

CARACTERIZAÇÃO POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DE PREPARAÇÕES EXTRATIVAS DE *ALLIUM SATIVUM* L.*

Vânia Rodrigues HOPPEN**
Mariangela Tirico AURICCHIO**
Mônica Arcon BATISTIC**

RIALA6/651

HOPPEN, V.R.; AURICCHIO, M.A. & BATISTIC, M.A. – Caracterização por cromatografia em camada delgada de preparações extrativas de *Allium sativum* L. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49 (1): 5-10, 1989.

RESUMO: Utilizando cromatografia em camada delgada, foram investigadas várias possibilidades de detecção de substâncias características do alho, seja de compostos responsáveis pelo aroma, presentes no óleo, ou de compostos de natureza aminoácida, presentes nos extratos hidroalcoólicos e nas preparações que contêm elementos histológicos de *Allium sativum* L. Foram selecionados dois sistemas cromatográficos que permitiram caracterizar estas duas classes de compostos em preparações contendo óleo de alho ou extrato hidroalcoólico de alho.

DESCRITORES: alho (*Allium sativum*), extrato hidroalcoólico de, identificação; alho, óleo essencial de, identificação; medicamentos, extrato hidroalcoólico de alho em, detecção; medicamentos, óleo essencial de alho em, detecção; óleo essencial de alho em medicamentos, identificação; cromatografia em camada delgada.

INTRODUÇÃO

O alho (*Allium sativum* L., Fam.: Liliaceae), é uma planta amplamente distribuída e utilizada por todas as partes do mundo, mas particularmente pelos países mediterrâneos, não só como alimento e condimento, mas também como agente profilático e curativo^{1,2,3, 21}. A tintura e alcoolatura são utilizadas como hipotensores e hipoglicemiantes. Na medicina caseira, utiliza-se o alho como vermífugo e, externamente, como antisséptico de feridas^{1,7,9,13,20,21}.

Devido ao seu considerável poder curativo, o alho tem sido repetidamente objeto de pesquisas sob muitos pontos de vista.

Em 1945, CAVALLITO et alii^{4,5,6} demonstraram que havia no alho um aminoácido, na concentração de 0,3-0,4%, que, pela ação de enzimas, era decomposto em alicina.

A aliina, sulfóxido de (+)-S-alil-L-cisteína, isolada por STOLL & SEEBECK²¹, é hoje

conhecida como precursora do principal princípio ativo do alho. Trata-se de substância de alto peso molecular, bastante estável, inodora, hidrossolúvel, sem atividade antimicrobiana, que, pela ação da aliinase, é convertida em uma substância fortemente antimicrobiana chamada alicina.

A alicina é um óleo instável, incolor, com odor característico do alho, cuja ação antimicrobiana ainda se faz presente nas diluições de 1:85.000 até 1:125.000 contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas^{4,21}. CAVALLITO & BAILEY⁴ estabeleceram que 1 mg de alicina equivale a aproximadamente 15 unidades Oxford de penicilina.

A decomposição da aliina pela aliinase produz, ao lado da alicina, ácido pirúvico e amônia^{12,13,20}. Este mecanismo de ação fundamentou o método de determinação fotométrica da alicina proposto por JÄGER¹³, que se baseia na reação do ácido pirúvico com dinitrofenilhidrazina, com formação de um composto colorido.

* Realizado na Seção de Farmacognosia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, S.P.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

Entretanto, HÖRHAMMER et alii¹² demonstraram, através de cromatografia em camada delgada, que existem no alho, ao lado da aliina, outros sulfóxidos de alquicisteína de mesma configuração óptica da aliina, que, ao serem decompostos pela aliinase, também fornecem ácido pirúvico. Os tiosulfinafos resultantes, porém, possuem uma ação antibacteriana muito menor em comparação com a alicina, o que não permite a substituição do método microbiológico pelo método químico proposto por Jäger.

GRANROTH¹⁰, utilizando eletroforese bidimensional, separou aminoácidos sulfurados e peptídeos, evitando assim a cromatografia em papel³, por ser esta uma técnica que demanda tempo, não permite a separação destes compostos sem decomposição e não possibilita a separação de isômeros. A eletroforese aumentou a sensibilidade da separação em 50 vezes.

Outras tentativas de avaliação dos componentes do alho voltaram-se para o seu óleo essencial^{16,17,18,22}. Sabe-se que o alho triturado, deixado em repouso, ou o produto de sua destilação por arraste a vapor fornece, a partir da alicina, dialildissulfetos e alilpolisulfetos, além de compostos provenientes da decomposição dos análogos da aliina. Segundo alguns autores^{11,18,21}, o teor de óleo essencial de alho por destilação por arraste a vapor é da ordem de 0,1-0,2%.

Na obtenção do óleo essencial, têm lugar profunda decomposição da aliina e da alicina, de modo que o óleo assim obtido tem um teor de enxofre que representa apenas uma fração do enxofre total encontrado no alho fresco¹⁹. Jäger propõe um método clássico de doseamento de enxofre baseado na precipitação do mesmo por BaCl₂.

Um avanço nestes estudos representou o método de MICHAHELLES¹⁵, no qual a alicina, após separação por cromatografia em camada delgada e reação com reativo N-etilmaleimida, solução de hidróxido de potássio e de ácido ascórbico, é determinada espectrofotometricamente.

Mais recentemente, foi introduzida a cromatografia em fase gasosa^{2,17} que, no entanto, devido à instabilidade da alicina, avalia apenas os produtos de sua decomposição, tais como, vinilditiina e diversos alquildi e trissulfetos.

MIETHING¹⁶ apresentou um método de determinação de alicina e de óleo de alho através de cromatografia líquida de alta resolução. Por esse método, o teor de alicina varia de 0,37 a 2,78%. Se, na destilação por arraste a vapor, a alicina fosse quantitativamente transformada nos componentes do óleo de alho, principalmente

dialildissulfetos, dever-se-ia encontrar teores de óleo bem mais altos do que os encontrados. Porém, apenas uma pequena parte (cerca de 10%) da quantidade original de alicina é encontrada no destilado sob forma de óleo de alho, não sendo, portanto, medida suficiente para a avaliação do alho fresco. A alicina propriamente dita, devido à sua pouca estabilidade, não é encontrada nem no destilado nem no resíduo da destilação.

Mais tarde VOIGT & WOLF²² propuseram um método de cromatografia líquida de alta resolução para determinação quantitativa dos produtos de transformação da alicina, onde se recorre a uma substância padrão de referência, estável, já que a alicina, mesmo à temperatura ambiente, sofre rearranjos que resultam na formação de uma série de outros compostos, que justificariam os valores muito altos de alicina encontrados por Miething.

Contudo, apesar de métodos altamente sofisticados, usados para a determinação dos componentes do alho, nem todo laboratório poderá utilizá-los devido à não disponibilidade de equipamentos e de reativos especiais.

Em função da necessidade de se controlar a presença de alho ou de seus componentes em formulações fitoterápicas, o presente trabalho, utilizando-se de técnicas de cromatografia em camada delgada, permite a identificação, não só de substâncias com caráter de aminoácido, como também de compostos sulfurados do óleo de alho, produto da degradação da alicina, estabelecendo, assim, perfis cromatográficos característicos para as várias preparações farmacêuticas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados óleos de alho obtidos no laboratório da Seção de Farmacognosia do Instituto Adolfo Lutz a partir de alho fresco, extratos hidroalcoólicos do alho, cápsulas de óleo de alho vendidas no comércio e pílulas contendo extrato concentrado de alho. Como padrões, foram utilizados óleos de alho provenientes da Holanda, México, Estados Unidos e França.

Extração do óleo essencial de alho a partir de alho fresco

Foi feita da seguinte maneira:

a) Por destilação pelo arraste a vapor de água (Pav) em aparelho Cocking e Middleton⁸.

b) Por extração direta a frio (Pext) com uma mistura de éter clorofórmio (80:20); neste caso, fez-se uma modificação no método de extração preconizado por SCHULTZ & MOHRMANN¹⁷. Em vez de se extrair o óleo de alho

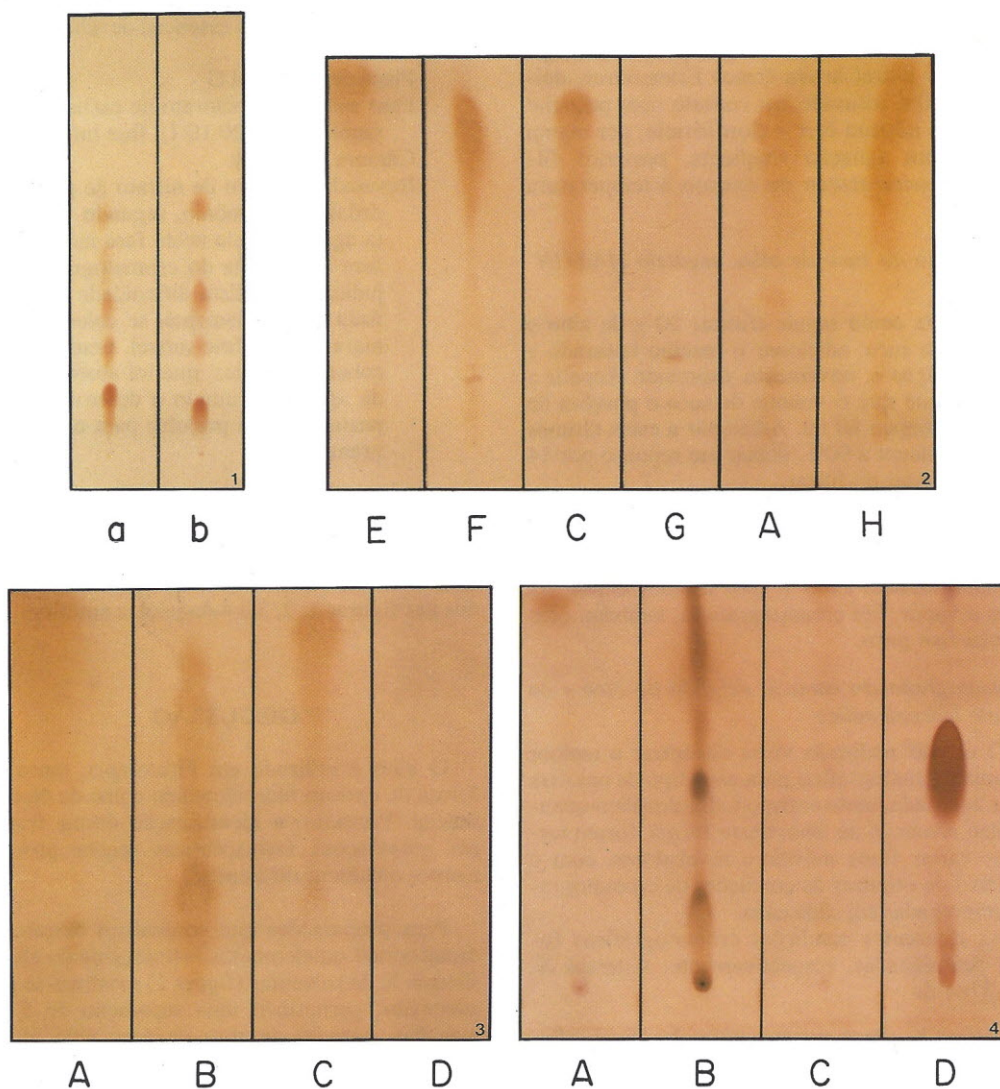


FIGURA 1 – Cromatograma do extrato hidroalcoólico (a) e da tintura comercial (b), onde foi empregado o Sistema X. R_f de 0,15 a 0,74.

FIGURA 2 – Cromatograma de óleos de alho de várias procedências, México (E), França (F), Estados Unidos (C), Holanda (G), do óleo obtido por arraste a vapor (A), e do óleo de alho comercial, onde foi empregado o Sistema Z.

FIGURA 3 – Cromatograma de amostras de alho obtidas por arraste a vapor (A) e por extração com solvente a frio (B), do padrão de óleo de alho (C) e padrão do óleo vegetal fixo (D), onde foi empregado o Sistema Y_1 .

FIGURA 4 – Cromatograma de amostras de alho obtidas por arraste a vapor (A) e por extração com solvente a frio (B), do padrão de óleo de alho (C) e padrão de óleo vegetal fixo (D), onde foi empregado o Sistema Y_2 .

em funil de separação, que apresenta o inconveniente de formar uma emulsão persistente, optou-se por extraí-lo em frasco Erlenmeyer, deixando o alho triturado em contato com pequeno volume da mistura éter – clorofórmio, por algum tempo, com agitação freqüente, posterior filtração e concentração do extrato à temperatura ambiente.

Preparação do suco de alho, segundo MARTINDALE¹⁴

Foi feita como segue: triturar 80 g de alho e espremer o suco: adicionar o resíduo triturado a 20 ml de água e, novamente, espremer. Repetir a operação até que o volume de suco e porções de lavagem atinjam 80 ml. Adicionar a estes últimos 20 ml de álcool a 90%, deixar em repouso por 14 dias e decantar ou filtrar.

Foram reconstituídas cápsulas de óleo de alho, misturando óleo de alho e óleo vegetal fixo nas proporções de 1:4 e 1:10. Estas amostras foram cromatografadas antes e após destilação por arraste a vapor. Foi cromatografado, também, óleo vegetal fixo puro.

Cromatografia em camada delgada do óleo e do extrato hidroalcoólico

O estudo realizado visou encontrar o melhor sistema cromatográfico para cada tipo de amostra a ser analisada, tanto extrato hidroalcoólico quanto óleo essencial de alho; desta forma, foram testadas várias fases móveis e reveladores, com o objetivo de otimizar as condições de cromatografia empregadas em cada caso.

As diferentes condições cromatográficas foram denominadas, respectivamente, sistemas X, Y₁, Y₂ e Z.

- a) *Sistema X* – Para extratos hidroalcoólicos, pílulas contendo extrato concentrado de alho, e cápsulas contendo elementos histológicos do alho

Placa de sílica gel G

Fase móvel: n-butanol – n-propanol – ácido acético – água (3:1:1:1)

Saturação da cuba: total

Percurso: 15 cm

Revelador: reativo de ninidrina, segundo STAHL¹⁹

- b) *Sistema Y₁ e Y₂* – para óleo essencial de alho

Placa de sílica gel G

Fase móvel: benzeno

Câmara Sandwich

Percurso: 10 cm

Reveladores: Y₁, reativo anisaldeído – ácido sulfúrico, segundo STAHL¹⁹; Y₂, reativo nitrato de prata – hidróxido de amônio, segundo STAHL¹⁹.

- c) *Sistema Z* – para óleo essencial de alho

Placa de Sílica gel G

Fase móvel: tetracloreto de carbono – metanol – água (20:10:1), fase inferior

Câmara Sandwich

Revelador: reativo de nitrato de prata - hidróxido de amônio, segundo STAHL¹⁹ (a água presente nesta fase móvel interfere na corrida do cromatograma, prejudicando-a. Esta dificuldade é contornada se, previamente, se colocar na câmara, com a fase móvel, uma placa recoberta de sílica, que irá absorver parte da água, permitindo o desenvolvimento posterior, sem prejuízo para o cromatograma).

RESULTADOS

Os cromatogramas obtidos nas condições da análise anteriormente descritas estão apresentados nas figuras 1, 2, 3 e 4 da página anterior.

DISCUSSÃO

O alho é utilizado em Fitoterapia, tanto sob forma de extrato hidroalcoólico como de óleo essencial. Portanto, a identificação destas frações em preparações farmacêuticas requer procedimentos analíticos diferentes.

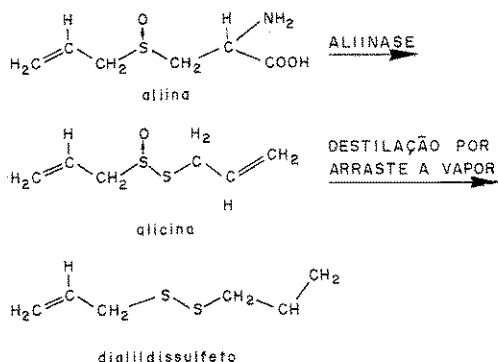
Para preparações que contenham extrato hidroalcoólico ou elementos histológicos de alho, o sistema X de solventes (figura 1) mostrou-se mais adequado, permitindo uma separação de 5 a 6 manchas, coradas de rosa-violáceo pelo reativo de ninidrina, segundo STAHL¹⁹. A utilização do reativo ninidrina - nitrato cúprico, defendida por HÖRHAMMER et alii¹², que permitiria uma diferenciação dos sulfóxidos dos derivados de cisteína por diferença de coloração, não foi satisfatória, provavelmente pelo fato de que nenhuma purificação dos extratos foi efetuada.

No caso de cápsula de óleo de alho, a utilização de benzeno, sistema Y, (figuras 3 e 4) como fase móvel, não se mostrou muito satisfatória, uma vez que a migração dos componentes separou manchas com R_f muito alto. O reativo anisaldeído, utilizado inicialmente, apresentou o inconveniente de revelar óleos vegetais fixos como manchas roxo-amarronzadas que mascaram o perfil cromatográfico do óleo de alho propriamente dito (figura 3); porém, permitiu a diferenciação entre os perfis cromatográficos de amostras de óleo de alho, obtidas por arraste a vapor (A), e extração com solvente a frio (B), e as

amostras padrão de óleo de alho (C) e óleo vegetal fixo (D).

A figura 3 evidencia a semelhança entre os perfis cromatográficos da amostra de óleo de alho obtida por arraste a vapor (A) e do padrão de óleo de alho (C), bem como a sua diferença em relação ao óleo de alho, obtido por extração com solvente a frio (B), quando o revelador é o nitrato de prata-hidróxido de amônio, segundo STAHL¹⁹. Nenhuma mancha foi observada para o óleo vegetal fixo (D).

Tanto os óleos de alho preparados na Seção, a partir de alho fresco, como aqueles provenientes da França, Holanda, Estados Unidos e México, usados como padrão, ou aqueles colocados à venda no comércio sob a forma de “cápsulas de óleo de alho” apresentaram no sistema Z (figura 2) mancha difusa, característica, de tonalidade cinza-amarelada e Rf-0,9. Segundo a literatura^{16,18}, trata-se de dialildissulfeto, principal componente do óleo de alho, obtido por destilação por arraste a vapor segundo o esquema abaixo:



Esta seria a única mancha comum a todos os óleos por nós analisados, pois as demais, que ocasionalmente apareceram, estariam possivelmente relacionadas, entre outros fatores, à origem do alho, modo de obtenção do óleo e impurezas.

No entanto, óleos obtidos por extração direta a frio apresentaram perfil cromatográfico diferente dos acima citados: a mancha correspondente ao dialildissulfeto não foi significativa e as outras manchas, que aparecem ao longo de todo percurso, permitem supor que a ausência de calor impede que a decomposição da aliina obedeça ao esquema acima.

O sistema Z foi o que, pela sua sensibilidade e reprodutibilidade, forneceu resultados mais satisfatórios.

A comercialização do óleo de alho é feita através de cápsulas gelatinosas de óleo de alho, que, na maioria das vezes, encontra-se em presença de óleo vegetal fixo. Com base nisso, experimentamos “reconstituir” cápsulas de óleo de alho nas proporções de 1:4 e 1:10. Estas amostras foram submetidas a destilação por arraste a vapor e posteriormente cromatografadas ao lado dos padrões. Este procedimento mostrou ser desnecessária a destilação, uma vez que a identificação dos dialildissulfetos é possível sem a separação do óleo volátil da do fixo e, ainda, que estejam na proporção de 1:10.

RIALA6/651

HOPPEN, V.R.; AURICCHIO, M.A. & BATISTIC, M.A. – Thin-layer chromatography of preparations from *Allium sativum* L. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 49(1): 5-10, 1989.

ABSTRACT: By using thin-layer chromatography the detection of characteristic substances contained in garlic such as the compounds responsible by the scent and those of aminoacid nature were investigated. Such study was made by analyzing hidroalcoholic extracts and preparations containing histologic elements of *Allium sativum* L. Two thin-layer chromatographic systems were selected in order to detect these two groups of compounds in preparations containing garlic oil or garlic hidroalcoholic extract.

DESCRITORES: garlic (*Allium sativum*), hidroalcoholic extract of, identification; garlic, essential oil of, identification; pharmaceuticals, garlic hidroalcoholic extract in, detection; pharmaceuticals, garlic essential oil in, detection; oils, garlic essential oil detection; thin-layer chromatography.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BECKER, H. – Knoblauch-nur Gewürz oder auch Phytopharmakon?. *Dtsch. Apoth. Ztg.*, **125** (34): 1677-80, 1985.
2. BRODNITZ, M.H.; PASCALE, J.V. & DERSLICE, L.V. – Flavor components of garlic extract. *J. agric. Food Chem.*, **19** (2): 273-5, 1971.
3. CARSON, J.F. & WONG, F.F. – A new colorimetric test for detecting sulfur-containing amino acids. *J. Chromatogr.*, **12** (1903): 408-9, 1963.
4. CAVALLITO, C.J. & BAILEY, J.H. – Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. I. Isolation, physical properties and antibacterial action. *J. am. chem. Soc.*, **66**: 1950-1, 1944.
5. CAVALLITO, C.J.; BAILEY, J.H. & BUCK, J.S. – The antibacterial principle of *Allium sativum*. III. Its precursor and "essential oil of garlic". *J. am. chem. Soc.*, **67**: 1032-3, 1945.
6. CAVALLITO, C.J.; BUCK, J.S. & SUTER, C.M. – Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. II. Determination of the chemical structure. *J. am. chem. Soc.*, **66**: 1952-4, 1944.
7. COSTA, A.F. – *Farmacognosia*. 2ª ed. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian [1967], v. 2, p. 925-7.
8. COSTA, A.F. – *Farmacognosia*. v. 3: *Farmacognosia experimental*. 2ª ed. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian [1967], p. 482-5.
9. ESSMAN, E.J. – The medicinal uses of herbs. *Fito-terapia*, **55** (5): 279-89, 1984.
10. GRANROTH, B. – Separation of *Allium sulfur* amino acids and peptides by thin-layer electrophoresis and thin-layer chromatography. *Acta chem Scand.*, **22** (10): 3333-5, 1968.
11. GUENTHER, E. – *The essential oils*. 1. Mitteilung: *chromatographische Untersuchungen über die genuinen Inhaltsstoffe – von Allium sativum* L. New York, Van Nostrand, 1952. p. 67-9.
12. HÖRHAMMER, L.; WAGNER, H.; SEITZ, M. & VEJDELEK, Z.J. – Zur Wertbestimmung von Knoblauchpräparaten. *Pharmazie*, **23**: 462-6, 1968.
13. JÄGER, H. – Quantitative Bestimmung von Allicin in Frischen Knoblauch. *Arch. Pharm., Weinh.*, **288** (3): 145-8, 1955.
14. MARTINDALE, W.H. – The extra pharmacopoeia; edited by L.F. Reynolds and Anne B. Prasad. 28th ed. London, Pharmaceutical Press, 1982. p. 688-9.
15. MICHAHELLES, E. apud MIETHING, H. ¹⁶.
16. MIETHING, H. – Allicin und Öl in Knoblauchzwiebeln – HPLC – Gehaltsbestimmung. *Dtsch. Apoth. Ztg.*, **125** (41): 2049 - 50, 1985.
17. SCHULZ, O.E. & MOHRMANN, H.L. – Beitrag zur Analyse der Inhaltsstoffe von Knoblauch - *Allium sativum* L. 1. Mitteilung: Dumschichtchromatographie des Knoblauchöls. *Pharmazie*, **20** (7): 379-81, 1965.
18. SCHULTZ, O.E. & MOHRMANN, H.L. – Beitrag zur Analyse der Inhaltsstoffe von Knoblauch - *Allium sativum* L. 2. Mitteilung: gaschromatographie des Knoblauchöls. *Pharmazie*, **20**(7):441-7, 1965.
19. STAHL, E., ed. – Thin-layer chromatography: a laboratory handbook. 2nd ed. English translation by M.R.F. Achworth. Berlin, Springer-Verlag, 1969. p. 1041.
20. STOLL, A. & SEEBECK, E. – Chemical investigations on Alliin, the specific principle of garlic. *Adv. Enzymol.*, **11**:377-400, 1951.
21. STOLL, A. & SEEBECK, E. – Über Alliin, die genuine Muttersubstanz des Knoblauchöls. 1. Mitteilung: Über chromatographie. *Helv. Chim. Acta*, **31**: 189-210, 1948.
22. VOIGT, M. & WOLF, E. – Knoblauch-HPLC – Bestimmung von Knoblauchwirkstoffen in Extrakten, Pulver und Fertigarzneimitteln. *Dtsch. Apoth. Ztg.*, **126** (12): 591-3, 1986.

Recebido para publicação em 7 de junho de 1988.