

III.5. EVALUACIÓN DE LA LIPOFILICIDAD DE LOS OSCs Y MODELADO QSRR PARA EVALUAR LAS INTERACCIONES IAM-OSCs

En esta etapa del trabajo de investigación se comenzó con el modelado estadístico multivariado de los datos.

La Quimiometría trata de construir un puente entre los métodos y su aplicación en química. Entre la gran cantidad de técnicas de análisis de datos, en la presente sección se describirán brevemente las denominadas técnicas de análisis univariadas y multivariadas tales como las técnicas de regresión simple y múltiple (MLR, por sus siglas en inglés) respectivamente y también, técnicas de análisis multivariado como la de análisis discriminante y la denominada “mínimo cuadrados parciales” (PLS, por sus siglas en inglés). Tales metodologías son unas de las más usadas en los estudios de QSAR y fueron las empleadas en el presente trabajo.

En el Capítulo I, se presentó la noción de que se pueden distinguir dos tipos de modelos: los de **regresión**, cuando la variable respuesta es cuantitativa, y los de **clasificación o de reconocimiento de patrones**, cuando se modelan categorías o clases. Estos modelos pueden, o no, ser lineales. Trataremos en primer lugar a los del primer grupo.

- **Análisis de Regresión Lineal Simple y Múltiple (MLR)**

De las técnicas más populares y sencillas para ver que parámetros se relacionan mejor con la variable dependiente; por ejemplo una determinada actividad biológica y_i en estudios de QSAR. El método de regresión lineal puede escribirse de la siguiente manera:

$$y = b_0 + \sum^n b_1 x_1 + e$$

donde los parámetros b_0 y b_1 son determinados por el método de mínimos cuadrados.

En este tipo de análisis, la relación, llamada función de regresión, se estudia entre una variable dependiente, y , y una única variable independiente x , dado un conjunto de datos que incluye observaciones para ambas variables para una población en particular. Una función de regresión lineal en los parámetros (pero no necesariamente en las variables independientes) se denominará modelo de regresión lineal. De lo contrario, el modelo se denomina no lineal. Los modelos de regresión lineal con más de una variable independiente se denominan modelos lineales múltiples (MLR). Al ajustar una línea recta a través de los puntos, se puede realizar un análisis de regresión lineal simple (Pirhadi, Shiri, & Ghasemi, 2015).

En el análisis multivariado, una de las decisiones más importantes es la de utilizar todas las variables x_i posibles o sólo unas pocas. Dependiendo de la complejidad del sistema a analizar, algunos de los métodos usados en la práctica pueden emplear un pequeño número de variables e ignorar el resto, por razones puramente de cálculo. Por otra parte los métodos multivariados como PLS pueden usar todas las variables disponibles significativas.

La óptima selección de las variables descriptoras (x_i) es importante cuando estas son altamente colineales. En este caso, la utilización de todas las variables puede ser inútil y resulta más adecuado reducirlas en forma significativa, ya que en este caso hay información reiterativa o repetitiva en muchas de las variables iniciales. En estos casos, uno de los métodos de mayor aceptación en la actualidad es el método PLS (Camargo, 2007). Otra opción es encontrar el "mejor subconjunto de variables", dando el modelo óptimo en MLR. Pero probar todas las combinaciones de variables posibles no es práctico cuando el número de variables es demasiado grande. Una alternativa es la selección de varias variables ortogonales utilizando algún conocimiento preliminar o utilizando un sistema de selección de variables. En QSAR se han propuesto varios enfoques para la selección de subconjuntos de variables. Entre ellos, los más aplicados son los algoritmos evolutivos y genéticos, las regresiones escalonadas, y la selección hacia adelante, la eliminación hacia atrás (*stepwise regression*). En esta tesis este último método, junto con conocimiento previos basados en bibliografía sobre qué tipos de interacciones pueden estar involucradas en el pasaje transmembrana de compuestos orgánicos, fueron empleados para el pre-tratamiento de los datos antes del modelado estadístico final.

- **Análisis de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS)**

El método PLS tiene como característica fundamental la reducción de la dimensión de la matriz descriptora X y la matriz de respuesta Y , reemplazando las variables originales con combinaciones lineales de dichas variables (factores latentes). Este análisis es un procedimiento de modelado que estima simultáneamente los factores subyacentes en la matriz respuesta Y (variables dependientes), y en la matriz X de variables independientes. Estos factores son usados para definir un nuevo subespacio en X que mejor ajuste a Y . Las siguientes ecuaciones expresan el funcionamiento del método PLS:

$$X = TP + E$$

$$Y = UQ + F$$

Donde los elementos T y U son matrices llamadas *scores* de X e Y respectivamente, y relacionan la información de la matriz descriptora X con la matriz de variables dependientes Y , a través de la correlación que existe en las matrices de covarianza de X e Y (o sea la máxima elongación de los datos originales sobre el nuevo subespacio originado por los componentes PLS). Los elementos P y Q son matrices llamadas *loadings* de X e

Y respectivamente, que indican las coordenadas de los datos iniciales sobre las nuevas componentes PLS. Un gráfico de los loadings en función de las variables originales x_i , permite observar cuales de ellas son relevantes para modelar la variable dependiente (y_i). E y F son las matrices de error asociado al modelado de X e Y para el modelo PLS. Los *scores T* no son óptimos para estimar las columnas en X, pero son rotados a fin de poder describir simultáneamente la matriz Y. El cálculo a través de herramientas PLS también da como resultado una matriz auxiliar conocida como matriz de pesos (*W* o *loadings weight*), que expresa la correlación entre las matrices U y X y es usada para calcular la matriz T.

Cuando las matrices X e Y son utilizadas para estimar los factores PLS, existen entre ellos una nueva relación, definida por la siguiente ecuación:

$$u = bt + g$$

donde t y u están escritos ahora en letra minúscula porque representan los vectores que dan origen a las coordenadas de cada uno de los componentes PLS utilizados en el modelo. Por otro lado, b es el término de relación interna entre u y t siendo g el error asociado. La **Figura III.5.** muestra como funciona el PLS teniendo en cuenta las anteriores consideraciones:

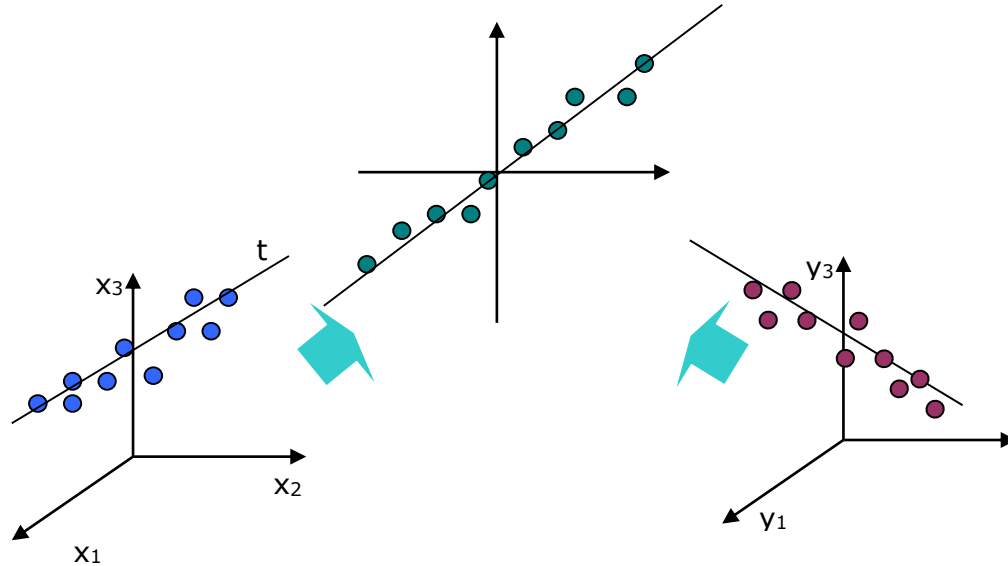


Figura III.5. Esquema de funcionamiento del análisis PLS
Fuente: Camargo, 2007

El PLS opera matemáticamente a fin de que las direcciones de los primeros componentes PLS (definidos por t y u) puedan explicar la mayoría de la variación de la muestra, siendo esta variación la información relevante de la misma necesaria para el modelado. Para ello, PLS utiliza las covarianzas del sistema y son las que definirán la dirección de máxima elongación de los puntos y la dirección de los componentes PLS. La consecuencia de esto es que la información inicial contenida a lo largo de n variables, se ve condensada en unas pocas nuevas variables ortogonales entre sí, con lo cual queda resaltada solamente la información útil con los primeros componentes PLS y la información redundante queda confinada en los últimos (definida por la matriz de errores). Si se seleccionan un número elevado de componentes PLS, el modelo se ajustará adecuadamente pero con el costo de tener incorporado en él gran cantidad de información irrelevante (sobreajuste), con lo cual las matrices de error se hacen pequeñas al utilizarse la información relevante e irrelevante. Por el contrario, si el número de componentes PLS seleccionado es muy pequeño, se corre el riesgo de dejar de lado información vital del sistema en estudio (subajuste) y las matrices de error del modelo se tornan grandes (Camargo, 2007).

En general se considera que el análisis PLS es más realista que MLR para construir modelos de las relaciones a menudo complicadas entre la estructura química y la actividad biológica. PLS proporciona diagnósticos tales como validación cruzada y gráficos de puntuación (*score plot*), con los gráficos de carga (*loading plot*) correspondientes, que informan sobre la complejidad del modelo y la estructura de los datos X que no se pueden lograr con MLR ordinario. Además, PLS puede abordar muchas variables descriptivas de estructura colineal que facilitan la aclaración de la variación de estructuras compuestas.

La capacidad del modelo de regresión PLS para las predicciones futuras se valida generalmente a través de un procedimiento interno de validación cruzada que deja uno fuera (*leave one out*). Para elegir el número óptimo de factores PLS, el valor *PRESS* (suma de cuadrados del error residual predicho) se monitorea como función de las variables latentes. Se elige el número de componentes relacionados con la *PRESS* mínima (Pirhadi et al., 2015).

- **Análisis Discriminante Lineal (LDA)**

A diferencia de los análisis antes presentados, este último se trata de un análisis clasificatorio. En los estudios QSAR es frecuente tener que enfrentarse con la necesidad de identificar las características que permiten diferenciar a dos o más grupos de datos, generalmente con la finalidad de poder clasificar nuevos casos como pertenecientes a uno u otro grupo. El análisis discriminante permite identificar las características que diferencian (discriminan) a dos o más grupos y a crear una función capaz de distinguir con la mayor precisión posible a los miembros de uno u otro grupo. Para llegar a conocer en qué se diferencian los grupos se necesita

disponer de información (cuantificada en una serie de variables) en la que suponemos que se diferencian. El análisis discriminante es una técnica estadística capaz de decirnos qué variables permiten diferenciar a los grupos y cuántas de estas variables son necesarias para alcanzar la mejor clasificación posible. La pertenencia a los grupos, conocida de antemano, se utiliza como variable dependiente (una variable categórica con tantos valores discretos como grupos). Las variables en las que suponemos que se diferencian los grupos se utilizan como variables independientes o variables de clasificación (también llamadas variables discriminantes).

El objetivo último del análisis discriminante es encontrar la combinación lineal de las variables independientes que mejor permite diferenciar (discriminar) a los grupos. Una vez encontrada esa combinación (la función discriminante) podrá ser utilizada para clasificar nuevos casos. Se trata de una técnica de análisis multivariante que es capaz de aprovechar las relaciones existentes entre una gran cantidad de variables independientes para maximizar la capacidad de discriminación.

El planteo del problema consiste:

- Sea un conjunto de n objetos divididos en q grupos $\{G_i; i=1, \dots, q\}$ de tamaños $\{n_g; g=1, \dots, q\}$ que constituyen una partición de la población de la que dichos objetos proceden.
- Sea $Y = (Y_1, \dots, Y_p)$ un conjunto de variables numéricas observadas sobre dichos objetos con el fin de utilizar dicha información para discriminar entre los q grupos anteriores.

Mientras no se diga lo contrario, supondremos que las variables anteriores son cuantitativas.

La discriminación entre los q grupos se realiza mediante el cálculo de unas funciones matemáticas denominadas funciones discriminantes. Existen varios procedimientos para calcularlas siendo el procedimiento de Fisher uno de los más utilizados.

Los resultados obtenidos se interpretan desde dos ópticas:

- Significado de las dimensiones de discriminación entre los grupos proporcionadas por las funciones discriminantes mediante el análisis de la matriz de estructura y de la de los coeficientes estandarizados de las funciones discriminantes.
- Análisis del sentido de la discriminación entre dichos grupos, es decir, averiguar qué grupos separa cada función discriminante y en qué sentido. Este análisis se lleva a cabo mediante representaciones gráficas del espacio de discriminación así como de perfiles multivariantes correspondientes a cada grupo (Camargo, 2007).

En este trabajo de tesis emplearemos estos análisis clasificatorios para realizar estudios QSAR de propiedades LADME como la permeación de la barrera hematoencefálica, que en este caso se trataba de una variable categórica, como se verá más adelante en apartados siguientes.

Las herramientas estadísticas y matemáticas aquí presentadas sirven varios propósitos dentro de la construcción de los modelos QSAR o QSPR en general. En primer lugar, considerando que se trabaja con un gran número de descriptores calculados, un proceso de regresión múltiple paso a paso, empleando el algoritmo *forward/selection* y *backward/elimination* resulta necesario para la inclusión o el rechazo de los descriptores en los modelos examinados. Posteriormente, las relaciones entre los descriptores seleccionados y las variables de respuestas biológicas (o propiedades) se modelan siguiendo alguno de los análisis aquí citados, eligiéndose cada uno según las características propias que presenten y la tendencia que sigan estas relaciones (lineales o no). Finalmente, se requieren métodos estadísticos para la validación del modelo. Una vez que se logra identificar la mejor solución matemática, con un número apropiado de descriptores moleculares para predecir la respuesta final evaluada, es indispensable ejecutar diversas pruebas de validación multipropósito, que verifiquen la veracidad, predictibilidad y aplicabilidad del modelo obtenido. Se pueden aplicar diversas técnicas de validación interna como la Validación Cruzada (C-V, por su sigla en inglés *cross-validation*) dejar-uno-afuera (LOO, por su sigla en inglés *leave one out*) y dejar-más-afuera (LMO, por su sigla en inglés *leave more out*), la técnica de Aleatorización-Y, y el Factor de Inflación de la Varianza (VIF); así como, definir el dominio de aplicación (AD, por su sigla en inglés *application domain*) del modelo. A través de estas estrategias se puede caracterizar de forma acertada la bondad predictiva del modelo, requerida para determinar el grado de aceptación del mismo. También se suele contar con un conjunto externo de moléculas con datos experimentales de la actividad bajo estudio; este conjunto se conoce como predicción (N_{pred}) (Reyes, 2020).

Para explicar las complejas relaciones entre moléculas y cantidades observadas, normalmente se abordan dos enfoques principales: en primer instancia se intenta de descifrar las relaciones entre estructuras moleculares y propiedades físico-químicas, Relaciones cuantitativas estructura-propiedad (QSPR), en este caso la propiedad se trata de parámetros cromatográficos de manera que los llamamos QSRR; y el segundo entre estructuras moleculares y actividades biológicas, Relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR). En esta sección discutiremos modelos QSRR para definir la interacción de los OSCs con la fase IAM, haciendo énfasis en la lipofilidad como parámetro físico-químico preponderante de estas interacciones.

III.5.1. MATERIALES Y MÉTODOS

III.5.1.1. Métodos estadísticos y programas empleados

Se trabajó sobre la base de set de compuestos OSCs presentados en la **Tabla III.1.** y sobre los cuales se calculó los descriptores moleculares discutidos en la sección III.4.

El análisis de regresión múltiple (MLR) y las proyecciones de mínimos cuadrados parciales (PLS) fueron los métodos seleccionados para construir los diferentes modelos estadísticos entre los parámetros cromatográficos IAM y los descriptores estructurales. La determinación del número significativo de componentes PLS se realizó mediante validación cruzada (cross-validation). El análisis MLR se realizó usando MINITAB® Release 17, mientras que el análisis PLS se llevó a cabo usando el software SIMCA-P 7.01 obtenido de Umetri AB, Umea, Suecia. Para evitar sobreestimaciones o dificultades en la interpretación de los modelos resultantes, los pares de variables con $r \geq 0,75$ se clasificaron como intercorrelacionadas, y solo una de ellos se incluyó en el modelo cribado. La capacidad predictiva de los modelos se evaluó mediante el coeficiente de correlación al cuadrado (R^2) y el estadístico F de Fisher (F). En los modelos PLS también evaluamos el coeficiente de validación cruzada (Q^2), que se basa en la suma de cuadrados del error de predicción (PRESS, por su sigla en inglés de *predicted residual error sum of squares*).

III.5.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.5.2.1. Determinación de la lipofilicidad de los OSC mediante IAM y parámetros fisicoquímicos

Primero, estudiamos la capacidad de la fase IAM para evaluar la lipofilicidad de las OSCs. El coeficiente de partición n-octanol/agua, simbolizado **log P**, es conocido como uno de los principales parámetros para estimar la lipofilicidad de un compuesto y sus propiedades farmacocinéticas, entre ellas la permeabilidad (Barbato, 2006). Por lo tanto, se estudió la medida en que los valores de $\log k'_{IAM}$ estaban relacionados con los valores calculados de $\log P$. Los valores de dicho coeficiente se obtuvieron de la herramienta web SwissADME.

En las **Tablas III.2. y III.3** se muestran los datos cromatográficos y los correspondientes parámetros fisicoquímicos de los compuestos en estudio.

Tabla III.3. Factores de capacidad cromatográfica de los OSCs en fase IAM

OSCs	$\log (k'_{IAM})$
------	-------------------

Propil Disulfuro	0,913
Isoaliina	-0,734
Aliina	-1,102
S-alil-L-cisteína	-1,710
S-propil-L-cisteína	-1,645
S-metil-L-cisteína	-1,322
Metiina	-1,922
2-Vinil-4H-1,3-ditiina	0,237
Dialil disulfuro	0,554
Etil disulfuro	0,420
Dimetil disulfuro	-0,017
Etil sulfuro	-0,099
Alil metil sulfuro	-1,021
E-Ajoeno	0,022
Z-Ajoeno	0,015
Dialil sulfuro	0,222
Metil Propil Trisulfuro	0,810
Furfuril disulfuro	0,713
Alicina	-0,409
Alil mercaptano	-0,197
Sulforafano	-0,514
Sulforafeno	-0,521
Dialil Trisulfuro	0,781
Indol-3-carbinol	-0,204
Alil Isotiocianato	0,118
Fenil Isotiocianato	0,663
Fenil Isotiocianato	0,746
Bencil Isotiocianato	0,571

En este caso, construimos un modelo MLR basado en $i\text{LOGP}$ (Log P implícito). Este parámetro es un valor calculado correspondiente al descriptor del coeficiente de partición n-octanol / agua basado en el enfoque GB / SA. Ha demostrado ser un parámetro fisicoquímico eficiente que muestra una fuerte correlación lineal entre la energía libre de solvatación calculada en solventes implícitos y el $\log P_{o/w}$ experimental en más de 17.500 moléculas (Daina, Michielin, & Zoete, 2014). La ecuación de regresión usando el conjunto completo de compuestos fue:

$$(1) \log K' (\text{IAM}) = - 2,08 (0,2484) + 1,02 (0,1284) i\text{LOGP}$$

(0,000) (0,000)

$$R^2 = 0,721; R^2(\text{cv}) = 0,683; s = 0,444; n = 28; F = 67,29; W_{i\text{LOGP}} = 0,8492$$

En la **ecuación (1)** y las siguientes ecuaciones, n es el número de compuestos, s es la desviación estándar, R^2 es el coeficiente de correlación al cuadrado, $R^2 (cv)$ es el coeficiente de validación cruzada al cuadrado y F es el estadístico F de Fisher. Los valores entre paréntesis corresponden a las desviaciones estándar y los valores p de los coeficientes, y el término W representa el coeficiente de regresión estandarizado.

La calidad estadística del modelo es adecuada como se ve en la calidad de ajuste y capacidad predictiva, expresada por los coeficientes R^2 y R^2cv , respectivamente. Sin embargo, se deben considerar algunos aspectos para mejorar aún más las estadísticas de la ecuación (1). La relación entre los valores de $\log k'(\text{IAM})$ e $i\text{LOGP}$ se muestra en la **Figura III.6**. Allí, es posible distinguir diferentes subgrupos de compuestos, marcados por diferentes colores, correspondientes a **OSCs no ionizables** (principalmente compuestos con grupos sulfuros), **OSCs ionizables** (ACSOs y compuestos que contienen cisteína), **compuestos con grupos sulfóxidos** (alicina, sulforafano/eno, EZ-ajoeno) y dos casos especiales (I3C y AMS). Esto sugiere una divergencia entre los diferentes compuestos que puede deberse a las diferentes interacciones de los grupos sulfóxido, tanto con la fosfatidilcolina en la fase IAM, como con el octanol cuando consideramos la partición octanol-agua.

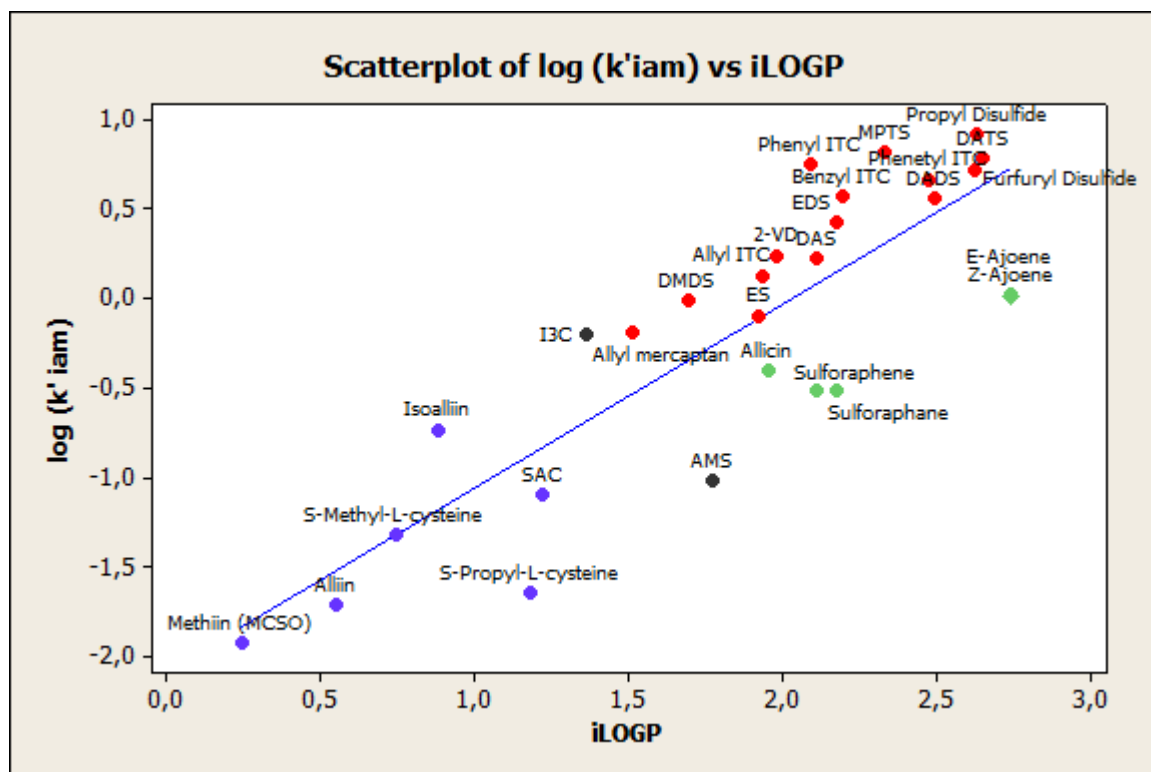


Figura III.6. Relación entre $\log k'(\text{IAM})$ e $i\text{LOGP}$ para los 28 OSCs

Clave: ● Compuestos organosulfurados no ionizables ● Compuestos organosulfurados ionizables
● Compuestos con sulfóxidos ● Observaciones inusuales

Los resultados obtenidos del modelo de regresión mostraron que aunque hubo un ajuste adecuado entre las variables $i\text{LOGP}$ y $\log k'_{IAM}$ (ambos parámetros fisicoquímicos llevan información similar con respecto a la lipofilicidad), no codifican la misma información con respecto a interacciones específicas, como se muestra a continuación. Este hecho concuerda con otros reportes (Grumetto, Russo, & Barbato, 2015b; Russo et al., 2017) que propusieron que cuando un compuesto es ionizable y/o presenta un área de superficie polar $\neq 0$, las interacciones con las dos fases de partición, es decir el n-octanol y los fosfolípidos se ven afectados de manera diferente por las fuerzas de interacción electrostática y polar llevadas a cabo por los OSCs. Por tanto, se puede concluir que el equilibrio entre los efectos polares e hidrófobos en los OSCs no es el mismo hacia las fases n-octanol e IAM. La **Figura III.6.** apoya esta idea, donde estas interacciones intermoleculares "extra" se vuelven indirectamente visibles, debido a la divergencia observada entre las diferentes clases de compuestos. En vista de esto, parece razonable considerar un mecanismo de interacción común entre los compuestos que contienen grupos sulfóxido, que algunos de ellos, a su vez, presentan grupos cargados y diferentes valores de pK_a (ver **Tabla III.2**), y los fosfolípidos constituyentes de la IAM. Este hecho explica el modesto ajuste observado entre los parámetros $\log k'_{IAM}$ e $i\text{LOGP}$, lo que indica la insuficiencia del sistema de partición de octanol para imitar las complejas interacciones entre la fase IAM y las formas ionizadas de los OSCs en estudio. En este punto, es importante resaltar que no abordamos la evaluación de $\log D$ porque, al pH experimental utilizado durante el análisis cromatográfico de las OSC, los valores de $\log D$ y $\log P$ eran los mismos.

Todos estos resultados nos dieron la pauta para seguir explorando otros descriptores moleculares para explicar el comportamiento de retención de los OSCs en la fase IAM de manera adecuada, como se tratará a continuación.

III.5.2.2. Modelos QSRR para evaluar las interacciones de los OSC con la fase IAM

Se construyeron varias ecuaciones QSRR para evaluar las interacciones intermoleculares fundamentales que gobiernan la retención de las diferentes OSC en las fases IAM. Como se muestra en la sección anterior, la lipofilicidad es un factor esencial a considerar en los modelos de relaciones cuantitativas estructura-retención (QSRR). Sin embargo, dado que la lipofilicidad puede describirse por la contribución de dos componentes, a saber, el tamaño molecular y la polaridad molecular, se examinaron modelos que incorporaron ambas propiedades moleculares. A partir de un Análisis de Regresión por Pasos y utilizando el parámetro VIP (importancia de la variable en la proyección), se seleccionaron diferentes descriptores y se construyó un MLR, así como un modelo PLS, con base en el mejor subconjunto de parámetros estructurales. A partir del análisis de los resultados obtenidos, y como se discutió anteriormente, las interacciones polares específicas fueron

mejor modeladas por dos descriptores electrónicos, la Electronegatividad de Mulliken y la Carga Negativa Relativa (RNCG_1). La mejor ecuación de regresión, que incluyó el parámetro iLOGP, fue:

$$(2) \log k' (\text{IAM}) = - 3,40 (0,4967) + 0,633 (0,1188) \text{ Mulliken Electronegativity} \\ (0,000) \quad (0,000) \\ - 2,61 (0,5974) \text{ RNCG}_1 + 0,876 (0,0807) \text{ iLOGP} - 0,201 (0,0251) \text{ Rotatable bonds} \\ (0,000) \quad (0,000) \quad (0,000)$$

$$R^2 = 0,936; R^2(\text{CV}) = 0,907; s = 0,226; n = 28; F = 84,1; \\ W_{\text{iLOGP}} = 0,726; W_{\text{Mullk,Elec.}} = 0,362; W_{\text{Rot,Bonds}} = - 0,481; W_{\text{RNCG}_1} = -0,252$$

Esta ecuación es altamente significativa y no existen fuertes intercorrelaciones entre los descriptores moleculares seleccionados, lo que es fundamental para alcanzar una correcta interpretación fisicoquímica. Un punto interesante a destacar en esta ecuación es una mejora en los parámetros estadísticos al comparar con la ecuación (1), lo que sugiere no solo una mejor capacidad predictiva sino también, como se hipotetizó, que las interacciones específicas con respecto al comportamiento de las OSC en la fase IAM surgen precisamente de los otros términos que se agregan al modelo, además de iLOGP.

Como forma alternativa de evaluar la confiabilidad y robustez del modelo QSRR, realizamos un enfoque estadístico diferente, utilizando los mismos descriptores incluidos en el modelo MLR. En consecuencia, realizamos el análisis de descriptores moleculares mediante regresión de mínimos cuadrados parciales. La significancia estadística de los modelos derivados QSRR-PLS se evaluó mediante la varianza de las matrices X e Y (R2X y R2Y), el coeficiente de correlación cuadrado (R-Sq), la desviación estándar (RMSS) y el estadístico F. La capacidad predictiva se evaluó mediante el coeficiente de validación cruzada (Q), que se basa en la suma de cuadrados del error de predicción (PRESS). La estadística PRESS se calcula como las diferencias cuadradas entre los valores observados y predichos cuando las observaciones se mantienen fuera del modelo derivado (J. M. Luco et al., 2003).

El modelo se construyó utilizando el conjunto total de OSC, lo que resultó en dos componentes estadísticamente significativos (CPLS), cuyos parámetros se detallan en la **Tabla III.4**. Como se muestra en la **Figura III.7.**, la concordancia entre los datos medidos y calculados del modelo PLS derivado es muy satisfactoria. También hubo una tendencia lineal de los residuales al observar la gráfica de probabilidad normal de dichos valores (Datos no mostrados), lo que indica que los términos de error se distribuyeron normalmente.

Tabla III.4. Parámetros estadísticos del modelo PLS resultante de las interacciones de los OSCs en fase

IAM

Comp.	R2X(CUM)	R2Y(CUM)	Q2(CUM)	RMSS	F statistical
CPLS-1	0.452	0.749	0.712		
CPLS-2	0.675	0.933	0.614	8.60	175.46

(R-Sq=0.9335) (Q=0.8886)

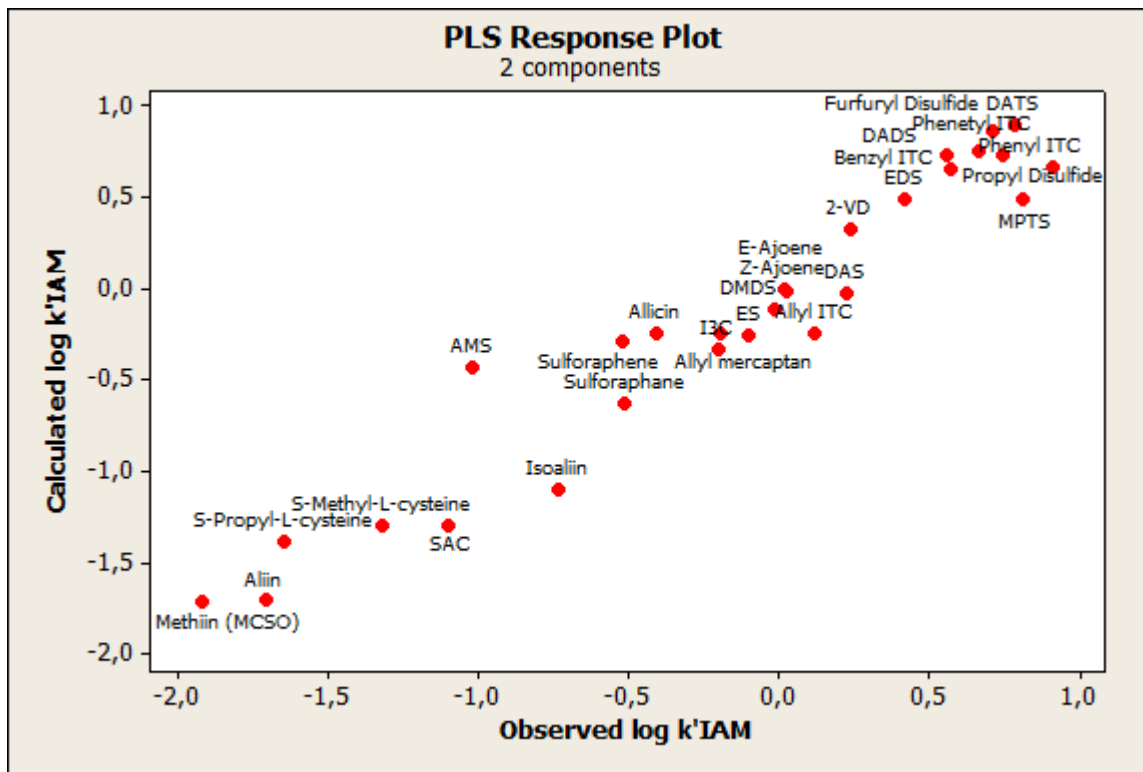


Figura III.7. Relación entre los valores observados y calculados utilizando el enfoque PLS para log k'IAM.

El único compuesto que mostró un comportamiento atípico fue el AMS, que al observar los residuales estandarizados, mostró más de dos desviaciones estándar con respecto a la tendencia centralizada del resto de los compuestos (**Figura III.8.**). Así, considerando este valor atípico, se construyó un segundo modelo PLS sin AMS (compuesto 14), y como se esperaba, el modelo PLS -con dos componentes- mejoró la calidad estadística (R-Sq = 0,953; Q = 0,763; F = 240,76).

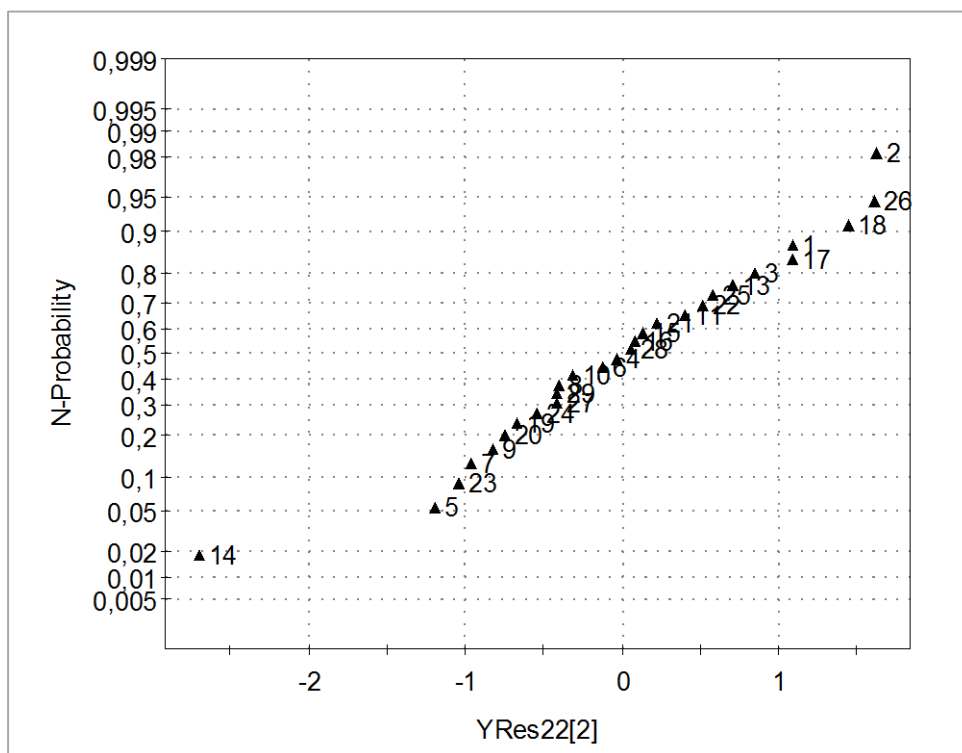


Figura III.8. Gráfico de N-probabilidad de los residuos del modelo PLS (QSRR-IAM)

Respecto a la interpretación de los modelos, lo primero que se desprende es la relación directa entre el log k' IAM y el parámetro de lipofilicidad. A su vez, el signo del coeficiente de i LOGP, el cual es positivo, indica que al aumentar la lipofilicidad aumentaría también la retención de los compuestos en esta fase estacionaria, lo cual es esperable. Por otro lado, las interacciones polares específicas se modelaron mejor mediante dos descriptores electrónicos, la electronegatividad de Mulliken y la carga negativa relativa (RNCG_1). Estos resultados están de acuerdo con los hallazgos de otros autores, quienes han demostrado que las propiedades moleculares polares / electrostáticas afectan la partición fosfolípidos-analito (Grumetto et al., 2015b; Russo et al., 2017). Al analizar el signo de cada uno de estos descriptores en el modelo, lo que vemos es que la electronegatividad de Mulliken presenta una relación directa con los k' IAM, mientras que hay una relación inversa entre log k' IAM-RNCG_1. En el primer caso, la relación directa nos indica que mientras más electronegatividad mayor retención. Los valores más grandes de electronegatividad, son característicos de los aceptores de electrones (este sería el caso de los polisulfuros), mientras que los donantes de electrones exhiben valores más pequeños de electronegatividad (grupos cisteínicos). Por tanto, estos parámetros pueden explicar las interacciones de los enlaces de hidrógeno entre los analitos y la fase cromatográfica (Buszewski et al., 2020). En otra línea de conceptos, la relación entre la carga atómica negativa máxima y la carga negativa total en la molécula, expresada por RNCG puede explicar también la capacidad de formación de enlaces de hidrógeno de las moléculas. El signo negativo del efecto medio para este descriptor

indica que la tendencia de los analitos a retenerse en la fase estacionaria aumentó al disminuir la carga negativa relativa en la molécula.

La presencia del descriptor de Número de Enlaces Rotables (*Rotatable Bonds*) en el modelo requiere una discusión por separado. En el sentido más general, se puede considerar que transmite información sobre la flexibilidad molecular y, curiosamente, esta propiedad parece estar también involucrada en el proceso de retención de IAM. La flexibilidad molecular juega un papel importante cuando se analizan los fármacos administrados por vía oral, ya que se ha informado que el aumento del recuento de enlaces rotables (lo que significa una mayor flexibilidad molecular) afecta negativamente la tasa de permeación (J. J. Li, Holsworth, & Hu, 2003). De esta forma, nuestros resultados concuerdan con esto último, ya que el signo negativo de la variable de enlaces rotables en los modelos desarrollados sugiere que a mayor flexibilidad molecular, menor interacción con la fase IAM y, en consecuencia, menor tiempo de retención podría ser observado. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la rigidez molecular es un tema mucho más complejo que el simple recuento de enlaces rotables. Por lo tanto, la aparición de esta propiedad molecular en los modelos sugiere la importancia de las restricciones conformacionales en la partición OSC-IAM.

III.6. MODELOS QSAR PARA EVALUAR PARÁMETROS DE PERMEABILIDAD DE LOS OSCs EN ESTUDIO

Hoy en día, los modelos QSAR van más allá de la simple predicción de la actividad modelada, sino que buscan brindar una posible interpretación del fenómeno responsable de la respuesta, y deducir algunos aspectos del mecanismo de acción involucrado, basándose en datos experimentales o predichos de otras respuestas finales asociadas con la actividad evaluada (Reyes, 2020). Estos principios son los que han guiado la presente tesis, por lo que una vez que se aclararon los factores moleculares que gobiernan la retención de los OSCs en la columna de IAM, evaluamos el rendimiento predictivo y buscamos adentrarnos en los mecanismos moleculares a partir de los datos de retención de IAM respecto algunos parámetros de permeabilidad.

Con este fin, se investigaron el **porcentaje de absorción gastrointestinal humana** (% HIA), la **permeabilidad de la barrera hematoencefálica** (BBB) y la **permeabilidad de la piel** (Log KP), frente a los OSCs bajo estudio. Cabe destacar que no hay datos experimentales de permeabilidad para estos OSCs en la literatura. Consecuentemente, se trabajó con datos obtenidos *in silico* calculados con la herramienta web SwissADME y la aplicación basada en la *webpage* preADMET. Para asegurar la confiabilidad de estos valores predichos, primero verificamos que nuestro conjunto de datos de OSCs perteneciera a cada espacio predictor que admite los correspondientes valores de piel de HIA, BBB y KP obtenidos de los servidores web.

Como lo muestran en su trabajo Kar, Roy, & Leszczynski, 2018, para analizar en qué medida se puede confiar en la predicción de un determinado modelo para un compuesto de consulta, en nuestro caso para los OSC objetivo, es necesario evaluar el **dominio de aplicabilidad (AD)** de ese modelo QSAR en particular. En este sentido, es importante reconocer que los QSAR están asociadas con restricciones en términos de agrupamiento de estructuras químicas, propiedades fisicoquímicas y mecanismos de acción para los cuales los modelos pueden producir predicciones confiables. Para evaluar el espacio AD de un modelo específico, los enfoques AD siguen un rango en valores de descriptores o hipótesis basadas en la distancia. En base a estos conceptos se trabajó en este apartado para estimar la utilidad de la fase IAM en el estudio de la permeabilidad celular.

III.6.1. MATERIALES Y MÉTODOS

III.6.1.1. Descriptores moleculares y datos ADME

Se trabajó sobre la base de descriptores moleculares calculados para los 28 OSCs (**Tabla III.1.**) empleando los programas Dragon vs 3.0., y la plataforma web del entorno de modelado químico en línea (OCHEM), procediendo como se indicó en el apartado III.4.1.2.

Para evaluar los parámetros de permeabilidad de los OSCs bajo estudio, se obtuvieron varias propiedades calculadas de la herramienta web SwissADME y la aplicación web preADMET (© 2005-2017 BMDRC. | Diseñado por Y.-M. Kang). Se investigaron la absorción gastrointestinal humana (HIA%), la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BBB) y la permeabilidad de la piel ($\text{Log } K_p$).

Para asegurar la confiabilidad de los datos *in silico* sobre HIA, pasaje BBB y K_p de la piel, calculados a partir de las plataformas web SwissADME y preADMET, se analizó el espacio predictor de cada plataforma. Al hacerlo, se puede probar el dominio de aplicabilidad (AD) de cada modelo QSAR que sirve para calcular los valores de predicción ofrecidos en las herramientas web. Los sistemas de predicción *in silico* cuentan con la capacidad de evaluar si una molécula de consulta es parte del AD del modelo desarrollado o no y, por lo tanto, brindan una sensación mejorada de confiabilidad a nivel de predicción individual (Kar et al., 2018). Para ello, se calcularon una serie de descriptores fisicoquímicos, tanto para cada uno de los compuestos que componen el espacio predictor asociado a cada respuesta de permeación (241 compuestos del conjunto de datos para construir el modelo de permeación de HIA (Zhao et al., 2001), 260 compuestos del conjunto de datos utilizado para calcular el pasaje BBB (Daina & Zoete, 2016), y 96 compuestos del conjunto de datos para calcular K_p piel,

así como para nuestros 28 OSC. A partir de estos datos, luego realizamos un PCA, y se evaluó si nuestros OSCs pertenecían al espacio predictivo generado por los compuestos utilizados en dichas plataformas.

III.6.1.2. Métodos estadísticos y programas empleados

Teniendo en cuenta los modelos QSAR para evaluar los parámetros de permeabilidad, utilizamos TableCurve 2D® para construir un modelo no lineal de *curve-fitting* para HIA vs.log k'IAM. MINITAB® Release 17 para llevar a cabo un análisis discriminante para evaluar la permeabilidad BBB, mientras que la permeación en piel se evaluó mediante un análisis PLS (software SIMCA-P 7.01). El Análisis de Componentes Principales para verificar los OSC pertenecientes al espacio predictor de cada respuesta de permeación según las diferentes plataformas web se realizó utilizando MINITAB® v.17.

III.6.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.6.2.1. Capacidad de la fase IAM para evaluar la Absorción Intestinal Humana (HIA%) de los OSCs

Uno de los usos más extendidos de las fases IAM consiste en la estimación de parámetros relacionados con la Absorción Intestinal Humana (HIA). La vía oral generalmente se considera la vía más conveniente de administración de compuestos con principios activos. Por esta razón, algunas de las propiedades fisicoquímicas más importantes que se evalúan actualmente al comienzo del diseño de fármacos o suplementos nutracéuticos, son la solubilidad acuosa, la permeabilidad intestinal y la biodisponibilidad oral. Una forma posible de evaluar las propiedades fisicoquímicas relacionadas con ADME es confiar en ensayos *in vitro*. Por ejemplo, las células Caco-2 o MDCK, y los ensayos de permeación de membranas artificiales paralelas (PAMPA), junto con cromatografía líquida utilizando fases especiales estacionarias o móviles (por ejemplo, la basada en membranas artificial inmovilizadas, IAM), las cuales han demostrado su eficacia para simular procesos de transporte en numerosos trabajos publicados (J. M. Luco et al., 2003; Talevi et al., 2011; Yen et al., 2005). Estas técnicas apoyadas en el uso de herramientas estadísticas han dado lugar a la posibilidad de predecir HIA desde sus implicancias moleculares.

Para evaluar la efectividad de la fase IAM en la predicción del porcentaje de absorción intestinal humana (HIA%), construimos varios modelos QSAR basados en el análisis MLR. Dado que existe una falta de

información sobre los valores de HIA de compuestos organoazufrados *in vivo*, utilizamos valores calculados obtenidos de la aplicación web preADMET (**Tabla III.5.**).

Tabla III.5. Datos de permeabilidad calculados *in silico* para los OSCs bajo estudio

OSCs	HIA%	log K_p (cm/s)	BBB permeación
Propil Disulfuro	98,14	-5,30	Si
Isoaliina	73,04	-9,83	No
Aliina	81,97	-8,75	No
S-alil-L-cisteína	73,04	-9,89	No
S-propil-L-cisteína	78,54	-8,59	No
S-metil-L-cisteína	74,08	-9,06	No
Metiina	62,66	-10,25	No
2-Vinil-4H-1,3-ditiina	98,17	-5,55	Si
Dialil disulfuro	98,17	-5,63	Si
Etil disulfuro	97,83	-5,88	Si
Dimetil disulfuro	97,18	-5,62	Si
Etil sulfuro	100,00	-5,47	Si
Alil metil sulfuro	100,00	-5,76	Si
E-Ajoeno	99,31	-6,52	No
Z-Ajoeno	99,31	-6,52	No
Dialil sulfuro	100,00	-5,46	Si
Metil Propil Trisulfuro	98,30	-5,65	Si
Furfuril disulfuro	98,91	-6,19	Si
Alicina	98,31	-6,36	Si
Alil mercaptano	96,87	-5,93	Si
Sulforafano	97,88	-6,38	No
Sulforafeno	98,34	-6,32	No
Dialil Trisulfuro	98,99	-5,51	Si
Indol-3-carbinol	89,06	-6,45	Si
Alil Isotiocianato	98,09	-5,19	Si
Fenetil Isotiocianato	97,81	-4,83	Si
Fenil Isotiocianato	98,00	-4,80	Si
Bencil Isotiocianato	97,91	-4,97	Si

Primero, evaluamos la confiabilidad de los datos preADMET en relación con nuestros OSCs. Considerando el conjunto de datos de Zhao et al., 2002 -241 moléculas- usado para construir el modelo HIA-QSAR que soporta valores de predicción del servidor web preADMET, calculamos varios descriptores como nHBacc; nHBDon; MLogP; McGowan_Volume; TopoPSA; MW; AMW; y XLogP. También calculamos estos parámetros

correspondientes a nuestro conjunto de OSCs. Los descriptores evaluados fueron resultado de un análisis de selección de descriptores previo, y de bibliografía relacionada. Luego llevamos a cabo un PCA, ya que el Análisis de Componentes Principales ha demostrado ser un enfoque válido para evaluar el espacio AD de un modelo QSAR (Kar et al., 2018). Los resultados se muestran en **Anexos, sección F**. En resumen, fue posible confirmar los OSCs que pertenecen al espacio de predicción de datos original que admite valores de servidor web preADMET. El gráfico de distancia de Mahalanobis (**Figura VI.14.**) sirve para probar el enfoque anterior, donde se puede ver que los OSCs mostraron una distancia de Mahalanobis aceptable. La distancia de Mahalanobis mide la distancia desde cada punto en el espacio multivariado hasta la media general o el centroide, utilizando la estructura de covarianza de los datos. Todos estos resultados sirven para asegurar que los valores predichos de los OSC en estudio eran realmente confiables para construir los modelos QSAR que se tratarán seguidamente (Minitab v.17; Minitab Inc .; State College, PA 2010).

Centrándonos en nuestros modelos QSAR, considerando una estimación lineal, se encontró una mala correlación estadística para los OSC objetivo ($S = 6,04354$; $R\text{-Sq (adj)} = 46,8\%$; $PRESS = 371,285$; $F = 6,27$). Por lo tanto, según los resultados anteriores y la disposición de los OSCs al graficar $\log k'(\text{IAM})$ frente a HIA (**Figura III.9.**), se realizó una estimación no lineal para modelar los datos. En este caso, empleando la TABLE 2D[®] se obtuvo una función exponencial con buen ajuste estadístico. La ecuación de regresión resultante fue:

$$(3) \text{ HIA (\%)} = 93,0 (2,494) - 7,66 (1,202) [\log k' (\text{IAM})]^2 + 4,60 (1,613) e^{[\log k' (\text{IAM})]}$$

$$(0,000) \quad (0,000) \quad (0,009)$$

$$R^2 = 0,763; R^2(cv) = 0,713; s = 5,381; n = 28; F = 40,35$$

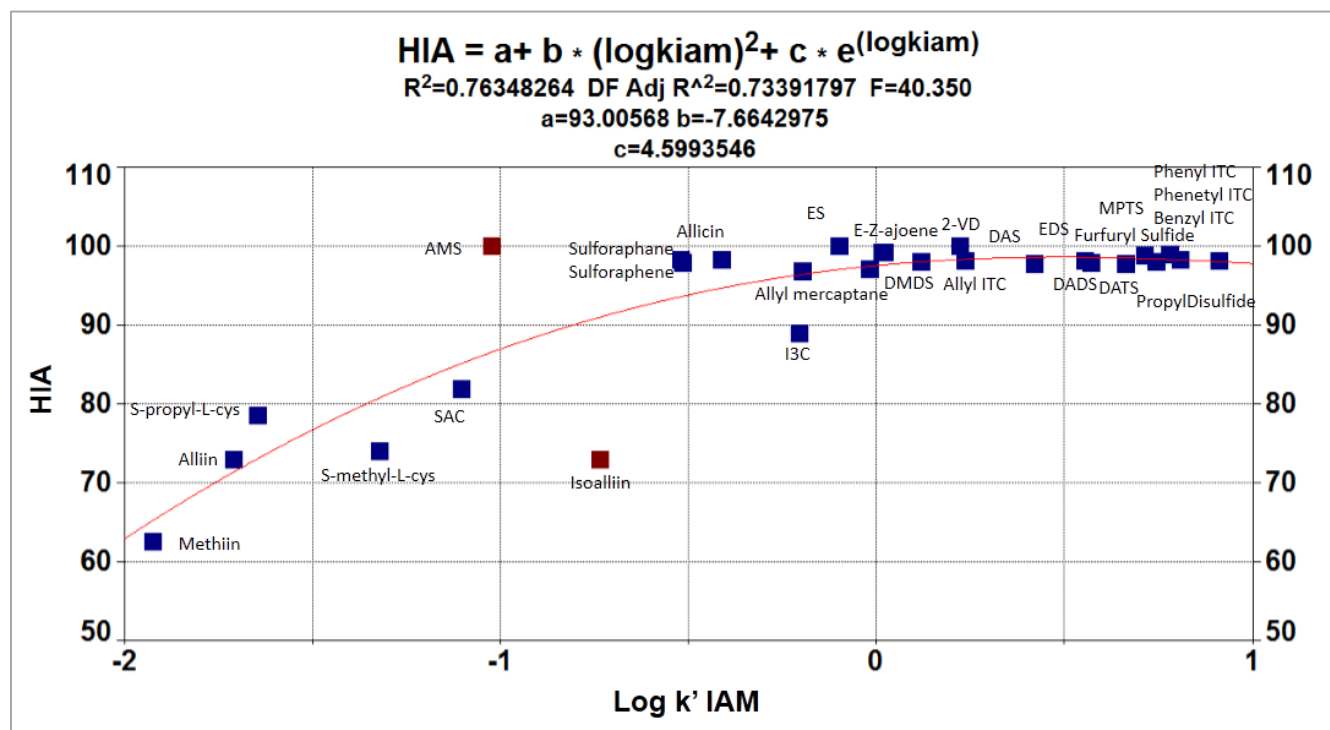


Figura III.9. Modelo QSAR no lineal que muestra la relación entre $\log k'(\text{IAM})$ y HIA (%).

Al igual que lo propuesto por Talevi y sus colegas (Talevi et al., 2011), la estimación no lineal explicó una mejor partición OSCs-IAM. Además, Yen et al., 2005 han discutido que cuando las moléculas contienen uno o más grupos ionizables, su lipofiliidad cambia con respecto al pH dando como resultado una relación no lineal con la absorción gastrointestinal. Sin embargo, considerando los resultados de los modelos QSRR y basados en el diagrama de dispersión de OSC de HIA (%) vs $\log k'(\text{IAM})$, es posible ver que $\log k'(\text{IAM})$ describe un mejor comportamiento de compuestos neutros (Ermondi et al., 2018a).

Aunque se logró una estimación razonable para modelar el comportamiento de los OSCs con respecto a HIA, en particular, se observó una desviación en el ajuste debido al comportamiento de los OSCs ionizables (ACSO, compuestos que contienen cisteína e I3C). En este sentido, informes anteriores han tratado los compuestos ionizables por separado en función de sus valores de lipofiliidad y la aparición de fuerzas de interacción intermolecular polar y / o electrostática (Grumetto et al., 2015b; Russo et al., 2017), por lo que para un mejor ajuste de las estimaciones, estos compuestos se modelaron por separado. En este caso, se llevó a cabo un análisis de regresión simple y *linear fitting* para los siete compuestos ionizables. Como indicaron Russo et al., 2017, el área de superficie polar es un factor crítico para modelar HIA cuando se trata de compuestos ionizables, ya que las fuerzas de interacción electrostática y polar afectan la partición analito-fosfolípido. Por lo tanto, el Área de Superficie Polar Total (denominada TPSA_1 para diferenciarlo del acrónimo TPSA - Área de Superficie Polar Topológica) se consideró en el modelo de la siguiente manera.

$$(4) \text{ HIA}_{\text{ionizable OSCs}} (\%) = 100 (4,182) - 0,143 (0,023) \text{TPSA}_1$$

$$(0,000) \quad (0,000)$$

$$R^2 = 0,884; R^2(\text{cv}) = 0,837; s = 3,087; n = 7; F = 38,20; W_{\text{TPSA}_1} = -0,940$$

La **Figura III.10.** muestra la relación entre HIA (%) y el área de superficie polar total (TPSA₁) para los siguientes compuestos: aliina, isoaliina, metiina, S-alil-L-cisteína, S-metil-L-cisteína, S-propil-L-cisteína e indol-3-carbinol.

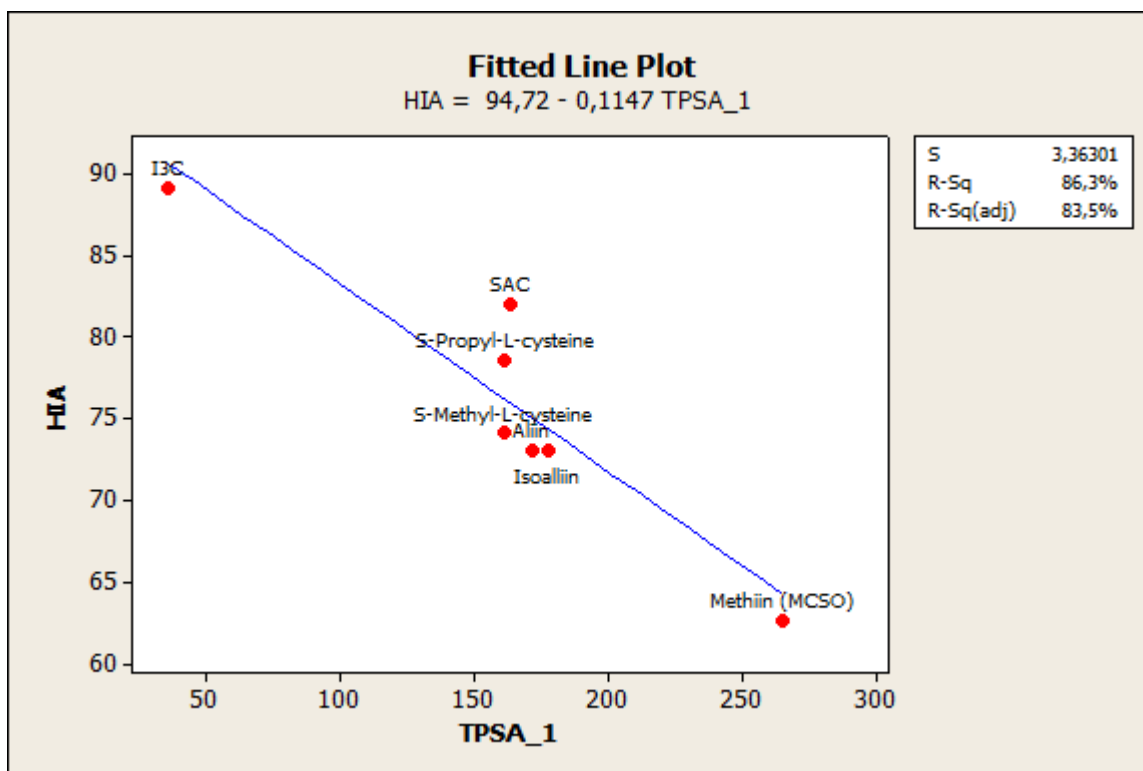


Figura III.10. Diagrama de dispersión y Fitted Line Plot de OSC ionizables que muestra la relación de HIA vs TPSA₁

Este modelo por separado de compuestos ionizables muestra que el área de superficie polar total (TPSA₁) explica mejor el comportamiento de los compuestos que contienen sulfóxidos y cisteína, cuya permeación de HIA se ve reducido en comparación con los otros OSCs. Este descriptor ya ha sido probado como parámetro molecular fundamental para describir las interacciones electrostáticas / polares en el proceso de absorción (Grumetto et al., 2015b; Russo et al., 2017). Singh & Singh, 2010 han encontrado resultados similares con respecto a la estimación de la HIA de ACSO, que mostró capacidades de permeación moderadas, y también discutieron la importancia de las interacciones de la superficie polar en este asunto. En breve, la partición de

los compuestos en la membrana celular, durante el transporte pasivo, se ha expuesto como un proceso de dos pasos. En el primer paso, la lipofilidad impulsa los compuestos hacia la bicapa de fosfolípidos. Por otro lado, en el segundo paso, el fármaco se transfiere al interior de la bicapa de fosfolípidos y las principales interacciones entre la bicapa y las partes polares de un soluto están relacionadas con los enlaces de hidrógeno y la polaridad. Por lo tanto, la tasa de permeación depende principalmente de descriptores moleculares simples como la capacidad de enlace de hidrógeno, la lipofilidad, el tamaño y la carga de la molécula. En este sentido, el área de superficie polar (PSA), que generalmente se asume que está relacionada con la capacidad de enlace de hidrógeno, se convierte en un excelente predictor de la permeabilidad pasiva de la membrana, especialmente para compuestos ionizables y / o polares (Artursson & Bergstrom, 2003).

III.6.2.2. Modelado QSAR para evaluar la permeación en la barrera hematoencefálica (BBB) de los OSCs

Para seguir en línea con la puesta a prueba de la fase IAM en la estimación de la permeabilidad celular, y dado que la cromatografía IAM se ha aplicado con éxito a las predicciones de permeabilidad de fármacos a través de la barrera hematoencefálica (J. Luco & Marchevsky, 2006), se construyó también un modelo QSAR basado en parámetros de fase IAM para evaluar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BBB, por sus siglas en inglés *Blood-Brain Barrier*) de los OSCs objetivo.

Reconociendo que no hay datos empíricos BBB reportados para OSC, el modelo BBB-QSAR se construyó utilizando datos estimados de la herramienta web SwissADME. La confiabilidad de los datos de permeabilidad BBB de SwissADME con respecto a nuestros OSCs se evaluó siguiendo los pasos discutidos anteriormente en la sección III.6.1.1. Los resultados de un PCA que incluyen varios parámetros físico-químicos (nHBacc; nHBDon; MLogP; McGowan_Volume; TopoPSA; MW; AMW; XLogP) se muestran en **Anexos, sección G**. El análisis de componentes principales mostró que nuestro conjunto de datos de los OSCs en realidad pertenece al espacio predictor de permeación BBB generado a partir de las 260 moléculas utilizadas para desarrollar el modelo QSPR de permeación BBB por SwissADME (Daina & Zoete, 2016), por lo tanto, los datos de permeación BBB de OSCs de SwissADME podrían usarse para construir el modelo QSAR correspondiente.

Los datos de permeación de BBB de SwissADME muestran qué compuesto podría permear BBB (marcado como valor Sí -1-, en la **Tabla III.5**) y cuál no (marcado como valor No -0-, en la **Tabla III.5**). Dado que la permeación de BBB era una variable categórica, se llevó a cabo un análisis discriminante mediante validación cruzada. La variable de agrupación fue la permeación BBB, mientras que los predictores fueron $\log k'$ (IAM) y TPSA (Área de superficie polar topológica), la elección de este último en base a bibliografía. La capacidad

discriminante se evaluó mediante el porcentaje de clasificaciones correctas, y la calidad de la función discriminante se evaluó mediante el parámetro de Wilks, λ , que se obtuvo mediante un análisis multivariado de varianza que prueba la igualdad de medias de grupo para la variable en el modelo discriminante. La función de discriminación estandarizada fue:

$$(5) DF_{\text{standard}} = -0,716667 \log k'(\text{IAM}) + 0,901356 \text{TPSA}$$

$$F = 54,425; \text{Wilks' lambda } (\lambda) = 0,18678; P(\text{valor}) = 0,0000; n = 28$$

La ecuación DF es altamente significativa como muestra el p-valor, $P < 0,00001$, y entre las 28 observaciones utilizadas para ajustar el modelo, 28 (o 100,0%) se clasificaron correctamente. La tasa de clasificación correcta se evaluó mediante validación cruzada y se obtuvo un 100% (28 de 28). La **Figura III.11.** traza la relación entre $\log k'(\text{IAM})$ vs. TPSA, considerando la distribución de OSCs usando la permeación BBB como la variable de clasificación de agrupamiento. Allí, es posible observar dos grupos diferentes: compuestos organoazufrados que permean BBB (grupo 1) y compuestos organoazufrados que no permean BBB (grupo 0).

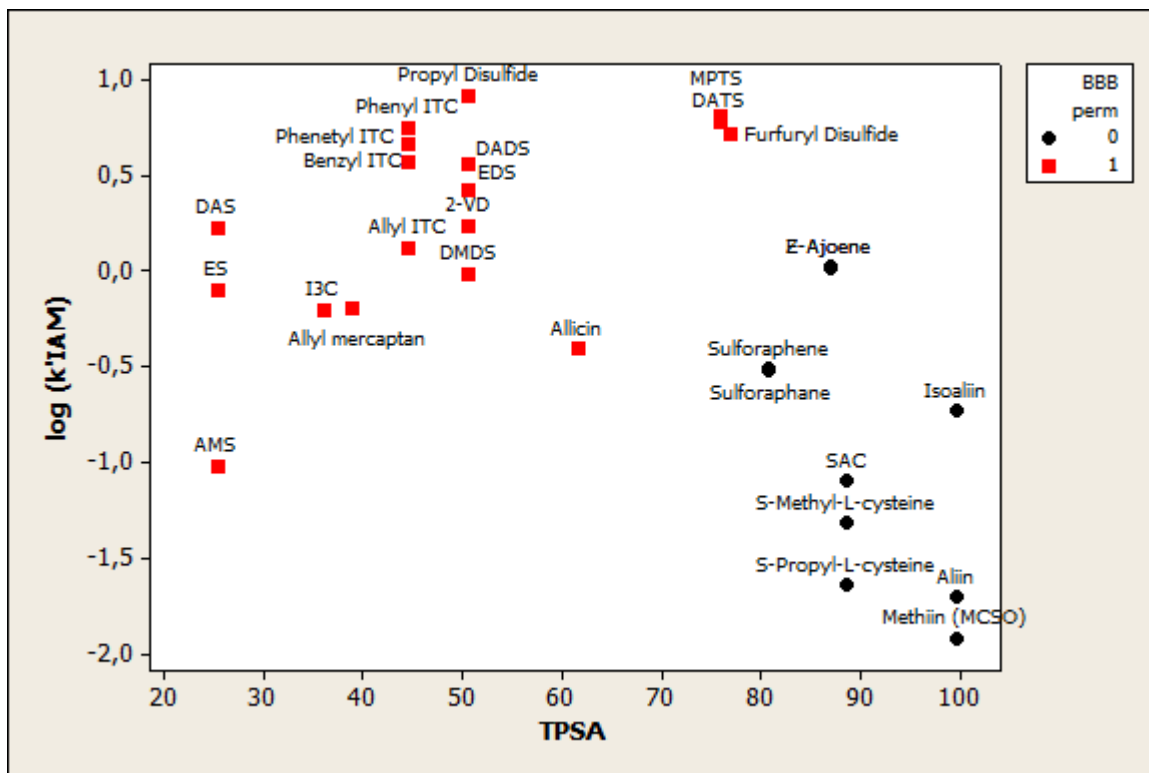


Figura III.11. Diagrama de dispersión que muestra la relación entre $\log k'(\text{IAM})$ vs. TPSA considerando la distribución de OSCs usando la permeación BBB como la variable de clasificación de agrupamiento. OSCs que permean BBB (grupo 1) y OSCs que no permean BBB (grupo 0).

El uso del parámetro $\log k'$ (IAM) fue necesario para obtener un modelo clasificatorio razonable, pero no fue suficiente para explicar completamente la permeación OSC-BBB. Por lo tanto, la combinación de $\log k'$ (IAM) y el área de superficie polar topológica (TPSA) produjo el mejor modelo clasificatorio OSC-BBB. El TPSA también se ha relacionado con modelos de permeación de BBB en varias investigaciones (Janicka, Sztanke, & Sztanke, 2020; J. M. Luco, 1999; J. Luco & Marchevsky, 2006) mostrando que el área de superficie polar es uno de los factores más importantes que determinan el paso de moléculas a través de BBB.

III.6.2.3. Evaluación de la capacidad de la fase IAM en la permeación en piel de los OSCs

Para estudiar la influencia de las estructuras químicas de los OSCs en la permeabilidad de la piel se llevó a cabo un análisis PLS. Para ello, se utilizaron varios valores calculados obtenidos de la herramienta web SwissADME, incluido $\log K_p$, un coeficiente de permeabilidad de la piel resultante de un modelo de relación cuantitativa estructura-propiedad construido por Potts y Guy, 1992 (Potts & Guy, 1992). Así como se procedió en las secciones anteriores, verificamos si nuestro conjunto de datos de OSC pertenecía al espacio de predicción de datos utilizado para construir valores de predicción de K_p en la herramienta web SwissADME. Estos resultados se muestran en la **Anexos, sección H**.

Como indicador de polaridad y tamaño, y dado que estas propiedades mostraron influencia en otros modelos *in-silico* de permeabilidad cutánea (Guth et al., 2014), también se consideró en este modelo como predictor el descriptor TPSA (Topological Polar Surface Area). Los otros descriptores que se utilizaron aquí fueron Tm_1 (descriptor WHIM) y TE1 (descriptor de carga), que resultaron de un análisis de regresión escalonada y el parámetro VIP (importancia de la variable en la proyección). La significancia estadística de los modelos QSAR-PLS se evaluó mediante la varianza de las matrices X e Y (R^2_X y R^2_Y), el coeficiente de correlación cuadrado (R^2), la desviación estándar (RMSS) y el estadístico F. La capacidad predictiva fue evaluada por el coeficiente de validación cruzada (Q). Se utilizó el conjunto completo de OSCs, resultando en dos componentes estadísticamente significativos (CPLS), cuyos parámetros se detallan en la **Tabla III.6**. Los Coeficientes de Regresión obtenidos se muestran en la **Tabla III.7**.

Tabla III.6. Parámetros estadísticos del modelo PLS resultantes de la permeabilidad cutánea $\log K_p$ de OSCs con fase IAM y parámetros físico-químicos.

Comp.	R2X(CUM)	R2Y(CUM)	Q ² (CUM)	RMSS	F statistical
CPLS-1	0.611	0.814	0.791	38.87	142.94
CPLS-2	0.902	0.920	0.897		

(R-Sq=0.9196) (Q=0.897)

Tabla III.7. Coeficientes de regresión PLS de la permeabilidad cutánea de OSCs

	log K_p (cm/s)	log K_p (cm/s) Estandarizada
Constante	-49,401	0,000
Log k' (IAM)	1,046	0,531
TPSA	-0,023	-0,349
TE1	-0,152	-0,293
Tm_1	0,112	0,237

Gráficamente, se puede observar en la **Figura III.12.** una alta concordancia entre los valores de permeabilidad cutánea de log K_p observados y los correspondientes calculados derivados del modelo PLS. También hubo una tendencia aproximadamente lineal de los residuales al observar la gráfica de probabilidad normal de dichos valores (**Figura III.13.**), lo que indica que los términos de error se distribuyeron normalmente, a excepción de la isoaliina (compuesto 2), que mostró más de 2 desviaciones estándar de la tendencia central del resto de OSCs.

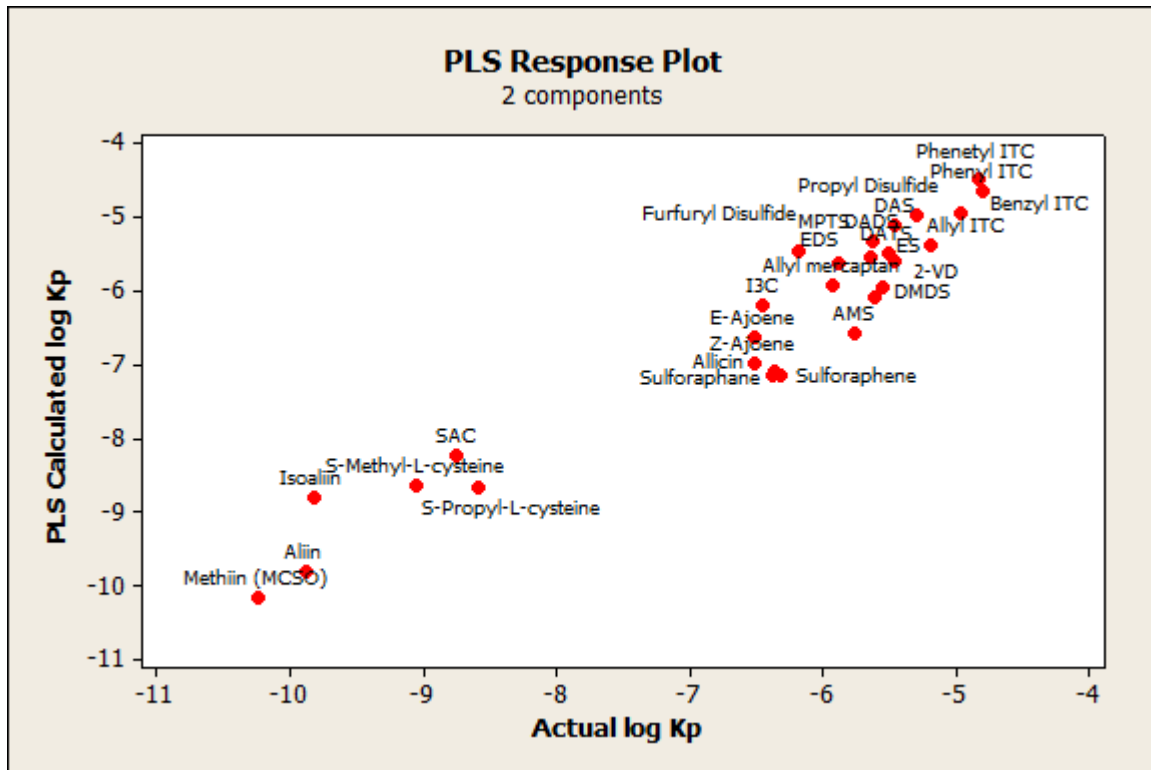


Figura III.12. Relación entre los valores de permeabilidad cutánea $\log K_p$ reales y calculados utilizando el enfoque PLS

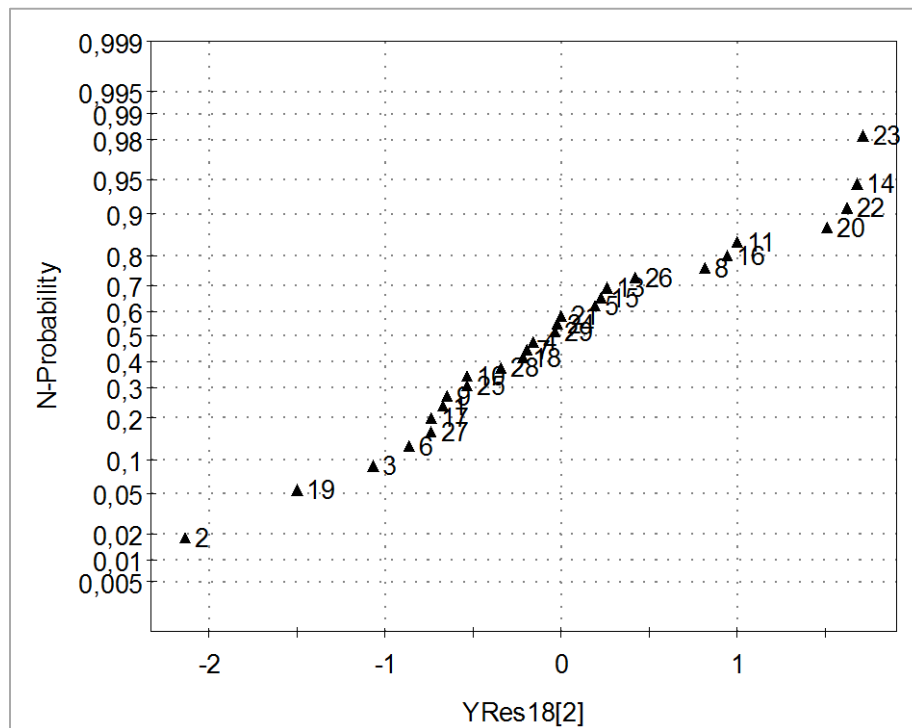


Figura III.13. Gráfico de N-probabilidad de los residuos del modelo PLS (K_p piel-IAM)

Como se encontró en los modelos anteriores aquí presentados, la lipofilicidad y las interacciones polares parecerían afectar la capacidad de penetración cutánea de los OSCs de interés, también de acuerdo con otros autores (Barbato, 2006). Pero cabe destacar que otras dos características moleculares parecen influir en el fenómeno de biopartición en la piel. Tm_1 (índice de tamaño total T / ponderado por masa) es un descriptor molecular invariante holístico ponderado WHIM, que explica el tamaño molecular 3D y la distribución de átomos (Todeschini y Gramatica, 1997), y TE1 es un descriptor electrónico topográfico. Estos descriptores, por lo tanto, muestran la influencia de la forma molecular, el tamaño y la carga en la permeabilidad de los OSCs a través de la piel.

Con el objetivo de profundizar en la discusión en relación con datos ADME sobre estos compuestos, se ha argumentado que la alicina, uno de los principales compuestos bioactivos relacionados con el ajo, puede penetrar fácilmente las membranas celulares de las bicapas de fosfolípidos, allí realiza su actividad intracelular e interactúa con el grupo -SH. A pesar de esta alta permeabilidad, la alicina se metaboliza rápidamente y se transforma en otros compuestos activos. Otros OSCs como SAC, dialil disulfuro y dialil trisulfuro también han mostrado una alta permeabilidad celular, aunque su razón de permeabilidad varía entre cada compuesto y tejido (Rahman, 2007). En otros reportes, se investigaron las propiedades farmacocinéticas de las vinilditiinas. La 1,3-vinilditiina parece ser menos lipofílica y se eliminó rápidamente del suero, los riñones y el tejido graso, mientras que la 1,2-vinilditiina es más lipofílica y mostró una tendencia a acumularse en el tejido graso (Egen-Schwind et al., 1992). Torres-Palazzolo et al., 2018 demostraron que la alicina, DAS y 2VD podrían penetrar menos del 5% a través del intestino. Algo que se ha discutido ampliamente es la rápida reacción de los OSCs con los componentes sanguíneos, dando lugar a diferentes metabolitos con posibles efectos bioactivos en el organismo (Lawson y Gardner, 2005). En resumen, algo a destacar de los modelos aquí construidos en relación a las diferentes capacidades de permeación de los OSCs en estudio, es la posibilidad de profundizar en los mecanismos moleculares que rigen estas propiedades y terminan afectando las variaciones en las tasas de permeación de los OSCs en diferentes tejidos. Pudimos observar la influencia de los factores hidrofóbicos que gobiernan el paso de los OSCs a través de la membrana, así como el alto efecto de descriptores moleculares simples como la capacidad de enlace de hidrógeno, el tamaño y la carga de las moléculas, particularmente considerando los parámetros relacionados con el área de la superficie polar, que afectan en gran medida el pasaje transmembrana de compuestos ionizables. Sin embargo, es necesario socavar en las propiedades ADME de los compuestos organoazufrados, por ejemplo, comparando nuestros resultados con modelos basados en células y tejidos para validar los modelos QSAR aquí propuestos para usos futuros.

III.7. CONCLUSIONES CAPÍTULO III

Se comenzó con el trabajo experimental cromatográfico, en donde se logró definir las variables instrumentales que permitieron alcanzar una adecuada sensibilidad y selectividad de los organoazufrados estudiados para su determinación empleando columnas de membranas inmobilizadas (IAM). En este punto, se lograron obtener los valores cromatográficos, factores de capacidad adecuados para la posterior construcción de los modelos QSRR y QSAR.

En una segunda etapa, se procedió con el trabajo *in silico*. Aquí, fue posible identificar, calcular y evaluar diferentes descriptores moleculares para caracterizar a los fitoquímicos organoazufrados. Se enfocó principalmente en descriptores de lipofilicidad, de carga, electrónicos y constitucionales para caracterizar a los OSCs bajo estudio.

Con la información obtenida, posteriormente, se construyeron modelos estadísticos multivariados en base a los descriptores moleculares calculados y a las respuestas de retención cromatográficas obtenidas experimentalmente. La lipofilicidad sola, no alcanzó para explicar acabadamente las interacciones IAM-OSCs. En un estudio QSRR más completo, se obtuvo que los mejores parámetros para describir la retención de los organoazufrados estudiados en la fase IAM son: el parámetro de lipofilicidad *i*LOGP, los parámetros electrónicos RNCG_1 y Electronegatividad de Mulliken, y el parámetro de Número de Enlaces Rotables. Estos dan idea de la influencia de los factores hidrofóbicos que gobiernan el paso de los OSCs a través de las membranas celulares, así como el efecto de descriptores moleculares simples como aquellos involucrados en la capacidad de formar enlaces puente hidrógeno, las interacciones donador-aceptor de pares de electrones, el tamaño y la carga de las moléculas.

Además, se logró estudiar la aplicabilidad de la cromatografía líquida con membranas artificiales inmobilizadas (IAM) para estimar diversos parámetros de la permeabilidad celular de compuestos organoazufrados. La relación HIA-IAM se modeló apropiadamente considerando una estimación no lineal, mientras que para los compuestos ionizables, particularmente, el área superficial polar mostró un mejor modelado de las interacciones entre dichos compuestos y HIA. Respecto a la permeabilidad en la barrera hematoencefálica un análisis discriminante lineal logró clasificar el total de compuestos organoazufrados; también en este caso el área superficial polar mostró incidir en las interacciones moduladoras del pasaje BBB explicado a través de la fase IAM, dando cuenta de la importancia de las interacciones polares en el pasaje transmembrana de los OSCs. Finalmente se estudió la permación en piel, y en este caso el modelo QSAR

resultante mostró la influencia de diversos parámetros como forma, el tamaño y la carga de las moléculas en la permeabilidad de los OSCs a través de la piel.

Podemos decir a grandes rasgos, que la permeabilidad de los organoazufrados estudiados dependería principalmente de sus factores hidrofóbicos, polares y de la importancia de las restricciones conformacionales en la partición OSC-IAM. En orden de razón de permeación podemos decir que en general los polisulfuros, serían los que por sus características estructurales presentarían mayor permeabilidad. Vemos en estos analitos características asociadas a una mayor lipofilicidad, y menor relación de área polar superficial. Mientras que los compuestos ionizables dada sus características de pKa, mayor polaridad, su capacidad donante de pares de electrones, y relación tamaño-carga, al igual que por su flexibilidad molecular, son los que presentarían menor permeabilidad celular.



CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES GENERALES



IV. CONCLUSIONES GENERALES

A la luz de los resultados obtenidos y en base a los objetivos planteados en el presente seminario de investigación se concluye:

- Que la funcionalidad de los alimentos puede explicarse a través de diferentes enfoques disciplinarios, como se presentó en la Introducción del presente manuscrito. Además para poder discutir de manera fehaciente acerca de los efectos biológicos que se asocian al consumo de dichos productos se requiere una secuencia de investigación que involucra inicialmente la determinación de los componentes que aportan los atributos de calidad y bioeficacia a estos alimentos o productos nutracéuticos.
- Que considerando al ajo y sus sub-productos como objetos de estudio, dada su importancia como fuente de compuestos bioactivos, se observó una abundante cantidad de reportes relacionados con la caracterización analítica de las matrices desde la perspectiva de medición de una familia particular de fitoquímicos (OSCs, flavonoides o inulina), considerados de manera individual y separados respecto a otros grupos de analitos. En el presente trabajo se logró un abordaje exhaustivo y novedoso para evaluar la calidad funcional de un alimento que integra en una metodología analítica la determinación de fitoquímicos de diferentes familias químicas.

Para lograr lo antes enunciado,

- Se adecuaron las condiciones operacionales para lograr la mejor resolución de los analitos bajo estudio. Sin la aparición de '*artifacts*' correspondientes a compuestos organoazufrados no representativos de las muestras, ni tampoco productos interferentes, y además se pudo sortear la dificultad de co-elución de los hidratos de carbono fructosa y glucosa entre sí, y entre los flavonoles.
- Se optimizó la etapa de preparación de muestra mediante diseño experimental de superficie de respuesta en la extracción por UAE, y así alcanzar una máxima respuesta (área) para todos los analitos.
- Se desarrolló un método analítico novedoso y eficiente para la determinación de los analitos bajo estudio, a través de la combinación de las técnicas de preparación de muestra y fraccionamiento desarrolladas en el presente trabajo junto con las técnicas cromatográficas ajustadas.
- Se aplicó el método analítico desarrollado obteniendo resultados robustos y confiables sobre distintos tipos de muestras. La extracción y determinación de OSCs, flavonoles e inulina es posible aún incluso en la presencia de matrices complejas y de diferente composición y estados.

- Se evaluó cómo las diferentes preparaciones a base de ajo se relacionaban con las propiedades funcionales reportadas. Esto permitió mostrar la utilidad del método propuesto para determinar el valor potencial total de los productos de ajo.

Esta propuesta de metodología analítica representa un mejor acercamiento a una adecuada caracterización del perfil de compuestos bioactivos de los alimentos, en los cuales las diferentes familias de fitoquímicos coexisten interactuando entre sí, generando efectos sinérgicos de diversa naturaleza. Además, se pudo demostrar que la metodología desarrollada es transferible y de posible aplicación en laboratorios tanto de investigación y desarrollo, como de control de calidad de alimentos funcionales y fitoquímicos. Lo anterior relacionado al hecho de que este método de análisis basado en la determinación de multi-fitoquímicos mostró ser una ventaja competitiva en términos de practicidad y eficiencia, y pudo aplicarse en diferentes matrices funcionales. Por último cabe destacar que los resultados de este trabajo fueron publicados en la Revista *Food Chemistry* en el año 2021, bajo el título “*Multi-phytochemical determination of polar and non-polar garlic bioactive compounds in different food and nutraceutical preparations*” (doi: 10.1016/j.foodchem.2020.127648).

En un segundo abordaje, y con la parsimonia de responder cuestionamientos relacionados con la biodisponibilidad de los compuestos en el organismo, se propuso el desarrollo y evaluación de modelos *in vitro-in silico* apoyados en fundamentos de la Química Medicinal y la Química Analítica. Aquí se concluyó:

~ Que la evidencia en relación a las propiedades funcionales de un alimento se sustenta en distintos tipos de ensayos, que van desde estudios *in vitro*, hasta modelos basados en animales de experimentación y estudios clínicos en humanos. No es novedad que las tendencias en estudios biológicos tratan de reducir el uso de material tejidos o células vivas. En este contexto surgió la inquietud de emplear las herramientas normalmente usadas en áreas como la farmacología o la toxicología para su aplicabilidad en el estudio de las respuestas biológicas de interés en el área de los alimentos saludables. En este sentido, el acercamiento a dilucidar los mecanismos que intervienen en la permeación de los fitoquímicos representa un paso crucial en el estudio de la biodisponibilidad y posterior bioeficacia de los compuestos bajo estudio.

Aquí, entonces, para lograr una primera aproximación de la biodisponibilidad de compuestos bioactivos del ajo:

- Se seleccionaron y evaluaron las variables instrumentales para alcanzar una adecuada sensibilidad y selectividad de los compuestos de interés (organoazufrados) mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) empleando columnas de membranas inmovilizadas (IAM).

- Se analizaron las respuestas cuantitativas de diferentes compuestos organoazufrados, para obtener valores cromatográficos característicos como el factor de capacidad (k') para su posterior uso en los modelos estadísticos multivariados.
- Se identificaron, calcularon y evaluaron diferentes parámetros moleculares (descriptores), más de 1800, en base a los principales compuestos bioactivos presentes en ajo para la construcción de modelos QSAR.
- Se realizó un análisis quimiométrico de los resultados mediante la construcción de modelos estadísticos QSRR en base a los descriptores moleculares calculados y las respuestas de retención cromatográficas obtenidas experimentalmente usando columnas IAM, y se pudo identificar cuáles características estructurales regían estas interacciones.
- Se estudió, además, la aplicabilidad de la fase IAM para estimar mediante modelos QSAR varios parámetros ADME, entre ellos la absorción intestinal humana (HIA), y la permeación a través de otras barreras biológicas como piel y barrera hematoencefálica. Mostrando en estos casos la incidencia de factores hidrofóbicos, polares y de la importancia de las restricciones conformacionales en el pasaje transmembrana de estos compuestos.

Si bien el empleo de la metodología QSAR para el estudio de fitoquímicos no es nueva, cobra valor su empleo a la hora de complementar estos modelos a datos experimentales obtenidos con columnas biomiméticas. Así, la aplicabilidad de los estudios QSAR como herramienta que aporta información para sustanciar la funcionalidad de alimentos representó una propuesta novedosa frente a las normalmente presentadas en bibliografía para este tipo de estudios.

Esta segunda parte del trabajo de tesis doctoral fue publicado en la revista *Frontiers in Chemistry*, el año de presentación de esta Tesis, 2021, bajo el título: “*Permeability Data of Organosulfur Garlic Compounds Estimated by Immobilized Artificial Membrane Chromatography: Correlation Across Several Biological Barriers*”, (doi: 10.3389/fchem.2021.690707).

A partir del conjunto de la información resultante de estas estrategias metodológicas se logra aportar información a cuestionamientos de larga data que están relacionados con la forma y cantidad apropiada de consumo de estas hortalizas y sus productos gastronómicos, o de las dosis efectivas de los productos nutraceuticos, para asegurar la bioeficacia de los fitoquímicos a largo plazo en la prevención de enfermedades crónicas. En este aspecto, vimos la utilidad de las técnicas aquí presentadas, así como también de los datos recabados a lo largo del desarrollo de esta Tesis, en el uso de los mismos para llevar a cabo el análisis de diversas matrices biológicas y de alimentos, y así avanzar en el estudio de la biodisponibilidad de compuestos bioactivos del ajo, que resultaron en trabajos colaborativos publicados respecto a la evaluación de la

bioaccesibilidad, permeabilidad *in vitro* y estabilidad en sangre de un set de OSCs (C. A. Torres-Palazzolo, Ramírez, Beretta, & Camargo, 2021; Torres Palazzolo et al., 2018). En conjunto estos estudios, complementados con la información surgida de esta Tesis, nos permiten decir cuáles serían los compuestos más interesantes a considerarse en relación a su contenido en las diferentes preparaciones de ajo y respecto a su compartamiento en el organismo una vez ingeridos. Podríamos sugerir a los polisulfuros como los fitoquímicos más llamativos, dadas sus importantes propiedades anticancerígenas, y sus características de estructura molecular, que colaboraría a favorecer su permeabilidad celular. Los extractos acuosos a base de ajo fresco han sido asociados mayormente a estos compuestos, pero en la presente investigación pudimos observar cantidades apreciables de DAS también en ajo cocido, lo que muestra otra alternativa de consumo para incorporar al organismo este grupo de fitoquímicos. Algo a destacar es que el resto de compuestos organoazufrados, si bien estructuralmente presentarían mayor dificultad para permear las membranas celulares, aún siguen siendo importantes candidatos bioactivos con potencial funcional, y podría mejorarse esta capacidad de permeación mediante reacciones químicas, o adoptando estrategias como la nanoencapsulación para facilitar su incorporación en el organismo. No debemos olvidar, que en los sistemas biológicos, los procesos implicados en la biodisponibilidad son más complejos que lo que se puede estudiar de manera *in vitro/in silico*, e involucran transformaciones químicas y metabolizaciones que sobrepasan el alcance de esta Tesis. Sin embargo, a futuro podría seguirse el estudio de algunas respuestas biológicas asociadas a estos procesos más complejos de la biodisponibilidad, abarcando además a otros compuestos bioactivos, para tener una idea más acabada de la funcionalidad real de los productos a base de ajo.

Finalmente, podemos concluir que los ensayos propuestos permitieron cumplir con los objetivos iniciales y corroborar la hipótesis planteada, que afirmaba *“El desarrollo de una adecuada caracterización de los fitoquímicos de interés y el empleo de modelos QSAR permite obtener información sobre la biodisponibilidad de dichos compuestos para ejercer los efectos biológicos que se les atribuyen.*



CAPÍTULO V

BIBLIOGRAFÍA



- Abourashed, E. a. (2013). Bioavailability of Plant-Derived Antioxidants. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 2(4), 309–25. <http://doi.org/10.3390/antiox2040309>
- Ackermann, R. T., Mulrow, C. D., Ramirez, G., Gardner, C. D., Morbidoni, L., & Lawrence, V. A. (2001). Garlic Shows Promise for Improving Some Cardiovascular Risk Factors. *Arch Intern Med*, 161, 813–824.
- Adefegha, S. A. (2018). Functional Foods and Nutraceuticals as Dietary Intervention in Chronic Diseases; Novel Perspectives for Health Promotion and Disease Prevention. *Journal of Dietary Supplements*, 15(6), 977–1009. <http://doi.org/10.1080/19390211.2017.1401573>
- Akan, S., & Yanmaz, R. (2017). Functional Food Properties of Garlic and Current Approaches. *International Congress on Medical and Aromatic Plants*, (May 2017), 122–127. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/338791920_FUNCTIONAL_FOOD_PROPERTIES_OF_GARLIC_AND_CURRENT_APPROACHES
- Akhter, S., Pauyo, T., & Khan, M. (2019). What Is the Difference Between a Systematic Review and a Meta-analysis? In *Basic Methods Handbook for Clinical Orthopaedic Research* (pp. 331–342). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. http://doi.org/10.1007/978-3-662-58254-1_37
- Ali, M., Khanafer, R. M. A., & Mustafa, T. (2000). Effect of allicin from garlic powder on serum lipids and blood pressure in rats fed with a high cholesterol diet. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 62(4), 253–259. <http://doi.org/10.1054/plef.2000.0152>
- Aliasgharzadeh, A., Khalili, M., Mirtaheri, E., & Gargari, B. P. (2015). A Combination of Prebiotic Inulin and Oligofructose Improve Some of Cardiovascular Disease Risk Factors in Women with Type 2 Diabetes : A Randomized Controlled Clinical Trial. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 5(4), 507–514. <http://doi.org/10.15171/apb.2015.069>
- Alminger, M., Aura, a. M., Bohn, T., Dufour, C., El, S. N., Gomes, A., ... Santos, C. N. (2014). In vitro models for studying secondary plant metabolite digestion and bioaccessibility. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 413–436. <http://doi.org/10.1111/1541-4337.12081>
- Altemimi, A., Lakhssassi, N., Baharlouei, A., Watson, D., & Lightfoot, D. (2017). Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts. *Plants*, 6(4), 42. <http://doi.org/10.3390/plants6040042>
- Álvarez-Borroto, R., Ruano-Nieto, A. L., Calle-Miñaca, M. R., & Lara-Fiallos, M. V. (2015). Extracción y determinación de inulina del ajo común autóctono (*Allium sativum*) Extraction and determination of inulin from common autochthonous garlic (*Allium sativum*) Resumen Introducción Inulina es el nombre genérico que designa a una familia de glú. *Revista Cubana de Química*, 27(2), 131–146.
- Alvírez, A., & Gonzalez, B. (2002). Tendencias en la producción de alimentos: alimentos funcionales. *Salud Pública Y Nutrición*, 3(3).
- Amagase, H. (2006). Significance of Garlic and Its Constituents in Cancer and Cardiovascular Disease Clarifying the Real Bioactive Constituents of Garlic 1. *Journal of Nutrition*, 136(2), 716–725.
- Amagase, H., Petesch, B. L., Matsuura, H., Kasuga, S., & Itakura, Y. (2001). Recent advances on the nutritional effects associated with the use of garlic as a supplement intake of garlic and its bioactive components. *The Journal of Nutrition*, 131, 955–962.
- Amarakoon, S., & Jayasekara, D. (2017). A review on garlic (*Allium sativum* L.) as a functional food. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(6), 1777–1780.
- Arnault, I., Christides, J., Mandon, N., Haffner, T., Kahane, R., & Auger, J. (2003). High-performance ion-pair chromatography method for simultaneous analysis of alliin , deoxyalliin , allicin and dipeptide precursors in garlic products using multiple mass spectrometry and. *Journal of Chromatography A*, 991, 69–75.
- Artursson, P., & Bergstrom, C. A. S. (2003). Intestinal Absorption: the Role of Polar Surface Area. In D. H. van de Waterbeemd, P. D. H. Lennernäs, & P. D. P. Artursson (Eds.), *Drug Bioavailability: Estimation of Solubility, Permeability, Absorption and Bioavailability* (pp. 339–357). WILEY-VCH.
- Aruoma, O. I., Spencer, J. P. E., Warren, D., Jenner, P., Butler, J., & Halliwell, B. (1997). Characterization of food antioxidants, illustrated using commercial garlic and ginger preparations. *Food Chemistry*, 60(2),

- 149–156. [http://doi.org/10.1016/S0308-8146\(95\)00254-5](http://doi.org/10.1016/S0308-8146(95)00254-5)
- Atkin, M., Laight, D., & Cummings, M. H. (2016). The effects of garlic extract upon endothelial function, vascular inflammation, oxidative stress and insulin resistance in adults with type 2 diabetes at high cardiovascular risk. A pilot double blind randomized placebo controlled trial. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 30(4), 723–727. <http://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2016.01.003>
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., ... Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426–436. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- Azzini, E., Durazzo, A., Foddai, M. S., Temperini, O., Venneria, E., Valentini, S., & Maiani, G. (2014). Phytochemicals Content in Italian Garlic Bulb (*Allium sativum* L.) Varieties. *Journal of Food Research*, 3(4), 26–32. <http://doi.org/10.5539/jfr.v3n4p26>
- Banerjee, S. K., & Maulik, S. K. (2002). Effect of garlic on cardiovascular disorders : a review. *Nutrition Journal*, 14, 1–14.
- Barbato, F. (2006). The Use of Immobilised Artificial Membrane (IAM) Chromatography for Determination of Lipophilicity. *Current Computer Aided-Drug Design*, 2(4), 341–352. <http://doi.org/10.2174/157340906778992319>
- Barbato, F., Cappello, B., Miro, A., La Rotonda, M. I., & Quaglia, F. (1998). Chromatographic indexes on immobilized artificial membranes for the prediction of transdermal transport of drugs. *Farmaco*, 53(10–11), 655–661. [http://doi.org/10.1016/S0014-827X\(98\)00082-2](http://doi.org/10.1016/S0014-827X(98)00082-2)
- Bayan, L., Koulivand, P. H., & Gorji, A. (2014). Garlic : a review of potential therapeutic effects. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 4(1), 1–14.
- Beato, V. M., Orgaz, F., Mansilla, F., & Montañó, A. (2011). Changes in Phenolic Compounds in Garlic (*Allium sativum* L.) Owing to the Cultivar and Location of Growth. *Plant Foods for Human Nutrition*, 66(3), 218–223. <http://doi.org/10.1007/s11130-011-0236-2>
- Benkeblia, N., & Lanzotti, V. (2007). Allium Thiosulfinates: Chemistry, Biological Properties and their Potential Utilization in Food Preservation. *Global Science Books*, 2(1), 193–201.
- Bernal, J., Mendiola, J. A., Ibáñez, E., & Cifuentes, A. (2011). Advanced analysis of nutraceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 55(4), 758–774. <http://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.11.033>
- Beshbishy, A., Wasef, L., Elewa, Y., Al-Sagan, A., Abd El-Hack, M., Taha, A., & Abd-Elhakim, Y. (2020). Chemical Constituents and Pharmacological Activities of Garlic (*Allium sativum* L.): A Review. *Nutrients*, 12(3), 872. Retrieved from <http://search.proquest.com/docview/2420177570/>
- Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., & Escaleira, L. A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5), 965–77. <http://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.019>
- Biniecka, M., & Caroli, S. (2011). Analytical methods for the quantification of volatile aromatic compounds. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30(11), 1756–1770. <http://doi.org/10.1016/j.trac.2011.06.015>
- Block, E. (1985). The chemistry of garlic and onions. *Scientific American*, 252, 114–119.
- Block, E., Ahmad, S., Catalfamo, J. L., Jain, M. K., & Apitz-castrozd, R. (1986). Antithrombotic Organosulfur Compounds from Garlic: Structural, Mechanistic, and Synthetic Studies. *Journal of American Chemical Society*, 2(6), 7045–7055.
- Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., Goran, A., & Igic, R. (2008). Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae). *Food Chemistry*, 111(4), 925–929. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.04.071>
- Brace, L. D. (2002). Cardiovascular Benefits of Garlic (*Allium sativum* L.). *J Cardiovasc Nurs*, 16(4), 33–49.
- Buszewski, B., & Noga, S. (2012). Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-a powerful separation technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402(1), 231–247. <http://doi.org/10.1007/s00216-011-5308-5>
- Buszewski, B., Žuvela, P., Sagandykova, G., Walczak-Skierska, J., Pomastowski, P., David, J., & Wong, M. W. (2020). Mechanistic Chromatographic Column Characterization for the Analysis of Flavonoids Using Quantitative Structure-Retention Relationships Based on Density Functional Theory. *International*

- Journal of Molecular Sciences*, 21(6), 2053. <http://doi.org/10.3390/ijms21062053>
- Cajamarca, M. (2015). *Aplicación de métodos QSAR y quimiométricos para determinar la relación estructura - actividad de pesticidas en mamíferos (rata)*. Universidad Politécnica Salesiana.
- Camargo, A. B. (2007). *Evaluación de diversos aspectos de la bioactividad de los compuestos organoazufrados presentes en Allium sativum L. Estudios de la relación actividad-estructura cuantitativa (QSAR) utilizando diversas metodologías quimiométricas*. Universidad Nacional de San Luis.
- Capasso, A. (2013). Antioxidant action and therapeutic efficacy of *Allium sativum L.* *Molecules*, 18(1), 690–700. <http://doi.org/10.3390/molecules18010690>
- Cardelle-Cobas, A., Costo, R., Corzo, N., & Villamiel, M. (2009). Fructo-oligosaccharide changes during the storage of dehydrated commercial garlic and onion samples. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(5), 947–952. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2008.01752.x>
- Causey, J., Feirtag, J., Gallaher, D., Tunland, B., & Slavin, J. (2000). EFFECTS OF DIETARY INULIN ON SERUM LIPIDS, BLOOD GLUCOSE AND THE GASTROINTESTINAL ENVIRONMENT IN HYPERCHOLESTEROLEMIC MEN. *Nutrition Research*, 20(2), 191–201.
- Cavaliere, C., Capriotti, A. L., La Barbera, G., Montone, C. M., Piovesana, S., & Laganà, A. (2018). Liquid chromatographic strategies for separation of bioactive compounds in food matrices. *Molecules*, 23(12). <http://doi.org/10.3390/molecules23123091>
- Chandrashekar, P. M., Prashanth, K. V. H., & Venkatesh, Y. P. (2011). Isolation, structural elucidation and immunomodulatory activity of fructans from aged garlic extract. *Phytochemistry*, 72(2–3), 255–64. <http://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.11.015>
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S., & Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540–560. <http://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>
- Choi, I. S., Cha, H. S., & Lee, Y. S. (2014). Physicochemical and Antioxidant Properties of Black Garlic. *Molecules*, 19, 16811–16823. <http://doi.org/10.3390/molecules191016811>
- Cieśla, Ł., & Moaddel, R. (2016). Comparison of analytical techniques for the identification of bioactive compounds from natural products. *Natural Product Reports*, 33(10), 1131–1145. <http://doi.org/10.1039/c6np00016a>
- Corzo-Martinez, M., Corzo, N., & Villamiel, M. (2007). Biological properties of onions and garlic. *Trends in Food Science & Technology*, 18(12), 609–625. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.07.011>
- Cuicui, G., Xiaoyan, J., Haina, W., Zhongxi, Z., & Weihong, W. (2013). Drug Metabolism and Pharmacokinetics of Organosulfur Compounds from Garlic. *Journal of Drug Metabolism & Toxicology*, 4(5), 1–10. <http://doi.org/10.4172/2157-7609.1000159>
- Dahlgren, D., & Lennernäs, H. (2019). Intestinal permeability and drug absorption: predictive experimental, computational and in vivo approaches. *Pharmaceutics*, 11(8). <http://doi.org/10.3390/pharmaceutics11080411>
- Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2014). iLOGP: A Simple, Robust, and Efficient Description of n - Octanol/Water Partition Coefficient for Drug Design Using the GB/SA Approach. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 54(12), 3284–3301. <http://doi.org/10.1021/ci500467k>
- Daina, A., & Zoete, V. (2016). A BOILED-Egg To Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules. *ChemMedChem*, 1117–1121. <http://doi.org/10.1002/cmdc.201600182>
- de Diego, M., Avello, M., Mennickent, S., Fernández, M., & Fernández, P. (2007). Validated liquid chromatographic method for quantitative determination of allicin in garlic powder and tablets. *Journal of Separation Science*, 30(16), 2703–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17763522>
- de Queiroz, Y. S., Antunes, P. B., Vicente, S. J. V., Sampaio, G. R., Shibao, J., Bastos, D. H. M., & Torres, E. A. F. da S. (2014). Bioactive compounds, in vitro antioxidant capacity and Maillard reaction products of raw, boiled and fried garlic (*Allium sativum L.*). *International Journal of Food Science & Technology*, 49(5), 1308–1314. <http://doi.org/10.1111/ijfs.12428>
- Durak, I., Kavutcu, M., Aytaç, B., Avci, A., Devrim, E., Özbek, H., & Öztürk, H. S. (2004). Effects of garlic extract

- consumption on blood lipid and oxidant/antioxidant parameters in humans with high blood cholesterol. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 15(6), 373–377. <http://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2004.01.005>
- Egen-Schwind, C., Eckard, R., & Kempfer, F. (1992). Metabolism of garlic constituents in the isolated perfused rat liver. *Planta Medica*, 58(4), 301–305.
- El-Kattan, A., & Varma, M. (2016). Oral Absorption, Intestinal Metabolism and Human Oral Bioavailability. *Intech, i(tourism)*, 13. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/57353>
- Ermondi, G., Vallaro, M., & Caron, G. (2018a). Learning how to use IAM chromatography for predicting permeability. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 114(January), 385–390. <http://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.01.001>
- Ermondi, G., Vallaro, M., & Caron, G. (2018b). Learning how to use IAM chromatography for predicting permeability. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 114(January), 385–390. <http://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.01.001>
- Escuder-Gilabert, L., Martínez-Pla, J. J., Sagrado, S., Villanueva-Camañas, R. M., & Medina-Hernández, M. J. (2003). Biopartitioning micellar separation methods: Modelling drug absorption. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 797(1–2), 21–35. [http://doi.org/10.1016/S1570-0232\(03\)00606-8](http://doi.org/10.1016/S1570-0232(03)00606-8)
- Espinosa-Martos, I. (2006). Note. Low Molecular Weight Carbohydrates in Foods Usually Consumed in Spain. *Food Science and Technology International*, 12(2), 171–175. <http://doi.org/10.1177/1082013206063838>
- Fernández-García, E., Carvajal-Lérida, I., & Pérez-Gálvez, A. (2009). In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutrition Research (New York, N.Y.)*, 29(11), 751–60. <http://doi.org/10.1016/j.nutres.2009.09.016>
- Fernandez, C. (2020). *ESTIMACIÓN DE VOLÚMENES Y CALIBRES DE AJO Temporada 2019/2020*. Mendoza, Argentina.
- Fotiadis, C. I., Stoidis, C. N., & Spyropoulos, B. G. (2008). Role of probiotics , prebiotics and synbiotics in chemoprevention for colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 14(42), 6453–6457. <http://doi.org/10.3748/wjg.14.6453>
- Freeman, F., & Kodera, Y. (1995). Garlic chemistry: stability of S-(2-propenyl) 2-propene-1-sulfinothioate (Allicin) in blood, solvents, and simulated physiological fluids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(9), 2332–2338.
- Gao, C., Wang, H., & Jiang, X. (2013). Drug Metabolism and Pharmacokinetics of Organosulfur Compounds from Garlic. *Journal of Drug Metabolism & Toxicology*, 4(5). <http://doi.org/10.4172/2157-7609.1000159>
- Gilabert, L. E. (2005). *Estimación de la hidrofobicidad de compuestos orgánicos mediante cromatografía líquida micelar . Implicaciones en los procesos biológicos de reparto*.
- Gómez, L. J., & Sánchez-Muniz, F. J. (2000). Revisión : Efectos cardiovasculares del ajo (*Allium sativum*). *ALAN Online*, 50(3).
- González, R. E., Camargo, A. B., & Burba, J. L. (2007). Obtención de un estándar secundario de cuantificación para la síntesis y purificación de allicina . Obtention of a quantitative secondary standard for allicin synthesis and purification . *Revista de La Facultad de Ciencias Agrarias*, 39(5567), 61–70.
- Gorinstein, S., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Drzewiecki, J., Najman, K., Katrich, E., ... Trakhtenberg, S. (2006). Raw and boiled garlic enhances plasma antioxidant activity and improves plasma lipid metabolism in cholesterol-fed rats. *Life Sciences*, 78(6), 655–663. <http://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.05.069>
- Gorinstein, S., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Namiesnik, J., Najman, K., Rzewiecki, J. D., ... Trakhtenberg, S. (2008). Comparison of the Main Bioactive Compounds and Antioxidant Activities in Garlic and White and Red Onions after Treatment Protocols. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56, 4418–4426.
- Goya-Jorge, E., Julián-Ortiz, J. de, & Gozalbes, R. (2020). Revisión de los modelos computacionales que relacionan la estructura química con la disrupción del sistema endocrino. *Revista de Toxicología*, 37(1), 55–68.
- Gozalbes, R., Jacewicz, M., Annand, R., Tsaion, K., & Pineda-Lucena, A. (2011). QSAR-based permeability model for drug-like compounds. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 19(8), 2615–2624.

- <http://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.03.011>
- Grumetto, L., Russo, G., & Barbato, F. (2015a). Relationships between human intestinal absorption and polar interactions drug/phospholipids estimated by IAM-HPLC. *International Journal of Pharmaceutics*, 489(1–2), 186–194. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.04.062>
- Grumetto, L., Russo, G., & Barbato, F. (2015b). Relationships between human intestinal absorption and polar interactions drug/phospholipids estimated by IAM-HPLC. *International Journal of Pharmaceutics*, 489(1–2), 186–194. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.04.062>
- Guercio, V., Galeone, C., Turati, F., & La Vecchia, C. (2014). Gastric cancer and allium vegetable intake: a critical review of the experimental and epidemiologic evidence. *Nutrition and Cancer*, 66(5), 757–73.
- Guevara-Figueroa, T., López-Hernández, L., Lopez, M. G., Dufoo Hurtado, M. D., Vázquez-Barríos, M. E., Guevara-Olvera, L., ... Mercado-Silva, E. M. (2015). Conditioning garlic “seed” cloves at low temperature modifies plant growth, sugar, fructan content, and sucrose sucrose fructosyl transferase (1-SST) expression. *Scientia Horticulturae*, 189, 150–158. <http://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.03.030>
- Häkkinen, S. H., Kärenlampi, S. O., Heinonen, I. M., Mykkänen, H. M., & Törrönen, A. R. (1999). Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(6), 2274–2279. <http://doi.org/10.1021/jf9811065>
- Hansch, C. (1969). Quantitative approach to biochemical structure-activity relationships. *Accounts of Chemical Research*, 2(8), 232–239. <http://doi.org/10.1021/ar50020a002>
- Harmita Hayun, L. N. (2011). Validation of Analytical Method of Inulin in Multivitamin syrup by High Performance Liquid Chromatography with Refractive Index Detection. *Jurnal Bahan Alam Indonesia*, 7(7), 347–350.
- Iberl, B., Winkler, G., & Knobloch, K. (1990). Products of Allicin Transformation: Ajoenes and Dithiins, Characterization and their Determination by HPLC. *Planta Medica*, 2, 202–211.
- Ilić, D., Nikolić, V., Stanković, M., Nikolić, L., Stanojević, L., Mladenović-Ranisavljević, I., & Smelcerović, A. (2012). Transformation of synthetic allicin: the influence of ultrasound, microwaves, different solvents and temperatures, and the products isolation. *The Scientific World Journal*, 2012, 1–7. <http://doi.org/10.1100/2012/561823>
- Iranshahi, M. (2013). A review of volatile sulfur-containing compounds from terrestrial plants : biosynthesis , distribution and analytical methods. *Journal Essential Oil Research*, 24(4), 393–434.
- Ivanović, M., Razboršek, M. I., & Kolar, M. (2020). Innovative extraction techniques using deep eutectic solvents and analytical methods for the isolation and characterization of natural bioactive compounds from plant material. *Plants*, 9(11), 1–29. <http://doi.org/10.3390/plants9111428>
- Janicka, M., Sztanke, M., & Sztanke, K. (2020). Predicting the blood-brain barrier permeability of new drug-like compounds via HPLC with various stationary phases. *Molecules*, 25(3). <http://doi.org/10.3390/molecules25030487>
- Jastrzebski, Z., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Namiesnik, J., Zachwieja, Z., Barton, H., ... Gorinstein, S. (2007). The bioactivity of processed garlic (*Allium sativum* L.) as shown in vitro and in vivo studies on rats. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 45(9), 1626–33. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2007.02.028>
- Jofré, V. P., Assof, M. V., Fanzone, M. L., Goicoechea, H. C., Martínez, L. D., & Silva, M. F. (2010). Optimization of ultrasound assisted-emulsification-dispersive liquid-liquid microextraction by experimental design methodologies for the determination of sulfur compounds in wines by gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 683(1), 126–35. <http://doi.org/10.1016/j.aca.2010.10.010>
- Julian-Ortiz, J., Zanni, R., Galvez-Llompart, M., & Garcia-Domenech, R. (2014). The Prediction of Human Intestinal Absorption Based on the Molecular Structure. *Current Drug Metabolism*, 15(4), 380–388. <http://doi.org/10.2174/1389200215666140605125412>
- Júnior, F. J. B. M., Oliveira, T. B., Ishiki, H. M., Quintans-Júnior, L. J., Duarte, M. C., Scotti, M. T., ... Ribeiro, F. F. (2017). *Computer-Aided Drug Design Studies in Food Chemistry. Natural and Artificial Flavoring Agents and Food Dyes*. Elsevier Inc. <http://doi.org/10.1016/b978-0-12-811518-3.00009-0>
- Kaliyaperumal, A., Kumarakurubaran, S., & Devi K. M., S. (2013). Reverse phase-high performance liquid

- chromatography-diode array detector (RP-HPLC-DAD) analysis of flavonoids profile from curry leaf (*Murraya koenigii* L.). *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(47), 3393-3399, 7 . <http://doi.org/10.5897/JMPR2013.5150>
- Kar, S., Roy, K., & Leszczynski, J. (2018). Applicability Domain: A Step Toward Confident Predictions and Decidability for QSAR Modeling. In O. Nicolotti (Ed.), *Computational Toxicology: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* (Vol. 1800, pp. 287–311). Springer Science+Business Media, LLC. <http://doi.org/10.1007/978-1-4939-7899-1>
- Karkacier, M., Erbas, M., Uslu, M. K., & Aksu, M. (2003). Comparison of different extraction and detection methods for sugars using amino-bonded phase HPLC. *Journal of Chromatographic Science*, 41(July), 331–333. http://doi.org/NO_DOI
- Kaschula, C. H., Hunter, R., & Iqbal Parker, M. (2010). Garlic-derived anticancer agents: Structure and biological activity of ajoene. *BioFactors*, 36(1), 78–85. <http://doi.org/10.1002/biof.76>
- Kataoka, H., Lord, H. L., & Pawliszyn, J. (2000). Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 880, 35–62.
- Khan, M. S., Qureshi, N. A., Jabeen, F., & Shakeel, M. (2016). Analysis of minerals profile, phenolic compounds and potential of Garlic (*Allium sativum*) as antioxidant scavenging the free radicals. *International Journal of Biosciences (IJB)*, 8(4), 72–82. <http://doi.org/10.12692/ijb/8.4.72-82>
- Khoddami, A., Wilkes, M. A., & Roberts, T. H. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, 18(2), 2328–2375. <http://doi.org/10.3390/molecules18022328>
- Khoo, Y. S. K., & Aziz, Z. (2009). Garlic supplementation and serum cholesterol : a meta-analysis. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 34, 133–145. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2710.2008.00998.x>
- Kimura, S., Tung, Y., Pan, M., & Su, N. (2016). Black garlic : A critical review of its production, bioactivity, and application. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(1), 62–70. <http://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.11.003>
- Kladt, C., Dennerlein, K., Göen, T., Drexler, H., & Korinth, G. (2018). Evaluation on the reliability of the permeability coefficient (Kp) to assess the percutaneous penetration property of chemicals on the basis of Flynn's dataset. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 91(4), 467–477. <http://doi.org/10.1007/s00420-018-1296-5>
- Kocabas, A. (2017). Ease of Phytochemical Extraction and Analysis from Plants ? Bitkilerden Fitokimyasal Özütlemenin ve Analizinin Kolaylığı ?, 1(2), 26–31.
- Koseoglu, M., Isleten, F., Atay, A., & Kaplan, Y. C. (2009). Effects of Acute and Subacute Garlic Supplement Administration on Serum Total Antioxidant Capacity and Lipid Parameters in Healthy Volunteers. *Phytotherapy Research*, 1213(December 2007), 1205–1213. <http://doi.org/10.1002/ptr>
- Kubec, R., & Dadáková, E. (2009). Chromatographic methods for determination of S-substituted cysteine derivatives. *Journal of Chromatography A*, 41, 6957–6963.
- Kumar, N., Bhandari, P., Singh, B., Gupta, A. P., & Kaul, V. K. (2008). Reversed phase-HPLC for rapid determination of polyphenols in flowers of rose species. *Journal of Separation Science*, 31(2), 262–267. <http://doi.org/10.1002/jssc.200700372>
- Kumar, S., & Krishnan, V. (2017). Phytochemistry and Functional Food: The Needs of Healthy Life. *Journal of Phytochemistry & Biochemistry*, 1(December), 1. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/321805692>
- Kwicien, I., Iciek, M., & Wlodek, L. (2009). Review Article Biological Properties of Garlic and Garlic-Derived Organosulfur Compounds. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 50(December 2008), 247–265. <http://doi.org/10.1002/em>
- Lancaster, J. E., & Collin, H. A. (1981). Presence of alliinase in isolated vacuoles and of alkyl cysteine sulphoxides in the cytoplasm of bulbs of onion (*Allium cepa*). *Plant Science Letters*, 22(2), 169–176.
- Lanzotti, V. (2006). The analysis of onion and garlic. *Journal of Chromatography. A*, 1112(1–2), 3–22. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16388813>
- Lasić, K., Bokulić, A., Milić, A., Nigović, B., & Mornar, A. (2019). Lipophilicity and bio-mimetic properties determination of phytoestrogens using ultra-high-performance liquid chromatography. *Biomedical Chromatography*, e4551. <http://doi.org/10.1002/bmc.4551>

- Lattanzio, V. (2013). Phenolic Compounds: Introduction. In *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes* (pp. 1–4242). Springer. <http://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6>
- Lawson, L. D. (1992). Characterization of the formation of allicin and other thiosulfinates from garlic. *Planta Medica*, *58*, 345–350.
- Lawson, L. D. (1993). Bioactive Organosulfur Compounds of Garlic. In A. D. Kinghorn & M. F. Balandrin (Eds.), *In human medicinal agents from plants* (Vol. 1960, pp. 306–330). Washington, DC.: American Chemical Society.
- Lawson, L. D., & Gardner, C. (2005). Composition, Stability, and Bioavailability of Garlic Products Used in a Clinical Trial. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*, 6254–6261.
- Lemańska, K., Van Der Woude, H., Szymusiak, H., Boersma, M. G., Gliszczynska-Swigło, A., Rietjens, I. M. C. M., & Tyrakowska, B. (2004). The effect of catechol O-methylation on radical scavenging characteristics of quercetin and luteolin - A mechanistic insight. *Free Radical Research*, *38*(6), 639–647. <http://doi.org/10.1080/10715760410001694062>
- Lemmens, L., Van Buggenhout, S., Van Loey, A. M., & Hendrickx, M. E. (2010). Particle size reduction leading to cell wall rupture is more important for the β -carotene bioaccessibility of raw compared to thermally processed carrots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(24), 12769–12776. <http://doi.org/10.1021/jf102554h>
- Leszczynski, J. (2010). *Recent Advances in QSAR Studies: Methods and Applications*. (Tomasz Puzyn, J. Leszczynski, & M. Cronin, Eds.) (Vol. 8. CH). Springer.
- Li, J. J., Holsworth, D. D., & Hu, L. Y. (2003). Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *Chemtracts*, *16*(7), 439–442.
- Li, Y., & Paxton, J. W. (2010). Oral Bioavailability and Disposition of Phytochemicals. In I. Rasooli (Ed.), *Phytochemicals – Bioactivities and Impact on Health*. INTECH.
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (1997). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *23*(1–3), 3–25. [http://doi.org/10.1016/S0169-409X\(96\)00423-1](http://doi.org/10.1016/S0169-409X(96)00423-1)
- Lisciani, S., Gambelli, L., Durazzo, A., Marconi, S., Camilli, E., Rossetti, C., ... Marletta, L. (2017). Carbohydrates Components of Some Italian Local Landraces: Garlic (*Allium sativum* L.). *Sustainability*, *9*(10), 1922. <http://doi.org/10.3390/su9101922>
- Liu, F., Prabhakar, M., Ju, J., Long, H., & Zhou, H. (2016). Effect of inulin-type fructans on blood lipid profile and glucose level: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *European Journal of Clinical Nutrition*, (July), 1–12. <http://doi.org/10.1038/ejcn.2016.156>
- Locatelli, D. A., Nazareno, M. A., Fusari, C. M., & Camargo, A. B. (2017). Cooked garlic and antioxidant activity: Correlation with organosulfur compound composition. *Food Chemistry*, *220*, 219–224. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.001>
- Locatelli, D., Altamirano, J., González, R., & Camargo, A. (2015). Home-cooked garlic remains a healthy food. *Journal of Functional Foods*, *16*, 1–8. Retrieved from <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1756464615001851>
- Locatelli, D., Altamirano, J., Luco, J., Norlin, R., & Camargo, A. (2014). Solid phase microextraction coupled to liquid chromatography. Analysis of organosulphur compounds avoiding artifacts formation. *Food Chemistry*, *157*, 199–204.
- López, A. M., Lanzavechia, S., Portela, J., Ciotti, L., & Gei, C. (2019). *XVI CURSO TALLER SOBRE PRODUCCIÓN, COMERCIALIZACIÓN E INDUSTRIALIZACIÓN DE AJO - INTA*. (I. E. C. de Trabajo, Ed.). Mar del Plata.
- López Hernandez, J., González-Castro, M. J., Naya Alba, I., & de la Cruz García, C. (1998). High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Mono- and Oligosaccharides in Vegetables with Evaporative Light-Scattering Detection and Refractive Index Detection. *Journal of Chromatographic Science*, *36*(June), 293–298.
- Loyo Ruíz, J. A., Cruz Ramírez, M., & Arciga Pedraza, R. (2020). Extracción y comparación de fructanos en ajos y cebollas. *Revista Nthe*, (Octubre), 74–81. Retrieved from

- http://nthe.mx/NTHE_v2/pdfArticulos/PDF_Articulo20201119173436.pdf
- Lozano-Aponte, J., & Scior, T. (2012). ¿Qué sabe Ud. acerca de...QSAR? *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 43(2), 82–84.
- Luco, J. M. (1999). Prediction of the Brain - Blood Distribution of a Large Set of Drugs from Structurally Derived Descriptors Using Partial Least-Squares (PLS) Modeling †, 396–404.
- Luco, J. M., Salinas, A. P., Torriero, A. A. J., Va, R. N., Raba, J., & Marchevsky, E. (2003). Immobilized Artificial Membrane Chromatography : Quantitative Structure-Retention Relationships of Structurally Diverse Drugs, 2129–2136.
- Luco, J., & Marchevsky, E. (2006). QSAR Studies on Blood-Brain Barrier Permeation. *Current Computer Aided-Drug Design*, 2(1), 31–55. <http://doi.org/10.2174/157340906776056437>
- Lutz, M. (2013). Biodisponibilidad de compuestos bioactivos en alimentos. *Perspectivas En Nutrición Humana*, 15(2), 217–226.
- Madrigal, L., & Sangronis, E. (2007). La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 57(2), 387–396.
- Mardomi, R. (2017). Determining the Chemical Compositions of Garlic Plant and its Existing Active Element. *IOSR Journal of Applied Chemistry*, 10(1), 63–66. <http://doi.org/10.9790/5736-1001016366>
- Márquez Fernández, P. M., & Márquez Fernández, D. M. (2019). Functional foods: Current issues and trends. *Vitae*, 26(1), 6–7. <http://doi.org/10.17533/udea.vitae.v26n1a01>
- Martinez-Mayorga, K., & Medina-Franco, J. L. (2009). *Chemoinformatics-applications in food chemistry. Advances in food and nutrition research* (1st ed., Vol. 58). Elsevier Inc. [http://doi.org/10.1016/S1043-4526\(09\)58002-3](http://doi.org/10.1016/S1043-4526(09)58002-3)
- Martins, N., Petropoulos, S., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). Chemical composition and bioactive compounds of garlic (*Allium sativum* L.) as affected by pre- and post-harvest conditions: A review. *Food Chemistry*, 211, 41–50. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.029>
- Matei, I., Tablet, C., Ionescu, S., & Hillebrand, M. (2014). Close-lying pKa values of kaempferol determined by second-derivative synchronous fluorescence. *Revue Roumaine de Chimie*, 59(6–7), 401–405.
- Mc Cleary, B., Murphy, A., & Mugford, D. (2000). Measurement of Total Fructan in Foods by Enzymatic/ Spectrophotometric Method: Collaborative Study. *Journal of AOAC International*, 83(2), 356–364.
- Mcclements, D. J., Zou, L., Zhang, R., Salvia-Trujillo, L., Kumosani, T., & Xiao, H. (2015). Enhancing Nutraceutical Performance Using Excipient Foods: Designing Food Structures and Compositions to Increase Bioavailability. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(6), 824–847. <http://doi.org/10.1111/1541-4337.12170>
- McGorin, R. (2011). The significance of volatile sulfur compounds in food flavors. In *Volatile sulfur compounds in food*. Washington, DC.: American Chemical Society.
- Miean, K. H., & Mohamed, S. (2001). Flavonoid (Myricetin, Quercetin, Kaempferol, Luteolin, and Apigenin) Content of Edible Tropical Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3106–3112. <http://doi.org/10.1021/jf000892m>
- Miron, T., Shin, I., Feigenblat, G., Weiner, L., Mirelman, D., Wilchek, M., & Rabinkov, A. (2002). A spectrophotometric assay for allicin, alliin, and alliinase (alliin lyase) with a chromogenic thiol: reaction of 4-mercaptopyridine with thiosulfates. *Analytical Biochemistry*, 307, 76–83.
- Mogrovejo Mata, K., & Muñoz Vázquez, D. (2020). *Relación estructura-actividad como estrategia para la selección de moléculas candidatas para el desarrollo de inhibidores de tirosinasas*. Universidad de Cuenca.
- Moldoveanu, S. C. ., & David, V. (2002). *Sample of Preparation in Chromatography*. Elsevier.
- Molero-Monfort, M., Escuder-Gilabert, L., Villanueva-Camañas, R. M., Sagrado, S., & Medina-Hernández, M. J. (2001). Biopartitioning micellar chromatography: An in vitro technique for predicting human drug absorption. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 753(2), 225–236. [http://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)00546-6](http://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)00546-6)
- Moreno, D., & Illic, N. (2018). Functional and Bioactive Properties of Food: The Challenges Ahead. *Foods*, 7(9), 139. <http://doi.org/10.3390/foods7090139>

- Moshfegh, A. J., Friday, J. E., Goldman, J. P., & Ahuja, J. K. C. (1999). Presence of Inulin and Oligofructose in the Diets of Americans. *The Journal of Nutrition*, *129*, 1407S–1411S.
- Muñoz Jauregui, A. M., & Ramos Escudero, F. (2007). Componentes fenólicos de la dieta y sus propiedades biomedicinales TT - Phenolics compounds of the diet and his biomedical properties. *Horiz. Méd. (Impresa)*, *7*(1), 23–38. Retrieved from <http://www.horizontemedicina.usmp.edu.pe/index.php/horizontemed/article/view/208/223>
- Neue, U. D., Hudalla, C. J., & Iraneta, P. C. (2010). Influence of pressure on the retention of sugars in hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Separation Science*, *33*(6–7), 838–840. <http://doi.org/10.1002/jssc.200900628>
- Nuutila, A. M., Puupponen-Pimiä, R., Aarni, M., & Oksman-Caldentey, K. M. (2003). Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity. *Food Chemistry*, *81*(4), 485–493. [http://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00476-4](http://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00476-4)
- Olivieri, A. C. (2014). Analytical Figures of Merit : From Univariate to Multiway Calibration. *Chemical Reviews*, *4*(2), 5358–5377.
- Oltra Noguera, D. (2010). *Estudio de la variabilidad de la permeabilidad intestinal de fármacos. Estudio in vitro e in situ*.
- Omar, S. H. (2010). Organosulfur compounds and possible mechanism of garlic in cancer. *Saudi Pharmaceutical Journal*, *18*(1), 51–58. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpsps.2009.12.007>
- Packia Lekshmi N.C.J, Viveka S, Jeeva S, R. B. J. (2015). Phytochemicals in Allium SPecies and its Analytical Methods- A Review. *International Journal of Institutional Pharmacy and Life Sciences*, *5*(1), 38–58.
- Palafox-Carlos, H., Ayala-zavala, J. F., & González-Aguilar, G. A. (2011). The Role of Dietary Fiber in the Bioaccessibility and Bioavailability of Fruit and Vegetable Antioxidants. *Journal of Food Science*, *76*(1), 6–15. <http://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01957.x>
- Parada, J., & Aguilera, J. M. (2007). Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *Journal of Food Science*, *72*(2). <http://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00274.x>
- Park, J. H., Park, Y. K., & Park, E. (2009). Antioxidative and antigenotoxic effects of garlic (*Allium sativum* L.) prepared by different processing methods. *Plant Foods for Human Nutrition*, *64*(4), 244–249. <http://doi.org/10.1007/s11130-009-0132-1>
- Petkova, N., & Denev, P. (2015). Methods for determination of inulin. In *Food Research & Development Institute - Food, Technologies and Health*. <http://doi.org/10.13140/RG.2.1.1790.4088>
- Petkova, N., Vrancheva, R., Denev, P., Ivanov, I., & Pavlov, A. (2017). HPLC-RID method for determination of inulin and fructooligosaccharides.
- Petrovska, B., & Cekovska, S. (2010). Extracts from the history and medical properties of garlic. *Pharmacognosy Reviews*, *4*(7), 106. <http://doi.org/10.4103/0973-7847.65321>
- Petruczynik, A., & Waksmundzka-Hajnos, M. (2013). Application of hydrophilic interaction chromatography in phytochemical analysis. *Acta Chromatographica*, *25*(1), 1–25. <http://doi.org/10.1556/AChrom.25.2013.1.1>
- Pidgeon, C., Ong, S., Liu, H., Qiu, X., Pidgeon, M., Dantzig, A. H., ... Szczerba, T. (1995). LAM Chromatography: An in Vitro Screen for Predicting Drug Membrane Permeability. *Journal of Medicinal Chemistry*, *38*(4), 590–594. <http://doi.org/10.1021/jm00004a004>
- Pirhadi, S., Shiri, F., & Ghasemi, J. B. (2015). Multivariate statistical analysis methods in QSAR. *RSC Advances*, *5*(127), 104635–104665. <http://doi.org/10.1039/c5ra10729f>
- Pittler, M. H., & Ernst, E. (2007). Review Clinical effectiveness of garlic (*Allium sativum*). *Molecular Nutrition & Food Research*, *51*, 1382–1385. <http://doi.org/10.1002/mnfr.200700073>
- Pontes, A. G. O., Silva, K. L., Fonseca, S. G. D. C., Soares, A. A., Feitosa, J. P. D. A., Braz-Filho, R., ... Bandeira, M. A. M. (2016). Identification and determination of the inulin content in the roots of the Northeast Brazilian species *Pombalia calceolaria* L. *Carbohydrate Polymers*, *149*, 391–8. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.108>
- Poojary, M. M., Putnik, P., Bursać Kovačević, D., Barba, F. J., Lorenzo, J. M., Dias, D. A., & Shpigelman, A. (2017). Stability and extraction of bioactive sulfur compounds from *Allium* genus processed by traditional and

- innovative technologies. *Journal of Food Composition and Analysis*, 61(May), 28–39. <http://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.04.007>
- Potts, R. O., & Guy, R. H. (1992). Predicting Skin Permeability. *Pharmaceutical Research*, 9(5), 663–669. <http://doi.org/10.1023/A:1015810312465>
- Price, E., Kalvass, J. C., DeGoey, D., Hosmane, B., Doktor, S., & Desino, K. (2021). Global Analysis of Models for Predicting Human Absorption: QSAR, in Vitro, and Preclinical Models. *Journal of Medicinal Chemistry*, 64(13), 9389–9403. <http://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c00669>
- Qiu, Z., Zheng, Z., Zhang, B., Sun-Waterhouse, D., & Qiao, X. (2020). Formation, nutritional value, and enhancement of characteristic components in black garlic: A review for maximizing the goodness to humans. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(2), 801–834. <http://doi.org/10.1111/1541-4337.12529>
- Quattrocchi, O. A. (2019). *Compendio de HPLC*. (D. Editors, Ed.) (1st ed.). Buenos Aires.
- Quattrocchi, O. A., Abelaira de Andrizzi, S., & Laba, R. F. (1992). *Introducción a la HPLC Aplicación y Práctica*. Buenos Aires: SA, Artes Gráficas Farro.
- Quemener, J., & Thibault, F. (1994). Determination of Inulin and Oligofructose in Food Products, and Integration in the AOAC Method for Measurement of Total Dietary Fibre. *Lebensmittel-Wissenschaft Und -Technologie*, 27, 125–132.
- Quesada, I., de Paola, M., Torres-Palazzolo, C., Camargo, A., Ferder, L., Manucha, W., & Castro, C. (2020). Effect of Garlic's Active Constituents in Inflammation, Obesity and Cardiovascular Disease. *Current Hypertension Reports*, 22(1), 2–11. <http://doi.org/10.1007/s11906-019-1009-9>
- Quintin, D., Garcia-Gomez, P., Ayuso, M., & Sanmartin, A. M. (2019). Active biocompounds to improve food nutritional value. *Trends in Food Science and Technology*, 84(June 2017), 19–21. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.024>
- Rabinowitch, H., & Brewster, J. (1990). *Onion an Allied Crop Vol III*. Florida, USA: CRC Press.
- Rahman, K. (2003). Garlic and aging : new insights into an old remedy. *Ageing Research Reviews*, 2, 39–56.
- Rahman, M. S. (2007). Allicin and Other Functional Active Components in Garlic: Health Benefits and Bioavailability. *International Journal of Food Properties*, 10(2), 245–268.
- Ramirez, D. A., Locatelli, D. A., González, R. E., Cavagnaro, P. F., & Camargo, A. B. (2016). Analytical methods for bioactive sulfur compounds in Allium : an integrated review and future directions. *Journal of Food Composition and Analysis*. <http://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.09.012>
- Ramirez, D. A., Locatelli, D. A., Torres-Palazzolo, C. A., Altamirano, J. C., & Camargo, A. B. (2016). Development of garlic bioactive compounds analytical methodology based on liquid phase microextraction using response surface design. Implications for dual analysis: Cooked and biological fluids samples. *Food Chemistry*, 215, 493–500. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.170>
- Ramirez, D., Locatelli, D., Torres-palazzolo, C. A., Altamirano, J., & Camargo, A. (2017). Development of garlic bioactive compounds analytical methodology based on liquid phase microextraction using response surface design. Implications for dual analysis: Cooked and biological fluids samples. *Food Chemistry*, 215, 493–500. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.170>
- Rein, M. J., Renouf, M., Cruz-Hernandez, C., Actis-Goretta, L., Thakkar, S. K., & da Silva Pinto, M. (2013). Bioavailability of bioactive food compounds: A challenging journey to bioefficacy. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 75(3), 588–602. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2012.04425.x>
- Reinhart, K. M., Talati, R., White, C. M., & Coleman, C. I. (2009). The impact of garlic on lipid parameters : a systematic review and meta-analysis Nutrition Research Reviews. *Nutrition Research Reviews*, 22, 39–48. <http://doi.org/10.1017/S0954422409350003>
- Ren, Q., Xing, H., Bao, Z., Su, B., Yang, Q., Yang, Y., & Zhang, Z. (2013). Recent advances in separation of bioactive natural products. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 21(9), 937–952. [http://doi.org/10.1016/S1004-9541\(13\)60560-1](http://doi.org/10.1016/S1004-9541(13)60560-1)
- Reyes, L. M. S. (2020). *APLICACIONES BIOLÓGICAS DE LA TEORÍA QSAR EN EL CONTROL DEL MOSQUITO Aedes aegypti L*. Universidad Nacional de La Plata.
- Rezaee, M., Assadi, Y., Milani Hosseini, M.-R., Aghaee, E., Ahmadi, F., & Berijani, S. (2006). Determination of

- organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography. A*, 1116(1–2), 1–9. <http://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.03.007>
- Ried, K. (2016). Garlic Lowers Blood Pressure in Hypertensive Individuals , Regulates Serum Cholesterol , and Stimulates Immunity : An Updated. *The Journal of Nutrition*, (6), 389–396. <http://doi.org/10.3945/jn.114.202192.in>
- Rivlin, R. (2001). Historical perspective on the use of garlic. *Journal of Nutrition*, 131(3S), 951S–954S.
- Rohner, A., Ried, K., Sobenin, I. A., Bucher, H. C., & Nordmann, A. J. (2015). Original Article A Systematic Review and Metaanalysis on the Effects of Garlic Preparations on Blood Pressure in Individuals With Hypertension. *American Journal of Hypertension*, 28(3), 414–423. <http://doi.org/10.1093/ajh/hpu165>
- Roselló-Soto, E., Martí-Quijal, F. J., Cilla, A., Munekata, P. E. S., Lorenzo, J. M., Remize, F., & Barba, F. J. (2019). Influence of temperature, solvent and pH on the selective extraction of phenolic compounds from tiger nuts by-products: Triple-TOF-LC-MS-MS characterization. *Molecules*. <http://doi.org/10.3390/molecules24040797>
- Rouseff, R. (2002). Analytical Methods to Determine Volatile Sulfur Compounds in Foods and Beverages. In *Aroma Compounds*. Washington, DC.: American Chemical Society.
- Ruano, P., Delgado, L. L., Picco, S., Villegas, L., Tonelli, F., Merlo, M., ... Masuelli, M. (2018). Introductory Chapter: Functional Foods. In *Functional Foods - IntechOpen* (pp. 1–4). Retrieved from <https://www.intechopen.com/books/advanced-biometric-technologies/liveness-detection-in-biometrics>
- Russo, G., Grumetto, L., Barbato, F., Vistoli, G., & Pedretti, A. (2017). Prediction and mechanism elucidation of analyte retention on phospholipid stationary phases (IAM-HPLC) by in silico calculated physico-chemical descriptors. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99, 173–184. <http://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.11.026>
- Rybak, M., Calvey, E., & Harnly, J. (2004). Quantitative determination of allicin in garlic: supercritical fluid extraction and standard addition of alliin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 682–687.
- Sarafraz-Yazdi, A., & Amiri, A. (2010). Liquid-phase microextraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 29(1), 1–14. <http://doi.org/10.1016/j.trac.2009.10.003>
- Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K. M., & Yoga Latha, L. (2011). EXTRACTION, ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM PLANTS' EXTRACTS. *Afr J Tradit Complement AlternMed.*, 8, 93–130. http://doi.org/10.1007/978-3-642-56936-4_2
- Schaafsma, G., & Slavin, J. L. (2015). Significance of Inulin Fructans in the Human Diet. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(1), 37–47. <http://doi.org/10.1111/1541-4337.12119>
- Schieber, A., & Lopes-Lutz, D. (2011). *Analytical Methods - Functional Foods and Dietary Supplements. Comprehensive Biotechnology, Second Edition* (Second Edi, Vol. 4). Elsevier B.V. <http://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00320-2>
- Sentkowska, A., Biesaga, M., & Pyrzynska, K. (2016). Application of Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography for the Quantification of Flavonoids in Genista tinctoria Extract. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2016. <http://doi.org/10.1155/2016/3789348>
- Shang, A., Cao, S., Xu, X., Gan, R., Tang, G., & Corke, H. (2019). Bioactive Compounds and Biological Functions of Garlic (*Allium sativum* L.). *Foods*, 8(246), 1–30. <http://doi.org/10.3390/foods8070246>
- Shouk, R., Abdou, A., Shetty, K., Sarkar, D., & Eid, A. H. (2014). ScienceDirect Mechanisms underlying the antihypertensive effects of garlic bioactives ☆. *Nutrition Research*, 34(2), 106–115. <http://doi.org/10.1016/j.nutres.2013.12.005>
- Silagy, C., & Neil, A. (1994). Garlic as a Lipid Lowering Agent—A Meta-Analysis. *Journal of the Royal College of Physicians of London*, 28(1), 39–45.
- Singh, Y. P., & Singh, R. a. (2010). Insilico studies of organosulfur-functional active compounds in garlic. *BioFactors (Oxford, England)*, 36(4), 297–311. <http://doi.org/10.1002/biof.102>
- Sjögren, E., Westergren, J., Grant, I., Hanisch, G., Lindfors, L., Lennernäs, H., ... Tannergren, C. (2013). In silico predictions of gastrointestinal drug absorption in pharmaceutical product development: application of the mechanistic absorption model GI-Sim. *European Journal of Pharmaceutical Sciences : Official Journal*

- of the European Federation for Pharmaceutical Sciences, 49(4), 679–98.
<http://doi.org/10.1016/j.ejps.2013.05.019>
- Soto, V., Camargo, A., & Galmarini, C. (2007). Síntesis y purificación de ajoeno y su cuantificación en aceites comerciales de ajo Synthesis and purification of ajoene and its quantification in commercial garlic oils. *Revista de La Facultad de Ciencias Agrarias*, (5567), 93–100.
- Stepnik, K. (2021). Biomimetic Chromatographic Studies Combined with the Computational Approach to Investigate the Ability of Triterpenoid Saponins of Plant Origin to Cross the Blood–Brain Barrier. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3573. <http://doi.org/10.3390/ijms22073573>
- Stepnik, K. E., & Malinowska, I. (2013). The use of biopartitioning micellar chromatography and immobilized artificial membrane column for in silico and in vitro determination of blood-brain barrier penetration of phenols. *Journal of Chromatography A*, 1286, 127–136. <http://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.02.071>
- Sultana, B., & Anwar, F. (2008). Flavonols (kaempferol, quercetin, myricetin) contents of selected fruits, vegetables and medicinal plants. *Food Chemistry*, 108(3), 879–884.
<http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.053>
- Szulińska, M., Kręgielska-Narozna, M., Świątek, J., Styś, P., Kuźnar-Kamińska, B., Jakubowski, H., ... Bogdański, P. (2018). Garlic extract favorably modifies markers of endothelial function in obese patients – randomized double blind placebo-controlled nutritional intervention. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 102(November 2017), 792–797. <http://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.131>
- Talevi, A., Goodarzi, M., Ortiz, E. V., Duchowicz, P. R., Bellera, C. L., Pesce, G., ... Bruno-Blanch, L. E. (2011). Prediction of drug intestinal absorption by new linear and non-linear QSPR. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46(1), 218–228. <http://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.11.005>
- Taylor, P., Loo, J. Van, Coussement, P., Leenheer, L. De, Hoebregs, H., & Smits, G. (1995). On the presence of Inulin and Oligofructose as natural ingredients in the western diet. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35(6), 37–41.
- Todeschini, R., & Consonni, V. (2000). *Handbook of Molecular Descriptors*. (R. Mannhold, H. Kubinyi, & H. Timmerman, Eds.). Weinheim, FRG: Wiley-VCH.
- Todeschini, R., & Consonni, V. (2009). *Molecular Descriptors for Chemoinformatics Volumes I & II*. (R. Mannhold, H. Kubinyi, & G. Folkers, Eds.). Weinheim, FRG: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Tomsik, A., Pavlic, B., Vladoic, J., Ramic, M., Brindza, J., & Vidovic, S. (2016). Optimization of ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from wild garlic (*Allium ursinum* L.). *Ultrasonics Sonochemistry*, 29, 502–511. <http://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.11.005>
- Torres-Palazzolo, C. A., Ramírez, D. A., Beretta, V. H., & Camargo, A. B. (2021). Matrix effect on phytochemical bioaccessibility. The case of organosulfur compounds in garlic preparations. *Lwt*, 136(P1), 110301. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110301>
- Torres-Palazzolo, C., Ramirez, D., Locatelli, D., Manucha, W., Castro, C., Camargo, A., ... Camargo, A. (2018). Bioaccessibility and permeability of bioactive compounds in raw and cooked garlic. *Journal of Food Composition and Analysis*, 70(March), 49–53. <http://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.03.008>
- Torres Palazzolo, C., Ramirez, D., Locatelli, D., Manucha, W., Castro, C., & Camargo, A. (2018). Bioaccessibility and permeability of bioactive compounds in raw and cooked garlic. *Journal of Food Composition and Analysis*, 70(March), 49–53. <http://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.03.008>
- Tsantili-Kakoulidou, A. (2020). How can we better realize the potential of immobilized artificial membrane chromatography in drug discovery and development? *Expert Opinion on Drug Discovery*, 15(3), 273–276. <http://doi.org/10.1080/17460441.2020.1718101>
- Tsopelas, F., Tsagkrasouli, M., Poursanidis, P., Pitsaki, M., Vasios, G., Danias, P., ... Giaginis, C. (2018). Retention behavior of flavonoids on immobilized artificial membrane chromatography and correlation with cell-based permeability. *Biomedical Chromatography*, 32(3), e4108. <http://doi.org/10.1002/bmc.4108>
- Turati, F., Pelucchi, C., Guercio, V., & Vecchia, C. La. (2015). Allium vegetable intake and gastric cancer : A case – control study and meta-analysis. *Molecular Nutrition & Food Research*, 59, 171–179. <http://doi.org/10.1002/mnfr.201400496>

- Valderrama, P., Braga, J. W. B., & Poppi, R. (2009). Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada. *Quimica Nova*, 32(5), 1278–1287.
- Valko, K. L. (2019). Application of biomimetic HPLC to estimate in vivo behavior of early drug discovery compounds. *Future Drug Discovery*, 1(1), FDD11. <http://doi.org/10.4155/fdd-2019-0004>
- Vendrell-Pascuas, S., Castellote-Bargalló, A. I., & López-Sabater, M. C. (2000). Determination of inulin in meat products by high-performance liquid chromatography with refractive index detection. *Journal of Chromatography A*, 881, 591–597.
- Viñas, P., Campillo, N., López-García, I., & Hernández-Córdoba, M. (2014). Dispersive liquid-liquid microextraction in food analysis. A critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(8), 2067–99. <http://doi.org/10.1007/s00216-013-7344-9>
- Wang, H., Li, X., Liu, S., & Jin, S. (2009). Quantitative determination of allicin in *Allium sativum* L. bulbs by UPLC. *Chromatographia*, 71(1–2), 159–161. Retrieved from <http://www.springerlink.com/index/10.1365/s10337-009-1416-1>
- Wang, J., & Hou, T. (2015). Advances in computationally modeling human oral bioavailability. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 86, 11–6. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2015.01.001>
- Wanyika, H., Gachanja, A., Kenji, G., Keriko, J., & Mwangi, A. (2010). A RAPID METHOD BASED ON UV SPECTROPHOTOMETRY FOR QUANTITAVE DETERMINATION OF ALLICIN IN AQUEOUS GARLIC EXTRACTS. *Journal of Agriculture, Science and Technology*, 12(1), 74–82.
- Warshafsky, S., Kamer, R. S., & Sivak, S. L. (1993). Effect of Garlic on Total Serum Cholesterol. *Ann Intern Med*, 119, 599–605.
- Weinberg, D. S., Manier, M. L., Richardson, M. D., & Haibach, F. G. (1993). Identification and Quantification of Organosulfur Compliance Markers in a Garlic Extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 37–41.
- Xiong, X. J., Wang, P. Q., Li, S. J., Li, X. K., Zhang, Y. Q., & Wang, J. (2015). Phytomedicine Garlic for hypertension : A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Phytomedicine*, 22, 352–361. <http://doi.org/10.1016/j.phymed.2014.12.013>
- Yang, N. J., & Hinner, M. J. (2015). Getting Across the Cell Membrane : An Overview for Small Molecules , Peptides , and Proteins. In *Site-Specific Protein Labeling: Methods and Protocols* (Vol. 1266). <http://doi.org/10.1007/978-1-4939-2272-7>
- Yao, Y., Lin, G., Xie, Y., Ma, P., Li, G., Meng, Q., & Wu, T. (2014). Preformulation studies of myricetin: A natural antioxidant flavonoid. *Pharmazie*, 69(1), 19–26. <http://doi.org/10.1691/ph.2014.3076>
- Yen, T. E., Agatonovic-Kustrin, S., Evans, A. M., Nation, R. L., & Ryand, J. (2005). Prediction of drug absorption based on immobilized artificial membrane (IAM) chromatography separation and calculated molecular descriptors. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 38(3), 472–478. <http://doi.org/10.1016/j.jpba.2005.01.040>
- Yoo, M., Lee, S., Kim, S., & Shin, D. (2012). Validation of HPLC Method for Determination of E - and Z- Ajoene in Oil-macerated Garlic Juice. *Food Science Biotechnology*, 21(1), 107–111. <http://doi.org/10.1007/s10068-012-0013-5>
- Yoo, M., Lee, S., Lee, S., Seog, H., & Shin, D. (2010). Validation of high performance liquid chromatography methods for determination of bioactive sulfur compounds in garlic bulbs. *Food Science and Biotechnology*, 19(6), 1619–1626. Retrieved from <http://link.springer.com/10.1007/s10068-010-0229-1>
- Yu, T. H., Wu, C. M., & Chen, S. Y. (1989). Effects of pH Adjustment and Heat Treatment on the Stability and the Formation of Volatile Compounds of Garlic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37, 730–734.
- Yuan, H., Sun, L., Chen, M., & Wang, J. (2016). The Comparison of the Contents of Sugar, Amadori, and Heyns Compounds in Fresh and Black Garlic. *Journal of Food Science*, 81(7), C1662–C1668. <http://doi.org/10.1111/1750-3841.13365>
- Zeng, T., Guo, F., Zhang, C., Song, F., Zhao, X., & Xie, K. (2012). A meta-analysis of randomized , double-blind , placebo-controlled trials for the effects of garlic on serum lipid profiles. *J Sci Food Agric*, (92), 1892–1902. <http://doi.org/10.1002/jsfa.5557>
- Zhang, H., Guo, Z., Zhang, F., Xu, Q., & Liang, X. (2008). HILIC for separation of co-eluted flavonoids under RP-

- HPLC mode. *Journal of Separation Science*, 31(9), 1623–1627. <http://doi.org/10.1002/jssc.200700656>
- Zhang, N., Huang, X., Zeng, Y., Wu, X., & Peng, X. (2013). Study on prebiotic effectiveness of neutral garlic fructan in vitro. *Food Science and Human Wellness*, 2(3–4), 119–123. <http://doi.org/10.1016/j.fshw.2013.07.001>
- Zhao, Y. H., Le, J., Abraham, M. H., Hersey, A., Eddershaw, P. J., Luscombe, C. N., ... Platts, J. A. (2001). Evaluation of human intestinal absorption data and subsequent derivation of a quantitative structure-activity relationship (QSAR) with the Abraham descriptors. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91(2), 605. <http://doi.org/10.1002/jps.10118>



CAPÍTULO VI

ANEXOS

VI. ANEXOS

VI.1. SECCIÓN A: DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS ORGANOAZUFRADOS EN MUESTRAS DE AJO MEDIANTE MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA ACOPLADA A HPLC-UV

Los compuestos organoazufrados (OSCs) presentes en el ajo (*Allium sativum* L.) son los principales responsables de varias propiedades biológicas. Investigaciones relacionadas con el análisis de alimentos funcionales se enfocan en la determinación y cuantificación de fitoquímicos, tales como los compuestos de nuestro interés, tanto en matrices alimentarias como en fluidos biológicos, permitiendo así responder interrogantes relacionados a la liberación de los analitos de la matriz del alimento y su posterior disponibilidad en el organismo para ejercer su efecto benéfico. Con este propósito, el presente trabajo presenta una novedosa metodología basada en microextracción líquida-líquida dispersiva (DLLME) para la extracción de los OSCs (alicina, ajoeno, 2-vinilditiina, dialil sulfuro y dialil disulfuro) presentes en muestras de ajo y fluidos biológicos, previo a su determinación por Cromatografía Líquida de Alta Performance acoplada a detector Ultravioleta (HPLC-UV). En primer lugar, se utilizó un diseño experimental de superficie de respuesta para optimizar la técnica de preparación de muestra, y luego bajo condiciones experimentales óptimas se calcularon las figuras analíticas de mérito. Se eligió un modelo D-Optimal para la optimización de las respuestas en términos del efecto ejercido por diferentes factores experimentales: tipo de solvente de extracción, tipo de solvente dispersante, volumen de solvente de extracción. Los resultados obtenidos en cuanto a las figuras analíticas de mérito se encontraron dentro de los rangos establecidos para cada parámetro, lo cual indica que el método analítico es confiable. A su vez el método fue positivamente aplicado para la determinación de OSCs en muestras de ajo cocido, muestras de fluidos digestivos simulados y muestras de plasma sanguíneo de ratas de laboratorio, de manera que se logró verificar la adecuación del método para diferentes matrices.

A continuación se resumen las tareas realizadas y los resultados obtenidos, para mayor detalle se puede acceder a la publicación del mismo bajo el doi: **10.1016/j.foodchem.2016.07.170**. En relación a lo que incumbe a la presente Tesis doctoral, es la metodología analítica para la determinación de los OSCs lo que se utilizó particularmente de esta sección. Sin embargo, la aplicabilidad del método DLLME-HPLC-UV en diversas matrices biológicas dio pautas para avanzar en el estudio de la biodisponibilidad de compuestos bioactivos del ajo, y que resultaron en trabajos colaborativos publicados concierne a estudios de bioaccesibilidad,

permeabilidad *in vitro* y estabilidad en sangre de un set de OSCs (C. A. Torres-Palazzolo, Ramírez, Beretta, & Camargo, 2021; Torres Palazzolo et al., 2018).

MATERIALES Y MÉTODOS:

• **Metodología (Extracción de OSCs en muestras vegetales y determinación por HPLC-UV)**

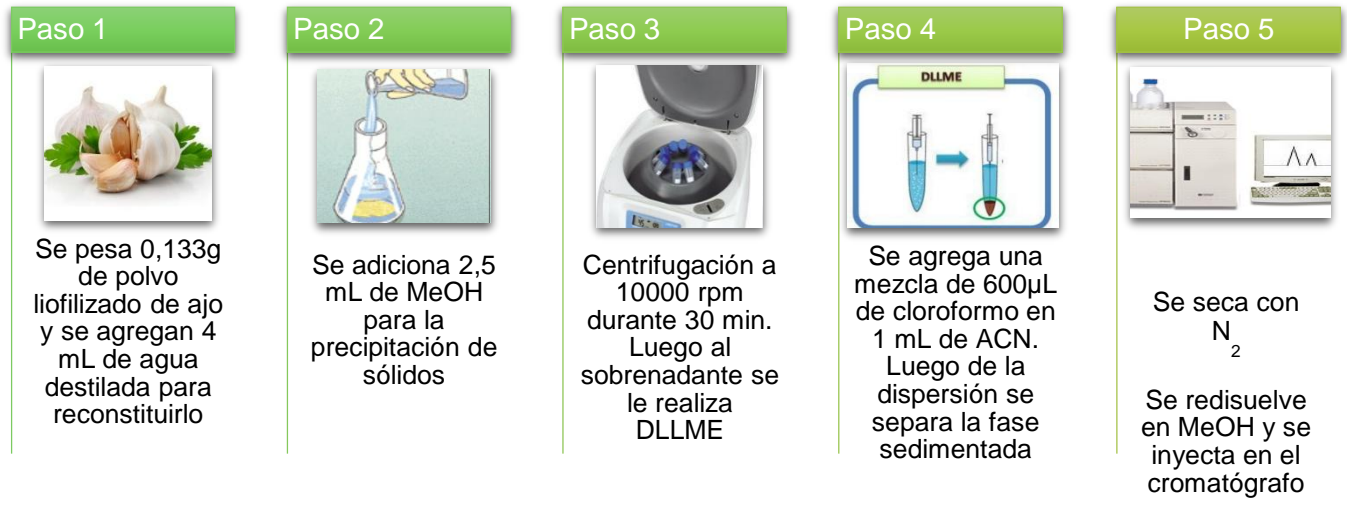


Figura VI.1. Esquema de la metodología analítica para determinar OSCs

• **Metodología (Análisis de fluidos biológicos)**

-**Determinación de OSCs en el plasma sanguíneo:** Estándares de alicina, E-Z- ajoeno, 2-VD, DAS y DADS, a concentraciones de 75, 100 y 130 mg L⁻¹ se añadieron a muestras de 1 mL de sangre, plasma y plasma desproteinizado. Posteriormente, se realizó el procedimiento propuesto de DLLME agregando 800 µL de la mezcla de acetonitrilo-cloroformo (**Figura VI.2.**)

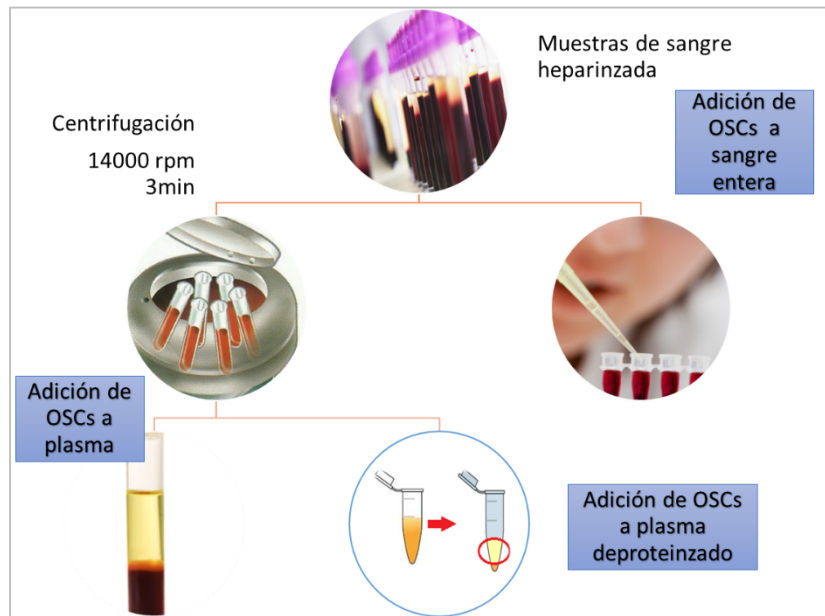


Figura VI.2. Esquema de los pasos involucrados para el análisis de muestras sanguíneas

-Determinación de OSCs en fluidos digestivos simulados: se añadieron los estándares de OSCs a una concentración de 75, 100 y 150 mg L⁻¹, a tres muestras de 5 mL de solución gástrica y el pH se ajustó a 2. Por otro lado, a un segundo grupo de muestras gástricas, luego de la adición de los estándares de OSCs, se ajustó el pH de cada una hasta alcanzar un valor de 5 adicionando NaOH 2 M, luego, se añadieron a las mismas 3 mL de solución intestinal, de manera de obtener un fluido gastrointestinal simulado. Después del procedimiento descrito, se extrajeron los OSCs utilizando la técnica de microextracción propuesta. (Figura VI.3.)

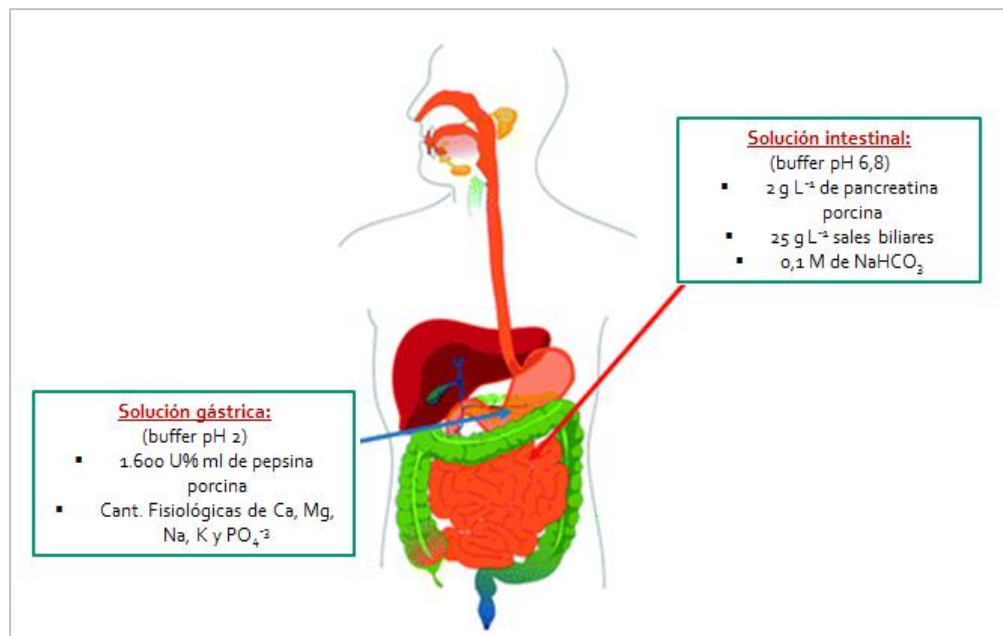


Figura VI.3. Composición de los fluidos digestivos simulados

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

Primero se realizó un Diseño Experimental analizando la superficie de respuesta de tres factores (solvente de extracción, solvente dispersante y volumen de solvente de extracción). Los resultados indicaron que la función deseabilidad óptima se logró usando 600 μ L de cloroformo como extractante, utilizando acetonitrilo como dispersante (**Figura VI.4.**). Posteriormente se analizaron las figuras de mérito (**Tabla VI.1.**)

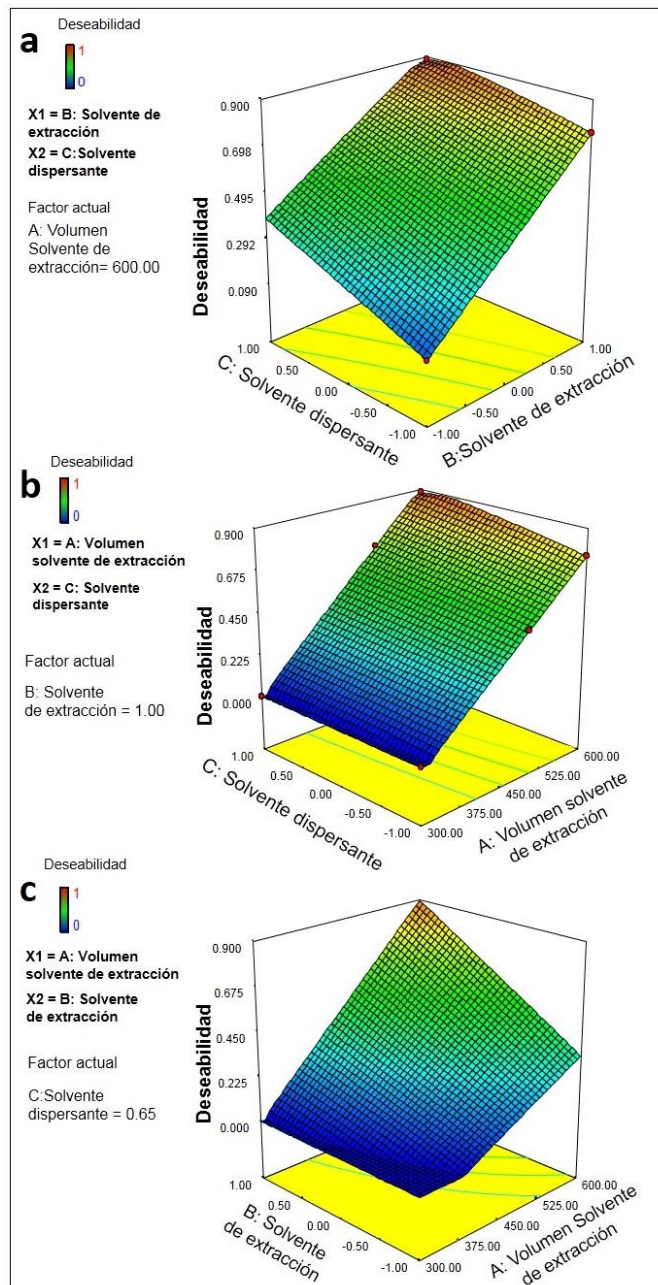


Figura VI.4. Gráficos en 3D de la deseabilidad alcanzada para optimizar la DLLME de OSCs
Tabla VI.1. Resultados cuantitativos del método DLLME-HPLC-UV de los OSCs target

Analitos	r^a	LODb	LOQc	CV% ^d	%Re
Alicina	0,99674	1,13	5,27	1,2	106
E-Z-ajoeno	0,99876	0,39	1,18	1,4	88
2-vinilditiinas	0,99562	0,38	0,5	2,7	95
DAS	0,99717	1,05	1,5	3,9	80
DADS	0,99626	0,16	1,13	0,9	76

^a r, coeficiente de correlación; ^b LOD, límite de detección ($\mu\text{g mL}^{-1}$); ^c LOQ, límite de cuantificación ($\mu\text{g mL}^{-1}$); ^d (C= 75 $\mu\text{g mL}^{-1}$, n=6); ^e Promedio

La aplicación del presente método analítico mostró ser confiable sobre distintos tipos de muestras. Las recuperaciones relativas variaron entre 107-116% para ajo feteado frito y 99-120% para ajo feteado hervido. (Tabla VI.2.)

Tabla VI.2. Resultados cuantitativos del método DLLME-HPLC-UV de los OSCs target en muestras de ajo cocido

OSCs	Ajo Feteado Frito		Ajo Feteado Hervido fuerte		Ajo Crudo Picado	
	Concentración real encontrada (mg L-1)	Recuperación relativa (%)	Concentración real encontrada (mg L-1)	Recuperación relativa (%)	Concentración real encontrada (mg L-1)	Recuperación relativa (%)
Alicina	nda	---	19	120,6	32,26	98,04
E-Z-ajoeno	23	116,7	7,5	105,55	nd	---
2-vinilditiina	20	107,33	4,15	99,83	nd	---
DAS	nd	---	nd	---	nd	---
DADS	14	108,12	nd	---	nd	---

^a No detectable

Los resultados del análisis de sangre y plasma, mostraron una baja recuperación (**Figura VI.5.**). En el primer caso las recuperaciones fueron las más bajas (4-8%). Esto podría deberse a la rápida reacción de los OSCs con eritrocitos y proteínas plasmáticas. Las recuperaciones en plasma fueron mayores que las anteriores (13-20%).

Por último se adicionó OSCs a plasma desproteínizado, obteniéndose altas recuperaciones (87-98%). En este caso, la reacción entre analitos y -SH presentes en las proteínas, no se produce, y los OSCs permanecen intactos para ser extraídos.

Los resultados del análisis de muestras de fluido gástrico mostraron recuperaciones entre 28-87%; el valor más alto para alicina, en acuerdo con investigaciones previas que indican que este analito es más estable a pH bajo. DAS y DADS aumentaron en fluido intestinal, indicando una mayor estabilidad a mayor pH mientras que las recuperaciones de ajoenos y 2-VD, fueron las más altas en ambos fluidos.

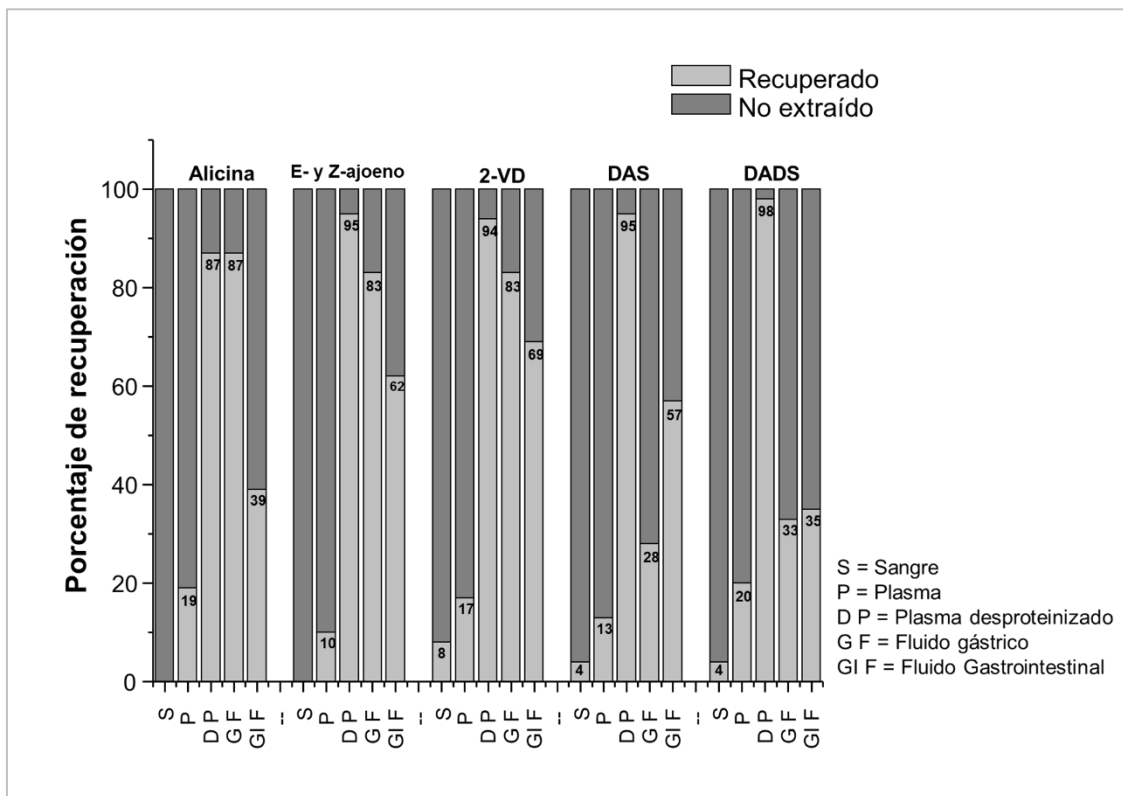


Figura VI.5. Representación gráfica de los resultados de la determinación de OSCs en muestras sanguíneas

VI.2. SECCIÓN B: ESPECTROS EN EL RANGO ULTRAVIOLETA-VISIBLE DE LOS COMPUESTOS ORGANOAZUFRADOS Y COMPUESTOS FENÓLICOS ANALIZADOS

- COMPUESTOS ORGANOAZUFRADOS

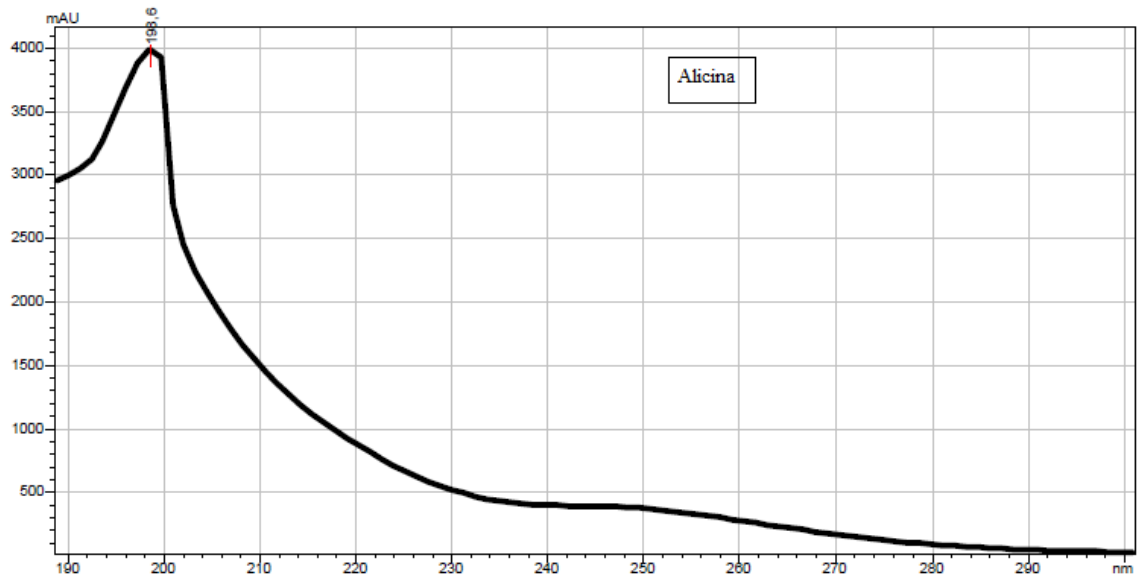


Figura VI.6. Espectro de un estándar de alicina en metanol en el rango de longitudes de onda UV

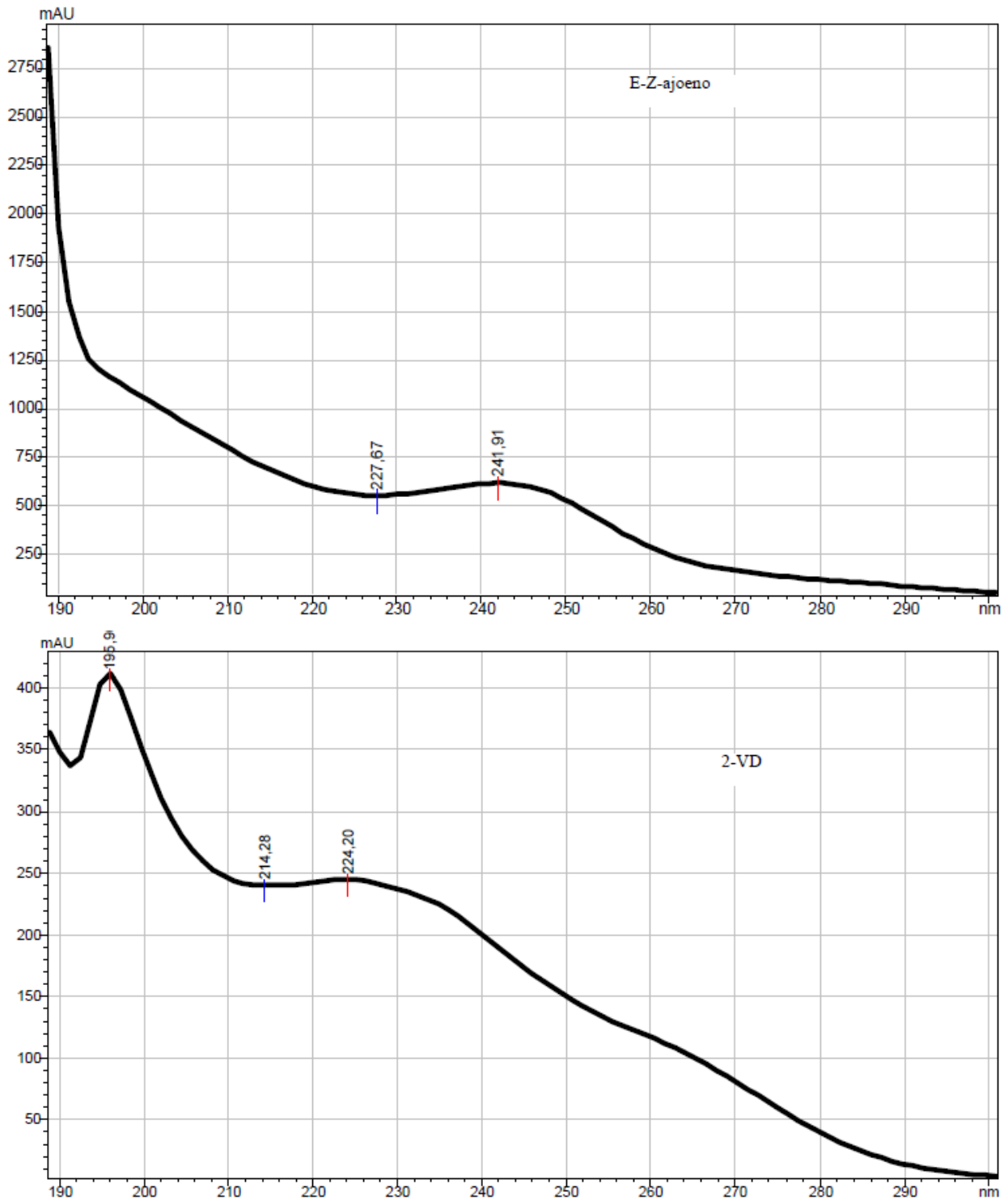


Figura VI.7. Espectros de estándares de referencia de E-Z-ajoeno y 2-vinilditiina en metanol en el rango de longitudes de onda UV

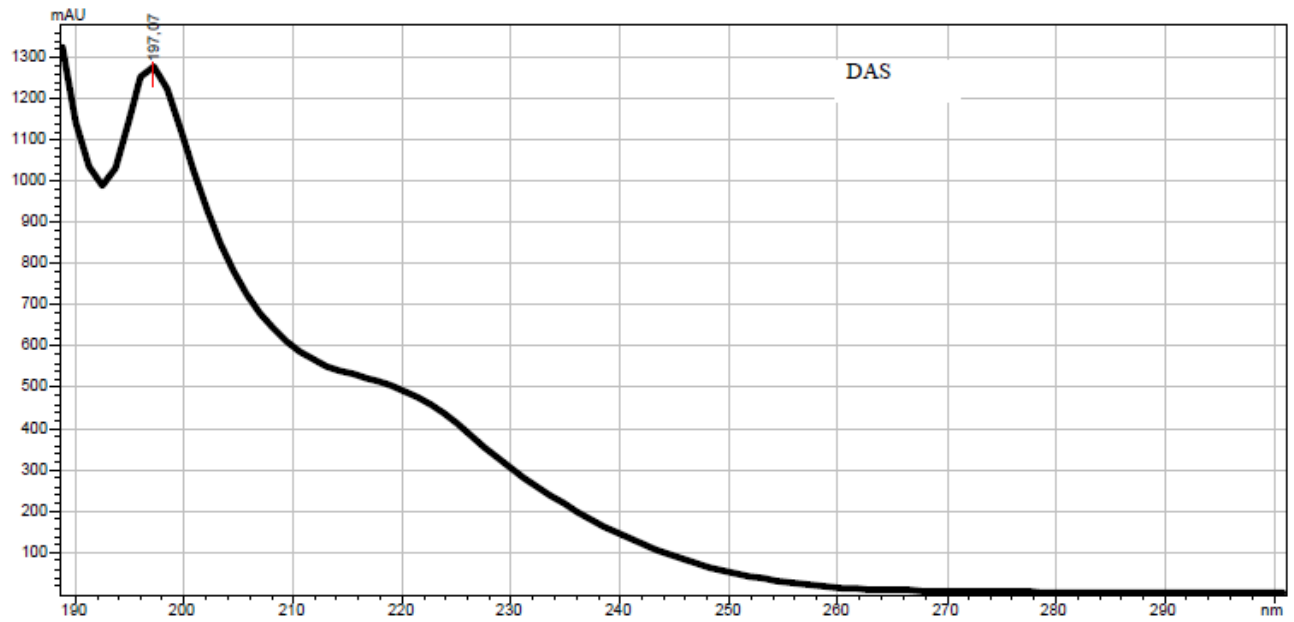


Figura VI.8. Espectro de un estándar de referencia de Dialil Sulfuro en metanol en el rango de longitudes de onda UV

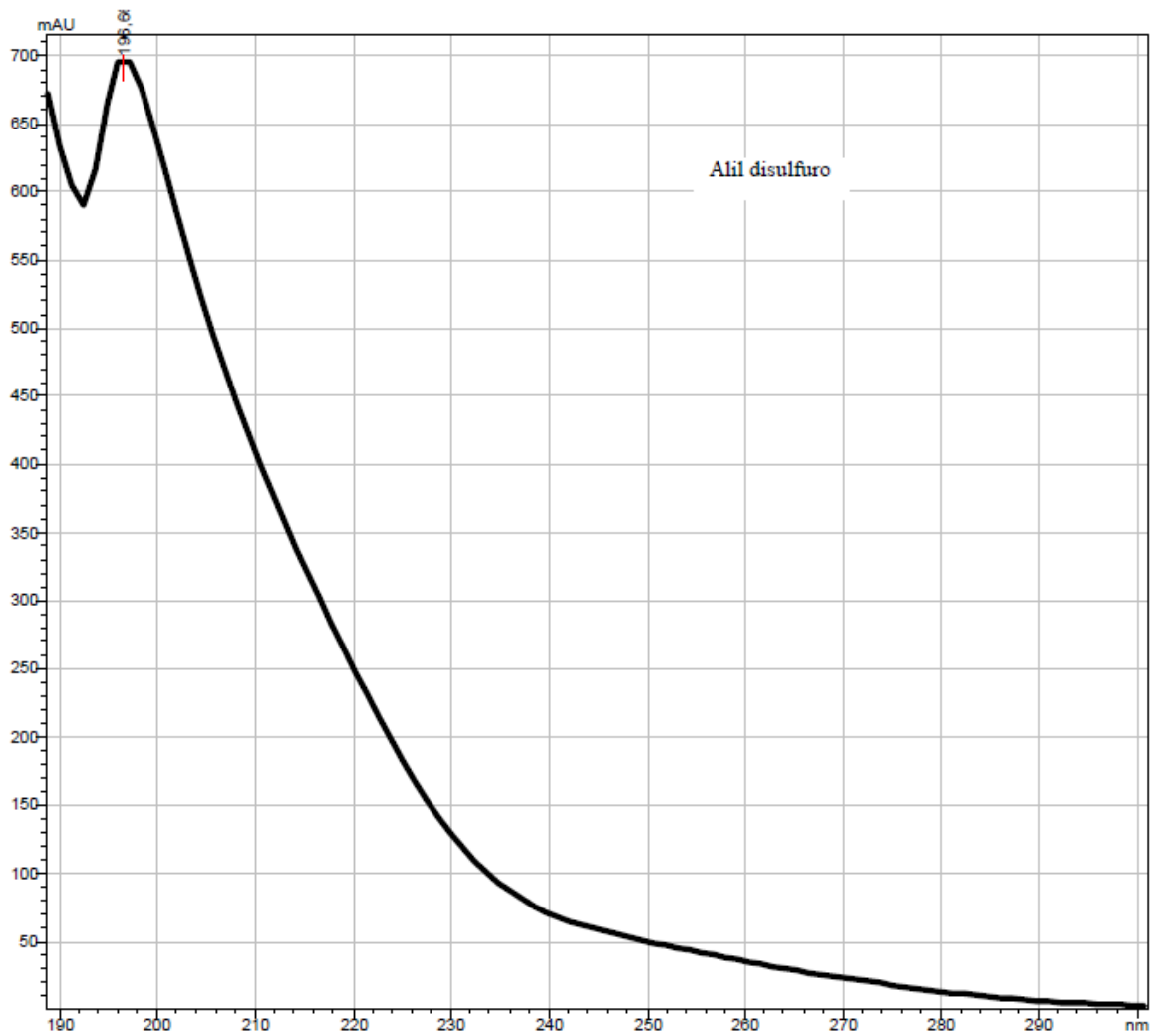


Figura VI.9. Espectro de un estándar de referencia de dialil disulfuro en metanol en el rango de longitudes de onda UV

- COMPUESTOS FENÓLICOS (FLAVONOLES)

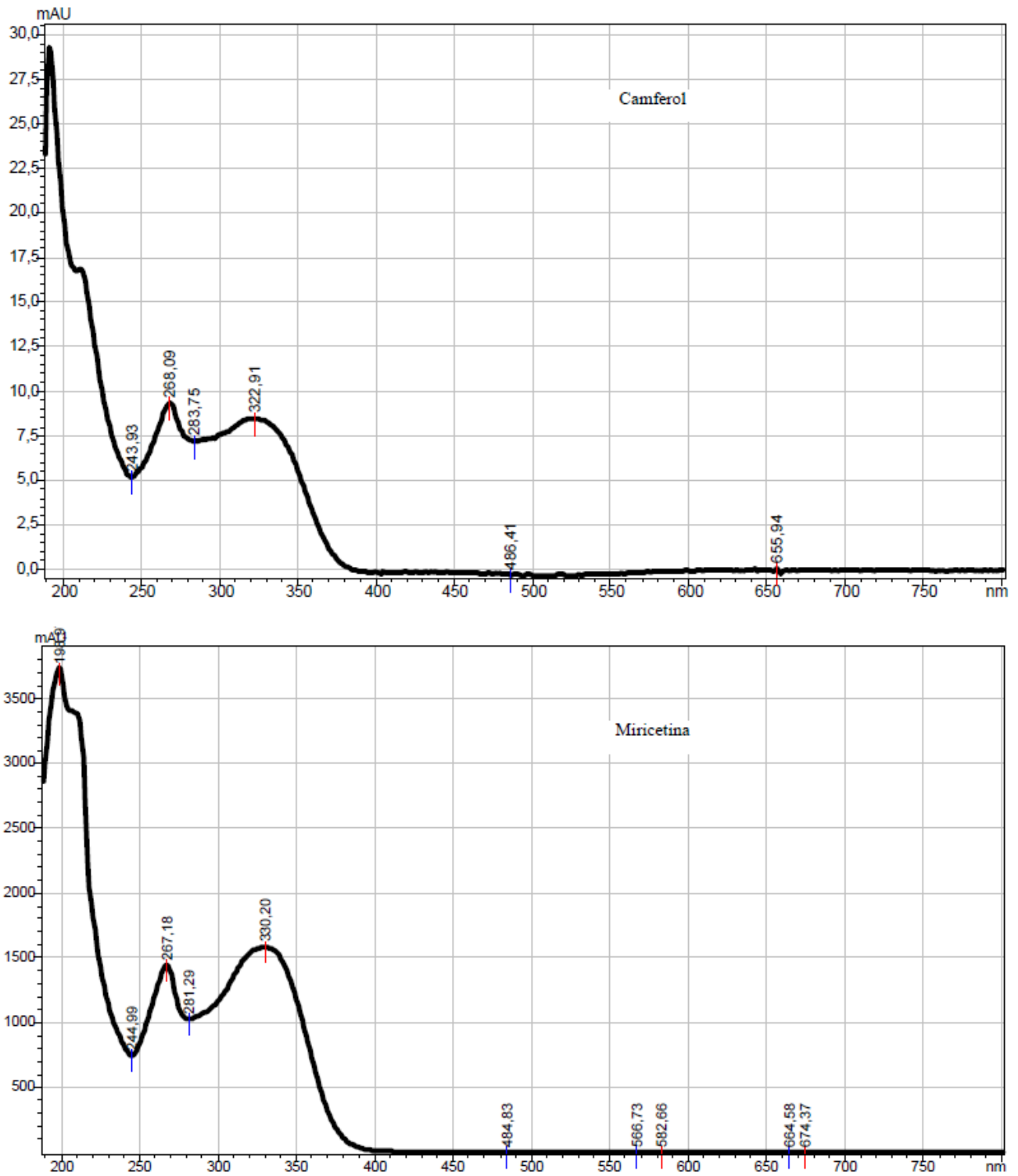


Figura VI.10. Espectro de estándares de referencia de camferol y miricetina en metanol en el rango de longitudes de onda UV-VIS

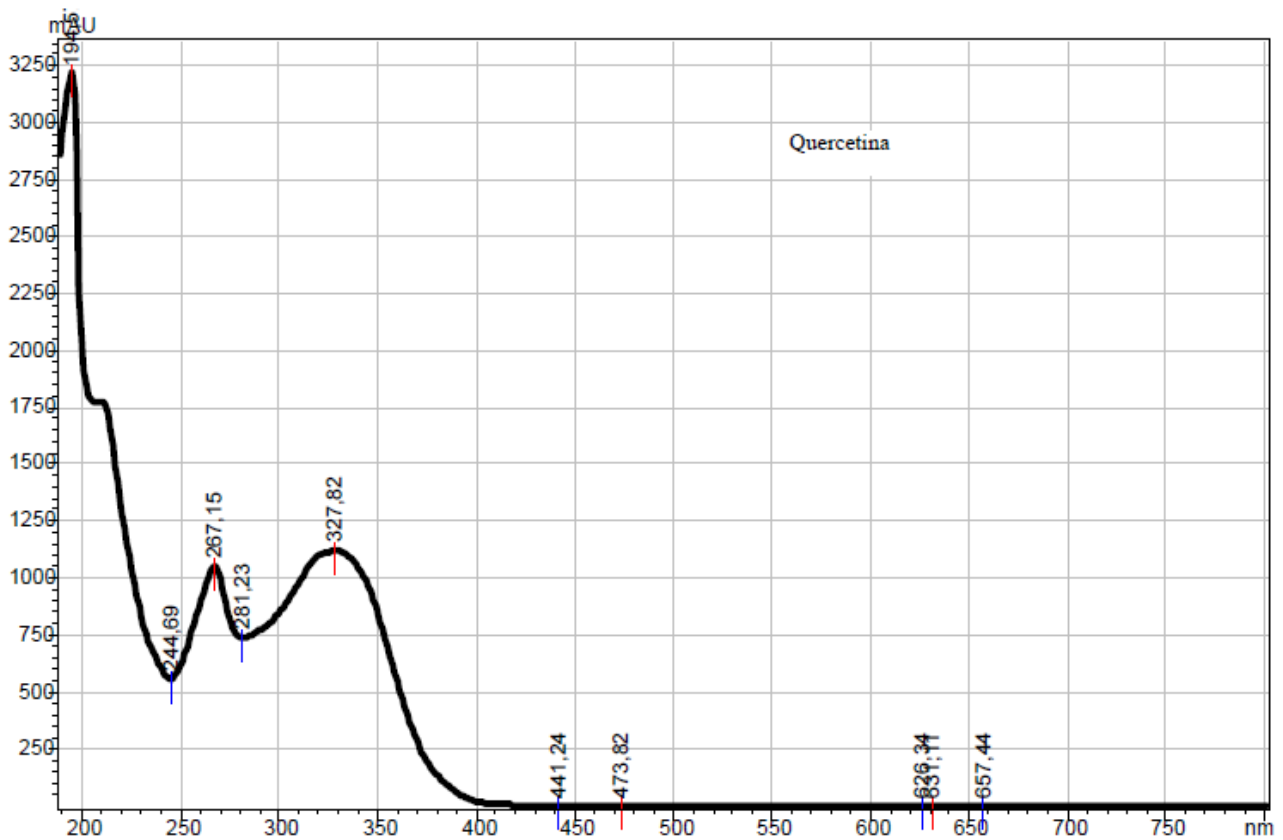


Figura VI.11. Espectro de un estándar de referencia de quercetina en metanol en el rango de longitudes de onda UV

VI.3. SECCIÓN C: ESTUDIO DE REPORTES ACERCA DE LOS EFECTOS BIOLÓGICOS ASOCIADOS A DIFERENTES PREPARACIONES Y COMPUESTOS DEL AJO

Una **revisión** sistemática, comúnmente llamada “*review*”, permite al investigador sintetizar y evaluar críticamente una serie de estudios en un contexto específico para proporcionar conclusiones basadas en la evidencia. Comparativamente, en la cima de la cadena jerárquica de evidencia se encuentra el **meta-análisis**, en el que se realiza una revisión sistemática y luego se emplean métodos estadísticos para agrupar cuantitativamente los resultados de un número seleccionado de estudios en un contexto específico (Akhter, Pauyo, & Khan, 2019). Con el fin último de discutir de una manera asertiva acerca del potencial real funcional de las preparaciones de ajo, en relación al contenido de fitoquímicos presentes en cada matriz, es que se llevó a cabo un estudio sistematizado de la evidencia disponible.

METODOLOGÍA DE BÚSQUEDA, SELECCIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LA INFORMACIÓN

Para llevar a cabo este estudio se realizó una búsqueda bibliográfica sistemática en Google Scholar, PubMed y ScienceDirect considerando publicaciones relevantes, ya sean meta-análisis o revisiones, desde el año 2007 hasta el año 2018 (año de envío de la publicación del artículo relacionado a esta sección). En casos puntuales, se consideraron artículos previos a estas fechas, debido a la relevancia de sus resultados y al no encontrar información actualizada. Utilizamos los siguientes encabezados de temas médicos y palabras clave: "ajo", "*Allium sativum*", "garlic powder (ajo en polvo)", "cooked garlic (ajo cocido)", en relación a los siguientes efectos biológicos: anticarcinogénesis, prevención del riesgo cardiovascular, hipolipidémico, hipocolesterolémico, antioxidante, disminución de la presión arterial y prebiótico.

Se dio prioridad a ensayos clínicos aleatorios (Randomized Clinical Trials) en seres humanos. Luego se clasificaron las conclusiones obtenidas de cada meta-análisis o revisiones según el nivel de evidencia del efecto biológico estudiado:

- 0- No hay evidencia
- 1- Evidencia muy escasa (asociada sólo a ensayos individuales *in vitro*)
- 2- Evidencia contradictoria (resultados positivos y negativos)
- 3- Evidencia insuficiente, pero consistente (revisiones de ensayos clínicos, pero falta de evidencia de meta-análisis)
- 4- Evidencia suficiente y consistente (acerca de meta-análisis RCT)

RESULTADOS

Tabla VI.3. Nivel de evidencia acerca de los principales efectos biológicos asociados a preparaciones a base de ajo crudo y cocido

Compuestos	Preparación de ajo	Anticarcinogénico	Prevención del Riesgo Cardiovascular	Hipolipidémico	Hipocolesterolémico	Antioxidante	Disminución de la Pr Arterial	Prebiótico	Concentración encontrada en el presente trabajo*	Referen
Alicina	Polvo de ajo	2	3	3	4	2	4	0	2079,665	
E-Z ajoeno	Polvo de ajo	1	0	1	0	1	0	0	77,17	
2VD	Polvo de ajo	0	0	1	0	0	0	0	0	
DAS	Polvo de ajo	3	1	1	0	1	0	0	0,302	
DADS	Polvo de ajo	3	1	1	0	1	0	0	0	
Camferol	Polvo de ajo	1	0	0	0	1	0	0	1169,4	
Miricetina	Polvo de ajo	0	0	0	0	0	0	0	5525,94	
Quercetina	Polvo de ajo	3	1	2	0	3	0	0	951,56	
Inulina	Polvo de ajo	3	3	3	3	3	0	4	46630	
Alicina	Ajo cocido	0	0	0	0	0	0	0	0	
E-Z ajoeno	Ajo cocido	3	3	3	1	2	0	0	28,67	
2VD	Ajo cocido	1	3	3	1	2	0	0	26,357	
DAS	Ajo cocido	4	3	3	1	3	0	0	0,768	
DADS	Ajo cocido	4	3	3	1	3	0	0	0	
Camferol	Ajo cocido	3	0	0	0	2	0	0	228,191	
Miricetina	Ajo cocido	0	0	0	0	2	0	0	291,768	
Quercetina	Ajo cocido	3	1	3	0	3	0	0	108,747	
Inulina	Ajo cocido	1	1	1	1	1	1	1	40950	

* Concentración en ppm

REFERENCIAS A:

(Ackermann et al., 2001; Ali, Khanafer, & Mustafa, 2000; Aliasgharzadeh, Khalili, Mirtaheri, & Gargari, 2015; Amagase, 2006; Aruoma et al., 1997; Atkin, Laight, & Cummings, 2016; Banerjee & Maulik, 2002; Brace, 2002; Causey et al., 2000; Durak et al., 2004; Fotiadis, Stoidis, & Spyropoulos, 2008; Kaschula, Hunter, & Iqbal Parker, 2010; Khoo & Aziz, 2009; Koseoglu, Isleten, Atay, & Kaplan, 2009; Pittler & Ernst, 2007; Reinhart, Talati, White, & Coleman, 2009; Ried, 2016; Rohner et al., 2015; Shouk, Abdou, Shetty, Sarkar, & Eid, 2014; Silagy & Neil, 1994; Szulińska et al., 2018; Turati, Pelucchi, Guercio, & Vecchia, 2015; Warshafsky, Kamer, & Sivak, 1993; Xiong et al., 2015; Zeng et al., 2012)

REFERENCIAS B:

(Banerjee & Maulik, 2002; Bozin et al., 2008; Corzo-Martinez et al., 2007; Gorinstein et al., 2006; Guercio, Galeone, Turati, & La Vecchia, 2014; Jastrzebski et al., 2007; D. A. Locatelli et al., 2017; Nuutila, Puupponen-Pimiä, Aarni, & Oksman-Caldentey, 2003; Omar, 2010; Park, Park, & Park, 2009; Turati et al., 2015)

Con la información recabada de este estudio fue que luego se construyeron los modelos estadísticos de Componentes Principales mostrados en el **capítulo II, sección II.5.1.2.1.**, donde se discutió además las implicancias de los mismos.

VI.4. **SECCIÓN D: ESTUDIO DE LA BIOACCESIBILIDAD DE COMPUESTOS ORGANOAZUFRADOS DERIVADOS DEL AJO Y SUS PREPARACIONES**

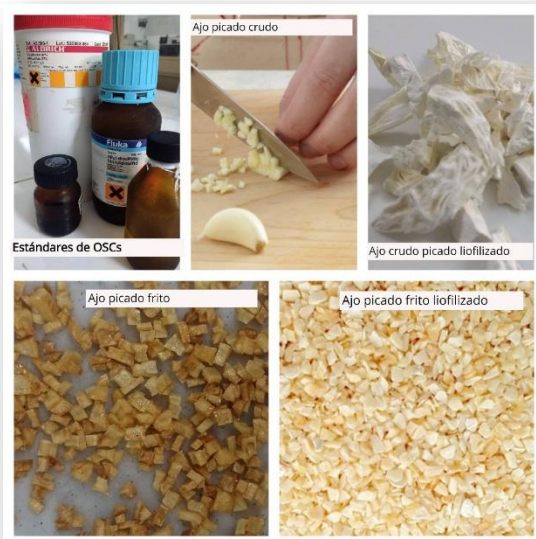
En el presente trabajo de Tesis, con el fin de dar luz a interrogantes relacionados con la biodisponibilidad de compuestos bioactivos de productos a base de ajo, se ha hecho foco sobre la etapa de absorción de los fitoquímicos debido a la relevancia de dicho proceso en la disposición final de los compuestos en el organismo. Aquí, hicimos hincapié en la interpretación mecanística-molecular del proceso de permeabilidad celular. Para adentrarnos aún más en lo que es biodisponibilidad, la información discutida en el capítulo III se puede complementar además con otros estudios que den cuenta de los fenómenos que suceden previo a la etapa de absorción. Es en este punto que la bioaccesibilidad toma relevancia, siendo este término definido como la fracción de un compuesto que es liberada de su matriz al tracto gastrointestinal (TGI) y por lo tanto, está disponible para la absorción intestinal. Para llevar a cabo estudios de bioaccesibilidad, los ensayos de

digestión gastrointestinal *in vitro* son normalmente aplicados. En el caso de los compuestos del ajo, su comportamiento durante la digestión GI todavía resta estudiarse exhaustivamente. En este sentido, en un trabajo colaborativo de nuestro grupo de investigación, logramos responder cuestionamientos acerca de cómo influye el proceso de digestión gastrointestinal en la bioeficacia de los compuestos organosulfurados del ajo, particularmente estudiando el efecto de la matriz alimentaria en la liberación y estabilidad en fluidos digestivos, de los compuestos bajo estudio. Dicho trabajo fue aceptado para publicar el año 2020 en la revista LWT, y se encuentra publicado bajo el título “*Matrix effect on phytochemical bioaccessibility. The case of organosulfur compounds in garlic preparations*” (doi: 10.1016/j.lwt.2020.110301).

Las conclusiones aportadas de este artículo sientan precedente para seguir ahondando en las implicancias moleculares y los parámetros físico-químicos que rigen los comportamientos de estos compuestos bioactivos bajo el efecto de la digestión GI. Es en este sentido que se está trabajando en la actualidad sobre la construcción de modelos *in silico* acerca de la bioaccesibilidad de los OSCs. Resultados que se encuentran en este momento bajo revisión.

A modo de resumen, se muestran seguidamente los resultados del artículo discutido en esta sección.

METODOLOGÍA EMPLEADA



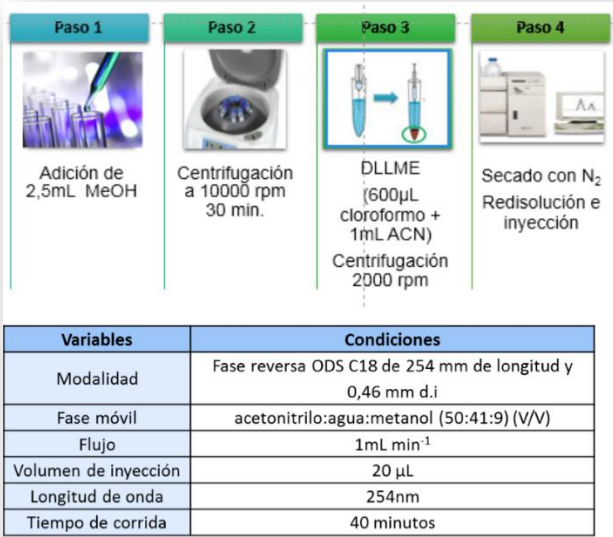
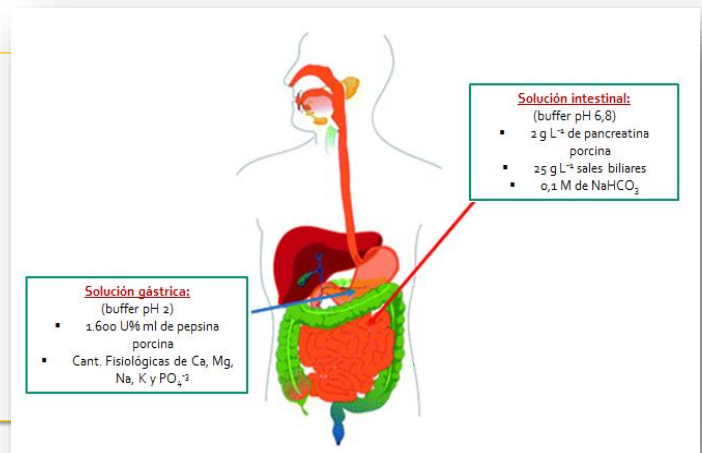
1- PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE AJO

Se prepararon siete muestras a analizar:

- Estándar de alicina
- Ajo picado crudo
- Ajo picado crudo liofilizado
- Ajo Picado Frito
- Ajo Picado Frito Liofilizado
- Ajo Picado Frito Liofilizado + OSCs spikeados

2- DIGESTIÓN *IN VITRO*

Determinación de OSCs en fluido gastrointestinal: 5 mL sol. gástrica + 0,5 g de muestras liofilizadas o 1,5 g de muestra fresca en 1,5 mL de agua destilada → Se deja a 37° 1 h → ajuste de pH a 5 → 3 mL sol. Intestinal → Se deja a 37° 2 h



3- EXTRACCIÓN OSCS Y DETERMINACIÓN ANALÍTICA

Con los resultados analíticos se determinó:

$$\text{Estabilidad [\%]} = \frac{\text{Cantidad remanente } [\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}]}{\text{Cantidad inicial } [\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}]} \cdot 100$$

$$\text{Bioaccesibilidad [\%]} = \frac{\text{cantidad accesible } [\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}]}{\text{cantidad inicial } [\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}]} \cdot 100$$

Figura VI.12. Esquema resumido de la metodología empleada para el estudio de la digestión gastrointestinal *in vitro* de OSCs en diferentes preparaciones de ajo

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En primer lugar se analizó la estabilidad digestiva de los OSCs bajo estudio en las distintas matrices. Con respecto a la estabilidad de la alicina, trabajos previos han reportado que dada su naturaleza reactiva en los fluidos digestivos, parte de su concentración inicial podría terminar descomponiéndose en nuevos compuestos volátiles como polisulfuros, ajoenos y vinilditinas; también puede sufrir reacciones con cisteínas de proteínas para formar S-alil mercaptocisteína y alil mercaptano

Sin embargo, a pesar de esta naturaleza reactiva, los resultados de nuestro trabajo (**Tabla VI.5.**) mostraron que cuando la matriz alimentaria está presente en el medio digestivo (ajo crudo picado y ajo en polvo liofilizado), hay un aumento en la estabilidad de la alicina. En la **Tabla VI.4.** se pudo observar una notable diferencia entre las muestras sin matriz en el medio digestivo y las muestras en las que los OSCs estaban contenidos en la matriz alimentaria. Por lo tanto, podríamos postular que, como en el caso de la alicina, se puede observar un efecto protector sobre la estabilidad de los OSCs, que puede ser el resultado de la interacción entre los fitoquímicos con los componentes de la matriz alimentaria.

Examinando la bioaccesibilidad de la alicina, que se refiere a la cantidad liberada del compuesto de la matriz vegetal a los fluidos digestivos, se observó que el ajo en polvo presentó el valor más alto (64%). Como ya se discutió anteriormente para la estabilidad de alicina en polvo de ajo, el tamaño de partícula de la matriz aumentaría la bioaccesibilidad fitoquímica en general (Alminger et al., 2014; Lemmens, Van Buggenhout, Van Loey, & Hendrickx, 2010; Palafox-Carlos, Ayala-zavala, & González-Aguilar, 2011; Parada & Aguilera, 2007). Este fenómeno, junto con el efecto de protección de los componentes extraídos de la matriz contribuiría a mejorar el rendimiento digestivo general del polvo de ajo. Con respecto a la bioaccesibilidad, el ajo salteado mostró los niveles más altos, 10-74%, mientras que los estándares de OSCs y el aceite macerado presentaron valores más bajos, 1-21% y 0,9-11%, respectivamente. En el caso de los compuestos adicionados, su baja bioaccesibilidad podría explicarse por su inestabilidad digestiva sumado a una ligera interacción con la matriz del ajo. Por otro lado, el ajo salteado liofilizado presentó una mayor bioaccesibilidad que el ajo salteado sin liofilizar. En este caso, y de manera similar a lo observado para el polvo de ajo crudo, la modificación de la matriz por el proceso de liofilizado y molienda podría explicar el aumento de la bioaccesibilidad (McClements et al., 2015).

CONCLUSIONES

Estos ensayos nos permitieron concluir que la bioaccesibilidad y estabilidad de los analitos variaba significativamente en función de la matriz. Los OSCs presentes naturalmente en el vegetal eran más estables que los OSCs aislados y adicionados a las preparaciones de ajo. El efecto protector de la matriz sobre los OSCs de origen natural pudo deberse tanto a la interacción entre los fitoquímicos y los componentes de la matriz en los fluidos digestivos, como a la disposición de los compuestos dentro del tejido vegetal.

Tabla VI.4. Comportamiento digestivo de OSCs ajenos, 2-VD y polisulfuros en diferentes preparaciones de ajo

Muestra	Ajoeno			2-vinilditiina			Dialil sulfuro			Dialil	
	Cantidad bioaccesible [$\mu\text{g g}^{-1}$]	Bioaccesibilidad [%]	Estabilidad[%]	Cantidad bioaccesible [$\mu\text{g g}^{-1}$]	Bioaccesibilidad [%]	Estabilidad[%]	Cantidad bioaccesible [$\mu\text{g g}^{-1}$]	Bioaccesibilidad [%]	Estabilidad[%]	Cantidad bioaccesible [$\mu\text{g g}^{-1}$]	Bioaccesibilidad [%]
OSCs estándares	25,4 ± 0,2	9,2	9,2	114 ± 1	20	20	3,26 ± 0,22	1,1	1,1	9,09 ± 0,01	
OSCs agregados a ajo frito liofilizado	57,0 ± 1,7	7,1	11	32,0 ± 1,8	4,7	15	8,86 ± 0,14	1,1	3,0	8,19 ± 0,11	
Ajo frito liofilizado	15,0 ± 0,1	52	71	6,80 ± 0,04	60	100	-	-	-	5,15 ± 0,32	
Ajo frito fresco	2,59 ± 0,32	74	74	2,73 ± 0,36	17	66	2,12 ± 0,22	10	86	24,6 ± 0,6	
Aceite macerado de ajo	1,17 ± 0,26	2,5	27	8,47 ± 0,03	4,4	100	0,3 ± 0,13	0,86	74	1,62 ± 0,24	

Muestra	Ajoeno			2-vinilditiina			Dialil sulfuro		
	Cantidad bioaccesible [$\mu\text{g g}^{-1}$]	Bioaccesibilidad [%]	Estabilidad[%]	Cantidad bioaccesible [$\mu\text{g g}^{-1}$]	Bioaccesibilidad [%]	Estabilidad[%]	Cantidad bioaccesible [$\mu\text{g g}^{-1}$]	Bioaccesibilidad [%]	Estabilidad[%]
OSCs estándares	25,4 ± 0,2	9,2	9,2	114 ± 1	20	20	3,26 ± 0,22	1,1	1,1
OSCs agregados a ajo frito liofilizado	57,0 ± 1,7	7,1	11	32,0 ± 1,8	4,7	15	8,86 ± 0,14	1,1	3,0
Ajo frito liofilizado	15,0 ± 0,1	52	71	6,80 ± 0,04	60	100	-	-	-
Ajo frito fresco	2,59 ± 0,32	74	74	2,73 ± 0,36	17	66	2,12 ± 0,22	10	86
Aceite macerado de ajo	1,17 ± 0,26	2,5	27	8,47 ± 0,03	4,4	100	0,3 ± 0,13	0,86	74

Compuestos	Preparación de ajo	Anticarcinogénico	Prevención del Riesgo Cardiovascular	Hipolipidémico	Hipocolesterolémico	Antioxidante	Disminución
Alicina	Polvo de ajo	2	3	3	4	2	

E-Z ajoeno	Polvo de ajo	1	0	1	0	1
2VD	Polvo de ajo	0	0	1	0	0
DAS	Polvo de ajo	3	1	1	0	1
DADS	Polvo de ajo	3	1	1	0	1
Camferol	Polvo de ajo	1	0	0	0	1
Miricetina	Polvo de ajo	0	0	0	0	0
Quercetina	Polvo de ajo	3	1	2	0	3
Inulina	Polvo de ajo	3	3	3	3	3
Alicina	Ajo cocido	0	0	0	0	0
E-Z ajoeno	Ajo cocido	3	3	3	1	2
2VD	Ajo cocido	1	3	3	1	2
DAS	Ajo cocido	4	3	3	1	3
DADS	Ajo cocido	4	3	3	1	3
Camferol	Ajo cocido	3	0	0	0	2
Miricetina	Ajo cocido	0	0	0	0	2
Quercetina	Ajo cocido	3	1	3	0	3
Inulina	Ajo cocido	1	1	1	1	1

* Concentración en ppm

Tabla VI.5. Comportamiento digestivo de la alicina en diferentes preparaciones de ajo

Muestra	Alicina		
	Cantidad bioaccesible [$\mu\text{g g}^{-1}$]	Bioaccesibilidad [%]	Estabilidad[%]
Alicina estándar	738 \pm 9	17	17
Homogenato de ajo crudo	1988 \pm 120	24	24
Ajo picado fresco	212 \pm 17	13	28



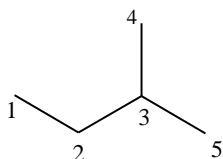
Polvo de ajo liofilizado	3745 ± 51	64	78
-------------------------------------	-----------	----	----

VI.5. SECCIÓN E: FUNDAMENTO Y CÁLCULO DE DESCRIPTORES TOPOLÓGICOS

Todos los **índices topológicos** (ITs) son derivados de grafos moleculares, como se mencionó en el Capítulo III. Éstos codifican diferentes propiedades específicas como la adyacencia o la conectividad de átomos en una molécula, y más generales como el tamaño y peso molecular, la forma, la simetría, el grado de ramificación y la ciclicidad. Adicionalmente, tienen la capacidad de considerar propiedades químicas específicas de los átomos, como la presencia de átomos electroatrayentes o electrodonadores de electrones, la polarizabilidad y la masa atómica. En general, los ITs se enfocan en cuantificar principalmente las distancias entre átomos calculados por el número de enlaces intermedios, por lo tanto se consideran índices de enlace directo (Reyes, 2020).

En el ejemplo siguiente se muestran representaciones de estructuras como grafos y matrices topológicas:

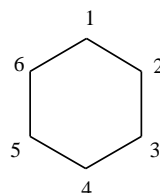
Isopentano



δ_i

$$\begin{array}{c|c} \begin{vmatrix} 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 1 & 1 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \end{vmatrix} & \begin{array}{c} 1 \\ 2 \\ 3 \\ 1 \\ 1 \end{array} \end{array}$$

Ciclohexano



δ_i

$$\begin{array}{c|c} \begin{vmatrix} 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 1 \\ 1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 1 \\ 1 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 \end{vmatrix} & \begin{array}{c} 2 \\ 2 \\ 2 \\ 2 \\ 2 \\ 2 \end{array} \end{array}$$

La valencia δ_i de cada vértice es el número de ejes que convergen en él (es igual a la suma de los términos que hay en la fila o columna correspondiente a dicho vértice).

A partir de la Matriz Topológica y de los algoritmos adecuados, se obtienen los índices topológicos. Estos índices son descriptores numéricos de la estructura molecular y deben ser lo más discriminante posible. A seguir se describen algunos índices topológicos.

- **Índice de Wiener:** este fue el primer índice topológico útil para caracterizar la “ramificación” de un grafo molecular. El cálculo del índice se basa en la matriz de distancia del grafo y se calcula por medio de la siguiente ecuación:

$$W = w + P$$

siendo W el índice de Wiener, w es el número de Wiener y P es el número de pares de vértices separados por 3 ejes. El número de Wiener, w, se calcula por la siguiente ecuación: $w = \sum_i^n$

$\sum_j^n d(i + j)$, donde d_{i+j} son los elementos de la matriz de distancia de la molécula.

- **Índices de Conectividad Molecular:** Para poder definirlos es necesario introducir el concepto de *Subgrafo (Si)*. Este es cualquier parte de un grafo constituido por sus vértices o bien por uno o varios ejes interconectados. Los subgrafos se clasifican según su:

-Orden (n): número de ejes del *Si*. Los enlaces múltiples se consideran como un solo eje.

-Tipo (t). Estos se dividen en:

- Path (p): subgrafos cuyos vértices tiene valencia 1 y 2, sin formar un ciclo.
- Cluster (c): subgrafos que contienen algún vértice con valencia 3 ó 4, pero ninguno con valencia 2, y sin formar un ciclo.
- Path-Cluster (pc): subgrafos que incluyen vértices con valencia 2, además de algunos con valencias 3 ó 4, sin formar un ciclo.
- Chain (ch): subgrafos que contienen algún ciclo.

Los índices de conectividad molecular, ${}^n\chi_t$, corresponden en cada caso a la suma, para todos los subgrafos moleculares de tipo t y orden n:

$${}^n\chi_t = \sum_j^n {}^nS_j$$

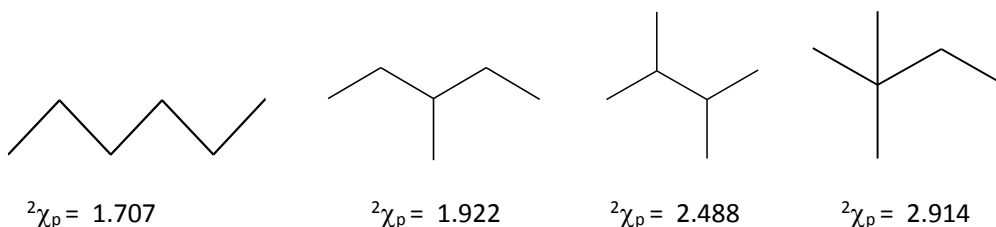
$${}^nS_j = \prod_j [(\delta i)_j]^{-1/2}$$

En el caso de moléculas con heteroátomos es necesario introducir un valor para la valencia del heteroátomo.

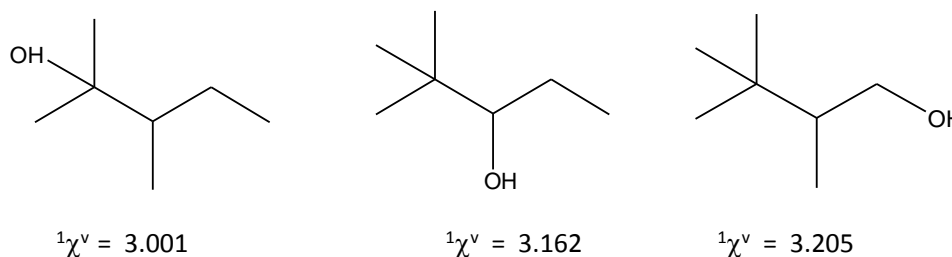
En este caso se reemplaza $(\delta i)_j$ por el delta de valencia $[(\delta i)_j]^v$ donde:

$$[(\delta i)_j]^v = Z^v - H / Z - Z^v - 1$$

siendo Z^v es el número de electrones de valencia, H es el número de átomos de H y Z es el número atómico. Estos índices codifican diferentes características estructurales de las moléculas tales como el tamaño molecular, grado de ramificación, posición e influencia de los heteroátomos y el grado de ciclicidad (Camargo, 2007). A continuación se muestran algunos ejemplos con el objeto de ilustrar el tipo de información que codifican esta familia de índices:



como puede observarse para estos isómeros del n-hexano, el valor del ${}^2\chi_p$ aumenta a medida que aumenta el grado de ramificación. En el siguiente ejemplo con un grupo de alcoholes, se puede observar como el ${}^1\chi^v$ de valencia codifica la posición del -OH en la molécula:



- **Índices Geométricos:** Proporcionan una descripción geométrica de la estructura molecular :
 - L- longitud del grafo. Separación, por el camino más corto, entre los vértices más alejados de la cadena principal.
 - R- número total de ramificaciones de vértices con valencia 3.
 - PR0- pares de ramificaciones convergentes en el mismo vértice.
 - PR1- pares de ramificaciones adyacentes.
 - PR2- pares de ramificaciones separadas por dos enlaces.
 - PR3- pares de ramificaciones separadas por tres enlaces.
 - E- factor de forma. Equivale a asimilar la molécula a una elipse. Se calcula de la siguiente manera:

$$E = \sum_i ni.di / L$$

donde di es la distancia de los vértices a la cadena principal. L es la longitud del grafo y ni es el átomo o vértice i de la molécula.

S- superficie molecular topológica, calculada como $S = E \cdot L^2$

- **Índices de Carga:** Los índices de carga se han desarrollado para caracterizar la distribución de carga en la molécula. Estos se calculan a partir de la matriz producto (M) de la matriz topológica (A) por la matriz del inverso al cuadrado de las distancias (D^*). Por ejemplo para el n-butano:

$$A = \begin{vmatrix} 0 & 1 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 1 \\ 0 & 0 & 1 & 0 \end{vmatrix} \quad D^* = \begin{vmatrix} 0 & 1 & 1/4 & 1/9 \\ 1 & 0 & 1 & 1/4 \\ 1/4 & 1 & 0 & 1 \\ 1/9 & 1/4 & 1 & 0 \end{vmatrix} \quad M = A \times D^* = \begin{vmatrix} 1 & 0 & 1 & 1/4 \\ 1/4 & 2 & 1/4 & 10/9 \\ 10/9 & 1/4 & 2 & 1/4 \\ 1/4 & 1 & 0 & 1 \end{vmatrix}$$

De esta manera se sabe quién transfiere la carga a quién dentro de la molécula. Los términos de carga son: $T_{cij} = m_{ij} - m_{ji}$, siendo m los términos de la matriz producto. Los índices de carga se generan a partir de sumar los valores absolutos de los términos de carga para los vértices que estén a una determinada distancia (por ejemplo, a distancia 1 entonces tenemos el G_1 , a distancia 2 obtenemos el G_2 , etc):

$$G_i = \sum_j |T_{cij}| \quad \text{a partir de estos, se definen otros índices como } J_i = G_i / N-1$$

En el presente trabajo de tesis los índices topológicos fueron calculados mediante los programas Dragon v.3.0. y mediante la aplicación disponible online OCHEM.

VI.6. SECCIÓN F: DOMINIO DE APLICABILIDAD DE LOS MODELOS Y DATOS DE ABSORCIÓN INTESTINAL HUMANA (HIA) CALCULADA A PARTIR DE preADMET

En esta sección evaluamos la confiabilidad de los datos obtenidos por la *webserver* preADMET en relación con nuestro set de 28 OSCs (**Tabla III.1.**). Con base en el conjunto de datos de HIA Zhao et al., 2001, -241 moléculas- utilizadas para construir el modelo HIA-QSAR que sirve de sustento para los valores predichos del servidor web preADMET, calculamos para este set varios descriptores como nHBAcc; nHBDOn; MLogP; McGowan_Volume; TopoPSA; MW (Peso Molecular); AMW; y XLogP. También calculamos estos parámetros correspondientes a nuestro conjunto de OSCs. Luego realizamos un Análisis de Componentes Principales para evaluar la pertenencia de nuestro set de compuestos al espacio predictor generado por los datos de preADMET.

Nota: La optimización 3D para todos los compuestos (conjunto de datos-HIA de Zao et. al y nuestros OSCs) se llevó a cabo utilizando OpenBabelGUI con el campo de fuerza MMFF94.

Los resultados se muestran a continuación:

Tabla VI.6. Eigenanálisis de la matriz de correlación (espacio predictor de HIA empleando datos de preADMET)

Variable	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8
Autovalor	32.527	26.997	10.352	0.4995	0.2864	0.1735	0.0455	0.0074
Proporción	0.407	0.337	0.129	0.062	0.036	0.022	0.006	0.001
Acumulado	0.407	0.744	0.873	0.936	0.972	0.993	0.999	1.000

Tabla VI.7. Autovectores del PCA (espacio predictor de HIA empleando datos de preADMET)

Variable	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8
nHBacc	0.470	-0.111	-0.040	0.008	-0.360	-0.752	-0.263	0.016
nHBDon	0.410	-0.222	0.266	-0.336	0.751	-0.133	0.127	0.016
MLogP	0.142	0.584	0.041	0.410	0.367	0.030	-0.576	-0.024
McGowan_Volume	0.419	0.322	-0.104	0.077	-0.115	0.156	0.383	0.721
TopoPSA	0.443	-0.231	-0.041	-0.315	-0.250	0.596	-0.480	-0.041
MW	0.441	0.232	-0.244	0.159	-0.054	0.113	0.438	-0.678
AMW	-0.024	-0.333	-0.862	0.166	0.304	-0.026	-0.099	0.127
XLogP	-0.157	0.525	-0.334	-0.748	0.009	-0.149	-0.063	-0.044

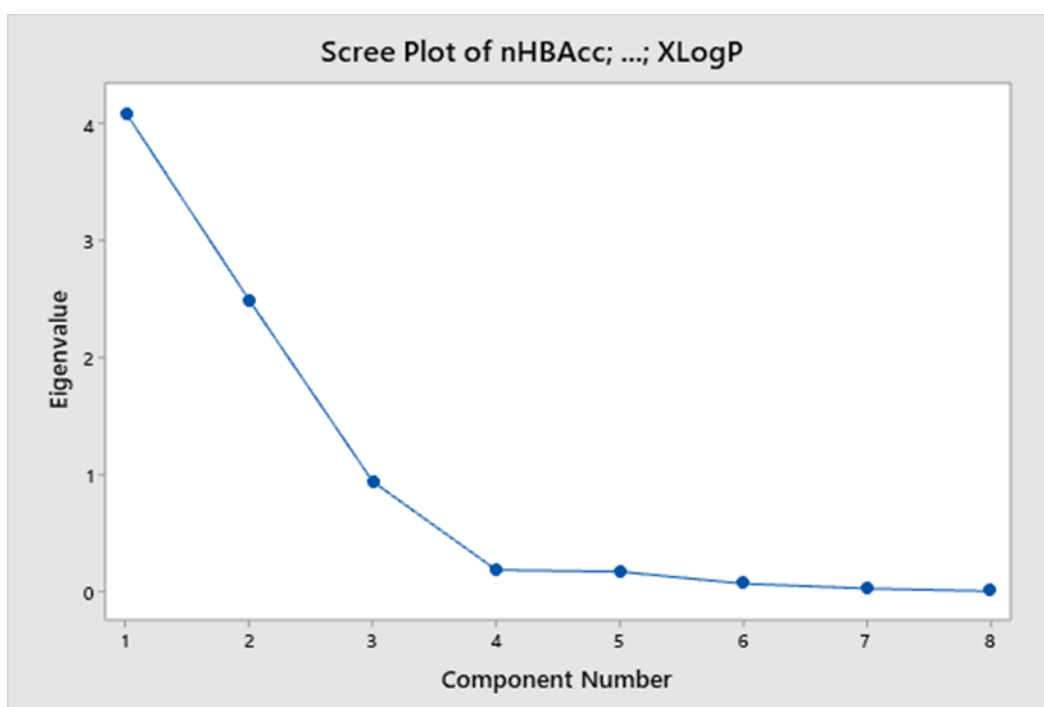


Figura VI.13. Gráfico de los autovalores del PCA para evaluar el espacio predictor de datos HIA en preADMET

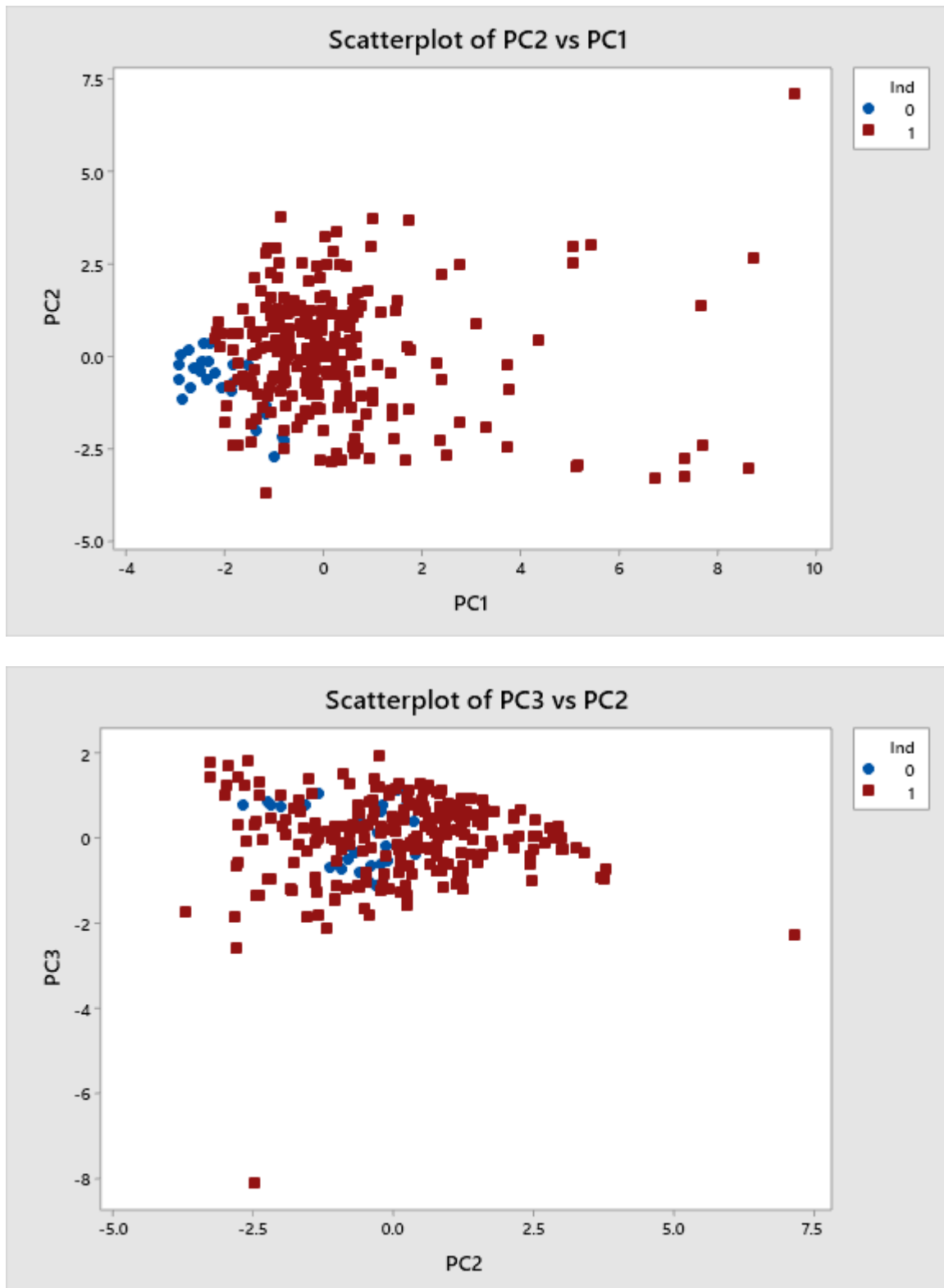


Figura VI.14. Scatter Plots del PCA para evaluar el espacio predictor de datos HIA en preADMET

Los puntos azules representan los OSCs.

Además, para estudiar la pertenencia de los valores de HIA de los OSCs al espacio predictor de preADMET se calculó la **distancia de Mahalanobis**, que mide la distancia desde cada punto en el espacio multivariado hasta la media general o el centroide, utilizando la estructura de covarianza de los datos. Minitab, el software estadístico utilizado, muestra una línea de referencia en el gráfico de valores atípicos para identificar aquellos con valores de distancia de Mahalanobis grandes. La línea de referencia se define mediante la siguiente fórmula:

Cuando $n - p - 1$ es 0, Minitab muestra el gráfico de valores atípicos sin la línea de referencia.

$$\sqrt{p \times F \text{ inversa } CDF (.95, p, n - p - 1)}$$

Notación: Y_i : vector de valor de datos en la fila; \bar{Y} : vector medio; S^{-1} : inversa de la matriz de covarianza; p : el número de variables; n : el número de filas que no faltan.

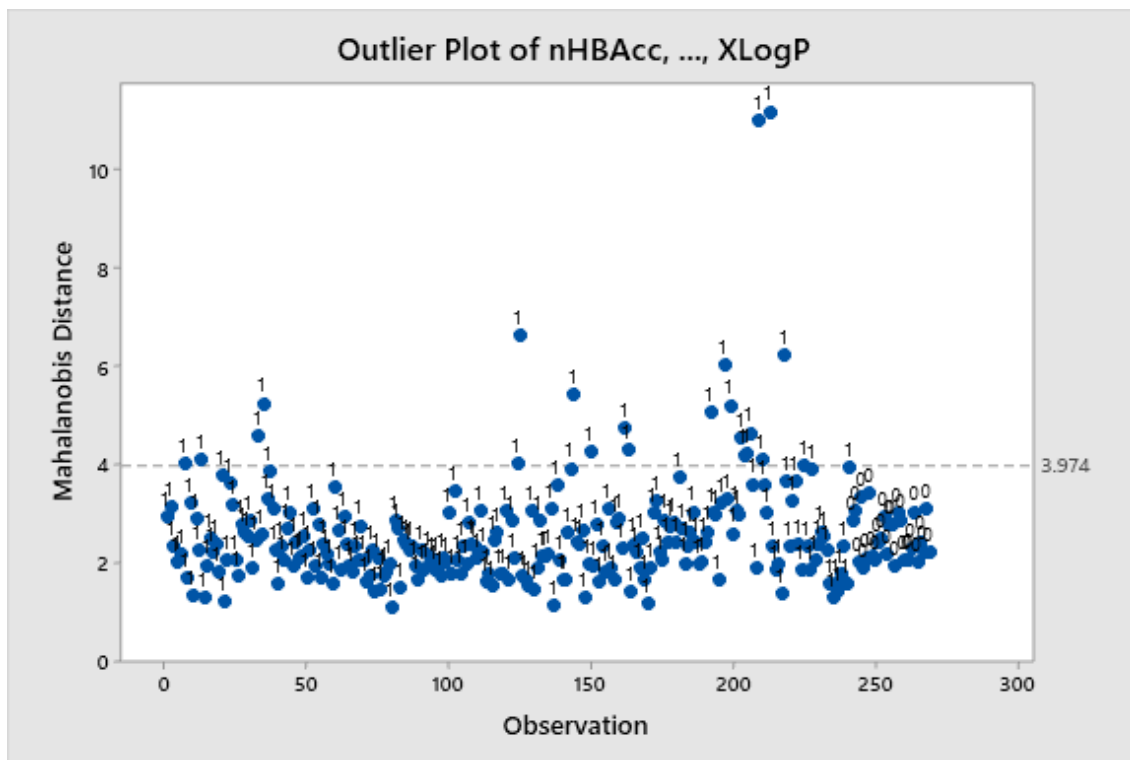


Figura VI.15. Gráfico de OUTLIERS para evaluar el espacio predictor de datos HIA en preADMET

Los 0 representan los OSCs de interés, mientras que los 1, son los 241 compuestos del espacio predictor (obtenidos de Zao et al., 2001), se puede observar que la distancia de Mahalanobis de los OSCs y los compuestos del espacio predictor no supera la línea de referencia.

VI.7. SECCIÓN G: DOMINIO DE APLICABILIDAD DE LOS MODELOS Y DATOS DE PERMEABILIDAD A TRAVÉS DE LA BARRERA HEMATO-ENCEFÁLICA (BBB) CALCULADA A PARTIR DE SwissADME

Evaluamos la confiabilidad de los datos de SwissADME en relación con nuestros OSCs. Con base en el conjunto de datos de Daina & Zoete, 2016 -260 moléculas- utilizadas para construir el modelo HIA-QSAR que soporta los valores de predicción del servidor web SwissADME, calculamos varios descriptores como nHBAcc; nHBDon; MLogP; McGowan_Volume; TopoPSA; MW; AMW; y XLogP. También calculamos estos parámetros correspondientes a nuestro conjunto de OSC. Luego realizamos un PCA. Nota: La optimización 3D para todos los compuestos (conjunto de datos BBB y OSC) se llevó a cabo utilizando OpenBabelGUI con el campo de fuerza MMFF94.

Los resultados se muestran a continuación:

Tabla VI.8. Eigenanálisis de la matriz de correlación (espacio predictor de BBB empleando datos de SwissADME)

Variable	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8
Autovalor	32.527	26.997	10.352	0.4995	0.2864	0.1735	0.0455	0.0074
Proporción	0.407	0.337	0.129	0.062	0.036	0.022	0.006	0.001
Acumulado	0.407	0.744	0.873	0.936	0.972	0.993	0.999	1.000

Tabla VI.9. Autovectores del PCA (espacio predictor de BBB empleando datos de SwissADME)

Variable	PC1	PC2	PC3
nHBAcc	0,314	0,424	-0,002
nHBDon	0,093	0,447	-0,349
MLogP	0,455	-0,293	-0,121
McGowan_Volume	0,550	-0,031	0,016
TopoPSA	0,151	0,543	0,074
MW	0,540	0,041	0,145
AMW	-0,082	0,209	0,881

XLogP	0,251	-0,440	0,247
-------	-------	--------	-------

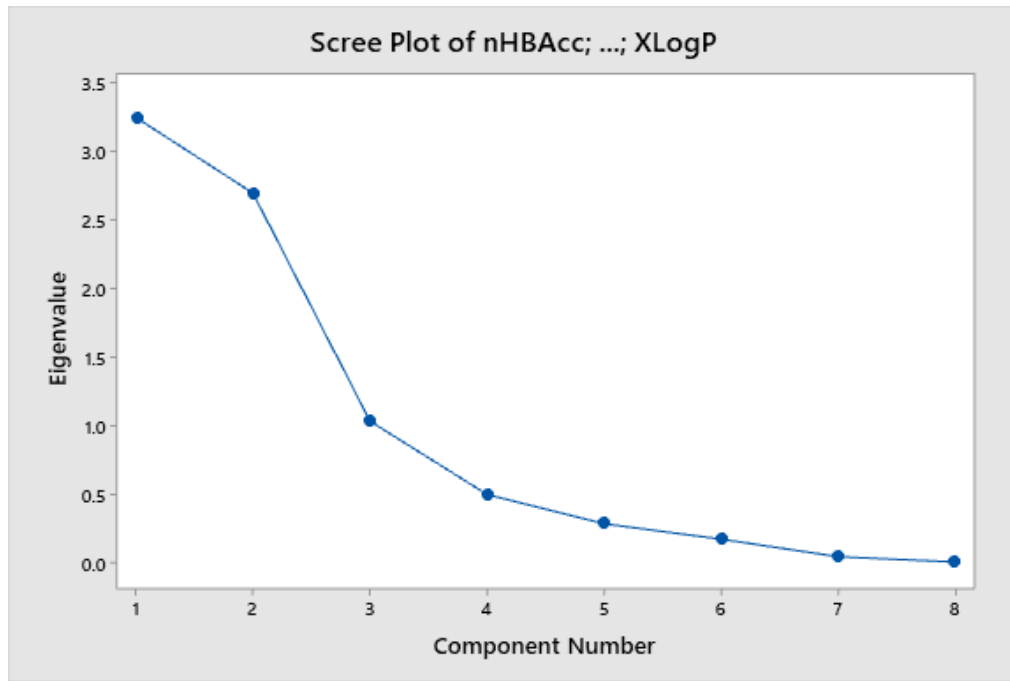


Figura VI.16. Gráfico de los autovalores del PCA para evaluar el espacio predictor de datos BBB en Swiss ADME

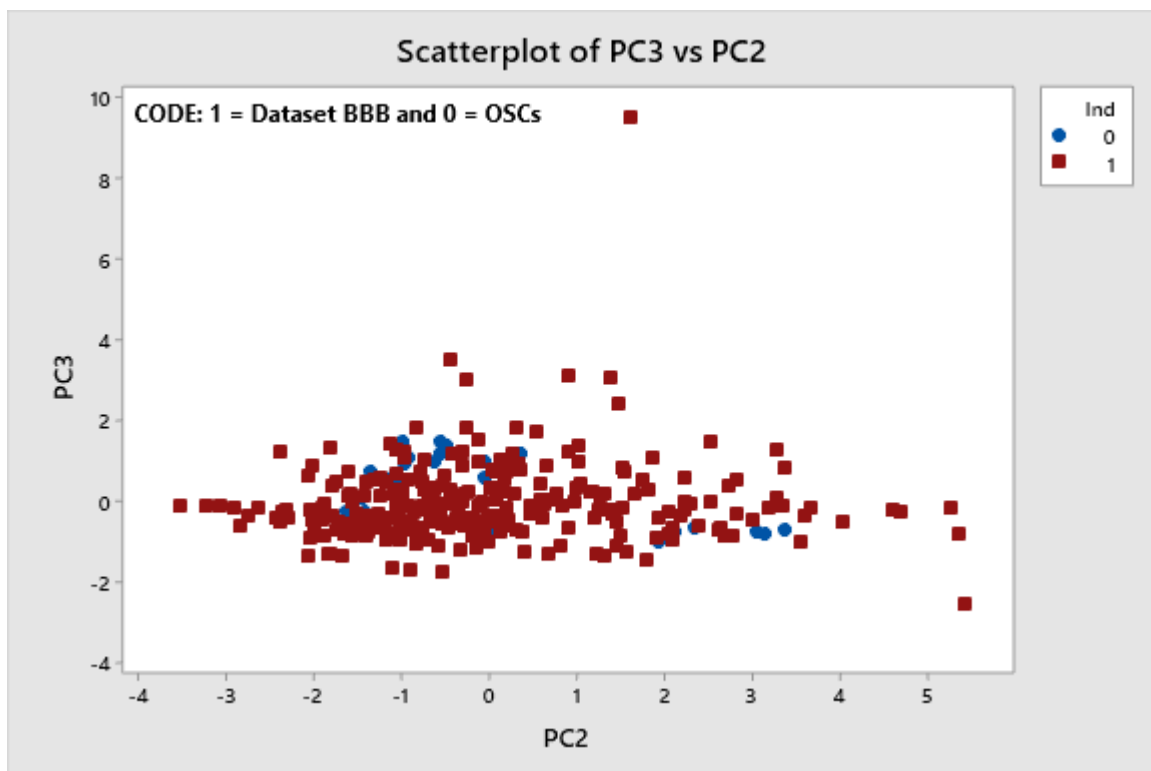
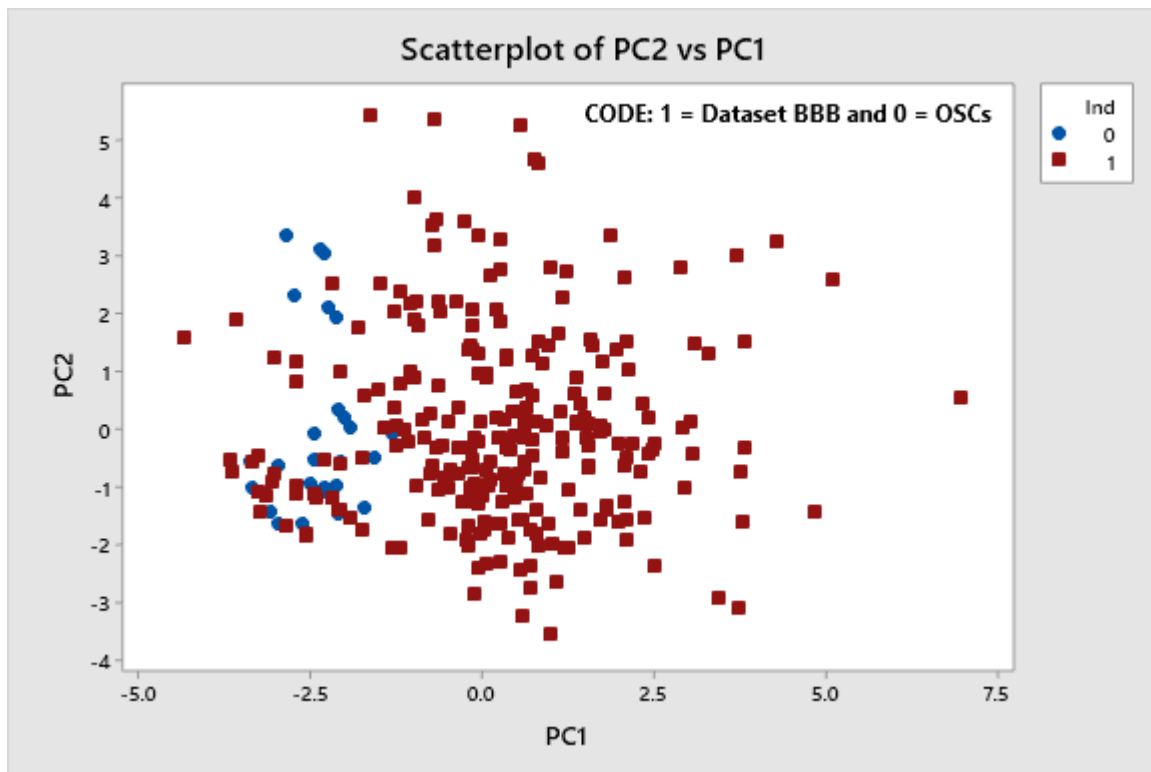


Figura VI.17. Scatter Plots del PCA para evaluar el espacio predictor de datos BBB en SwissADME

Los puntos azules representan los OSCs.

Además, para estudiar la pertenencia de los valores de HIA de los OSCs al espacio predictor de SwissADME se calculó la **distancia de Mahalanobis**.

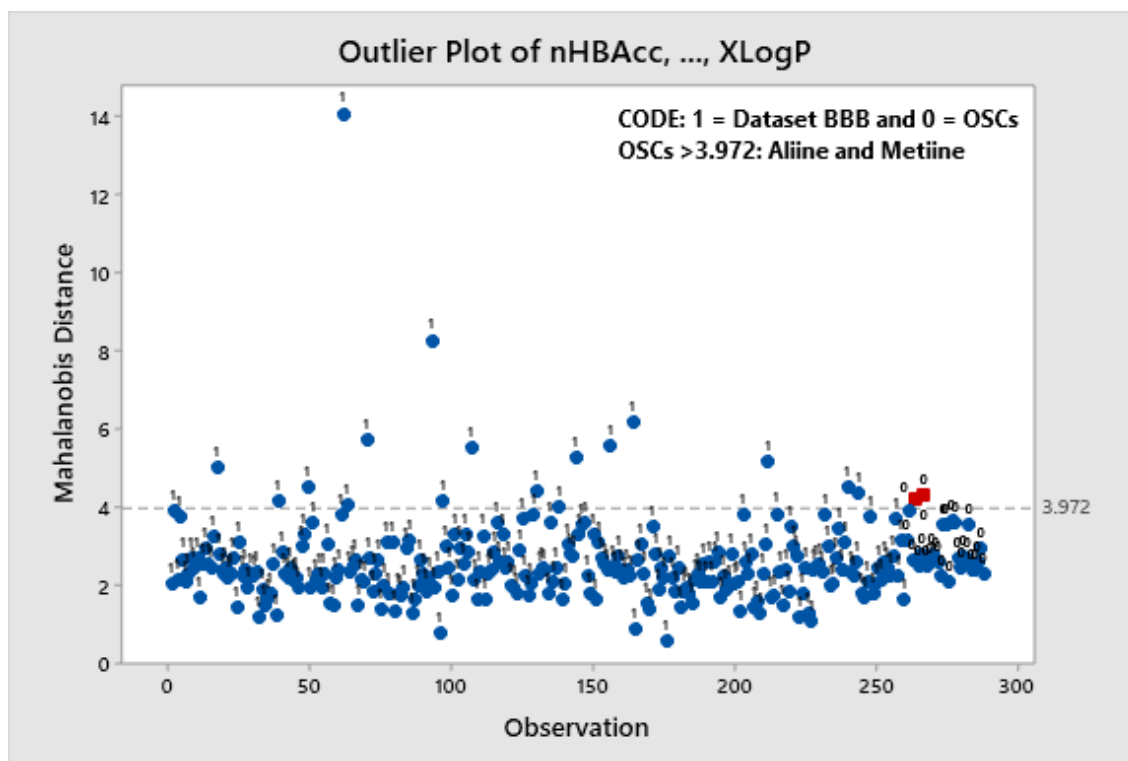


Figura VI.18. Gráfico de OUTLIERS para evaluar el espacio predictor de datos BBB en SwissADME

Los 0 representan los OSCs de interés, mientras que los 1, son los 260 compuestos del espacio predictor (obtenidos de Daina & Zoete, 2016), se puede observar que la distancia de Mahalanobis de los OSCs y los compuestos del espacio predictor no supera la línea de referencia.

VI.8. SECCIÓN H: DOMINIO DE APLICABILIDAD DE LOS MODELOS Y DATOS DE PERMEACIÓN EN PIEL (K_p) CALCULADA A PARTIR DE SwissADME

Evaluamos la confiabilidad de los datos de SwissADME en relación con nuestros OSC. Con base en el conjunto de datos de Kladt et al., 2018 -41 moléculas- utilizadas para construir el modelo HIA-QSAR que admite los valores de predicción del servidor web SwissADME, calculamos varios descriptores como nHBacc; nHBDon; MLogP; McGowan_Volume; TopoPSA; MW; AMW; y XLogP. También calculamos estos parámetros

correspondientes a nuestro conjunto de OSC. Luego realizamos un PCA. Nota: La optimización 3D para todos los compuestos (conjunto de datos K_p y OSC) se llevó a cabo utilizando OpenBabelGUI con el campo de fuerza MMFF94. Nota: La optimización 3D para todos los compuestos (conjunto de datos-HIA de Zao et. al y nuestros OSCs) se llevó a cabo utilizando OpenBabelGUI con el campo de fuerza MMFF94.

Los resultados se muestran a continuación:

Tabla VI.10. Eigenanálisis de la matriz de correlación (espacio predictor de K_p empleando datos de SwissADME)

Variable	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8
Autovalor	44.307	18.567	10.054	0.3225	0.2627	0.1053	0.0150	0.0017
Proporción	0.554	0.232	0.126	0.040	0.033	0.013	0.002	0.000
Acumulado	0.554	0.786	0.912	0.952	0.985	0.998	1.000	1.000

Tabla VI.11. Autovectores del PCA (espacio predictor de K_p empleando datos de SwissADME)

Variable	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8
nHBacc	0.433	0.185	0.140	0.104	-0.171	-0.833	-0.155	0.021
nHBDdon	0.348	0.316	0.227	-0.802	0.248	0.123	0.078	-0.034
MLogP	0.370	-0.420	-0.011	0.087	0.460	0.139	-0.665	0.080
McGowan_Volume	0.451	-0.190	-0.126	0.186	0.062	0.094	0.370	-0.749
TopoPSA	0.368	0.361	-0.184	0.093	-0.617	0.442	-0.339	0.022
MW	0.455	-0.118	-0.202	0.161	0.095	0.098	0.517	0.653
AMW	-0.093	0.299	-0.874	-0.119	0.279	-0.186	-0.094	-0.061
XLogP	0.001	-0.649	-0.273	-0.505	-0.476	-0.152	-0.010	0.022

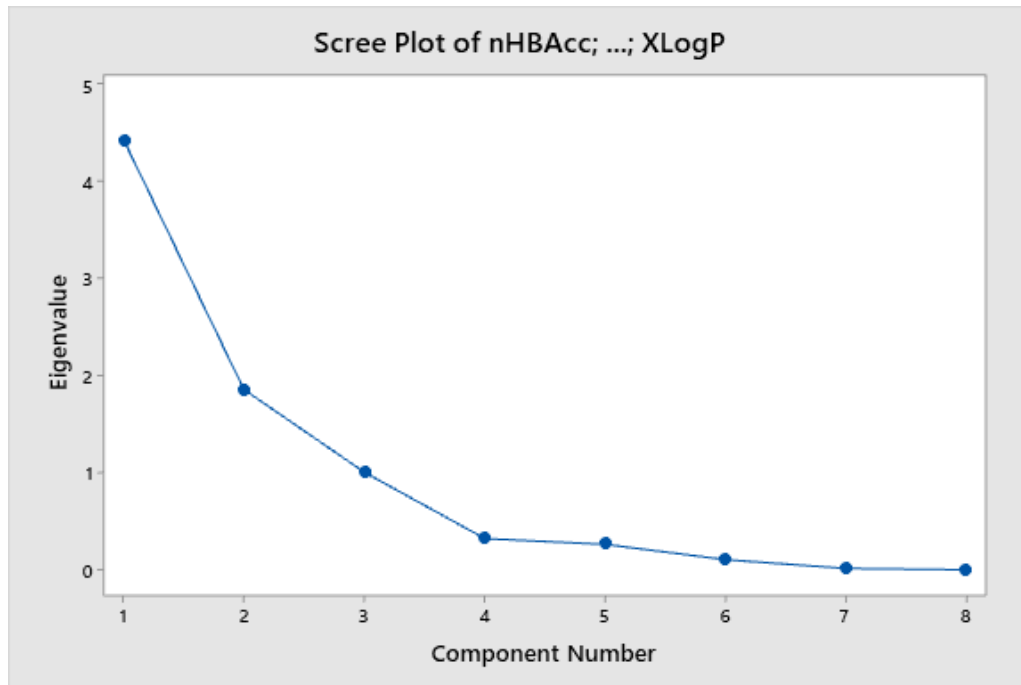
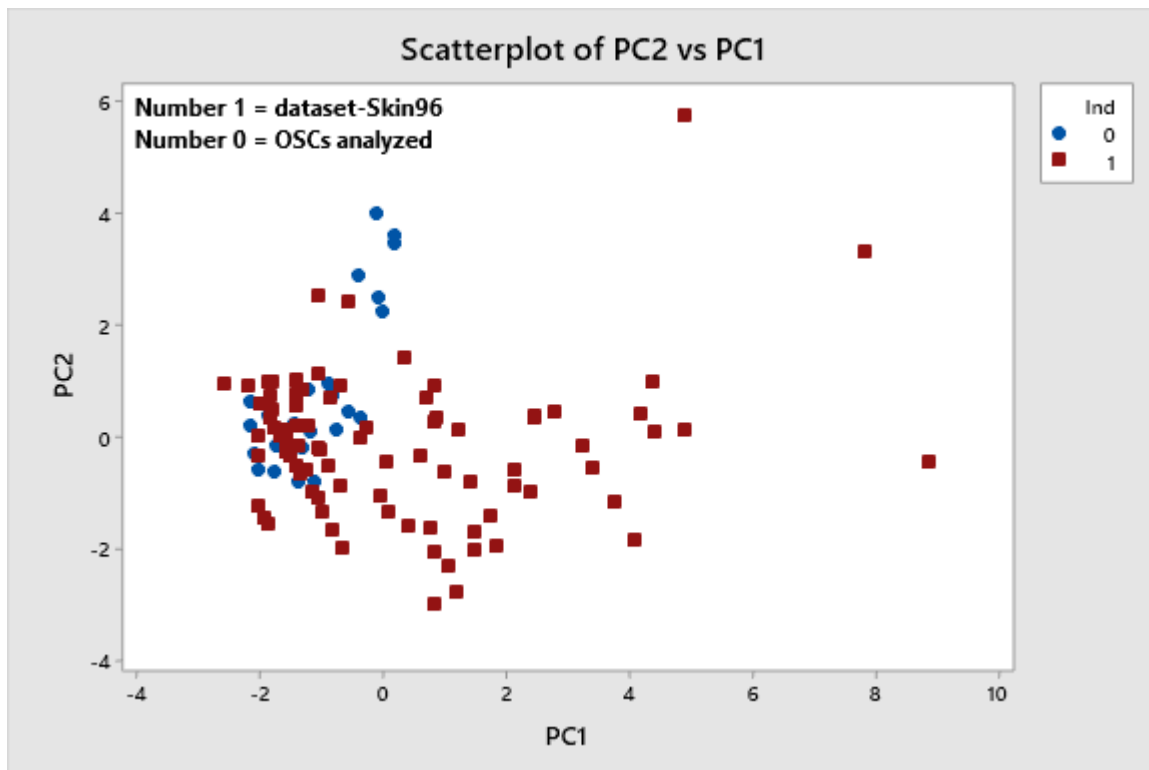


Figura VI.19. Gráfico de los autovalores del PCA para evaluar el espacio predictor de datos K_p en SwissADME



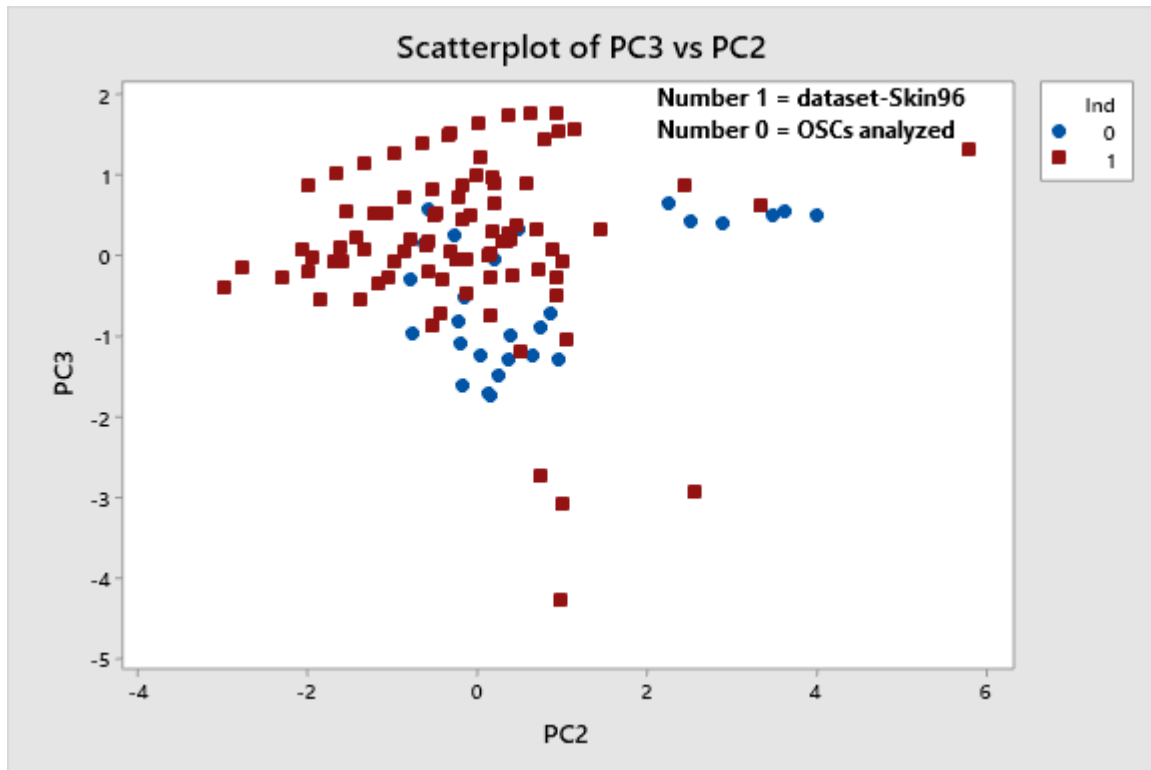


Figura VI.20. Scatter Plots del PCA para evaluar el espacio predictor de datos K_p en SwissADME

Los puntos azules representan los OSCs.

Además, para estudiar la pertenencia de los valores de K_p de los OSCs al espacio predictor de SwissADME se calculó la **distancia de Mahalanobis**.

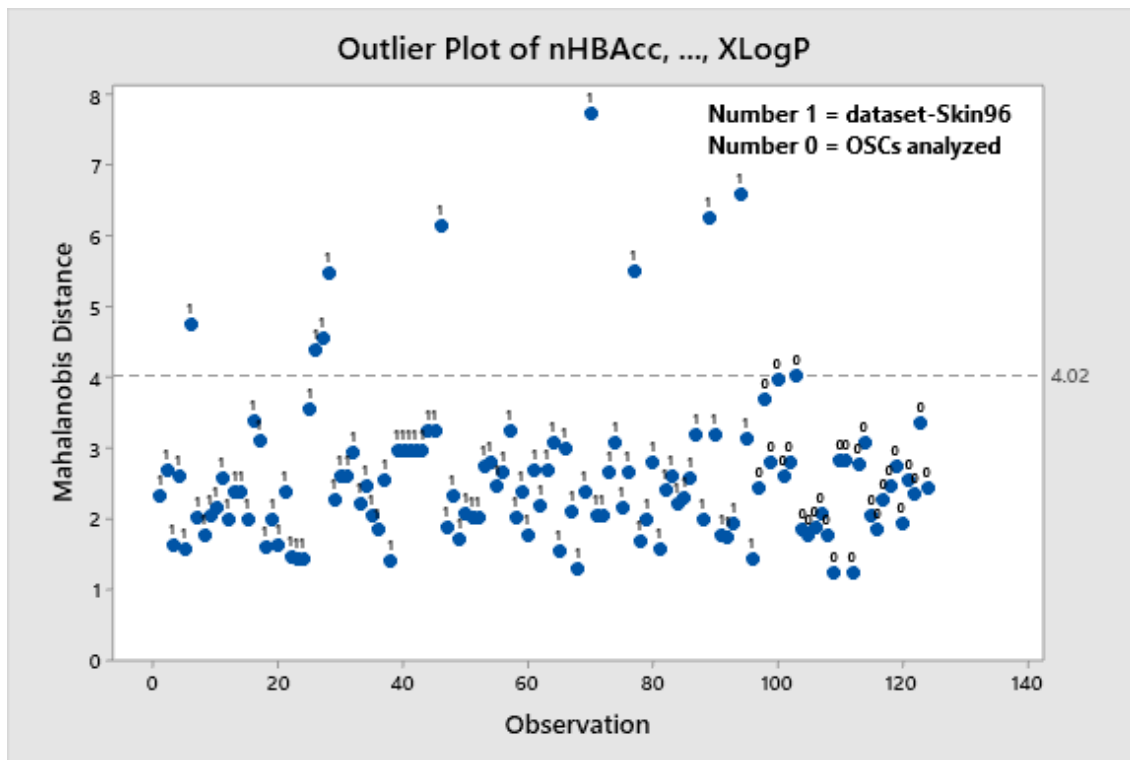


Figura VI.21. Gráfico de OUTLIERS para evaluar el espacio predictor de datos HIA en preADMET. Los 0 representan los OSCs de interés, mientras que los 1, son los 96 compuestos del espacio predictor (obtenidos de Kladt et al., 2018), se puede observar que la distancia de Mahalanobis de los OSCs y los compuestos del espacio predictor no supera la línea de referencia.