



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN CHIMICA INDUSTRIALE

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

**Caratterizzazione e sintesi dell'allicina e sviluppo
di un metodo analitico basato sul PTR-MS per lo
studio della formazione di allicina da diverse
varietà di aglio**

Relatore: Prof. Luca Cappellin

Correlatore: Prof. Franco Biasioli

Controrelatrice: Prof. essa Cristina Peggion

LAUREANDA: Panebianco Alessia

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

INDICE

ABSTRACT	4
CAPITOLO 1: INTRODUZIONE	5
1.1 Origini dell'aglio	5
1.2 L'aglio oggi	6
1.3 Composti contenuti nell'aglio	7
1.4 Biosintesi allicina	8
1.5 Sintesi in laboratorio	9
1.5.1 Meccanismo sintesi dell'allicina in acqua ossigenata	10
1.5.2 Meccanismo sintesi dell'allicina in acido perossibenzoico	11
1.6 Caratteristiche chimico-fisiche dell'allicina	12
1.7 Proprietà dell'aglio	14
1.7.1 Proprietà antibatteriche	14
1.7.2 Proprietà antimicrobiche	15
1.7.3 Proprietà antiparassitarie	16
1.8 Endoterapia	17
1.8.1 Bite®	19
1.9 Scopo della tesi	20
CAPITOLO 2: MATERIALI E METODI	22
2.1 Reagenti	22
2.2 Strumenti	24
2.3 Varietà di aglio	24
2.4 Procedura sperimentale	27
2.4.1 Sintesi	27
2.4.1.1 Procedura 1	27
2.4.1.2 Procedura 2	28

2.4.2 Soluzioni e campioni	28
2.4.2.1 Allicina per iniezioni in HPLC	28
2.4.2.2 Campioni aglio per PTR-TOF	29
2.4.2.3 Formulazione di allicina per iniezione endoterapica	29
2.4.2.4 Bianco formulazione	29
2.4.2.5 Abamectina formulazione	29
2.4.3 Parametri strumentali	30
2.4.3.1 Analisi allicina di sintesi	30
2.4.3.1.1 HPLC-QTOF	30
2.4.3.1.2 HPLC-DAD	30
2.4.3.1.3 GC-MS	30
2.4.3.2 Analisi aglio macinato	31
2.4.3.2.1 PTR-MS	31
2.4.3.3 Analisi campioni foglie	32
2.4.3.3.1 UHPLC-QQQ-MS	32
2.4.4 Iniezioni endoterapiche	32
2.4.4.1 Caratteristiche meli	32
2.4.4.2 Procedura iniezione	32
2.4.4.3 Campionamento foglie	33
2.4.4.4 Analisi foglie	34
2.4.4.5 Analisi mele	34
CAPITOLO 3: RISULTATI E DISCUSSIONE	35
3.1 Sintesi	35

3.2 Caratterizzazione allicina	37
3.2.1 HPLC-QTOF	37
3.2.2 GC-MS	40
3.2.3 HPLC-DAD: ottimizzazione del metodo	42
3.2.4 Identificazione dei composti di degradazione con HPLC- DAD	49
3.2.5 Stabilità dell'allicina pura e in formulazione per soluzioni endoterapiche	52
3.3 Analisi con PTR-MS	54
3.3.1 Pestaggio aglio	54
3.3.2 Differenti varietà di aglio macinato in azoto	57
3.3.3 Analisi mele con PTR-MS	66
3.4 Analisi foglie macinate in azoto liquido con HPLC-QQQ-MS	67
CAPITOLO 4: CONCLUSIONI	71
BIBLIOGRAFIA	73
RINGRAZIAMENTI	77

ABSTRACT

L'allicina è un tioestere dell'acido sulfenico (tiosolfato dialliile) ed è la molecola responsabile del caratteristico odore pungente dell'aglio. Essa non è naturalmente presente all'interno dell'aglio ma si forma per danneggiamento di un bulbo, schiacciamento, macinazione o taglio che induce il rilascio dell'enzima alliinasi trasformando in pochi secondi allina in allicina attraverso intermedi estremamente reattivi.

L'allicina è una molecola molto instabile essendo volatile, termolabile e fotodegradabile e ciò influisce notevolmente sulla difficoltà di maneggiamento e sul metodo di analisi.

L'importanza di questo composto è legata alle sue proprietà mediche antimicrobiche e antibatteriche su un gran numero di virus, batteri, funghi e parassiti. Negli ultimi anni sono stati eseguiti molti studi sugli effetti dell'allicina nelle piante sia in vitro che in vivo osservandone gli effetti sullo sviluppo (germinazione, radicazione) e sulla diminuzione di parassiti presenti. Dati i risultati promettenti ottenuti, tale molecola è stata introdotta recentemente in formulazioni per iniezioni endoterapiche come prodotto fitosanitario.

Gli obiettivi di questo lavoro sono molteplici. In primo luogo, consistono nell'ottimizzazione della sintesi di formazione dell'allicina e nello studio di un metodo analitico per la determinazione quantitativa del prodotto di sintesi ottenuto. In secondo luogo, consistono nella valutazione della stabilità e dei prodotti di degradazione al fine di mettere a punto strategie per prolungarne la conservazione. In terzo luogo, consistono nello sviluppo di un metodo analitico basato su Proton Transfer Reaction-Mass Spectrometry (PTR-MS) per eseguire l'analisi dei composti volatili (VOC) in differenti varietà di aglio, osservando in tempo reale la quantità di allicina formata. Lo scopo dello studio è quello di arrivare ad individuare varietà con alto contenuto di allicina per valutare una possibile estrazione del composto naturale.

Infine, valutare l'effetto fitosanitario sulle piante di melo di fluidi contenenti come principio attivo l'allicina e l'abamectina (utilizzata come riferimento). Le iniezioni endoterapiche sono eseguite con Bite® "Blade for Infusion in Trees" brevettato dell'Università di Padova in collaborazione con spin-off Piante Acqua Natura srl.

CAPITOLO 1: INTRODUZIONE

1.1 Origini dell'aglio

L'aglio *Allium sativum* è una pianta bulbosa della famiglia delle Alliaceae ed è tra le più antiche colture orticole conosciute. Il suo consumo da millenni è legato sia alle sue proprietà gastronomiche che alle sue numerose capacità profilattiche e terapeutiche. Le sue origini sono incerte, ma è certo che già i Sumeri, gli Egizi e gli Indiani consumassero aglio più di 4000 anni fa. A testimonianza dell'esistenza dell'aglio già nell'Antico Egitto sono stati ritrovati degli spicchi nella tomba di Tutankhamon risalente al 1500 a.C. Per gli antichi Greci invece, l'aglio simboleggiava il coraggio e per questo i soldati venivano nutriti con esso prima di una battaglia associandolo alla guerra e alla forza maschile. Inoltre, nell'antica Cina e Giappone veniva utilizzato per preservare il cibo che faceva parte della quotidiana alimentazione ed era assunto principalmente per favorire la digestione e la respirazione come fonte di ricarica e di energia. ^[1,2]

In passato, l'aglio selvatico cresceva spontaneamente in una zona molto grande compresa tra Cina, India, Egitto e Ucraina. Questo territorio in cui l'aglio è cresciuto allo stato selvatico viene definito il suo centro d'origine, poiché questa è la regione geografica in cui la coltura ha avuto inizio e l'unico luogo in cui ha prosperato allo stato selvatico. Oggi l'aglio cresce selvatico solamente nell'Asia centrale (concentrata in Kirgizstan, Tajikistan, Turkmenistan e Uzbekistan).

Tuttora non si è a conoscenza dei primi tipi di aglio prodotti, nessuna designazione di varietà d'aglio è stata fatta nei primi scritti scoperti fino ad oggi, che si tratti di varietà a collo duro o a collo molle, rosse o bianche, precoci o tardive, locali o esotiche. Gli esseri umani che migravano e viaggiavano attraverso l'Asia centrale e le aree circostanti hanno raccolto aglio selvatico e l'hanno portato con loro per il successivo consumo e coltivazione. Di conseguenza ora, le piante chiamate localmente aglio selvatico sono altre specie del genere aglio (*Allium*) ma, non l'aglio stesso (*Allium sativum*). Per esempio, *Allium vineale* è un parente selvatico dell'aglio che si trova in Nord America ed è comunemente chiamato aglio selvatico. ^[3]

1.2 L'aglio oggi

L'aglio è una coltura ampiamente coltivata per il mercato fresco da molti produttori su piccola scala per i mercati locali. Circa un milione di ettari di aglio producono circa 10 milioni di tonnellate di aglio a livello globale ogni anno, secondo l'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'Alimentazione e l'Agricoltura. [3]

Esso è un prodotto ampiamente coltivato ed è solo da quando la produzione di sementi di routine è diventata possibile negli anni '80 che l'aglio può essere definito una coltura addomesticata, poiché una definizione rigorosa di addomesticamento è il processo di allevamento selettivo di una pianta o di un animale per soddisfare meglio le esigenze umane. [3] La coltura dell'aglio esige per la sua crescita un clima temperato e asciutto ed un terreno permeabile e ben drenato per smaltire facilmente gli eccessi di acqua. Durante la semina i bulbi devono essere rivolti con l'apice verso l'alto e collocati in piccoli solchi del terreno profondi circa 5-7 cm e successivamente ricoperti con terra e deposti ad una distanza di circa 25 cm l'uno dall'altro (Figura 1).

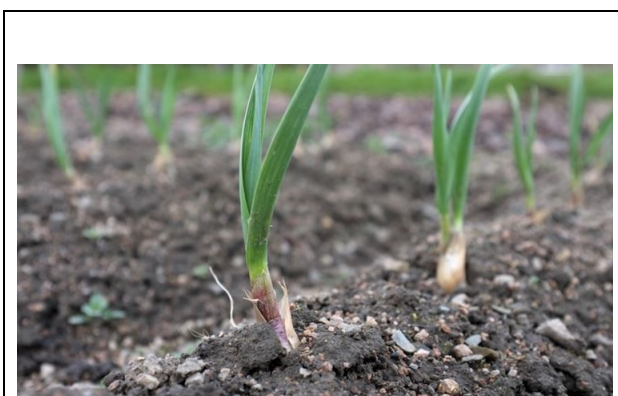


Figura 1: Pianta aglio

<https://www.tuttogreen.it/come-coltivare-laglio/>

La raccolta si esegue nei mesi di giugno-luglio quando le foglie sono completamente secche e dopo l'estirpazione si lasciano asciugare al sole per rimuovere la terra e confezionati in mazzi con numero di bulbi variabile a seconda delle richieste dei mercati locali. [4]

La produzione in UE è di circa 400 000 tonnellate di aglio all'anno, a fronte di una produzione mondiale di circa 28 milioni di tonnellate. Con un totale di oltre 273 000 tonnellate nel 2018, la Spagna è il maggiore produttore europeo, seguita dall'Italia (29 980 tonnellate nel 2017) e dalla Romania (28 770 tonnellate nel 2018). [5]

1.3 Composti contenuti nell'aglio

Nel bulbo di *Allium sativum* sono presenti una elevata varietà di composti bioattivi, tra cui organosolforati, composti fenolici e polisaccaridi. I principali componenti attivi dell'aglio (Figura 2) sono i suoi composti organosolforati, come il tiosolfonato diallilico (allicina), il solfuro di diallile (DAS), il disolfuro di diallile (DADS), il trisolfuro di diallile (DATS), l'E/Z-ajoene, la S-allil cisteina (SAC) e alliina.

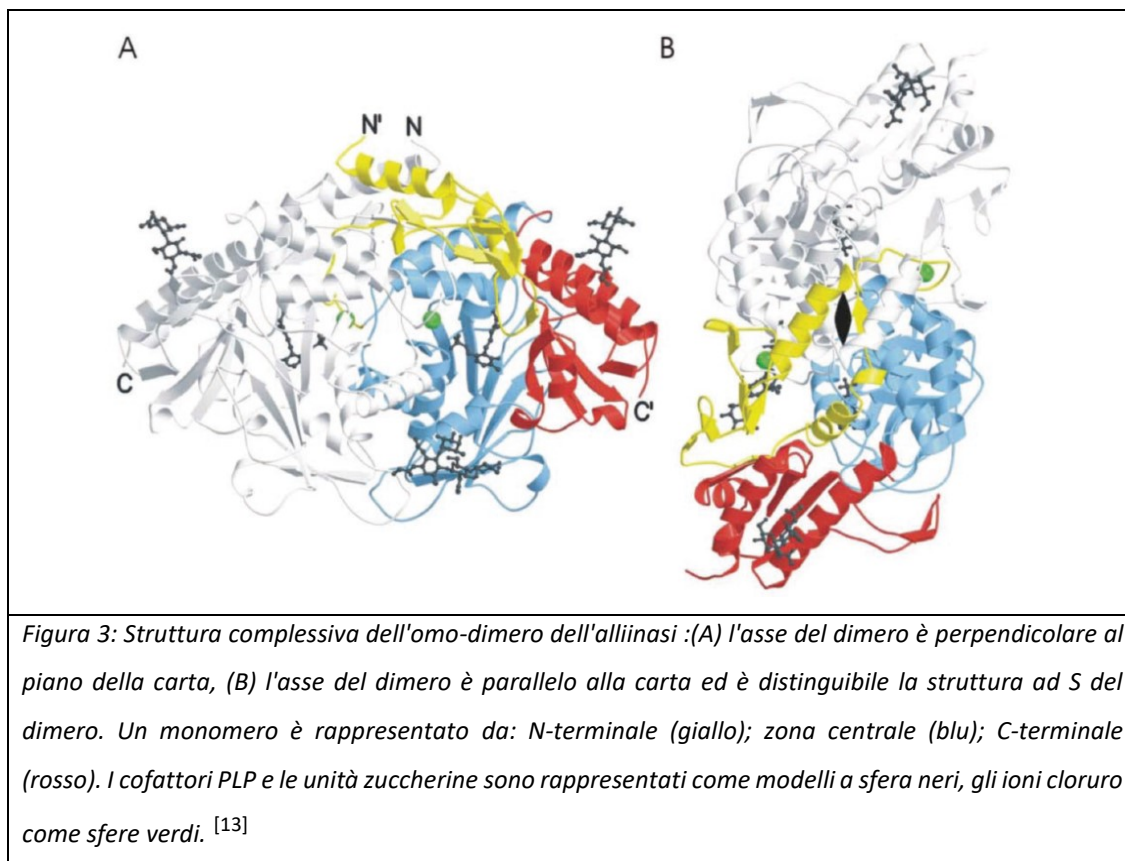
Compounds	Molecular formula	Structure
Alliin	$C_6H_{11}NO_3S$	
Allicin	$C_6H_{10}OS_2$	
E-Ajoene	$C_9H_{14}OS_3$	
Z-Ajoene	$C_9H_{14}OS_3$	
2-Vinyl-4H-1,3-dithiin	$C_6H_8S_2$	
Diallyl sulfide (DAS)	$C_6H_{10}S$	
Diallyl disulfide (DADS)	$C_6H_{10}S_2$	
Diallyl trisulfide (DATS)	$C_6H_{10}S_3$	
Allyl methyl sulfide (AMS)	C_4H_8S	

Figura 2: Struttura chimica dei maggiori composti organosolforici contenuti nell'aglio.

L'alliina, la principale cisteina sulfossido viene trasformata in allicina dall'enzima alliinasi dopo il taglio dell'aglio e la rottura. Le cisteine sulfossido di cui fa parte anche allicina sono le principali molecole odorose prodotte dall'aglio appena macinato. Si possono produrre più di cinquanta metaboliti che dipendono dal contenuto d'acqua, dalla temperatura e dall'enzima alliinasi. [6,7]

1.4 Biosintesi dell'alicina

Allicina è la molecola caratteristica del flavor dell'aglio, e la sua struttura è stata determinata nel 1948 da Stoll e Seebeck. ^[8] Essa si produce solo per danneggiamento del bulbo di aglio attraverso macinazione o schiacciamento dello stesso. La reazione avviene perché nell'aglio è presente l'enzima alliinasi e il precursore allina. ^[9] In un bulbo sano l'enzima alliinasi è confinato nei vacuoli delle cellule, piccole sacche contenenti svariate sostanze utili alla cellula, mentre l'allina è dispersa nel citoplasma. Quando si schiaccia o si taglia uno spicchio d'aglio, si danneggiano le cellule e si permette all'enzima di entrare a contatto con l'allina portando alla formazione dell'alicina, la cui quantità prodotta dipende molto dal danneggiamento del tessuto cellulare. ^[10,11] La reazione prevede l'idrolisi dell'allina grazie all'enzima alliinasi portando alla formazione di deidroalanina e di acido allil sulfenico. Successivamente due molecole di acido allil sulfenico condensano spontaneamente ottenendo alicina. Tali reazioni avvengono molto velocemente, in pochi secondi, data l'elevata reattività degli intermedi formati. La deidroalanina prodotta può reagire a sua volta data la presenza di acqua e formare acido piruvico liberando una molecola di ammoniaca. ^[9]



In particolare, la reazione è catalizzata dall'enzima alliinasi (C-S-liasi) che consiste in due uguali subunità di 448 amminoacidi ruotate di 180° l'una rispetto all'altra. Il monomero è caratterizzato dalla presenza del cofattore piridossal 5 fosfato (PLP) (Figura 3). In assenza di substrato un residuo di lisina è legato al gruppo PLP (sito attivo) ma in presenza di allina il gruppo ammidico lisina è sostituito dall'ammino gruppo allina formando un'aldimmina esterna composto da PLP e allina (Figura 4). Esso è considerevolmente più reattivo della sola allina e consente la scissione del legame carbonio-zolfo ottenendo acido sulfenico (RSOH) e il legame PLP-ammino acrilato. L'acido sulfenico formatosi è molto reattivo e si combina con una seconda molecola formando alicina e acqua. [12]

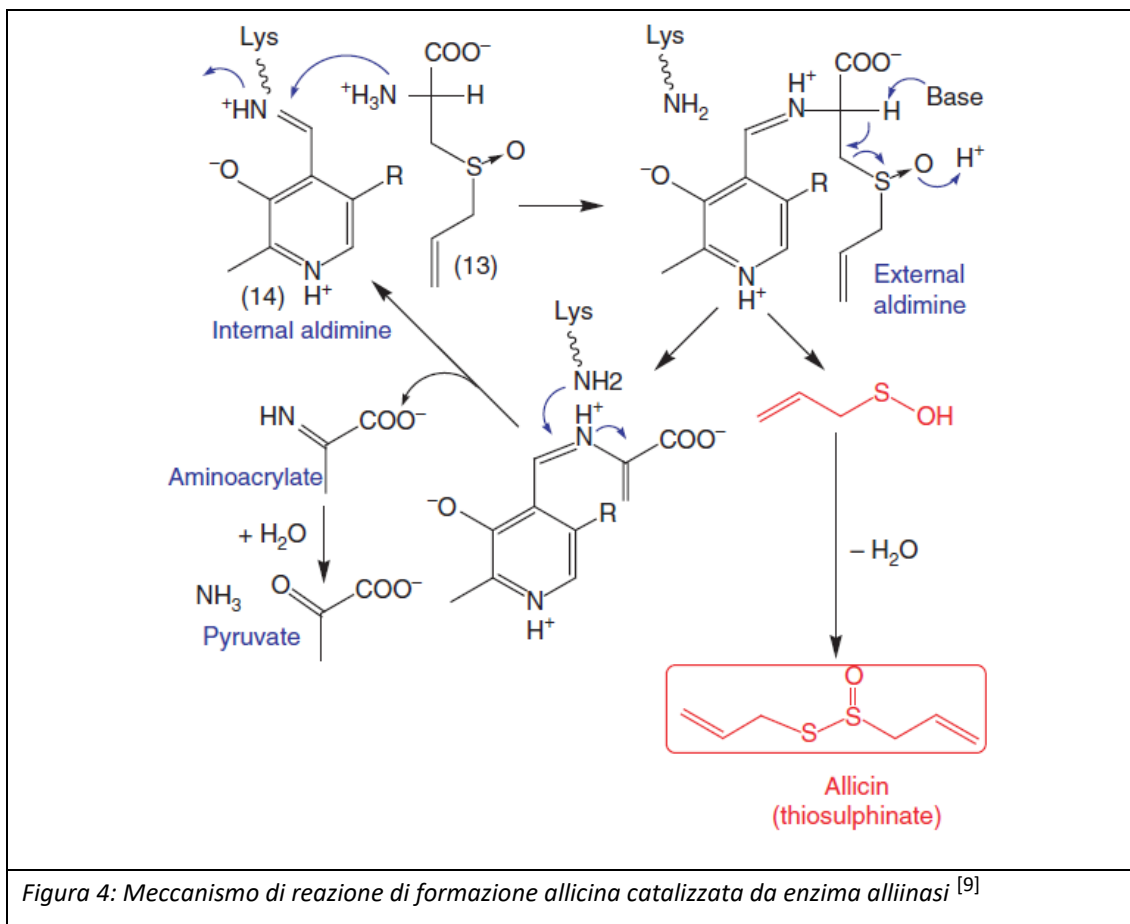


Figura 4: Meccanismo di reazione di formazione alicina catalizzata da enzima alliinasi [9]

1.5 Sintesi in laboratorio

L'alicina, essendo molto instabile, è difficile da reperire pura in commercio se non a costi elevati. La maggior parte delle sintesi coinvolge l'ossidazione disolfuro di diallile in presenza di un perossido o perossiacido. Le sintesi più conosciute prevedono l'impiego

di perossido di idrogeno e acido perossibenzoico come ossidanti in acido acetico e cloroformio rispettivamente. Un'ulteriore sintesi prevede l'uso di una soluzione in diclorometano di disolfuro di diallile con magnesio monoperoxidato in ammonio butilsolfato. ^[14] Tutte le sintesi avvengono a basse temperature comprese tra 0°C e 20 °C ma varia il metodo di purificazione.

1.5.1 Meccanismo di sintesi dell'allicina in acqua ossigenata ^[15]

Il meccanismo di formazione dell'allicina in presenza di acqua ossigenata è radicalico (Figura 5).

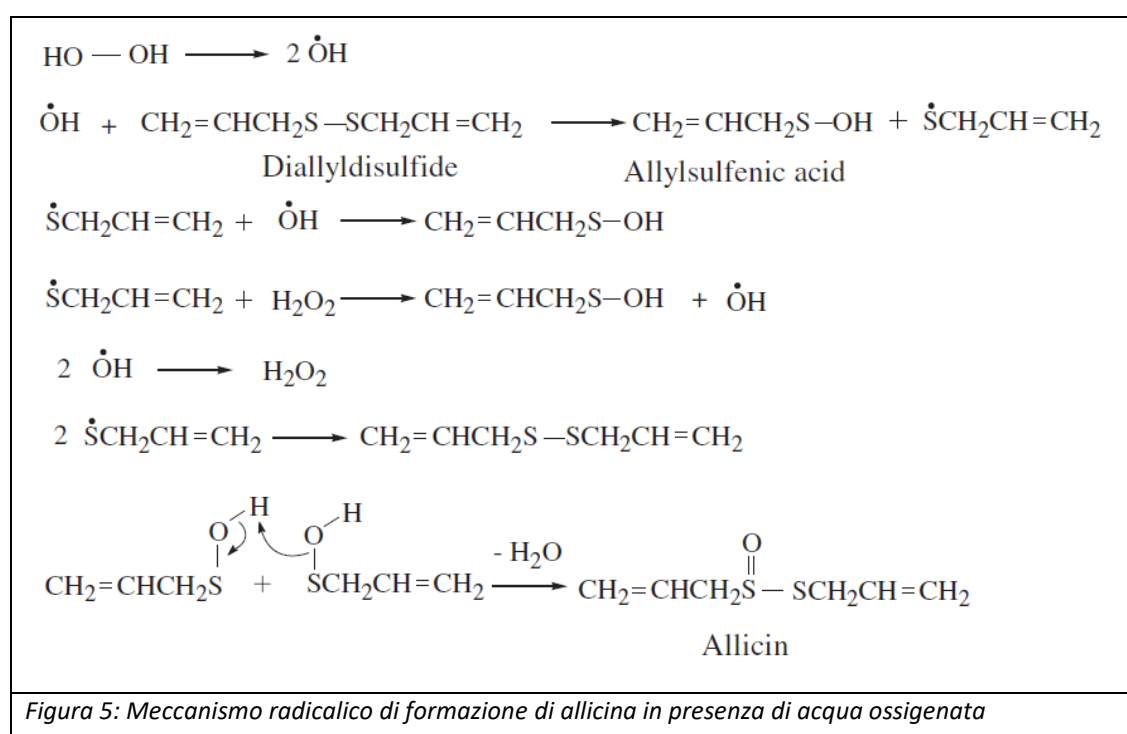


Figura 5: Meccanismo radicalico di formazione di allicina in presenza di acqua ossigenata

Per scissione omolitica dell'acqua ossigenata si ha la formazione di due radicali OH che attaccano la molecola di disolfuro di diallile portando alla formazione del radicale corrispondente e acido allil sulfenico. Il radicale può essere ulteriormente combinato con un radicale ossidrilico ottenendo acido sulfenico, oppure reagire con perossido di idrogeno e produrre acido sulfenico e un altro radicale idrossido. Le possibili reazioni di terminazione possono prevenire la ricombinazione di due radicali di allil mercaptano per ottenere di solfuro di diallile di partenza o per unione di due radicali idrossido.

Poiché l'energia di dissociazione del legame O—O nel perossido (200,9 kJ/mol) è più debole del legame S—S (301,39 kJ/mol), esso favorisce la formazione di radicali idrossili, che attaccano la molecola di disolfuro di diallile e producono il radicale di allil mercaptano e acido allil sulfenico. È anche possibile ricombinare due radicali per ottenere il disolfuro di diallile, il substrato di partenza per l'allicina di sintesi. Due molecole di acido allil sulfenico, molto instabili, reagiscono e producono allicina rilasciando una molecola d'acqua. La fase più lenta della sintesi di allicina è la decomposizione del composto in radicali, la cui concentrazione è costante nello stato stazionario, che indica che la sintesi è una reazione di ordine zero, che può essere confermata osservando la cinetica di sintesi dell'allicina.

1.5.2 Meccanismo di sintesi dell'allicina in acido perossibenzoico

I perossidi organici data la loro eccezionale reattività e il loro potenziale ossidativo, sono ampiamente utilizzati nei laboratori di ricerca poiché versatili ed in grado di ossidare un'ampia varietà di gruppi funzionali in condizioni generalmente blande. Tra i perossidi organici, l'acido meta-cloro-perossibenzoico (mCPBA) è un acido perossicarbossilico utilizzato come ossidante nella sintesi organica grazie al suo versatile potere ossidante e alla relativa facilità di manipolazione. L'mCPBA è una polvere bianca, infiammabile e igroscopica e, deve essere conservato in frigorifero in contenitori ben chiusi. È solubile in CH₂Cl₂, CHCl₃, 1,2-dicloroetano, EtOAc, EtOH, t-BuOH, benzene ed è leggermente solubile in esano, CCl₄ e insolubile in H₂O.

La sua particolare reattività è caratterizzata da un debole legame O-O e da un gruppo OH nucleofilo. Il legame O-O dell'mCPBA trasferisce un atomo di ossigeno ai substrati ricchi di elettroni, mentre il gruppo nucleofilo OH del mCPBA su chetoni e aldeidi determina l'inserimento di un atomo di ossigeno. ^[16]

Un possibile meccanismo per l'ossidazione dei composti con perossiacidi è quello che coinvolge l'attacco del perossiacido (I, Figura 6) da parte del solfuro. Il legame intramolecolare di I si trova in una posizione unica per promuovere la reazione portando alla formazione del doppio legame tra ossigeno e zolfo e di acido benzoico (Figura 6). ^[17]

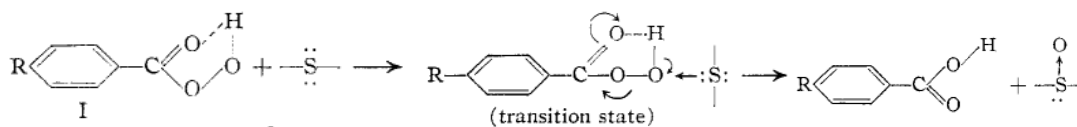


Figura 6: Meccanismo di ossidazione DADS utilizzando l'acido perossibenzoico come agente ossidante ^[17]

La prima descrizione dell'ossidazione dei solfuri a solfossidi utilizzando l'acido perbenzoico fu nel 1928. Da allora questo metodo è stato ampiamente utilizzato e le condizioni di reazione sono state ottimizzate.^[18]

1.6 Caratteristiche chimico fisiche dell'allicina

L'allicina è una molecola molto instabile essendo volatile, termolabile e fotodegradabile. Essa, oltre ad essere caratterizzata da un forte odore pungente, si presenta come un olio di colore giallo pallido. È molto reattiva ed è difficile ottenerla pura senza la contaminazione di altri composti solforosi. Decompone a temperature non elevate (circa 37°C) ed è poco solubile in acqua. Pertanto, è preferibile conservarla in soluzioni con solventi polari protici in freezer a -20°C. Ad elevate temperature (80°C) decompone in circa 25 min. ^[19] L'allicina si trasforma facilmente in un olio di polisolfuri composti maggiormente da diallil disulfide (DADS), diallil sulfide (DAS) e in condizioni appropriate si ottiene anche vinyl-dithiin e Z/E ajone. ^[20] Tali composti, riportati in Figura 7, risultano essere maggiormente stabili rispetto all'allicina. ^[21]

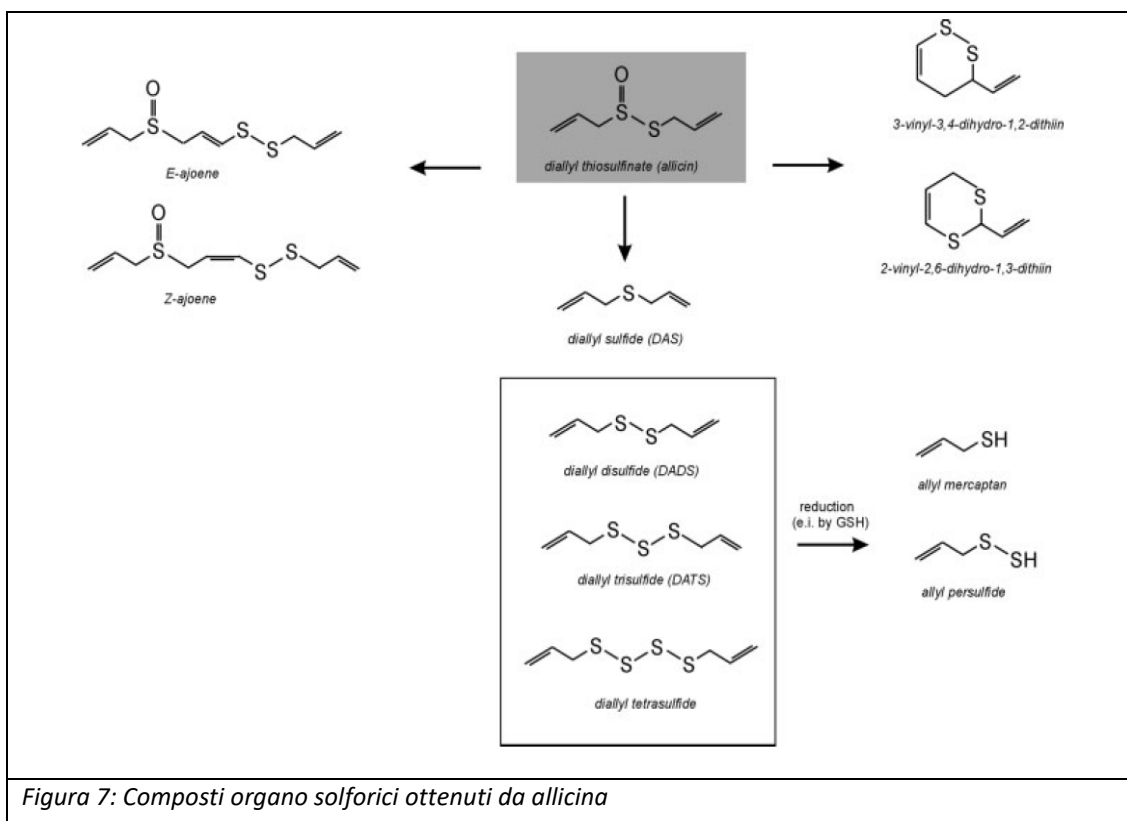


Figura 7: Composti organo solforici ottenuti da allicina

Inoltre, l'allicina rispetto ai suoi composti di degradazione, ha la caratteristica di avere un picco massimo di assorbimento all'interno della regione UV a 254nm (Figura 8). Esso non è molto pronunciato però, permette di distinguere l'allicina da altri composti organo solforici che assorbono nella stessa regione spettrale.

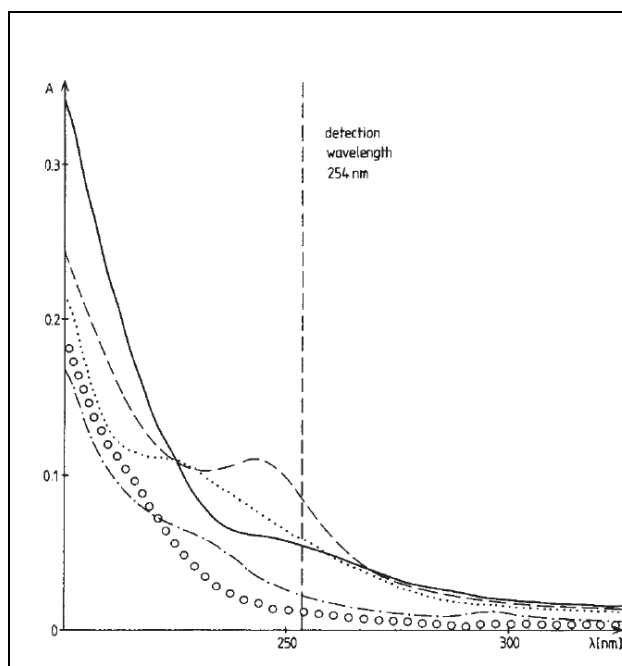


Figura 8: Spettro assorbimento allicina (—), (*E*)-ajoene (---), 2-vinyl-(4H)-1,3-dithiin (.....), 3-vinyl-(4H)-1,2-dithiin (-.-.) disolfuro di diallile (°°°°°) [22]

1.7 Proprietà dell'aglio

L'aglio è stato usato per scopi medicinali fin dall'antichità, esercita diversi effetti biologici, come l'abbassamento dei livelli di colesterolo, l'inibizione della crescita tumorale, l'attività antivirale e antibatterica. L'aglio ha forti proprietà antiossidanti che alleviano i danni associati alla presenza di radicali liberi nelle membrane biologiche o ad altri sistemi biologici. Tali proprietà antiossidanti sono state maggiormente riscontrate nell'aglio crudo piuttosto che nell'aglio cotto poiché sono dovute principalmente alla quantità di allicina contenuta. Pertanto, l'ossidazione di radicali liberi derivanti come sottoprodotti di vie metaboliche o dall'ambiente conferisce all'aglio ulteriori caratteristiche a sfavore di condizioni fisiopatologiche, tra cui invecchiamento, infiammazione, promozione dei tumori e aterosclerosi e la riduzione selettiva delle concentrazioni di colesterolo LDL, senza alterare le concentrazioni di HDL.^[23]

1.7.1 Proprietà antibatteriche

Le proprietà antibatteriche dell'aglio schiacciato sono note da tempo, Cavallito e Bailey sono stati i primi a dimostrare che l'azione antibatterica dell'aglio è dovuta principalmente all'allicina.^[24] Il DADS, uno dei prodotti di decomposizione diretta dell'allicina, ha un'attività antimicrobica significativamente più bassa indicando che il gruppo tiosolfinato gioca un ruolo importante in tale attività. Diverse preparazioni a base di aglio hanno dimostrato di possedere un'attività antibatterica ad ampio spettro contro i batteri Gram-negativi e Gram-positivi tra cui specie di *Escherichia*, *Salmonella*, *Strafilococco*, *Streptococco*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Bacillus* e *Clostridium*. È interessante notare che diversi ceppi batterici resistenti agli antibiotici come lo *Staphylococcus aureus*, resistente alla meticillina e altri ceppi enterotossigeni multifarmaco resistenti di *Escherichia coli*, *Enterococcus*, *Shigella dysenteriae*, *S. flexneri* e *S. sonnei* sono risultati sensibili all'allicina (Figura 9).^[6,7] L'efficacia dell'allicina rispetto a penicillina e altri antibiotici risulta comunque essere minore e ciò potrebbe essere spiegato dalla loro minore reattività con i residui di cisteina.

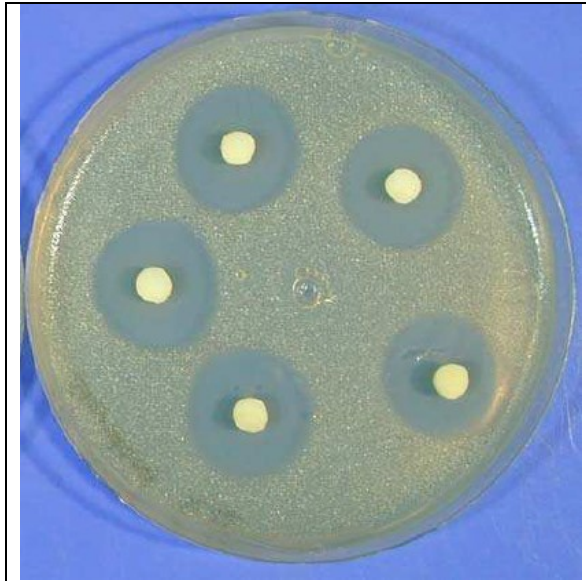


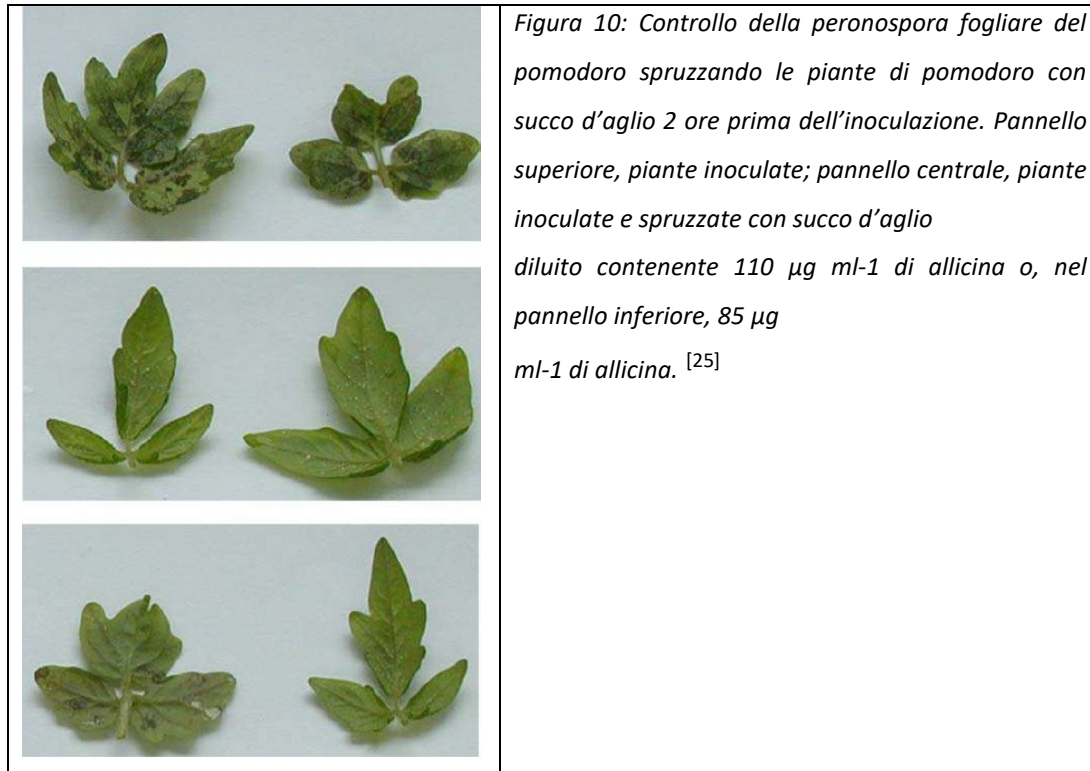
Figura 9: Inibizione della crescita di *E. coli* K12 usando dischetti imbevuti di succo di aglio con concentrazione di allicina di 90 μg .^[25]

1.7.2 Proprietà antimicrobiche

Gli estratti di aglio hanno anche un forte effetto antifungino e inibiscono la formazione di micotossine come l'aflatossina dell'*Aspergillus parasiticus*. Si è ipotizzato che l'allicina sia il principale responsabile dell'inibizione della crescita fungina inibendo sia la germinazione delle spore che delle ife sia in vivo che in vitro. La disinfezione dei semi si è rivelata un'applicazione efficace e potenziale dell'allicina. È stato dimostrato che i semi di carota, infestati da *Alternaria* spp. sono stati disinfettati dal trattamento con succo d'aglio in misura paragonabile a quella di un prodotto commerciale per la disinfezione dei semi.^[25] In un altro test, la germinazione e lo sviluppo della plantula di semi di grano infestati da patogeni sono stati potenziati dal trattamento con succo d'aglio.^[26]

Pertanto, l'allicina sembra avere un potenziale nei programmi di disinfezione delle sementi, sia nell'agricoltura ecologica sia in condizioni di bassa tecnologia (come nei Paesi in via di sviluppo). Oltre a queste applicazioni orientate all'agricoltura, le infezioni fungine dell'uomo e degli animali sono oggetto di interesse. Alcuni studi hanno riportato che l'allicina è risultata efficace in vitro contro specie di *Candida*, *Cryptococcus*, *Trichophyton*, *Epidermophyton* e *Microsporum* a concentrazioni di 1,57-6,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. L'estratto di aglio agisce sulla parete cellulare fungina (es *Poronospera*, Figura 10)

causando cambiamenti irreversibili nelle cellule fungine, che portano alla perdita dell'integrità strutturale e compromettono la capacità germinativa. Questi cambiamenti nel contenuto citoplasmatico portano al danneggiamento del nucleo e degli organelli cellulari che conducono alla morte cellulare. Inoltre, l'allicina provoca un'ossidazione del glutatione che si traduce in uno spostamento del potenziale redox cellulare correlato all'induzione dell'apoptosi. [27]



1.7.3 Proprietà antiparassitarie

Gli effetti antiparassitari dell'aglio fresco schiacciato erano conosciuti già nella medicina cinese tradizionale come trattamento per le malattie intestinali. Diversi anni fa è stato scoperto che l'*Entamoeba histolytica*, il protozoo umano parassita intestinale dell'uomo, è molto sensibile all'allicina, in quanto solo 30 µg/mL di allicina inibiscono totalmente la crescita delle colture di amebe. [28] Più recentemente invece è stato scoperto che a concentrazioni più basse (5 µg/mL), l'allicina inibisce del 90% la virulenza dei trofozoiti di *E. histolytica*, inibendo la loro capacità di distruggere monostrati di cellule di mammifero coltivate in vitro. [29] L'allicina rallenta in modo molto efficiente la crescita di altri parassiti protozoi come *Giardia lamblia*, *Leishmania major*, *Leptomonas*

colosoma e Crithidia fasciculata. Una certa tossicità dell'allicina nei confronti di cellule di mammifero in coltura tissutale è stata invece osservata a concentrazioni superiori a 100 µM. [6,7] Il meccanismo principale coinvolto nell'effetto antibiotico è stato ipotizzato per rapida reazione dei tiosolfonati con i gruppi tiolici presenti in enzimi nei microrganismi. [23]

1.8 Endoterapia

Le piante sono soggette ad attacchi microbici e fungini che vengono contrastati grazie all'applicazione di prodotti fitofarmaci. Tuttavia, essi presentano delle criticità quali, ad esempio, la non completa selettività del principio attivo nei confronti del parassita bersaglio, disomogeneità di distribuzione nelle piante, tossicità per l'operatore, nonché frequenti fenomeni di accumulo e inquinamento nell'ecosistema. Nelle piante vascolari, la linfa xilematica sale dalle radici alle foglie lungo i vasi della linfa. L'endoterapia è una tecnica utilizzata per prevenire o trattare patologie o carenze nutrizionali su piante arboree/legnose e sfrutta tale meccanismo per somministrare fluidi (es. pesticidi, fungicidi, battericidi, fertilizzanti, essiccanti) compatibili con le caratteristiche chimico-fisiche della linfa. Il trattamento per assorbimento spontaneo del fluido nella pianta si chiama infusione (Figura 11). I vantaggi che risiedono nell'utilizzo di un approccio endoterapico rispetto ad un trattamento per irrorazione sono:



Figura 11: Iniezione endoterapica nel melo con Bite®

- 1) riduzione della quantità di fitofarmaci da utilizzare e di quella dispersa nell'ambiente;
- 2) trasporto mirato del prodotto fitosanitario;
- 3) riduzione dell'esposizione ai residui di prodotti fitosanitari nell'ambiente di organismi non bersaglio;

4) conservazione del suolo, delle acque reflue e dell'aria dalla contaminazione;

5) uso più sicuro per gli operatori;

6) possibilità di effettuare i trattamenti in presenza di vento.

Purtroppo, però, le formulazioni studiate a tale scopo sono molto scarse sul mercato e pertanto l'utilizzo risulta essere limitato a sei composti (Azadiractina, Clorpirifosmetil, Imidacloprid, Abamectina, Fosfiti di potassio e Glifosato). Per tutti l'unico veicolante prescritto dall'azienda produttrice è l'acqua. Inoltre, sono presenti ulteriori limitazioni che influenzano l'utilizzo dell'endoterapia dovute all'iniettabilità nulla o molto lenta di molti prodotti fitosanitari autorizzati che può essere forzata con l'aumento della pressione per velocizzare il processo. Tale metodologia può portare a notevoli danni alla pianta causando possibili emboli o un distacco della corteccia e di conseguenza richiede maggiore perizia da parte dell'operatore. Le potenzialità di veicolanti per endoterapia diversi dall'acqua e in grado di consentire l'iniezione di principi attivi non solubili, o di velocizzare quelli già sufficientemente solubili, sono studiate da molti anni, ma i maggiori sforzi sono stati rivolti all'uso di solventi protici (alcoli) e aprotici (acetone, dimetilsolfossido) e solventi organici alcolici polari, di difficile impiego pratico e con una tossicità intrinseca per la pianta e per l'operatore.^[30]

Il trattamento generalmente avviene utilizzando la tecnica dell'infusione che consiste nell'applicazione di pesticidi o altri prodotti all'interno del sistema vascolare a pressione atmosferica. L'infusione è preferita rispetto alla tecnica dell'iniezione, tipicamente eseguita a pressioni molto maggiori, in quanto più costosa perché dà una maggiore probabilità di danni all'albero causati dall'introduzione forzata di un fluido. Tipicamente sia il metodo di infusione che quello di iniezione prevedono la realizzazione di un foro sull'albero, ad esempio mediante un punzone rotante come una punta da trapano, in modo da realizzare una cavità cilindrica per l'inserimento di un ago, che consente l'introduzione nella pianta del prodotto contenuto in un contenitore collegato allo strumento di iniezione o infusione. I problemi principali risiedono: nell'asportazione di un volume di legno vitale nella pianta, il riscaldamento della superficie legato alla rotazione dell'utensile, il riempimento parziale del foro con resina che rende l'operazione parzialmente inefficiente e il rallentamento della cicatrizzazione per

embolizzazione. Pertanto, l'Università di Padova in collaborazione con lo spin-off Pianta Acqua Natura srl (PAN srl) ha brevettato Bite® "Blade for Infusion in Trees". Esso per la sua struttura progettuale consente l'allargamento delle fibre della pianta senza danneggiarle e facilita l'inserimento di un ago dal quale, essendo provvisto di condotti interni per il flusso dei fluidi, è possibile eseguire l'infusione.^[31] L'allicina date le proprietà sopra descritte, è stata selezionata per la realizzazione di formulazioni innovative per l'endoterapia. La composizione del veicolante è stata sviluppata per migliorare la stabilità della molecola, facilitare l'iniettabilità e la solubilizzazione in acqua. Inoltre, è stata considerata la compatibilità chimico-fisica e il dosaggio utilizzato per evitare problematiche di fitotossicità. Tale formulazione è stata brevettata da Pianta Acqua Natura S.R.L. ^[30]

1.8.1 Bite® ^[32]

Il Bite® "Blade for Infusion in Trees" è uno strumento innovativo per endoterapia brevettato dallo spin-off Pianta Acqua Natura srl (PAN srl), di cui l'Università di Padova è sia promotore che socio. Esso non prevede l'uso di trapano ma di una lama forata che entra nelle fibre legnose permettendone la separazione con un attrito minimo. La lama di forma lenticolare, esercitando una leggera pressione sulle pareti dei vasi linfatici, fa aumentare la velocità della linfa, permettendo la salita di un liquido esterno fino alle foglie, quando la traspirazione è sufficiente. L'apertura causata dalla lama si richiude velocemente grazie all'elasticità ed al turgore dei tessuti della pianta; la naturale attività cambiale induce poi un processo di cicatrizzazione che si completa in qualche settimana.

Lo strumento è completamente manuale e fornito di lame intercambiabili, un portapunta comunicante con la siringa contenente il liquido e un percussore per l'inserimento e l'estrazione della lama. Esso può essere utilizzato come accessorio di altre strumentazioni per endoterapia già disponibili sul mercato. Inoltre, può essere usato per l'infusione o l'iniezione a bassa pressione di prodotti regolarmente autorizzati allo scopo o che non necessitano di autorizzazione.

Il Bite®, riportato in Figura 12 è composto dai seguenti componenti:

A) Lama lenticolare: lama a sezione lenticolare forata e vuota all'interno, penetra il legno separando le fibre senza l'asportazione di tessuto.

A1) Guarnizione: posizionata tra la lama e il suo alloggiamento serve ad impedire il deflusso di liquido e l'ingresso di aria. Essa deve essere adeguata alla lama per favorire aderenza alla superficie del fusto.

B) O-ring: è situato internamente tra la lama e il porta-punta. Permette alla lama di essere posizionata nella corretta posizione.

B1) Porta-punta: possiede un braccio inclinato di 45° atto all'inserimento della lama sia in posizione orizzontale (fusto) sia verticale (radici). L'estremità ha un foro tronco-conico per l'inserimento di una comune siringa farmaceutica o di una siringa a pressione o di un deflussore per flebo. Esternamente il braccio è filettato per l'accoppiamento a tubi o capsule contenenti prodotti endoterapici già disponibili sul mercato.

C) Alloggiamento porta-punta: facilita l'introduzione e l'estrazione della lama attraverso un meccanismo ad incastro.

D) Percussore: è composto da una barra filettata con un battente con forma ergonomica. Permette sia l'inserimento sia l'estrazione della lama evitando la rottura della stessa e il possibile ferimento dell'operatore.

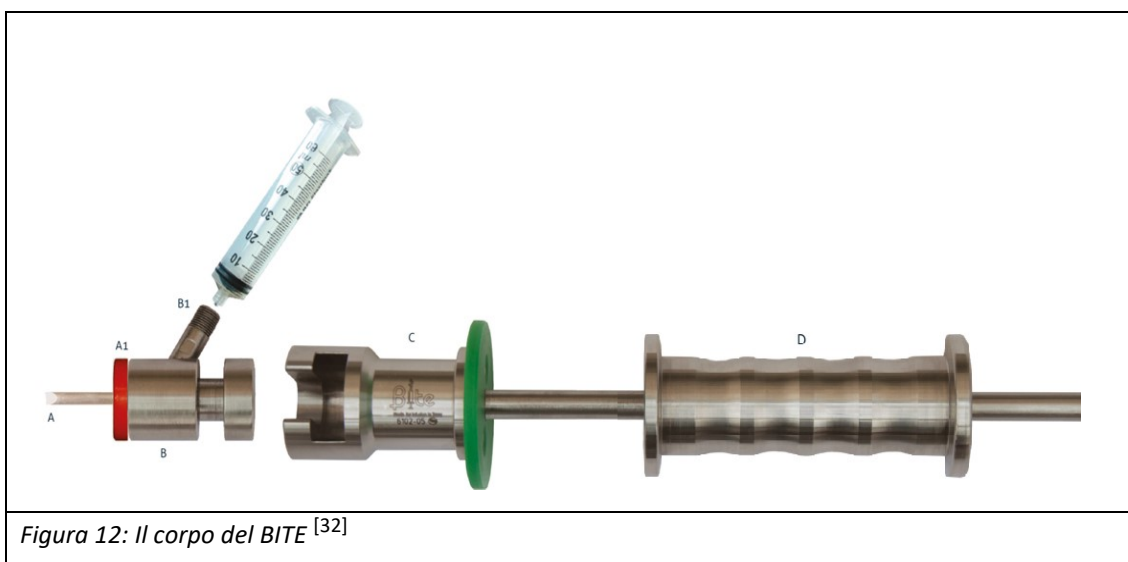


Figura 12: Il corpo del BITE [32]

1.9 Scopo della tesi

Il progetto su cui si basa questo lavoro di Tesi nasce dall'interesse di sfruttare le proprietà benefiche dell'allicina, composto naturale studiato fin dall'antichità come

ottimo antiossidante, antibatterico e antiparassitario, per applicazioni come fitofarmaco in colture arboree di interesse. Nello specifico, lo studio è focalizzato su due principali obiettivi: lo studio della molecola, sia dal punto di vista della sintesi in laboratorio che della sua produzione naturale dall'aglio, e l'applicazione della stessa come prodotto fitosanitario in una prova preliminare realizzata su piante di melo.

In particolare, vista l'elevata instabilità dell'allicina e la difficoltà nella sua determinazione, la prima parte del lavoro ha come obiettivo primario quello di ottimizzare il processo di sintesi e mettere a punto un metodo analitico che permetta una sua identificazione e di determinare la purezza del prodotto di sintesi. Si vuole inoltre valutare della stabilità dell'allicina nel tempo monitorando la degradazione la stessa a differenti temperature ed eseguire un'identificazione approssimativa dei prodotti di degradazione sviluppati.

Inoltre, in parallelo alla sintesi e caratterizzazione dell'allicina, il progetto si pone come scopo quello di: sviluppare un metodo di analisi mediante Proton Transfer Reaction-Mass Spectrometry (PTR-MS) per eseguire un'analisi dei composti volatili (VOC), inclusa l'allicina, sviluppati dal danneggiamento di uno spicchio di aglio; osservare la formazione nel tempo dei VOC in diverse varietà di aglio (selezionate per l'elevata persistenza) e individuare quelle che sviluppano la maggiore concentrazione di allicina. Lo studio fornirà le basi per un confronto e una valutazione futura tra la possibilità di utilizzare per scopi fitoterapici l'allicina prodotta naturalmente dall'aglio, piuttosto che quella di sintesi.

Infine, si vogliono eseguire delle iniezioni endoterapiche in piante di melo di fluidi contenenti come principio attivo allicina o abamectina (utilizzata come riferimento). Queste prove preliminari hanno come obiettivo quello di valutare l'efficacia per l'allicina del metodo analitico comunemente utilizzato per la determinazione dei pesticidi nelle foglie e quello di valutare la presenza o meno dei composti iniettati in diverse parti della pianta e a diversi tempi.

CAPITOLO 2: MATERIALI E METODI

2.1 Reagenti

Nome	Formula molecolare	Marca	Massa molecolare (g/mol)	Densità (g/mL)	Melting Point/ Boiling Point
Disolfuro di diallile ≥80%	C ₆ H ₁₀ S ₂	Sigma Aldrich	146,27	1.008	BP =180-195°C
Acido acetico glaciale	C ₂ H ₄ O ₂	Sigma Aldrich	60.05	1.049	BP=117-118°C
Acqua ossigenata 30wt%	H ₂ O ₂	Sigma Aldrich	34.01	1.11	/
Etere dietilico	C ₄ H ₁₀ O	Sigma Aldrich	74.12	0.7100	BP=34.60°C
Sodio carbonato	Na ₂ CO ₃	Sigma Aldrich	105,99	2,54	/
Cloroformio	CHCl ₃	Sigma Aldrich	119,38	1,49	BP=61,2°C
Idrossido di sodio	NaOH	Baker	40.00	/	/
Acido meta cloro perossibenzoico	C ₇ H ₅ ClO ₃	Sigma Aldrich	172,57	/	MP=69-71°C
Metanolo >90%	CH ₃ OH	Sigma Aldrich	32,04	0,79	BP=64,5°C MP=-89°C
Etanolo	C ₂ H ₆ O	Sigma Aldrich	46,07	0,79	BP=78°C MP=-114°C
PEG 200	HO(C ₂ H ₄ O) _n H	Sigma Aldrich	190-210	1,13	/

Citrato di sodio	$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	Sigma Aldrich	258,06	/	MP=150°C BP=309°C
Acido sorbico	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_2$	Sigma Aldrich	112,1	1,20	MP=130°C BP=200°C
Acido gallico	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$	Sigma Aldrich	170,12	1,694	MP=253°C
EDTA disodato	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Carl Roth	372,24	1,03	/
Acido adipico	$\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4$	Carl Roth	146,14	1,37	MP= 150 – 156 °C BP= 337 °C
L-acido ascorbico	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$	Sigma Aldrich	176,12	1,65	MP= 190 – 192°C
Propil gallato	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_5$	Sigma Aldrich	212,20	1,21	MP= 130°C
Solfato di magnesio	MgSO_4	Sigma Aldrich	120,37	2,66	MP= 1.124 °C
Primary-secondary amine PSA	$(\text{SiN}_2\text{C}_5\text{H}_{13})_n$	Sigma Aldrich	/	2.5 -3.5	MP= >1710°C BP= 2230°C
Cloruro di sodio	NaCl	Sigma Aldrich	58,44	2,17	BP= >1.450 °C
Acido citrico	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	Sigma Aldrich	192,124	1,542	MP= 153°C

2.2 Strumenti

Tabella 1: Marca e Modello degli strumenti utilizzati per le analisi.

Strumentazione	Marca e modello
HPLC-DAD	HPLC: Dionex P680 Pump: Thermostatted column Compartment TCC-100 DAD: PDA -100 Photos Array Diode. Column: Gemini C18 110 A (250x 4,60 mm, 5 µm)
HPLC-QTOF	Agilent 6545 LC-QTOF Column: 00D-4725-AN Kinetex 2,6 5 µm EVO C18 100A 100x2,1mm
UHPLC-QQQ-MS	UHPLC (Acquity UPLC, Waters) analizzatore triplo quadrupolo (Xevo TQ, Waters) Column: Acquity C18 2.1x100mm 1.7 um
GC-MS	Agilent Technologies 5977A MSD Column: InnoWax 30mx0,32mmx0,5um
PTR-TOF	Ionicon Analytik GmbH PTR-TOF 8000

2.3 Varietà di aglio ^[33-35]

Le varietà di aglio selezionate e su cui sono state eseguite le analisi con PRT-MS sono 5: aglio Bianco Piacentino, aglio di Voghiera, aglio rosso di Nubia e aglio bianco Polesano. Le rispettive caratteristiche sono descritte in seguito.

- **Aglio Bianco Piacentino:** è una delle varietà più diffuse in Italia ed è definito il “Re dell’Aglio” per le grandi dimensioni e l’alta produttività. Prodotto in provincia di Piacenza è un aglio davvero molto apprezzato, per la sua ottima conservabilità e per le caratteristiche aromatiche e di gusto deciso e avvolgente.
- **Aglio di Voghiera:** è la varietà più coltivata in Italia e uno dei suoi rappresentanti più illustri è la DOP emiliana Voghiera, il cui nome indica uno dei cinque comuni dell’entroterra ferrarese in cui viene prodotto. Si contraddistingue da bulbi di forma rotondeggiante, regolare e compatta, di colore bianco luminoso e uniforme. Per l’elevato quantitativo di allicina, il profumo è molto intenso, ma al palato non risulta tra le varietà più delicate.
Esso fa parte delle denominazioni italiane, iscritte nel Registro delle denominazioni di origine protette, delle indicazioni geografiche protette e delle specialità tradizionali garantite numero regolamento Reg. UE n. 442 del 21.05.10

- **Aglio rosso di Nubia:** è un presidio Slow Food, il nome deriva da una piccola contrada di Paceco, in provincia di Trapani, la zona della sua coltivazione storica – e dal colore. Si semina tra novembre e dicembre, a volte anche in gennaio, e si raccoglie fresco nel mese di maggio, oppure a giugno, essiccato in parte sui campi. Secondo la tradizione viene confezionato in trecce molto grandi, di cento teste ciascuna, e appeso ai balconi oppure sistemato in cantine o magazzini. Questa varietà dal sapore piccante è caratterizzata da un elevatissimo contenuto in allicina.
- **Aglio bianco Polesano:** è conosciuta fin dall'Ottocento e viene coltivata nella provincia di Rovigo, corrispondente alla zona del Polesine da cui prende il nome. Questo aglio è molto pregiato ed è rigidamente protetto dalla DOP, si distingue per la sua forma regolare e compatta, il colore bianco lucente. È proprio il tipo di terreno alluvionale, ricco di calcio, magnesio, fosforo e potassio a rendere unico questo prodotto dall'aroma delicato e sapore intenso non pungente, ma molto persistente
Esso fa parte delle denominazioni italiane, iscritte nel Registro delle denominazioni di origine protette, delle indicazioni geografiche protette e delle specialità tradizionali garantite numero regolamento Reg. CE n. 1175 del 30.11.09 Reg. UE n. 197 del 05.02.15

Nella Tabella 2 si riportano le specifiche di produzione e confezionamento per ogni campione.

Tabella 2: Specifiche per ogni varietà di aglio e campione acquistato

Aglio	Fornitura
Aglio rosso di Nubia	Duccio srl Prodotto: Canino Salvatore di Paceco (TP) confezionato: Duccio s.r.l., Gavello (RO) calibro: 40/60 L:160
	confezionato: Duccio s.r.l., Gavello (RO) prodotto: Paceco (TP) calibro: 40/60 L:159
Aglio bianco Polesano	Prodotto: agr. Corte Lina, Rovigo confezionato: Duccio s.r.l., Gavello (RO) calibro: 40/60 L:160
	Prodotto: Az. Agr. Romagnolo Pierino Calibro: 40/60 L: 02/A
Aglio di Voghiera	Sapori e d'intorni Conad Certificato da organismo di controllo dal Mipaaf. Prodotto per Conad S.C. via Michelino 59 bologna da S.R.L. SOC. AGR. Nello stabilimento Quartesana (FE)
	Confezionato: Soc.Coop. Agr. Voghierese Calibro: 40/60 L:175 Certificato da organismo di controllo dal Mipaaf
Aglio bianco Piacentino	Cooperativa produttori aglio piacentino (CO.P.A.P.) Monticelli d'Ongina (PC) Confezionato: copap-piacenza Calibro:45/65 L: A/104/21/1

Il consorzio aglio di Voghiera sviluppa la produzione dalla semina nelle aziende in due diversi modi:

- Autoprodotto:
 - da coltura DOP dell'anno precedente;
 - da coltura ecotipo "Aglio di Voghiera", con riferimenti al piano colturale;
- Acquistato:
 - da coltura DOP anno precedente, con riferimenti del fornitore/documento;
 - da coltura ecotipo "Aglio di Voghiera", con riferimenti fornitore/documento;

Quindi l'aglio che si semina, è lo stesso da anni e anni, e mantiene le sue peculiari caratteristiche genetiche. Per le altre varietà selezionate non si è a conoscenza del metodo di produzione agricolo.

2.4 Procedura sperimentale

2.4.1 Sintesi

Confrontando studi precedenti sono state identificate due differenti sintesi per l'ottenimento dell'allicina impiegando come reagente di partenza disolfuro di diallile (DADS) avente concentrazione $\geq 80\%$. La procedura consiste nell'ossidazione del DADS per formare l'allicina che viene estratta con solventi organici allontanati poi per evaporazione.

Entrambe le procedure descritte di seguito sono state eseguite sotto cappa chimica ed evitando il più possibile il contatto con la luce, lavorando al buio nel limite del possibile.

2.4.1.1 Procedura 1

In un matraccio da 25 mL sono stati inseriti 3,5 mL di DADS che poi è stato portato a volume con acido acetico glaciale ed è stato riposto in ghiaccio. In un altro matraccio sono stati introdotti 3,5 mL di acqua ossigenata al 30 wt% e anch'esso è stato portato a volume con acido acetico glaciale. In una beuta ricoperta di alluminio e riposta in un bagno a ghiaccio è stata introdotta la soluzione di disolfuro diallile alla quale sotto costante e vigorosa agitazione è stata aggiunta goccia a goccia la soluzione di acqua ossigenata facendo attenzione e non impiegare più di 30 min. La beuta è stata chiusa e lasciata nel bagno a ghiaccio sotto agitazione per 6 ore. Nel frattempo, è stata preparata una soluzione di NaOH 12M in acqua per un volume complessivo di 50 mL. Al termine delle ore previste, è stata aggiunta goccia a goccia una quantità di NaOH tale da neutralizzare la soluzione. Il pH della soluzione finale è stato verificato con una cartina torna sole. Nel caso in cui nella soluzione si formasse del precipitato bianco aggiungere qualche millilitro di acqua distillata. Successivamente la soluzione è stata riposta in un imbuto separatore e sono state eseguite le estrazioni con etere dietilico 4x50mL. La frazione organica contenente allicina è stata recuperata in un pallone e mediante evaporatore rotante è stato evaporato il solvente. Si ottengono due frazioni oleose una

incolore e l'altra giallo pallido (allicina) che sono state separate sfruttando la diversa densità. La quantità di allicina prodotta varia da 0,5-2mL. ^[15]

2.4.1.2 Procedura 2

In un matraccio da 100ml sono stati inseriti 1,9 g di acido perossibenzoico e successivamente portati a volume con cloroformio mentre, in un altro matraccio da 50ml sono stati inseriti 1,45 g di solfuro di allile e portato a volume in cloroformio. La soluzione di acido perossibenzoico è stata aggiunta goccia goccia a quello disolfuro di allile contenuta in una beuta in un bagno a ghiaccio. La soluzione è stata mantenuta sotto costante agitazione, chiusa e coperta con alluminio per circa 5/6 ore. Successivamente all'intera soluzione è stato aggiunto goccia-goccia sodio carbonato al 5% fino ad ottenere un pH=7. Il pH della soluzione è stato verificato con una cartina tornasole. La soluzione è stata trasferita in un pallone ricoperto con alluminio ed è stato evaporato il solvente mediante evaporatore rotante mantenendo il bagno ad una temperatura di circa 30 °C ponendo attenzione a non superare i 40 °C. La soluzione ottenuta, circa 2mL di allicina, presenta un colore giallino caratteristico del composto. Conservando la soluzione in freezer si nota la formazione di un precipitato bianco che è stato rimosso per ripetute centrifugazioni. ^[36,37]

Entrambe le sintesi che utilizzano come agenti riducenti acqua ossigenata e acido meta cloro perossibenzoico sono state ripetute più volte cercando di ottimizzare le condizioni di temperatura e durata della reazione. Se si ripete la sintesi per più volte si consiglia di lasciare la vetreria immersa in acqua e ipoclorito per alcune ore per poi lavarla con acqua e acetone e infine riporla in stufa a 100°C per 30 min.

2.4.2 Soluzioni e campioni

2.4.2.1 Allicina per iniezione in HPLC

Dall'allicina ottenuta dalle sintesi sono stati poi prelevati con una micropipetta 10 µl e riposti in un matraccio da 10 ml che è stato portato a volume in metanolo ottenendo una soluzione a 1000ppm. Da tale soluzione poi sono state preparate soluzioni più diluite a 100 ppm per poter eseguire l'iniezione in HPLC. Tutte le soluzioni sono state tutte conservate in freezer.

2.4.2.2 Campioni di aglio per PTR-TOF

Le varietà di aglio dopo essere state reperite sono state conservate in congelatore a -20°C. Successivamente più spicchi appartenenti a diversi teste di aglio sono stati macinati in azoto liquido con un macinino elettrico. Successivamente 0,1g di composto reso polvere sono stati inseriti in una vial per poter essere analizzati.

2.4.2.3 Formulazione di allicina per iniezione endoterapica ^[37]

Per la preparazione della formulazione contenente allicina sono state preparate 3 differenti soluzioni:

soluzione 1: Allicina in PEG

Conoscendo la quantità di allicina all'interno del prodotto di sintesi 80% sono stati prelevati 20 ml a cui sono stati aggiunti 4 ml di PEG 200.

soluzione 2: Tampone

In un matraccio da 2 L sono stati introdotti: 9.6380 g di citrato di sodio, 1.3880 g di acido citrico, 20 mg di acido sorbico e 20 mg di propil gallato. La soluzione è stata portata a volume in acqua (milli Q)

soluzione 3: Soluzione di allicina

In un matraccio da 2 L sono stati introdotti rispettivamente: 400 mg di acido sorbico, 100 mg di acido adipico, 40 mg di acido gallico, 20 mg di EDTA-2Na e 10 ml di soluzione 1. La soluzione è stata portata a volume con la soluzione 2 preparata precedentemente

2.4.2.4 Bianco formulazione

La soluzione è stata preparata con la stessa procedura della soluzione 3 ma invece di aggiungere 10 ml della soluzione 1 sono stati aggiunti 10 ml di PEG 200 puro.

2.4.2.5 Abamectina formulazione

La formulazione di abamectina utilizzata è un prodotto commerciale che contiene Mircormegas (Massò agro department) e Sapjet® HD (Newpharm®), i quantitativi sono informazioni coperte da segreto industriale.

2.4.3 Parametri strumentali

2.4.3.1 Analisi allicina di sintesi

2.4.3.1.1 HPLC-QTOF

La colonna utilizzata è 00D-4725-AN Kinetex 2,6 μm EVO C18 (100x2,1mm) e un volume di iniezione di 5 μL e un flusso di 0,1 mL/min e eluenti A (milliQ+5mMNH₄Fe_o+0,1% acido formico) e B (acetonitrile+ 0,1% acido formico). Essi eluiti secondo un gradiente alle seguenti condizioni: 0-5 min 95% A, 15-20 min 0% A, 21-30 min 95% A. Sorgente ESI e protonazione positiva con i seguenti parametri: sheath gas a 375°C, V Camp 3500 V, Nozzle voltage 200V, Fragmentor 125 V. L'analizzatore è formato da un singolo quadrupolo (Q) e da un analizzatore a tempo di volo (TOF)

2.4.3.1.2 HPLC-DAD

L'allicina formatasi è stata analizzata in HPLC-DAD per riuscire a determinare la percentuale di allicina contenuta al suo interno. Lo strumento utilizzato è Dionex P680 HPLC Pump Thermostatted column Compartment TCC-100 con rivelatore PDA -100 Photo Array Diode. La colonna utilizzata in reversed-phase è Gemini C18 110 A (250x 4,60 mm, 5 μm) e sono stati utilizzati come eluenti A (milli-Q), B (metanolo >90%) ad una temperatura di 25°C e con un flusso di 0,6ml/min. Nel detector invece sono state invece impostate tre diverse lunghezze d'onda in corrispondenza al massimo assorbimento allicina a 254nm e dei composti di degradazione predominanti 230 e 240 nm. [19]

2.4.3.1.3 GC-MS

Le analisi eseguite con gascromatografo con analizzatore di massa a singolo quadrupolo sono state eseguite con tecnica solid phase micro extraction (SPME) analizzando lo spazio di testa con una fibra di 2 cm di spessore di divinil benzene (DVB), carboxen (CAR), poli divinil silossano (PDMS). La vial contenente il campione è stata fatta condizionare per 10 min a 35°C e poi è avvenuta l'estrazione esponendo la fibra per 15 min nello spazio di testa della vial e la fase di deassorbimento è avvenuta per 5 min.

La colonna utilizzata è InnoWax 30mx0,32mmx0,5 μm con un flusso di 2 ml/min e la temperatura dell'iniettore a 250°C ed è stato utilizzato un gradiente di temperatura con le seguenti condizioni: 40°C per 1 min, aumento lineare di temperatura 10°C/min fino a

150°C, aumento lineare 2°C/min fino a 250°C per 20 min. Analizzatore a singolo quadrupolo eseguendo una scansione da 33 m/z a 300 m/z.

2.4.3.2 Analisi aglio macinato

2.4.3.2.1 PTR-MS

Il monitoraggio della formazione dell'allicina è stato eseguito iniettando direttamente i VOC prodotti nel drift tube del PTR- MS dove i composti vengono ionizzati in H_3O^+ in aria e successivamente analizzati con analizzatore a tempo di volo (TOF). All'interno di un barattolo chiuso con un tappo in plastica che presenta un setto è stato introdotto uno spicchio di aglio precedentemente privato della camicia esterna. Tramite il setto sono stati introdotti due tubi: mediante il primo si introduce aria pura con un flusso di 100 Standard Cubic Centimeters per Minute (sccm) mentre con il secondo si aspirano con un flusso di uscita di 50 sccm i VOC all'interno del barattolo e li si introduce nell'inlet riscaldato a 110°C. Dopo il condizionamento del barattolo con una bacchetta di vetro è stata fatta pressione sullo spicchio intaccandone la superficie e osservato in tempo reale la formazione di allicina. Successivamente viene rimosso l'inlet dal barattolo e si vede ripristinata la linea di base dei segnali di tutti i composti. Tutte queste operazioni sono state eseguite in sequenza ed a dei tempi prestabiliti riportati in Tabella 3 secondo il protocollo di analisi ideato.

Tabella 3: Schema riassuntivo del protocollo di analisi utilizzato per il pestaggio dell'aglio.

Tempo (s)	Operazione
0	Introdurre spicchio aglio nel barattolo e chiuderlo con il tappo
95	Introduzione dei tubi con rispettivi flussi
700	Pestaggio aglio
1900	Rimozione tubi
3300	Termine analisi

Le vial contenenti aglio macinato in azoto liquido sono state analizzate iniettando direttamente lo spazio di testa del campione nel drift tube del PTR- MS dove i composti vengono ionizzati in H_3O^+ . La temperatura del inlet e del drift tube è pari a 110°C ed una pressione di 2,80 mbar. Ogni singola vial contenente 0.1 g di aglio macinato in azoto liquido è stata conservata a -80°C. L'analisi è stata eseguita mediante autocampionatore

prendendo la vial direttamente dal congelatore, posizionandola sullo stesso ed eseguendo immediatamente l'analisi. Nello spazio di testa dinamico è presente un flusso di aria pura in ingresso a 65 sccm e uno di aspirazione a 60 sccm direttamente collegato con inlet e la reazione è stata monitorata per 20 min. Per ogni campione sono state eseguite tre repliche ed è stata distinta la provenienza di ogni varietà.

2.4.3.3 Analisi campioni foglie

2.4.3.3.1 UHPLC-QQQ-MS

Le analisi eseguite sulle foglie macinate dopo il processo di estrazione QuEChERS (si veda 2.4.4.4) sono state eseguite con UHPLC con un flusso di 0.450 ml/min, volume di iniezione di 10 µL, e eluente A (H₂O + 0.1 % FA) e B (MeOH + 0.1%FA). Essi sono stati eluiti secondo un gradiente di eluizione alle seguenti condizioni: 95% A per 0.25 min; 30% A a 6 min; 0% A (100 % B) a 9.50 min e poi è stata mantenuta una condizione isocratica per 2 min. Si è utilizzata una Sorgente Electrospray (ESI) con protonazione positiva: ad una temperatura di 150 °C, gas di nebulizzazione azoto a 1000 L/h, potenziale del capillare 1, 5 KV. Gli spettri sono stati acquisiti in modalità MRM con analizzatore a triplo quadrupolo analizzando le transizioni: m/z 163>73 per l'allicina e m/z 895.5>183 per l'abamectina.

2.4.4 Iniezioni endoterapiche

2.4.4.1 Caratteristiche meli

Nella prova effettuata a titolo preliminare, 3 piante di melo di varietà Golden Delicious sono state trattate rispettivamente con formulazioni di abamectina, allicina e bianco (solo veicolante). Le piante hanno rispettivamente una circonferenza a 30 cm dal terreno di 22 cm, 26 cm, 26 cm.

2.4.4.2 Procedura iniezione

Le iniezioni nelle piante di melo sono state eseguite mediante l'utilizzo del BITE® ed in giornate soleggiate per favorire l'assorbimento del prodotto all'interno della pianta. L'iniezione è stata eseguita a 30 cm dal terreno con un quantitativo di 4 ml per cm di circonferenza per le piante in cui è stato iniettato allicina e il bianco, mentre sono stati

iniettati 5 ml per cm di circonferenza per la pianta in cui è stata iniettata la soluzione di abamectina.

L'ago utilizzato è lungo 8 cm, compatibile con la lunghezza, spessore e diametro della pianta. Per piante con superficie molto irregolare o piccole si può utilizzare del mastice all'olio di lino da posizionare alla base evitando di coprire i fori da cui fuoriesce il prodotto. Selezionate le piante bisogna cercare di trovare un punto che sia il più possibile liscio e nel caso ci fosse una corteccia spessa è consigliato toglierla con un coltellino facendo attenzione a non incidere la parte vitale della pianta. Successivamente è stata riempita la siringa sterile del fluido fino a 5 cm dal massimo riempimento. L'ago con la guaina è stato fissato nel battente e posizionandosi lateralmente alla pianta e perpendicolare rispetto alla stessa e al terreno sono stati dati dei colpi con il battente per far entrare l'ago nella pianta fino a quando la guaina non è ben aderente alla superficie. Poi è stato staccato il battente e rapidamente inserita la siringa nel supporto del solido per evitare la formazione di emboli. In seguito, è stato controllato che il fluido non fuoriuscisse in prossimità dalla guaina, se dovesse succedere, è necessario dare ulteriori colpi con il battente per assicurare la giusta pressione. Dopo che tutto il quantitativo di fluido è stato assorbito mediante l'utilizzo del battente è stato tolto l'ago. Infine l'ago è stato disinfettato con etanolo 90% e risciacquato con acqua per evitare contaminazioni di batteri/malattie tra piante. Durante tutta la procedura sono stati indossati guanti e occhiali di protezione.

2.4.4.3 Campionamento foglie

Da tutte e tre le piante trattate sono stati prelevati dei campioni di foglie da analizzare successivamente. I campionamenti sono stati eseguiti appena prima dell'iniezione del trattamento, dopo 5 giorni dal trattamento e infine dopo 19 giorni dal trattamento. La chioma della pianta è stata divisa a metà distinguendo per ogni campionamento la zona in alto e in basso. Per campionamento, pianta e zona sono state prelevate 15 foglie per avere un'adeguata variabilità. Dopo essere state raccolte sono state insacchettate e conservate in ghiaccio.

2.4.4.4 Analisi foglie ^[38]

Le foglie ottenute dai tutti i campionamenti sono state macinate mediante l'uso di un macinino elettrico in azoto liquido e 2 g della polvere ottenuta sono stati introdotti in una vial. Per ogni campione sono state eseguite 3 repliche tecniche utilizzando lo stesso metodo di estrazione e purificazione. La procedura, che si basa su quella normata QuEChERS (UNI EN 15662:2018), prevede una prima estrazione monofase di 2 g di campione con 2 mL di acetonitrile, seguita da una estrazione liquido-liquido, favorita dall'aggiunta di 0,8 g di MgSO₄ anidro e 0,2 g di NaCl. La rimozione dell'acqua residua e la purificazione sono state eseguite simultaneamente utilizzando una dispersiv solid-phase extraction (d-SPE) in fase solida in cui 75 mg di MgSO₄ anidro e 5 mg di ammina primaria e secondaria (PSA) sono semplicemente mescolati con 0,2 mL di estratto di acetonitrile. L'estratto poi è pronto per essere analizzato con UHPLC-QQQ-MS (si veda 2.4.3.3.1). Prima di analizzare le foglie campionate dai meli trattati sono state eseguite delle contaminazioni artificiali per verificare il metodo di estrazione. Alle foglie macinate di piante non trattate sono state aggiunte le soluzioni di allicina in formulazione e di abamectina in formulazione ottenendo una concentrazione di 1 mg/Kg.

2.4.4.5 Analisi mele

Dopo circa tre mesi dal trattamento endoterapico sono state raccolte 3 mele per pianta e analizzate con PTR-MS. Nello specifico si sono analizzate tre mele dalla pianta trattata con la formulazione di allicina e tre dalla pianta trattata con la formulazione di riferimento non contenente nessun principio attivo. Di ogni mela circa 5 g sono stati inseriti all'interno di un barattolo da 200 ml chiuso con un tappo. Il condizionamento è durato 5 min e poi è stata eseguita la misura inserendo l'inlet all'interno di un barattolo tramite un foro nel tappo e un ago per permettere il passaggio dell'aria. Il monitoraggio è avvenuto per 1 minuto utilizzando una ionizzazione con ione primario H₃O⁺ in aria e un analizzatore a tempo di volo (TOF). La temperatura del inlet e del drift tube è pari a 110°C e la pressione nel drift tube di 2,80 mbar.

CAPITOLO 3: RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Sintesi

L'allicina è stata sintetizzata in laboratorio mediante due diverse procedure di sintesi descritte nel paragrafo 2.4.1. Nonostante l'ottenimento del prodotto già dalle prime sintesi, si è cercato di migliorare la resa della stessa andando a modificare i parametri di temperatura, tempo di reazione e pH. Di seguito nelle Tabelle 3-4 sono riportati i parametri modificati per ciascuna prova nella rispettiva sintesi.

SINTESI: acqua ossigenata

Tale sintesi impiega acqua ossigenata come ossidante per disolfuro di diallile e viene eseguita in acido acetico e successivamente viene estratto il prodotto in esano. Per i tempi di reazione più brevi (4-6h) la soluzione è stata continuamente mescolata mediante ancorotta magnetica mentre per tempi superiori inizialmente è stata anch'essa mescolata utilizzando l'ancoretta magnetica e poi riposta in frigo per tutta la notte coperta da carta stagnola. Nella Tabella 4 sono riportate le relative masse di prodotto ottenute e le condizioni sperimentali.

Tabella 4: Prove di sintesi eseguite con acqua ossigenata con le rispettive condizioni

Prova	m prodotto (g)	T di reazione (°C)	Tempo di reazione (h)	T durante la neutralizzazione	pH prima dell'estrazione	Colore prodotto
1	1.8308	0	4	Bagno ghiaccio	8	Gialla
2	10.7894	0	24	Bagno ghiaccio	8	Gialla
3	0.1258	0	6	Bagno ghiaccio	5	Giallo pallido
4	1.9782	0	6	Bagno ghiaccio	7	Giallo pallido
5	0.7435	0	24	Temperatura ambiente	7	Giallo intenso
6	25.6732	22	5	Bagno ghiaccio	7	Giallo pallido
7	0.6234	0	5	Temperatura ambiente	7	Giallo pallido
8	0.2148	0	4	Bagno ghiaccio	7	Giallo pallido

Il pH della soluzione prima dell'estrazione è un parametro determinante che influisce sulla estrazione liquido-liquido (LLE) poiché il quantitativo di base aggiunta permette un aumento del pH e una dissociazione dell'acido acetico presente in soluzione. Tale aumento del pH consente la formazione del sale dell'acido favorendo la ripartizione dello stesso in fase acquosa invece che in fase organica facilitandone la rimozione durante l'estrazione. Pertanto, come dimostra la prova 3 nel quale è stato utilizzato un pH pari a 5 il quantitativo di prodotto è molto inferiore. Il pH ottimale da raggiungere prima dell'estrazione è quello compreso tra 7 e 8.

Inoltre, per tempi di reazione molto lunghi (prova 2-5) per l'esperimento condotto a temperatura ambiente (prova 6) la massa di prodotto ottenuto è molto elevata e il colore rimane sempre giallo pallido, tranne per la prova 5 in cui la colorazione è molto più intensa. In queste prove, pur avendo ottenuto una massa di prodotto molto più grande, in realtà la quantità di allicina non era maggiore rispetto agli esperimenti di durata inferiore. Anzi, in questi casi, si nota un aumento dei prodotti di degradazione, probabilmente responsabili della colorazione giallo intenso della prova 5. Il tempo di reazione ottimale è dunque quello di 5-6 ore e la soluzione deve essere mantenuta costantemente in bagno di ghiaccio.

Per avere un'indicazione preliminare sull'esito della reazione durante la sintesi è utile osservare la soluzione all'interno dell'imbuto separatore prima dell'aggiunta di esano, si dovrebbe vedere infatti, in superficie una sospensione di colore giallo.

SINTESI: acido perossibenzoico

Questa sintesi invece impiega acido perossibenzoico in presenza di cloformio per ossidare allil disulfuro. Tale sintesi (si veda 2.4.1.2) è stata ripetuta più volte ma si sono sempre ottenuti quantitativi di prodotto minori rispetto alla sintesi eseguita con acqua ossigenata. Inoltre conservando il prodotto in freezer, si nota la formazione di un precipitato bianco solubile in solventi organici, probabilmente sale dell'acidoperossibenzoico. Anche a seguito di centrifugazioni esso continua a formarsi, sintomo che il processo di estrazione dell'allicina non risulta molto efficace con questa

procedura. In Tabella 5 si riportano le sintesi più significative condotte con questa procedura.

Tabella 5: Prove di sintesi eseguite in acido perossibenzoico con le rispettive condizioni

Prova	Data	m DADS (g)	M prodotto (g)	T di reazione (°C)	Tempo di reazione (h)	pH	Colore
1	09/03	1.4488	1.4222	0	0.5	7	Giallo intenso
2	13/04	1.4685	0.145	0	5	7	Giallo intenso

Nonostante l'acido perossibenzoico sia il composto ossidante preferito per eseguire l'ossidazione di disolfidi a solfossidi, si sono ottenute quantità irrisorie di prodotto. Molto probabilmente questo fattore è legato alla temperatura poiché solitamente queste reazioni richiedono basse temperature anche -30°C. [39]

Comparando le sintesi eseguite nelle condizioni sopra descritte risulta essere migliore per l'ottenimento di allicina eseguire il procedimento che prevede l'utilizzo di acqua ossigenata come agente ossidante.

3.2 Caratterizzazione allicina

L'allicina è una molecola molto instabile e degrada a temperatura ambiente. Date le sue caratteristiche, non è facile riuscire ad individuare la strumentazione adeguata alla sua determinazione. Di conseguenza sono state eseguite delle prove preliminari per identificare quella ottimale.

3.2.1 HPLC-QTOF

Inizialmente si è optato per un'analisi con spettrometria di massa ad alta risoluzione accoppiata alla cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC-QTOF). Grazie alla sorgente electrospray (ESI), che permette una ionizzazione soft, e all'alta risoluzione si è cercato di identificare lo ione molecolare dell'allicina (m/z 163.0246) in modalità positiva. Dall'analisi si è ottenuto il cromatogramma con la corrente ionica totale in funzione del tempo di ritenzione (min). Da tale cromatogramma è stata eseguita l'estrazione per il frammento dell'allicina $[M+H^+]=131,0525$ m/z e si osserva un picco a tempo di ritenzione pari a 2,499 min (Figura 13).

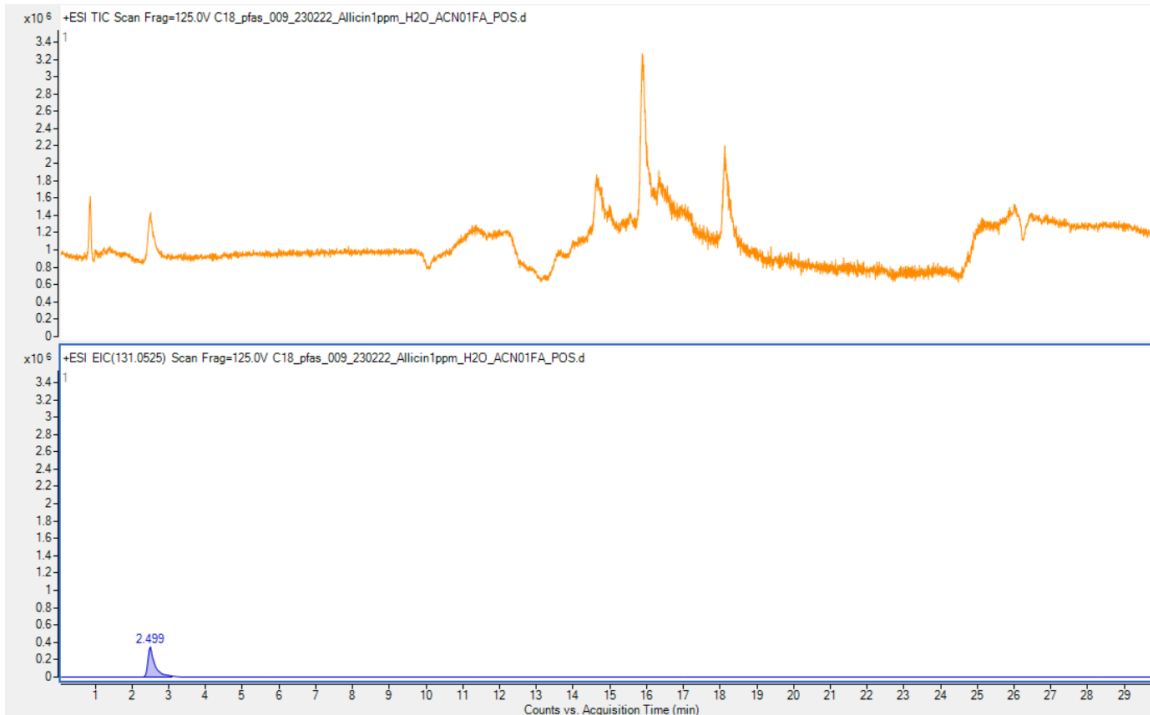


Figura 13: Nel cromatogramma superiore è rappresentata la corrente ionica totale in funzione del tempo di ritenzione (min) mentre in quello inferiore è un'estrpolazione della corrente ionica del picco relativo al frammento dell'allicina in funzione del tempo di ritenzione (min)

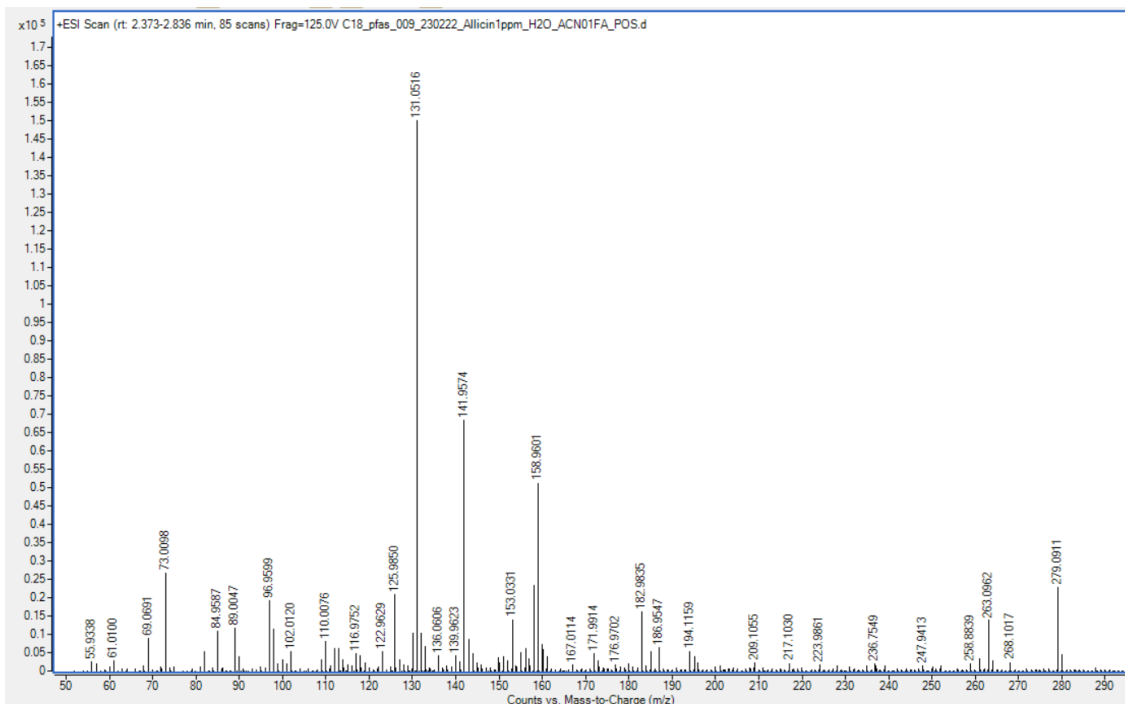


Figura 14: Spettro di massa con abbondanze relative per gli ioni in funzione del loro rapporto massa/carica relativo al picco con tempo di ritenzione di 2.499 min

Lo spettro di massa associato al picco del frammento dell'allicina è riportato in abbondanza relativa rispetto al rapporto m/z (Figura 15).

Nella Tabella 6 si è cercato di effettuare l'assegnazione dei composti alle rispettive m/z calcolando anche l'errore in ppm dato dall'equazione:

$$\text{Errore (ppm)} = \frac{MT - MS}{MT} * 10^6 \quad (\text{eq.1})$$

con MT massa teorica [M+H⁺] e MS massa sperimentale [M+H⁺].

Tabella 6: Picchi molecolari relativi all'allicina riportati con i relativi m/z, formula bruta, m/z sperimentale della figura 15, assegnazione ed errore.

Formula bruta	M+H ⁺ teorica	M+H ⁺ sperimentale	Assegnazione	Errore (ppm)	
C ₆ H ₁₀ S ₂ O	163,0246	/	Allicina		
C ₆ H ₉ SO	131,0525	131,0516		6,87	Frammentazioni allicina ^[40,41]
C ₃ H ₆ OS	91,0212	/	Acido sulfenico		
C ₃ H ₄ S	73,0106	73,0098		11,00	

Lo ione molecolare dell'allicina non si vede nello spettro di massa nonostante si tratti di una ionizzazione chimica soft che ne consentirebbe la visione. Questo fatto potrebbe essere dovuto alla difficoltà della molecola di ionizzare o che essa degradi per le elevate temperature già all'interno della sorgente permettendo di vedere nello spettro di massa solo alcune frammentazioni, come ad esempio gli ioni a m/z 131,0516 e m/z 73,0098 alle quali però non è stato possibile eseguire l'assegnazione. Il frammento dell'allicina che dovrebbe comparire a m/z pari a 91,0212 relativo all'acido sulfenico non è presente nello spettro. Trattandosi di un acido, per le sue caratteristiche chimico-fisiche ha maggiore tendenza a cedere un protone piuttosto che acquisirlo. Pertanto, probabilmente si osserverebbe eseguendo una protonazione in negativo rispetto a una positiva come eseguito. Per le masse con m/z 141,9875 e 158,9601 non è stato possibile eseguire l'assegnazione ma si suppone appartengano ad altri composti sviluppati durante la sintesi.

Tale strumentazione idealmente era quella preferita data l'alta risoluzione ma non essendo riusciti ad individuare lo ione molecolare e il pattern isotopico caratteristico

della molecola non si è in grado di stabilire che all'interno del prodotto di sintesi sia effettivamente contenuta allicina. Inoltre, l'intensità del segnale della corrente ionica è relativamente bassa essendo dell'ordine di grandezza 10^{5-6} .

3.2.2 GC-MS

La formulazione contenente allicina preparata per le iniezioni endoterapiche è stata analizzata in GC-MS con una concentrazione di 1 ppm in acqua sfruttando la tecnica SPME. La colonna utilizzata per la separazione cromatografica è composta da una fase stazionaria molto polare, poli etilenglicole (PEG).

Lo spettro cromatografico (Figura 15) vede la percentuale di corrente ionica totale in funzione del tempo di ritenzione (min). Dei composti di interesse si riescono ad identificare solo due molecole: disolfuro di diallile (Figura 16, 17) e trisolfuro di diallile (Figura 18,19). Essi hanno rispettivamente tempo di ritenzione pari a 10,50 min e 14,87min, trattandosi di una colonna polare il diallil trisulfide avendo un atomo di zolfo in più rispetto al diallil disulfide, è maggiormente trattenuto dalla colonna. Il picco maggioritario con tempo di ritenzione a 4.66 min è relativo a etanolo avendo un basso punto di ebollizione che lo rende facilmente trasportabile dalla fase mobile mentre gli altri picchi corrispondono a silossani presenti nella colonna.

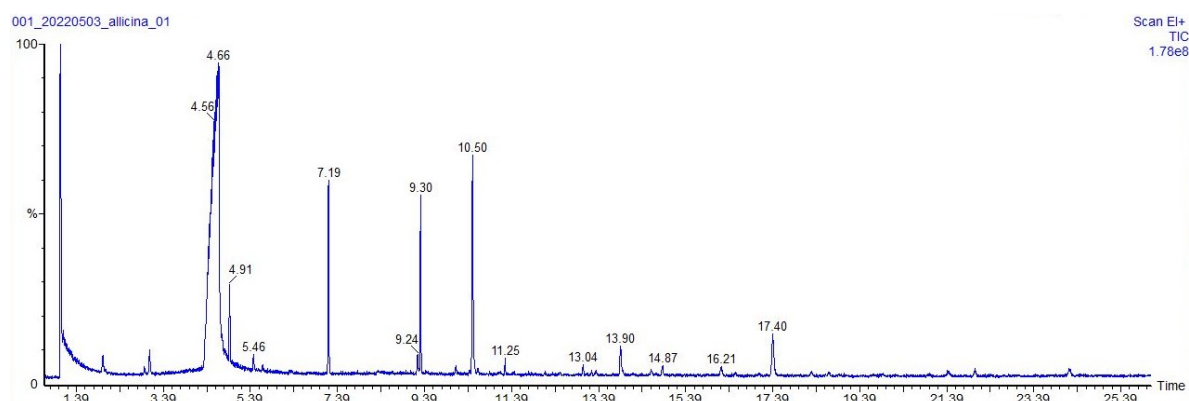


Figura 15: Spettro cromatografico della formulazione allicina per soluzioni endoterapiche 1 ppm, percentuale di intensità ionica % in funzione del tempo di ritenzione (min).

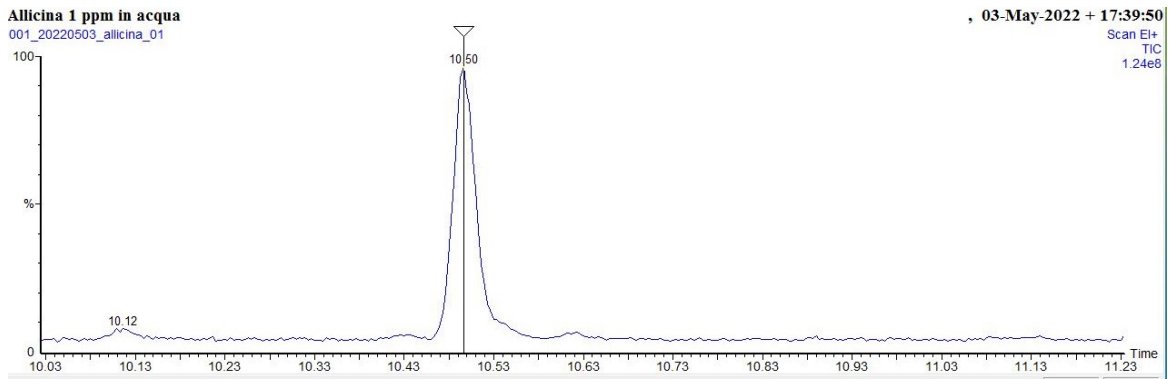


Figura 16: Ingrandimento picco eluizione DADS con tempo di ritenzione di 10.50 min

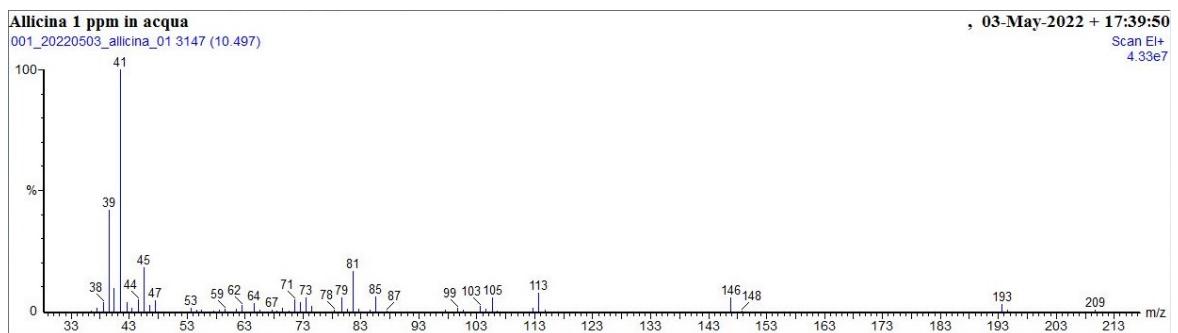


Figura 17: Spettro di massa del reagente DADS con abbondanza relativa % in funzione del rapporto massa/carica.

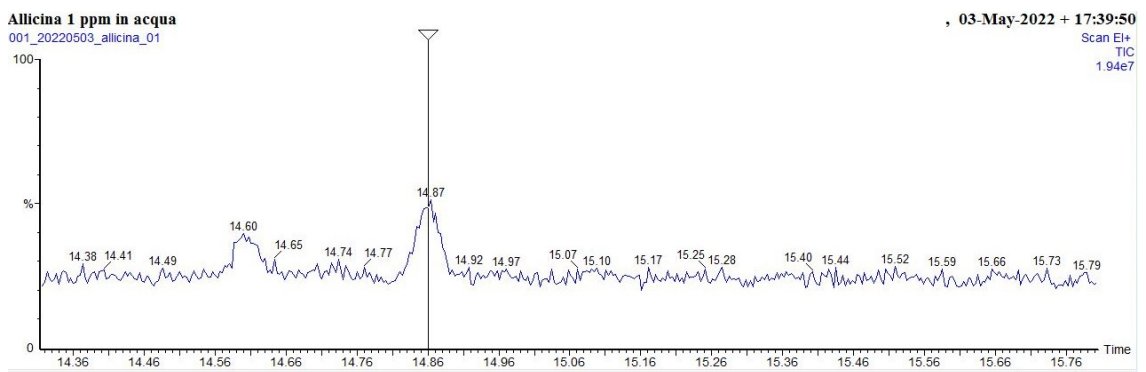


Figura 18: Cromatogramma con picco di eluizione trisolfuro di diallile

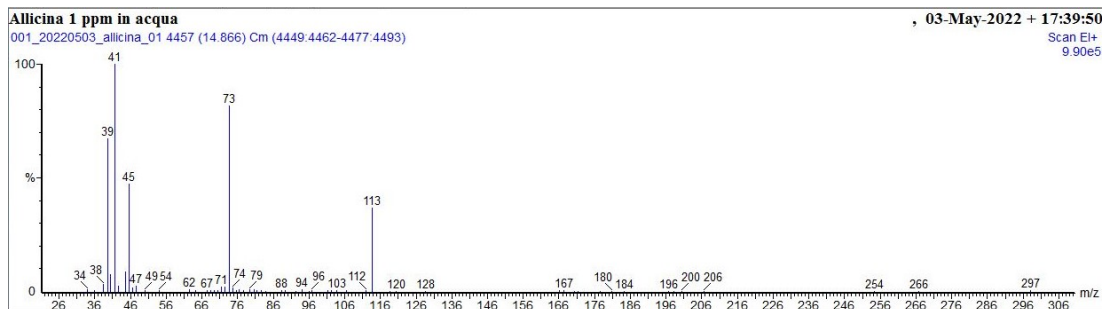


Figura 19: Spettro di massa trisolfuro di diallile con abbondanza relativa % in funzione del rapporto massa/carica.

Negli spettri di massa (Figura 17,19) sono rappresentate le abbondanze relative per gli ioni in funzione del loro rapporto massa/carica. In entrambi gli spettri non sono presenti gli ioni molecolari che hanno m/z pari a: 147,0 m/z (disolfuro di allilile) e 179,0 (trisolfuro di allilile) ma è possibile comunque identificarli dal pattern di frammentazione caratteristico della singola molecola. [42,43]

In conclusione, anche mediante GC-MS non è stato possibile determinare la presenza di allilina. I maggiori composti identificati sono: disolfuro di allilile e trisolfuro di allilile. Tale risultato si suppone sia dovuto alla degradazione della molecola già all'interno dell'iniettore. L'allilina, infatti, a temperature superiori ai 150° deidrata a $C_6H_8S_2$ portando alla formazione di composti ciclici: vinyl-6/7-1,2-dithiin e 3-vinyl-4//1,2-dithiin. [44,45]

3.2.3 HPLC-DAD: ottimizzazione del metodo

Infine, si è optato per una strumentazione HPLC-DAD sfruttando l'assorbimento nel UV dell'allilina a 254 nm. Inizialmente è stata utilizzata una colonna Kinetex 2,6 μm XB C18 100 angstrom, size 100x2,10mm ad una temperatura 25°C con flusso 0,15 ml/min e iniettato una soluzione 100ppm in metanolo. Gli eluenti utilizzati sono milliQ (A), metanolo (B) con il seguente gradiente: 0-5min 20% B, 20-30 min 80% B, 31-45min 20% B. Sono state selezionate le lunghezze d'onda di 254 e 230 e 240 nm che corrispondono ai massimi di assorbimento nell'UV per allilina, e alcuni dei composti di degradazione maggioritari. [19]

Inizialmente con le condizioni sopra descritte è stata iniettata la soluzione del reagente della sintesi (DADS) con una concentrazione di 100 ppm in metanolo per poterne determinare i tempi di ritenzione. Nello spettro cromatografico (Figura 20) è riportata

l'intensità luminosa (mAu) in funzione del tempo di ritenzione (min). Si osservano due picchi cromatografici con tempi di ritenzione di 25,442 min e 27,508 min (Tabella 7).

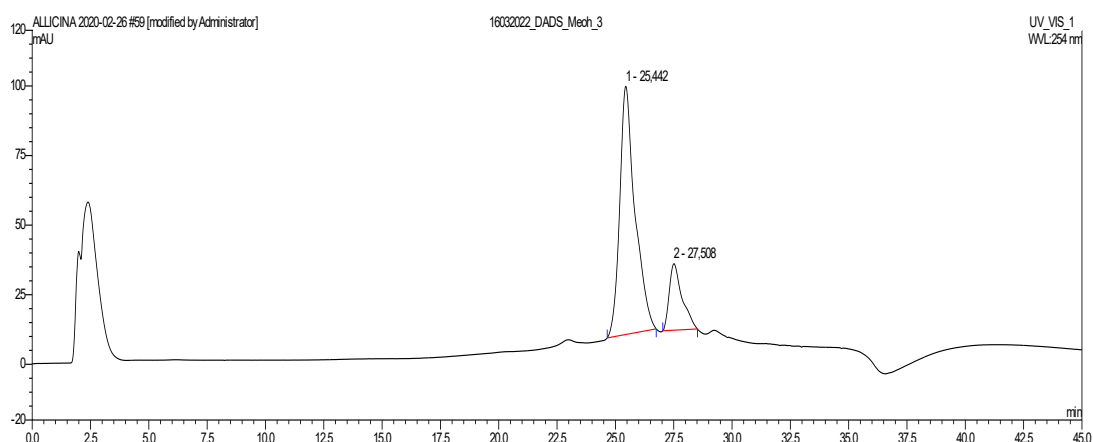


Figura 20: Spettro cromatografico DADS 100ppm in metanolo in cui è riportata l'intensità luminosa (mAU) in funzione del tempo di ritenzione (min)

Tabella 7: Tempi di ritenzione e relative aree dello spettro cromatografico del DADS

picco	tempo di ritenzione (min)	Area picco (mAU*min)	Apicco/Atot *100
1	25,442	67,6466	81,67
2	27,508	15,1785	18,33

La soluzione di disolfuro di diallile con cui sono state eseguite le sintesi è pura $\geq 80\%$, ciò è confermato osservando il rapporto percentuale della singola area del picco rispetto all'area totale dei picchi nel cromatogramma. Il picco maggioritario presente all'81,67% corrisponde a disolfuro di diallile mentre quello presente a 18,33% è relativo alle impurezze. Successivamente è stata iniettata una soluzione a 100 ppm in metanolo del prodotto di sintesi eseguita utilizzando acqua ossigenata come ossidante. Confrontando gli spettri di diallil disulfide (Figura 21) e del prodotto di reazione (Figura 21) si nota la presenza di due picchi in più a tempo di ritenzione di 14,275 min e 20,800 min.

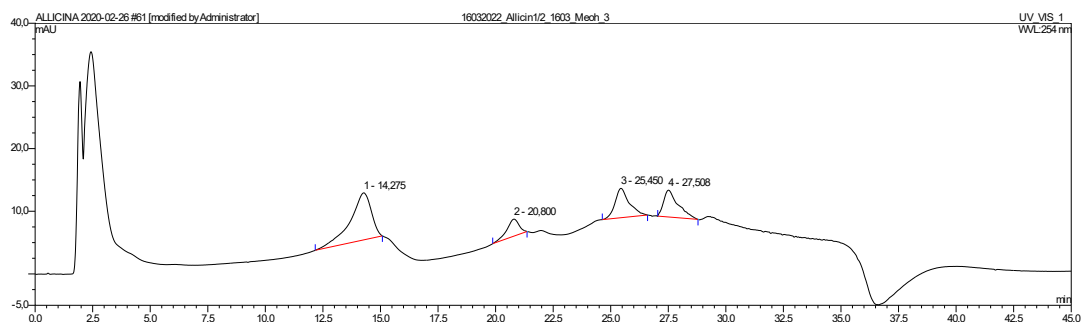


Figura 21: Spettro cromatografico prodotto di sintesi 100ppm in metanolo in cui è riportata l'intensità luminosa (mAU) in funzione del tempo di ritenzione (min)

Tabella 8: con tempi di ritenzione e relative aree dello spettro cromatografico del prodotto di sintesi

picco	tempo di ritenzione (min)	Area picco (mAU*min)	Apicco/Atot *100
1	14,275	8,0086	49,54
2	20,800	1,6858	10,43
3	25,450	3,3500	20,72
4	27,508	3,1211	19,31

Il secondo picco a 20,800 min si suppone corrisponda all'allicina considerando lo spettro di assorbimento che presenta un lieve picco a 254 nm (Tabella 8). I picchi sono molto larghi e scodati, inoltre, non è possibile identificare dallo spettro UV il picco a 14,275 min. È tuttavia possibile ipotizzare che il picco sia dovuto ad un prodotto di degradazione dell'allicina vista l'elevata instabilità della molecola. Ipotesi che potrebbe essere confermata solo grazie ad uno standard. Infine, al tempo di ritenzione pari a 2-2,50 min è visibile una sovrapposizione tra due picchi. Per cercare di separare tali picchi è stato sviluppato un ulteriore metodo che impiega un gradiente di eluizione diverso con le seguenti condizioni: 0-5min 0% A, 20-30 min 80% A, 31-45min 0% A. Nell'intervallo di tempo da 0-5 min si è utilizzato il 100% A in modo tale da favorire la ritenzione sulla colonna dei composti e consentire la separazione dei due picchi. Purtroppo, non si sono osservati dei miglioramenti consistenti.

Basandosi su delle prove effettuate in precedenza, si è deciso di testare una seconda colonna, una Gemini-C18 (5 μ m 110 A 250x 4,60 mm), per valutare la migliore separazione tra i composti presenti nel prodotto di sintesi. Si è deciso di utilizzare un metodo che prevedeva una temperatura di utilizzo di 25°C, con un flusso di 0,6 ml/min, volume di iniezione di 5 μ L ed A (milliQ) e B (metanolo) come eluenti isoeluiti al 50% (50% A + 50% B). Anche nel medesimo caso è stata prima iniettata una soluzione a 100ppm in metanolo di diallil disulfide e poi nelle medesime condizioni il prodotto di reazione. Nel cromatogramma (Figura 22) ottenuto per disulfuro diallile si osservano 3 picchi di ritenzione entrambi con un'intensità luminosa molto bassa e molto allargati.

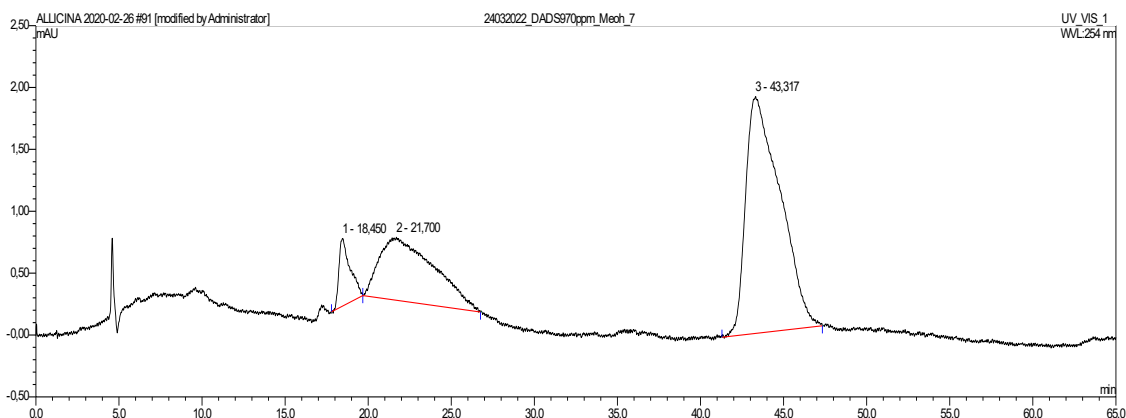


Figura 22: Spettro cromatografico del reagente 100ppm in metanolo in cui è riportata l'intensità luminosa (mAU) in funzione del tempo di ritenzione (min)

Tabella 9: con tempi di ritenzione e relative aree dello spettro cromatografico del reagente

picco	tempo di ritenzione (min)	Area picco (mAU*min)	Apicco/Atot *100
1	18,45	0,4252	6,08
2	21,7	1,9617	28,06
3	43,37	4,605	65,89

Il picco con tempo di ritenzione pari a 43,37 min può essere attribuito al disolfuro diallile dato l'elevato rapporto percentuale delle aree (Tabella 9). Osservando lo spettro cromatografico (Figura 24) ottenuto per il prodotto di sintesi si è determinato che il picco con tempi di ritenzione di 9,625 min corrisponda all'allicina dato l'assorbimento a 254nm.

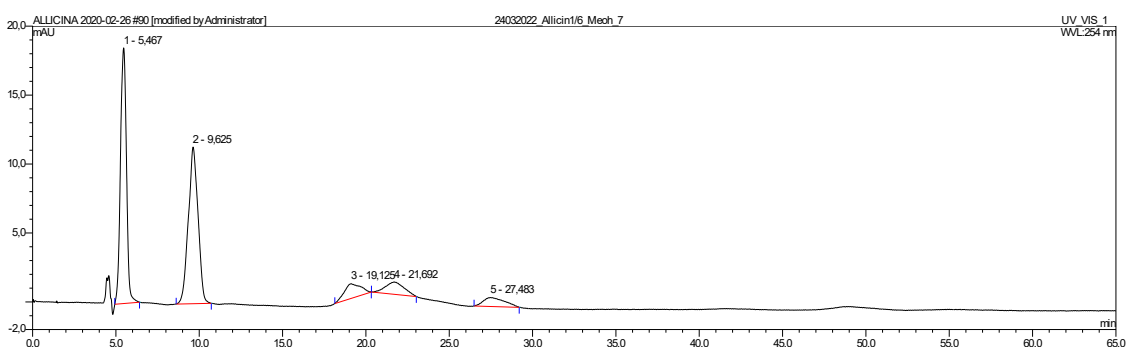


Figura 24: Spettro cromatografico prodotto di sintesi 100ppm in metanolo in cui è riportata l'intensità luminosa (mAU) in funzione del tempo di ritenzione (min)

Tabella 10: con tempi di ritenzione e relative aree dello spettro cromatografico del prodotto di sintesi

picco	tempo di ritenzione (min)	Area picco (mAU*min)	Apicco/Atot *100
1	5,467	7,7468	41,30
2	9,625	7,6717	40,90
3	19,125	1,2039	6,42
4	21,692	1,1700	6,24
5	27,483	0,9663	5,15

La diminuzione del tempo di ritenzione dell'allicina (Tabella 9-10) può essere attribuita principalmente al cambio di fase stazionaria. La colonna Kinetex XB-C18 utilizzata per le prove sopra descritte, infatti, ha delle ramificazioni isobutiliche all'interno di quelle C18, presentando maggiore funzionalizzazione rispetto ad una normale C18. Di conseguenza le specie apolari sono maggiormente trattenute ed eluiscono a tempi di ritenzione maggiori. ^[46]

I picchi con tempo di ritenzione pari a 5,467min e a 27,483 min probabilmente corrispondono a composti di degradazione dell'allicina formati durante la sintesi. Anche in questo caso, tuttavia, mancando gli standard, non è possibile una loro identificazione solo in base allo spettro di assorbimento. Inoltre, confrontando i due spettri cromatografici si può determinare che i picchi corrispondenti al reagente siano quelli con tempi di ritenzione pari a 19,125 e 21,692min. All'interno dello spettro (Figura 23) si osserva che manca il picco del DADS, che nello spettro (Figura 22) è chiaramente visibile a circa 43min. La mancanza del picco cromatografico del reagente si suppone sia dovuto al fatto che esso è molto trattenuto dalla colonna e questo fa sì che il picco risulti essere molto allargato non permettendo di rivelarlo. Di conseguenza utilizzando la medesima colonna e parametri si è deciso di impostare un gradiente di eluizione che aumenti il quantitativo di eluente organico, metanolo, per favorire la ripartizione del DADS in fase mobile e fuoriuscire prima dalla colonna con un tempo di ritenzione inferiore. Il gradiente prevedeva: 0-10 min 50% B, 10-20 min aumento lineare della quantità di metanolo, 20-30 min 100% B, 31-45 min 50% B. Per i primi 10 min si è deciso di mantenere il 50% di metanolo come nel metodo precedente per consentire la fuoriuscita dell'allicina circa attorno ai 10 min e poi si è aumentato il quantitativo di metanolo per diminuire il tempo di ritenzione del DADS. Lo spettro cromatografico relativo al DADS (Figura 24) è stato ottenuto iniettando una soluzione a 100 ppm di

reagente in metanolo. Si osserva (Tabella 11) che come previsto i tempi di ritenzione sono diminuiti di circa 20 min e che i picchi sono molto più stretti e consentono una migliore risoluzione.

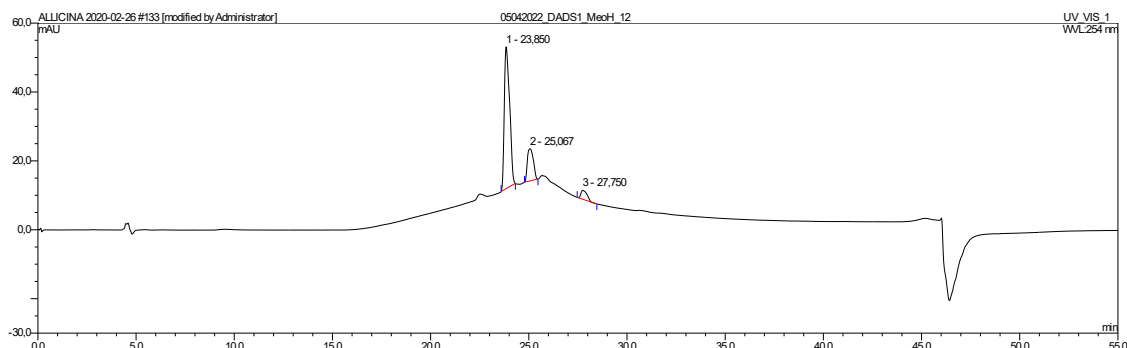


Figura 24: Spettro cromatografico reagente 100 ppm in metanolo in cui è riportata l'intensità luminosa (mAU) in funzione del tempo di ritenzione (min)

Tabella 11: Tempi di ritenzione e relative aree dello spettro cromatografico del reagente DADS

picco	Tempo di ritenzione (min)	Area picco (mAU*min)	Apicco/Atot *100
1	23,850	17,8759	80,86
2	25,067	3,2919	14,89
3	27,750	0,9383	4,24

Il picco 1 a 23,85 min corrisponde all'DADS essendo predominante all'80,86% mentre i successivi sono relativi a impurezze. Lo spettro (Figura 25) è relativo al prodotto di sintesi iniettando una soluzione a 1000 ppm in metanolo.

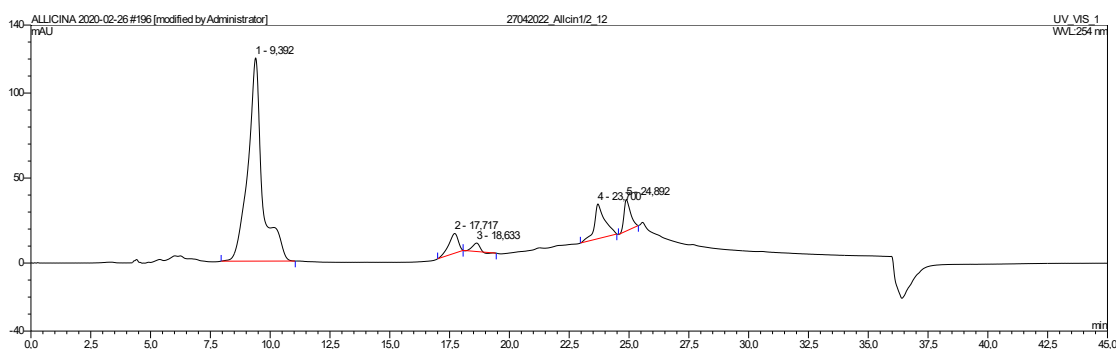


Figura 25: Spettro cromatografico prodotto di sintesi 100ppm in metanolo in cui è riportata l'intensità luminosa (mAU) in funzione del tempo di ritenzione (min)

Tabella 12: Tempi di ritenzione e relative aree dello spettro cromatografico del prodotto di sintesi

picco	Tempo di ritenzione (min)	Area picco (mAU*min)	Apicco/Atot *100
1	9,392	83,5791	78,30
2	17,717	5,3945	5,05
3	18,633	1,5821	1,48
4	23,700	10,3842	9,73
5	24,892	5,8047	5,44

Il primo picco a 9,392 min che è anche quello maggioritario è riferito all' allicina con assorbimento a 254 nm (Figura 26).^[46] I picchi 2 e 3 invece sono dei prodotti di degradazione dell'allicina mentre i picchi 4 e 5 sono relativi al reagente poiché presenti anche nello spettro del reagente (Figura 24).

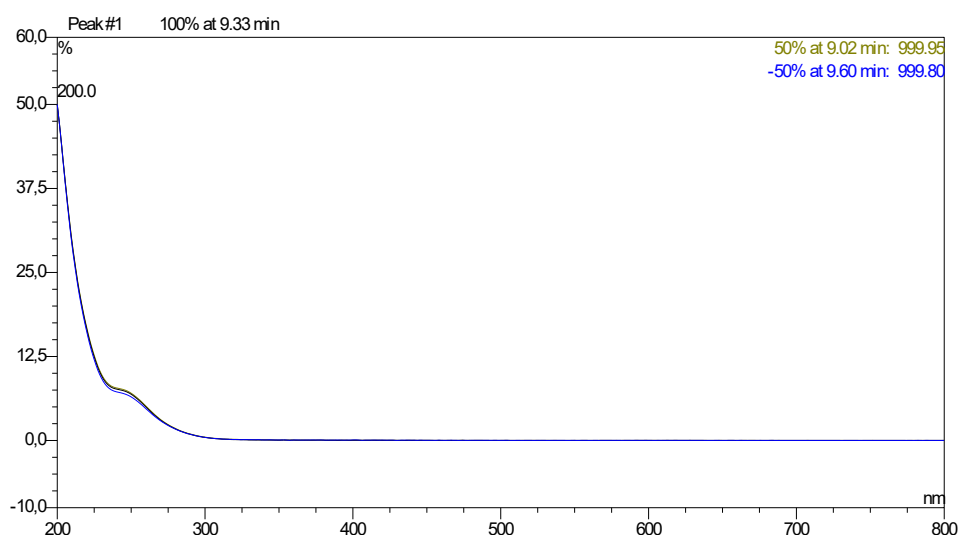


Figura 26: Spettro assorbimento dell'allicina in cui è riportato il segnale in (AU) in funzione della lunghezza d'onda (nm)

Tale metodo, rispetto a quello precedente consente di avere una migliore risoluzione cromatografica (si veda Figura 28, paragrafo 3.2.4). Tuttavia, il metodo testato con la colonna Kinetex XB-C18 era inizialmente più promettente in quanto le dimensioni delle particelle e del diametro della colonna sono più consone per un'applicazione in HPLC-MS, in quanto è possibile utilizzare dei flussi più bassi (da 0.1 a 0.3 mL/min) e garantire una migliore ionizzazione dei composti eluiti. Il metodo, quindi, sarebbe stato potenzialmente trasferibile per un'applicazione in spettrometria di massa. Vista però la migliore performance del metodo con la colonna C18 (Gemini) tutte le successive analisi con HPLC-DAD sono state eseguite con il medesimo metodo.

Tutte le sintesi eseguite sono state analizzate in HPLC-DAD iniettando una soluzione di allicina diluita in metanolo che ha in modo approssimativo consentito di determinare il quantitativo di allicina contenuto nel prodotto di sintesi che varia dal 12-78%. Infine, già dal colore del prodotto si può avere circa un'indicazione approssimativa sulla quantità di allicina contenuta: se risulta essere molto gialla probabilmente contiene molti prodotti di degradazione come nel caso della prova 5 (si veda 3.1), mentre se è molto pallida si avrà una maggiore quantitativo di reagente all'interno.

3.2.4 Identificazione dei composti di degradazione con HPLC-DAD

La determinazione dei composti di degradazione all'interno dei prodotti di sintesi è avvenuta mediante HPLC-DAD basandosi sui tempi di ritenzione e gli assorbimenti nel range dell'UV-VIS.

In particolare, il prodotto di sintesi della prova 5 (si veda 3.1) eseguita utilizzando acqua ossigenata come ossidante aveva un colore particolarmente intenso. Iniettando la soluzione in HPLC-DAD, diluita a 100 ppm in metanolo si sono potuti osservare molti picchi cromatografici corrispondenti presumibilmente ai composti di degradazione. In Tabella 13 si riportano i tempi di ritenzione, le aree assolute e le aree percentuali dei picchi visibili nel cromatogramma.

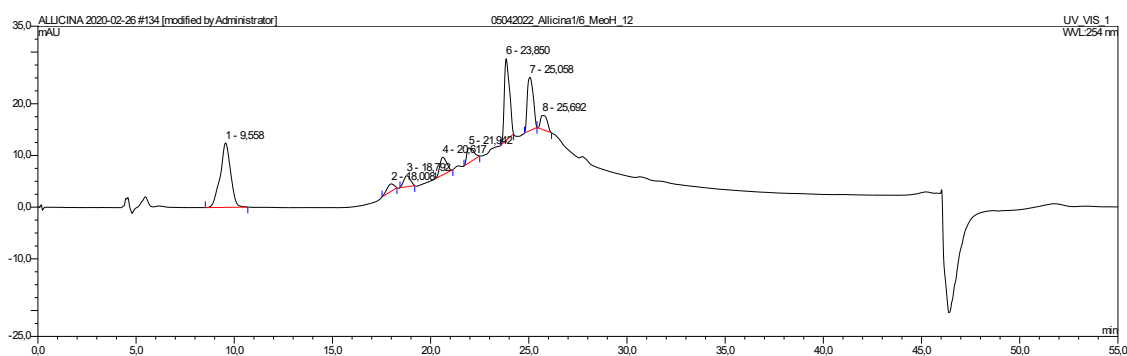


Figura 27: Spettro cromatografico prodotto di sintesi 100ppm in metanolo in cui è riportata l'intensità luminosa (mAU) in funzione del tempo di ritenzione (min)

Tabella 13: Tempi di ritenzione e relative aree dello spettro cromatografico del prodotto di sintesi

picco	tempo di ritenzione (min)	Area picco (mAU*min)	Apicco/Atot *100
1	9,558	7,7507	36,21
2	18,008	0,6130	2,90
3	18,792	0,8384	3,97
4	20,617	1,3711	6,49
5	21,942	1,1351	5,37
6	23,85	4,8145	22,79
7	25,058	3,5982	17,03
8	25,692	1,1050	5,23

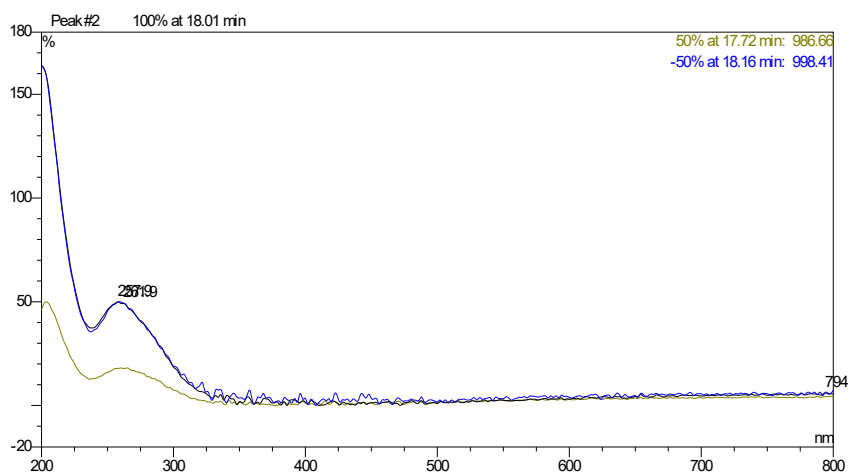


Figura 28: Spettro assorbimento relativo al picco 2 di eluizione con tempo di ritenzione 18,008 min in cui è riportato il segnale in (AU) in funzione della lunghezza d'onda (nm)

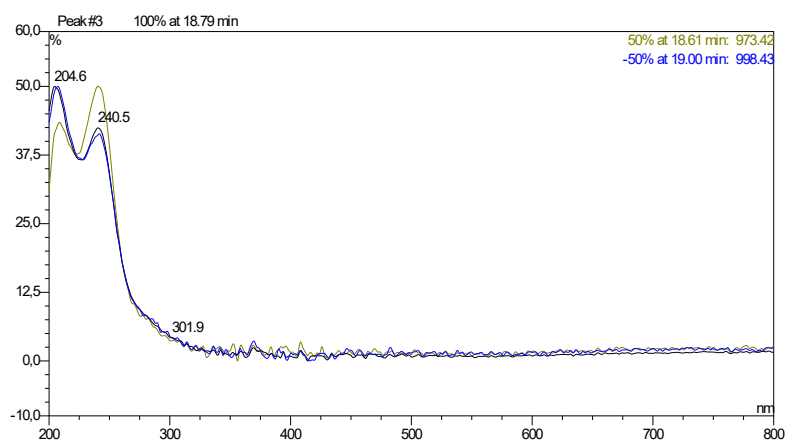


Figura 29: Spettro assorbimento relativo al picco 3 di eluizione con tempo di ritenzione 18,792 min in cui è riportato il segnale in (AU) in funzione della lunghezza d'onda (nm)

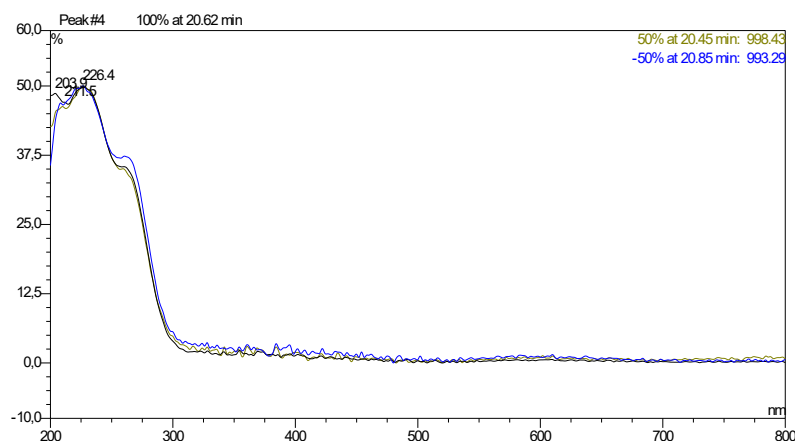


Figura 30: Spettro assorbimento relativo al picco 4 di eluizione con tempo di ritenzione 20,617 min in cui è riportato il segnale in (AU) in funzione della lunghezza d'onda (nm)

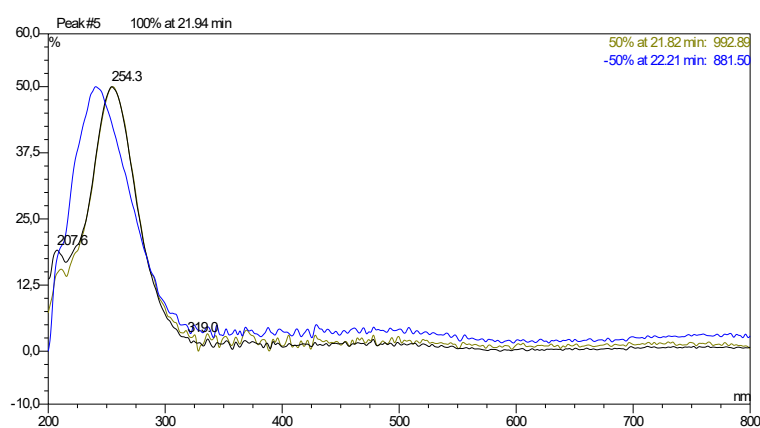


Figura 31: Spettro assorbimento relativo al picco 5 di eluizione con tempo di ritenzione 21.942 min in cui è riportato il segnale in (AU) in funzione della lunghezza d'onda (nm)

Correlando l'assorbimento delle molecole visibile negli spettri UV-VIS, il tempo di ritenzione e considerando la polarità della molecola è possibile supporre il relativo composto di degradazione. Purtroppo, con le informazioni a disposizione è stato possibile solamente formulare delle ipotesi di riconoscimento sui picchi 3 e 4. Il picco numero 3 con tempo di ritenzione 18,792 min, dato l'assorbimento a 244-235^[19] e la forma dei picchi (Figura 29), si suppone sia E-Z ajone^[22,47] L'ipotesi è avvalorata dal fatto essendo più polare rispetto ad altri composti eluisce prima dalla colonna cromatografica. Il picco 4 invece si suppone sia 3-vinyl-(4H)-1,2-dithin e 2-vinyl-(4H)-1,3 dithin essendo maggiormente apolari e quindi maggiormente trattenuti dalla colonna. Inoltre, hanno un assorbimento a 227-232nm (Figura 30) molto simile sia per forma e lunghezza d'onda come riportato in letteratura.^[46]

Non avendo a disposizione gli standard per i principali composti di degradazione dell'allicina non è stato possibile confermare le ipotesi e identificare tutti i composti presenti (Figura 28-31).

3.2.5 Stabilità dell'allicina pura e in formulazione per soluzioni endoterapiche

L'allicina degrada molto facilmente, pertanto si è monitorata la sua stabilità nell'arco di 8 giorni. In particolare, è stata monitorata l'allicina come prodotto di sintesi e poi all'interno della soluzione per le iniezioni endoterapiche conservando i campioni sia a temperatura ambiente che a -20°C . L'analisi è stata eseguita con HPLC-DAD e per ogni campione è stata iniettata la rispettiva soluzione diluita a 100 ppm in metanolo. Da tutti gli spettri ottenuti a 0-1-2-6-8 giorni sono state estrapolate le aree dei picchi relative dell'allicina e raccolte nel grafico (Figura 32).

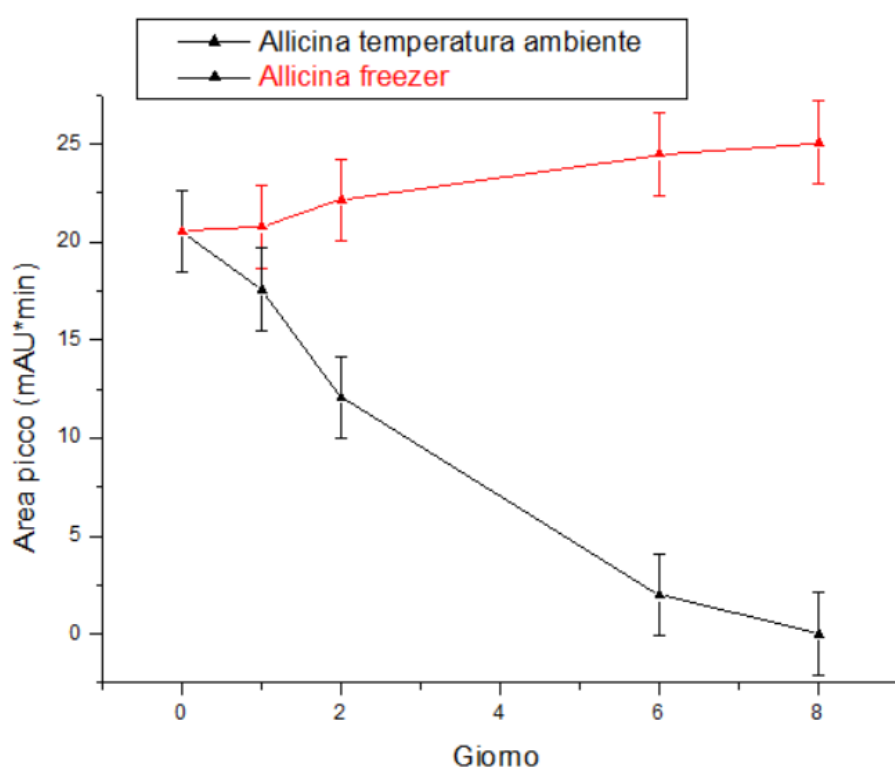


Figura 32: Grafico in cui è riportata l'area del picco relativo all'allicina (mAU*min) in funzione del giorno al quale è stata eseguito il monitoraggio. In particolare, sono riportate le curve di degradazione per allicina ottenuta come prodotto di sintesi conservata a temperatura ambiente e in freezer a -20°C . Il monitoraggio è avvenuto con HPLC-DAD

La temperatura come si può osservare è un fattore determinante; la quantità di allicina dopo solamente due giorni a temperatura ambiente è dimezzata e dopo 6 giorni è irrilevante. Invece l'allicina come prodotto di sintesi conservata in freezer mantiene la

concentrazione iniziale anche dopo 8 giorni. Nel cromatogramma relativo all'allicina (Figura 34) mantenuta a temperatura ambiente dopo sei giorni si può osservare la lieve quantità di allicina a 9,483 min rimasta, l'insorgenza di un picco a 20,492 min di degradazione e i picchi successivi a 23,725-24,993-26,00 min relativi al DADS.

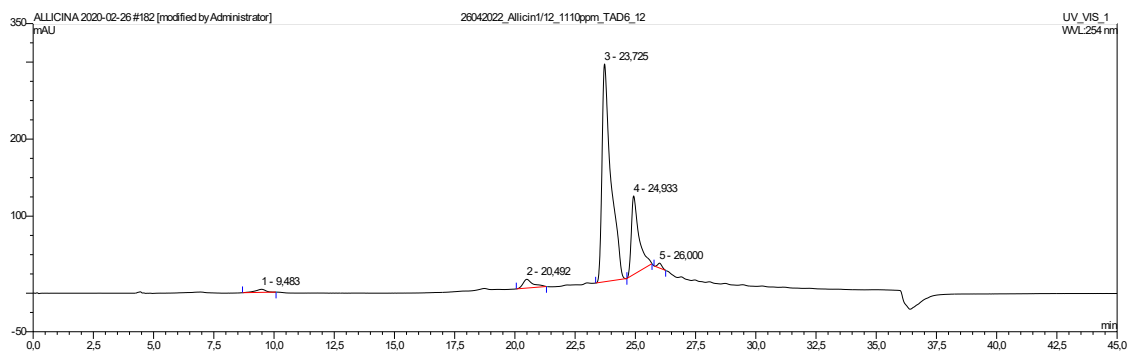


Figura 33: Spettro cromatografico in cui è riportata l'intensità luminosa in funzione (mAU) in funzione del tempo di ritenzione (min). Tale spettro è relativo all'iniezione 100ppm di allicina ottenuta come prodotto di sintesi conservata a temperatura ambiente dopo 6 giorni.

L'allicina all'interno della formulazione per iniezioni endoterapiche (Figura 34) invece degrada molto più lentamente nonostante sia anch'essa conservata a temperatura ambiente.

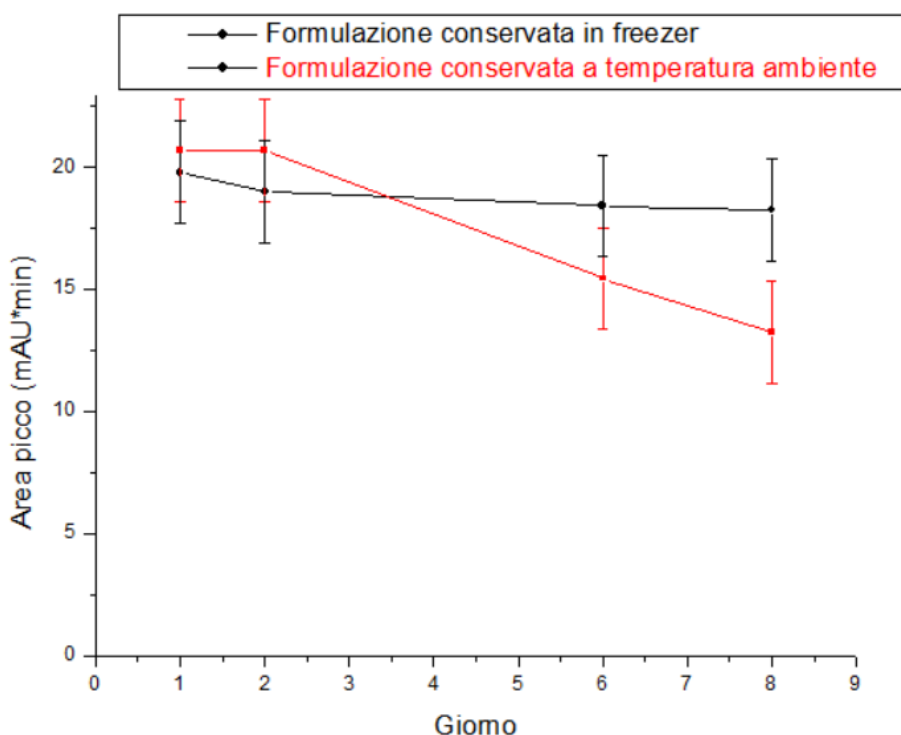


Figura 34: Grafico in cui è riportata l'area del picco relativo all'allicina (mAU*min) in funzione del giorno al quale è stata eseguito il monitoraggio. In particolare, sono riportate le curve di degradazione per allicina all'interno della formulazione per soluzione endoterapiche conservata a temperatura ambiente e in freezer a -20°C. Il monitoraggio è avvenuto con HPLC-DAD

Dopo 8 giorni il quantitativo di allicina è più del 50% rispetto alla quantità iniziale. La soluzione conservata a -20°C risulta essere molto stabile nel tempo mantenendo un andamento pressochè costante rispetto al quantitativo iniziale presente dopo un giorno.

Le barre d'errore sono state calcolate considerando la riproducibilità intermedia dell'analisi, calcolando la deviazione standard sulle aree dei picchi relativi all'allicina per il campione conservato in freezer a -20°C nei diversi giorni. L'errore associato alla singola area è pari a $\pm 2,1$ (mAU*min).

3.3 Analisi con PTR-MS

3.3.1 Pestaggio aglio

Mediante l'utilizzo del PTR-MS si è studiato il processo di formazione dell'allicina all'interno dell'aglio con lo scopo di quantificarla. Inizialmente si è pestato uno spicchio di aglio con vari materiali analizzando i composti volatili formati (si veda 2.4.3.2.1). Nelle prime prove il danneggiamento dell'aglio è stato eseguito grazie ad una bacchetta di vetro. La prova è stata eseguita 4 volte utilizzando spicchi di aglio appartenenti alla stessa testa di aglio e utilizzando le stesse condizioni sperimentali. Dalla Figura 36 si nota chiaramente che è molto difficile esercitare la stessa pressione nelle repliche, rendendo il processo poco ripetibile. La quantità di danneggiamento e la modalità di rottura è fondamentale poiché per poter avvenire la reazione deve verificarsi la rottura delle cellule e la quantità di allicina formata è proporzionale al grado di rottura delle cellule.



Figura 35: In alto a sinistra 4 spicchi di aglio selezionati prima di essere danneggiati mentre in basso a sinistra i medesimi spicchi dopo essere pestanti facendo pressione sugli stessi con una bacchetta di vetro. A destra invece il barattolo contenente uno spicchio d'aglio pestato durante l'analisi.

Oltre alla bacchetta di vetro, per avere maggiore sensibilità nell'applicazione della forza per la rottura dell'aglio, sono state eseguite delle prove con degli stuzzicadenti da spiedo che consentono di mantenere dimensioni costanti del foro. Essendo fatti di legno però essi assorbono le sostanze volatili quindi si è deciso di non procedere con l'utilizzo degli stuzzicadenti. Nello spettro in Figura 36, ottenuto dal PTR-MS è rappresentata l'intensità ionica in funzione del tempo (s) per i composti di interesse.

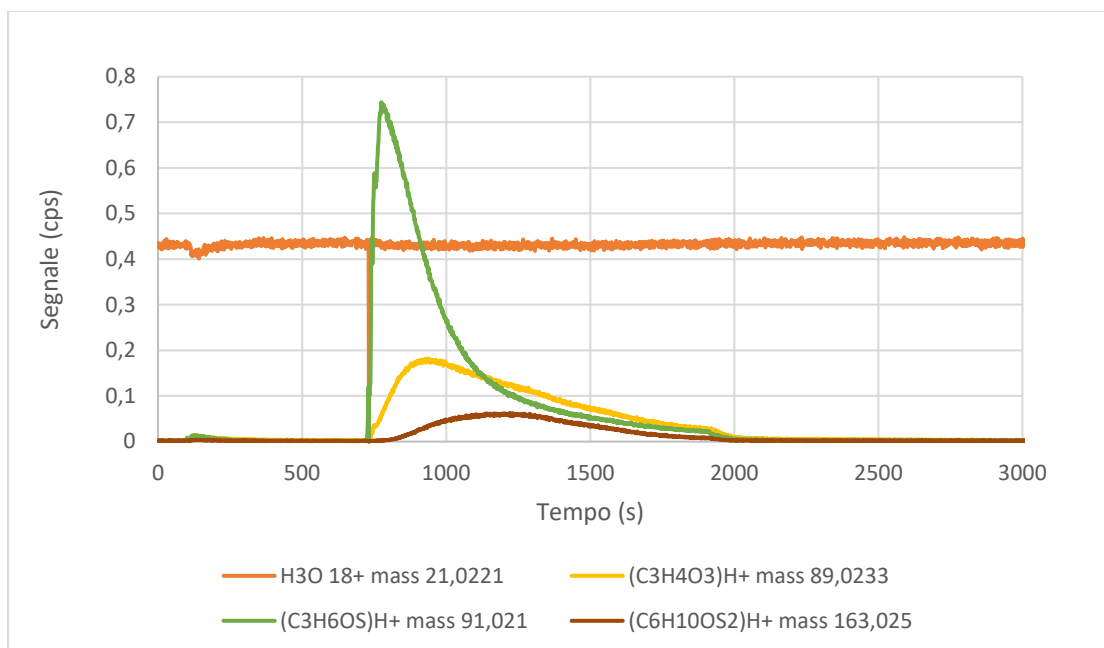


Figura 36: Spettro relativo al pestaggio dell'aglio con bacchetta di vetro con intensità ionica in funzione del tempo (s)

Circa a 100s è presente un leggero innalzamento della curva dei composti dovuta all'introduzione dei tubi all'interno del barattolo per il condizionamento; poi a circa 700s facendo pressione sulla bacchetta di vetro si è rotto lo spicchio di aglio e si sono potuti osservare i maggiori composti solforosi presenti (Tabella 14). Subito dopo il pestaggio dell'aglio si osserva l'emissione dell'acido allil sulfenico, mentre dopo circa 150 s dal danneggiamento del bulbo che si nota la formazione di allicina e acido piruvico.

Tabella 14: Riepilogo ione molecolare teorico e sperimentale con relativa assegnazione e ruolo del composto all'interno della sintesi dell'allicina.

Formula bruta	M+H ⁺ teorica	M+H ⁺ sperimentale	Assegnazione	Commento
C ₃ H ₄ O ₃	89.0239	89.003	Acido piruvico	Prodotto di reazione ottenuto per reazione di acido allil sulfenico e diidroalanina in presenza di acqua
C ₃ H ₆ OS	91.0212	91.019	Acido allil sulfenico	Intermedio di reazione per la formazione dell'allicina
C ₆ H ₁₀ OS ₂	163.0246	163.025	Allicina	Prodotto ottenuto per condensazione di acido allil sulfenico

3.3.2 Differenti varietà di aglio macinato in azoto

Data la difficoltà riscontrata nella ripetibilità della rottura dello spicchio d'aglio si è deciso di macinare in azoto liquido gli spicchi d'aglio privati della camicia tramite un macinino elettrico e poi il campione è stato conservato a -80°C. L'utilizzo della bassa temperatura è stato necessario per poter bloccare la reazione enzimatica e lo sviluppo dell'allicina direttamente durante la macinazione. Inizialmente sono state eseguite delle prove preliminari con aglio comune italiano per cercare di sviluppare un metodo riproducibile e maggiormente idoneo per il monitoraggio dello sviluppo dell'allicina. L'analisi è stata eseguita per 1 ora per osservare l'andamento anche per tempi molto lunghi. Osservando gli spettri acquisiti si è notato che nei primi 1000s di analisi avveniva la formazione e decadimento del segnale dei composti d'interesse. Per alcuni di essi non si raggiunge mai lo zero ma essi raggiungono il plateau e rimangono tali per il resto del monitoraggio. Di conseguenza per l'analisi delle differenti varietà di aglio, selezionate per la loro elevata intensità e persistenza (si veda sezione 2.3) si è deciso di accorciare i tempi di monitoraggio a 20 min.

Come atteso lo sviluppo dell'allicina da parte della reazione enzimatica avviene molto velocemente, come si può notare dalla Figura 37 in cui è riportata la curva di formazione nel tempo. Pochi secondi dopo l'inizio dell'analisi si nota la presenza del segnale dell'allicina che nel tempo aumenta di intensità raggiungendo il massimo valore dopo circa 250-300s per poi diminuire drasticamente.

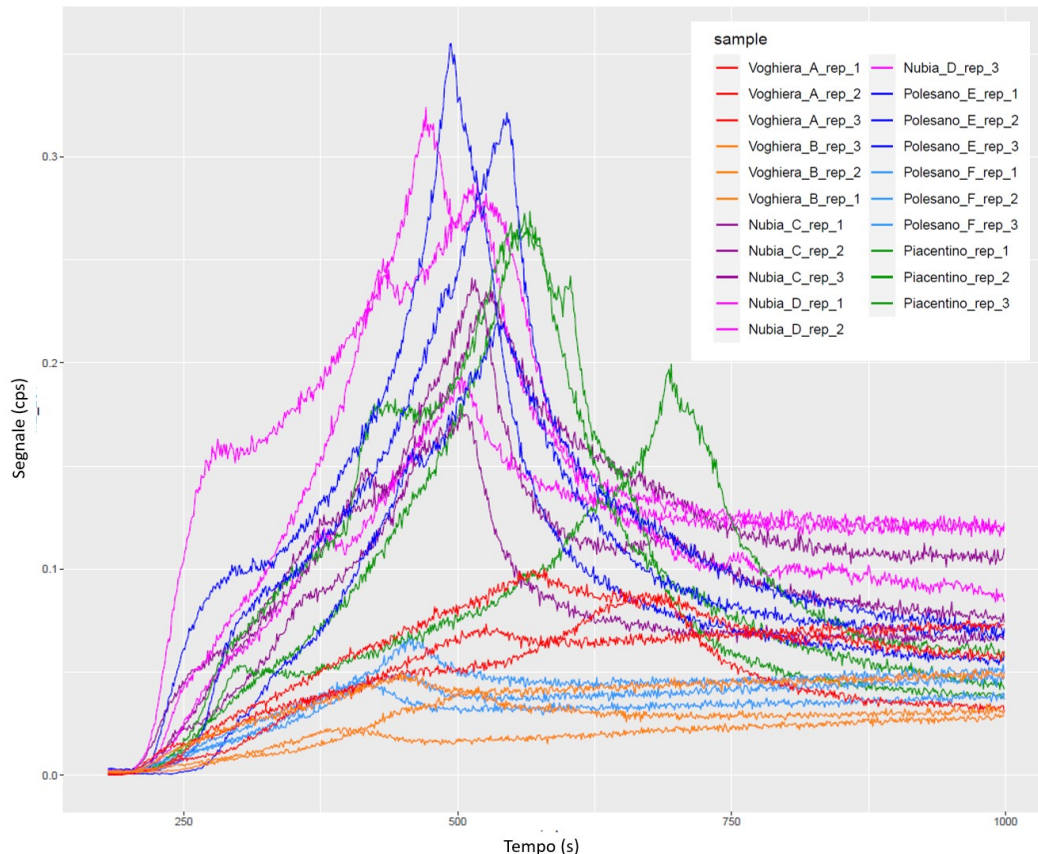


Figura 37: Grafico in cui è riportato il segnale in Cycle Per Second (cps) in funzione del tempo (s) nell'intervallo di 180-1000 s per tutti i campioni di aglio per la massa dell'allicina.

La forma del picco e l'intensità variano a seconda della varietà analizzata. In tutti i casi il segnale dell'allicina scende rapidamente per poi rimanere costante dopo i 1000s ma non raggiunge mai lo zero probabilmente perché rimane in tracce adesa alle pareti dell'inlet. Dalla Figura 37 si evince un'elevata riproducibilità dell'esperimento e differenze nella formazione di allicina in base alla varietà ed alla provenienza. Per le varietà di Voghiera (rosso-arancio) e di Nubia (rosa-viola) si nota che la provenienza dell'aglio non influisce notevolmente sulla quantità di allicina formata, presentando intensità di segnali simili.

L'aglio Polesano (blu-azzurro) invece presenta un'elevata variazione di quantità di allicina pari circa alla metà a seconda della provenienza.

Oltre a basare il confronto sull'intensità e sulla forma del picco si è calcolata l'area sottostante la curva per tutti i 20 minuti di analisi. Le masse in esame per il quale è stata calcolata l'area sotto la curva sono: acido piruvico m/z 89,0233, acido sulfenico m/z 91,021, disolfuro di diallile m/z 147,03; allicina m/z 163,025, trisolfuro di diallile m/z 179,002. Di seguito si riportano i box-plot (Figura 38-42) in cui le aree ottenute per ciascuna massa d'interesse sono graficate in funzione della varietà di aglio. Tali grafici consentono di visualizzare per ogni campione la distribuzione del set di dati, il valore di mediana, i valori di massimo e di minimo.

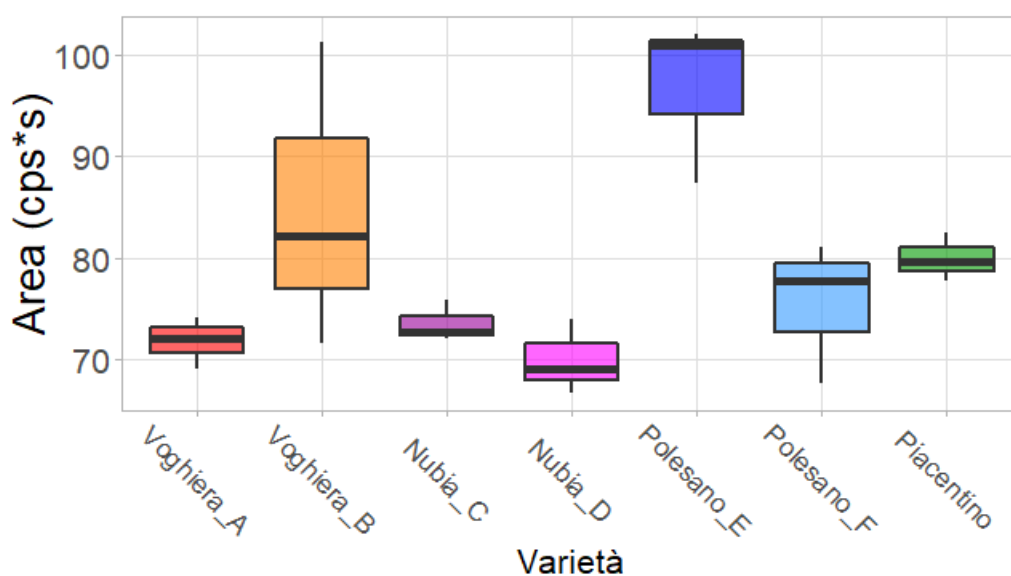


Figura 38: Grafico box-plot dell'area sotto la curva (cps*s) per la massa dell'acido sulfenico per tutti i campioni di aglio

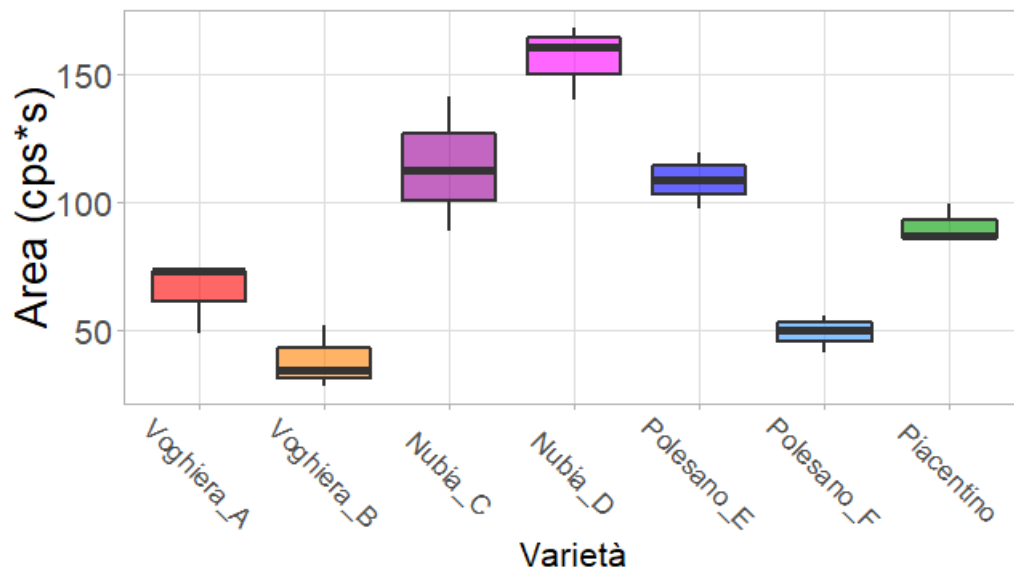


Figura 39: Grafico box-plot dell'area sotto la curva (cps*s) per la massa dell'allicina per tutti i campioni di aglio

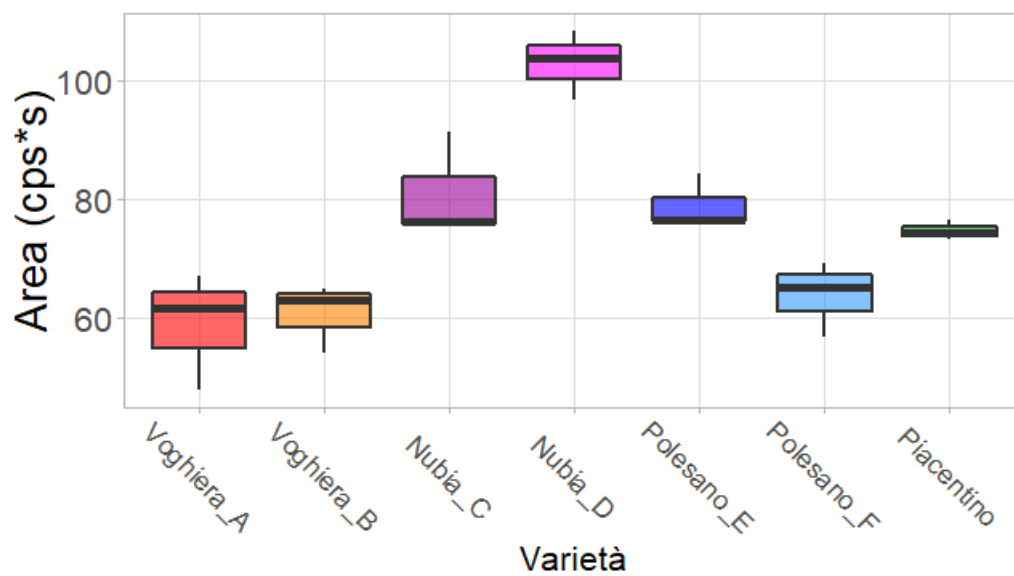


Figura 40: Grafico box-plot dell'area sotto la curva (cps*s) per la massa dell'acido piruvico per tutti i campioni di aglio

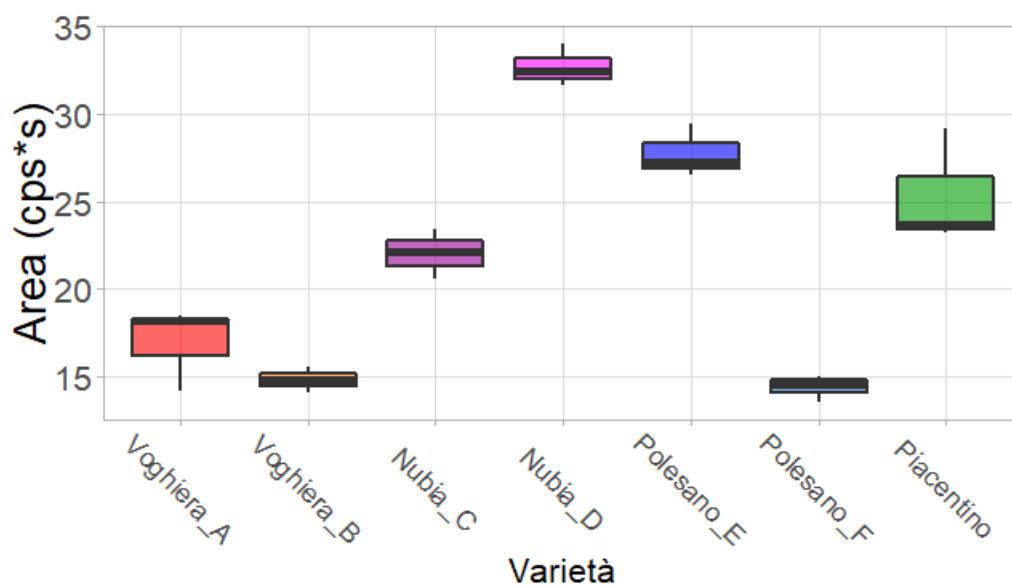


Figura 41: Grafico box-plot dell'area sotto la curva (cps*s) per la massa trisolfuro di diallile per tutti i campioni di aglio

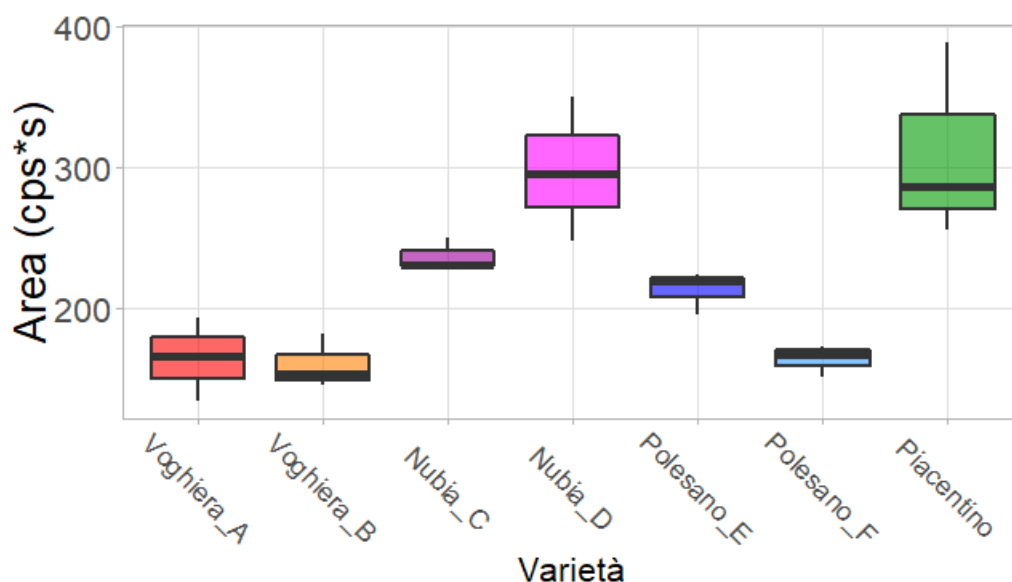


Figura 42: Grafico box-plot dell'area sotto la curva (cps*s) per la massa disolfuro di diallile per tutti i campioni di aglio

Da tale rappresentazione grafica si nota in generale che la variabilità tra le repliche tecniche è bassa e si possono evincere delle differenze nei valori di area per le masse d'interesse a seconda della varietà. Per l'aglio di Voghiera_A e B e Polesano_F si notano valori simili d'area tranne per i valori relativi all'acido sulfenico. Infatti, la mediana e la distribuzione dei dati relativi all'acido sulfenico è molto elevata per l'aglio di Voghiera_B. L'aglio Nubia_C ha un andamento molto simile a Nubia_D solo che presenta valori di mediana leggermente più bassi per allicina, disolfuro di diallile, trisolfuro di diallile e

acido piruvico. Il campione che presenta il maggior contenuto di allicina è Nubia_D ma allo stesso tempo ha anche il valore più basso di acido sulfenico. Tale andamento inverso non è presente nell'aglio Polesano_E che ha un elevato contenuto sia di allicina che di acido sulfenico. L'aglio Piacentino, invece, presenta un'elevata distribuzione dei dati per disolfuro di diallile e trisolfuro di diallile ed ha un'elevata quantità di allicina. Infatti, esso è molto simile a Polesano_E ma presenta una variabilità più elevata.

Infine, si può stabilire che l'aglio di Nubia, Piacentino e Polesano_E hanno elevati contenuti di allicina a differenza di Voghiera e Polesano_F. Tra l'allicina sviluppata e la quantità di acido piruvico, disolfuro di diallile e trisolfuro di diallile sembrano direttamente proporzionali a differenza dell'acido sulfenico per cui non esiste una chiara correlazione ma dipende dalla varietà considerata

Per lo stesso set di dati è stata eseguita anche un'analisi multivariata tramite Principal Component Analysis (PCA). Questo metodo consente, grazie ad una rappresentazione grafica, di valutare assieme tutte le variabili, in questo caso le cinque masse di interesse, ed evidenziare le differenze tra i vari campioni. La PCA si compone di due grafici: score plot e loading plot. Lo score plot è la rappresentazione in un piano bidimensionale dello spazio 5-dimensionale dei campioni in quanto ciascun campione è descritto da 5 variabili. La componente 1 e 2 del piano bidimensionale sono le componenti che sottolineano la maggiore varianza tra i campioni. Il loading plot, invece, indica il contributo di ciascuna variabile alla formazione dello score plot e la correlazione tra le variabili originarie e le componenti principali considerate. Per ottenere i grafici i dati hanno subito un trattamento di "centering" e "scaling" per facilitare la visualizzazione grafica delle differenze tra i campioni. Nel grafico del loading plot (Figura 43) sono riportate le cinque masse d'interesse rispetto alla componente principale 1 e 2.

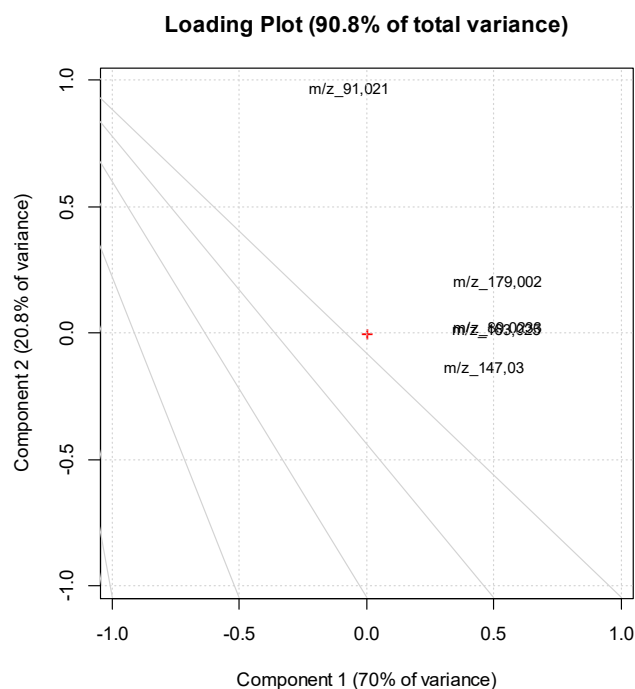


Figura 43: Grafico Loading plot in cui sono riportate le 5 variabili, masse d'interesse acido piruvico m/z 89,0233, acido sulfenico m/z 91,021, disolfuro di diallile m/z 147,03; allicina m/z 163,025, allil trisulfide m/z 179,002 con in ascissa la componente 1 e in ordinata la componente 2

Si nota che quattro di esse m/z 89,0233-147,03-163,025-179,002 sono posizionate nella stessa zona del grafico e di conseguenza sono correlate tra loro con la componente principale 1 mentre la massa m/z 91,021 è scorrelata dalle altre ed è correlata alla componente principale 2. La variazione delle aree per le masse m/z 89,0233-147,03-163,025-179,002 spiega il 70% della varianza tra i campioni, mentre le differenze per la massa m/z 91,021 ne spiegano il 20.8%. Nello score plot (Figura 44), sono riportate le varietà di interesse.

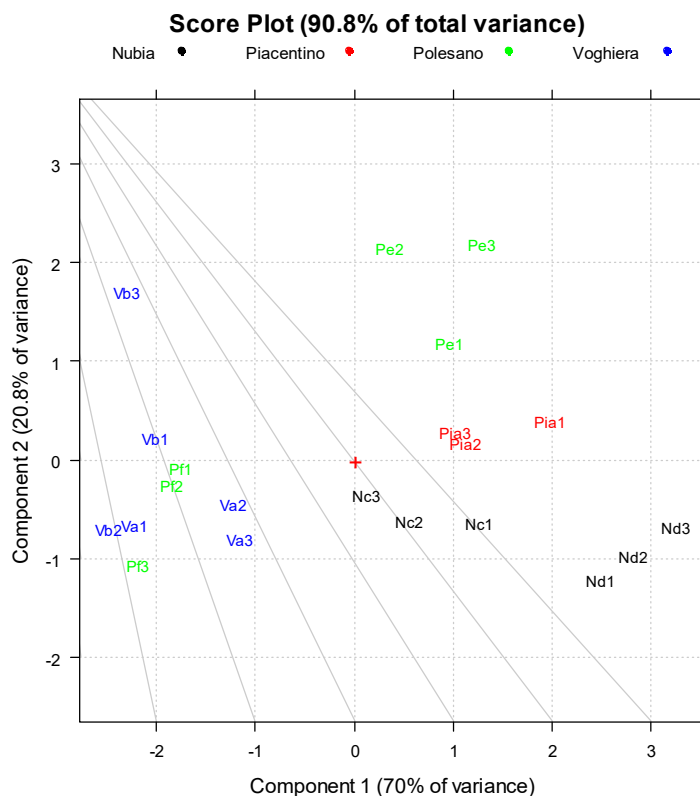


Figura 44: Grafico score plot dei campioni analizzati con le relative repliche con in ascissa la componente 1 e in ordinata la componente 2

Dal grafico è possibile distinguere innanzitutto due macro-gruppi separati nella Componente 1. Il primo è costituito dalle varietà Nubia_C, Nubia_D, Piacentino e Polesano_E per le quali si hanno delle aree più grandi per i composti acido piruvico m/z 89,0233, disolfuro di diallile m/z 147,03; allicina m/z 163,025 e trisolfuro di diallile m/z 179,002. Tale considerazione è ottenuta per confronto delle aree del secondo gruppo costituite da Voghiera_A, Voghiera_B, Polesano_F. Osservando la componente 2, invece, si osserva che l'aglio che ha una maggiore area di acido sulfenico è Polesano_E.

Data la separazione dei campioni nello spazio bidimensionale è possibile distinguere nettamente 3 varietà su 4 totali considerate in quanto è presente un'elevata differenza tra l'aglio Polesano_E e Polesano_F che non è riscontrata per Voghiera e Nubia. Questa variazione potrebbe essere indice di un effetto legato al territorio di provenienza che andrebbe ulteriormente approfondito. Voghiera_A e B e Polesano E e F sono coltivati rispettivamente a Ferrara e a Rovigo mentre l'aglio Nubia proviene dalla Sicilia. Quindi, essendo coltivati nella stessa zona, per l'aglio Polesano_E e F per il momento è da considerare sicuramente l'effetto dell'azienda produttrice, il quale sembra essere

maggiore rispetto all'effetto varietà e territorio. Infine, la differenza tra le repliche tecniche di ciascun campione è bassa poiché si posizionano una vicina all'altra nel piano della PCA e la variabilità è minore di quella tra le diverse varietà. Di conseguenza, il metodo sviluppato per l'analisi consente un'adeguata riproducibilità della misura ed è ritenuto valido per eseguire questo tipo di considerazioni. In Figura 45 si riporta, per una migliore visualizzazione, una rappresentazione grafica del territorio italiano in cui sono state evidenziate le zone di provenienza delle varietà analizzate in questo studio.



Figura 45: Rappresentazione geografica stato italiano con riportati il territorio in cui sono state coltivate le varietà di aglio. Piacentino (Pia verde) in provincia di Piacenza, Voghiera_A (Va rosso) e Voghiera_B (Vb arancione) in provincia di Ferrara, Polesano_E (Pe blu) e Polesano_F (Pf azzurro) in provincia di Rovigo e Nubia_C (Nc viola) e Nubia_D (Nd rosa) in provincia di Trapani.

3.3.3 Analisi mele con PTR-MS

Dalle piante di melo trattate sono state raccolte dopo 3 mesi dall'iniezione endoterapica 6 mele ed analizzate con PTR-MS. Sono state analizzate 3 mele raccolte dall'albero trattato con la formulazione senza alcun principio attivo e altre 3 mele della pianta in cui è stata iniettata la formulazione di allicina. Le masse di interesse monitorate sono: m/z 45,033 (acetaldeide), 91.039 (acido allilsulfenico), 145.076 (disolfuro di diallile), 163.025 (allicina). L'acetaldeide è stata monitorata poiché essa si ottiene dal processo di fermentazione in basso contenuto d'ossigeno. Essa poi può essere successivamente ridotta ad alcol.

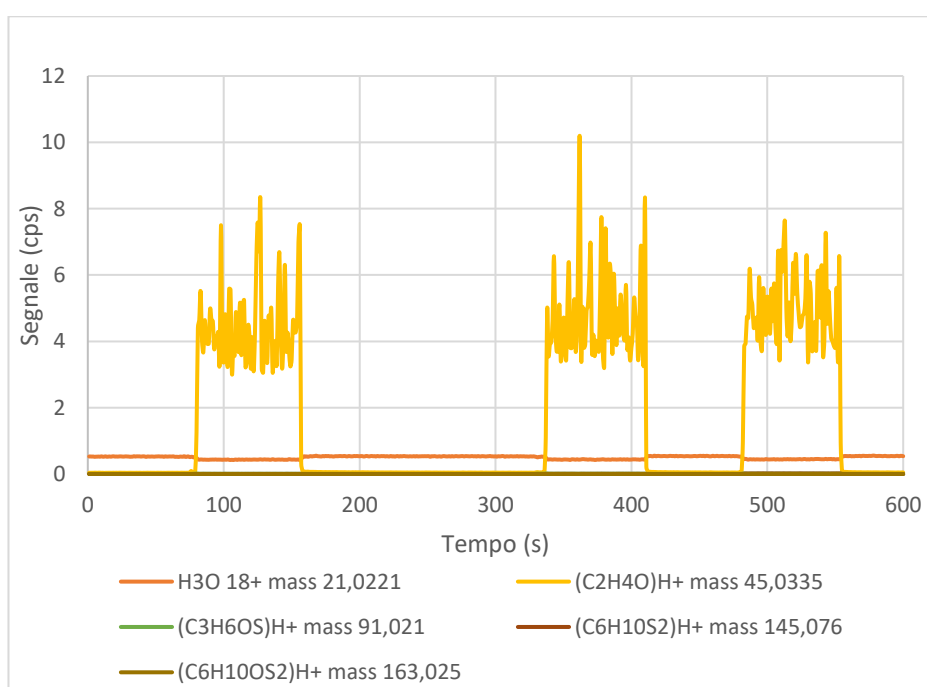


Figura 46: Analisi dei VOC di 3 mele relativi alla pianta in cui è stata iniettata la formulazione senza principio attivo.

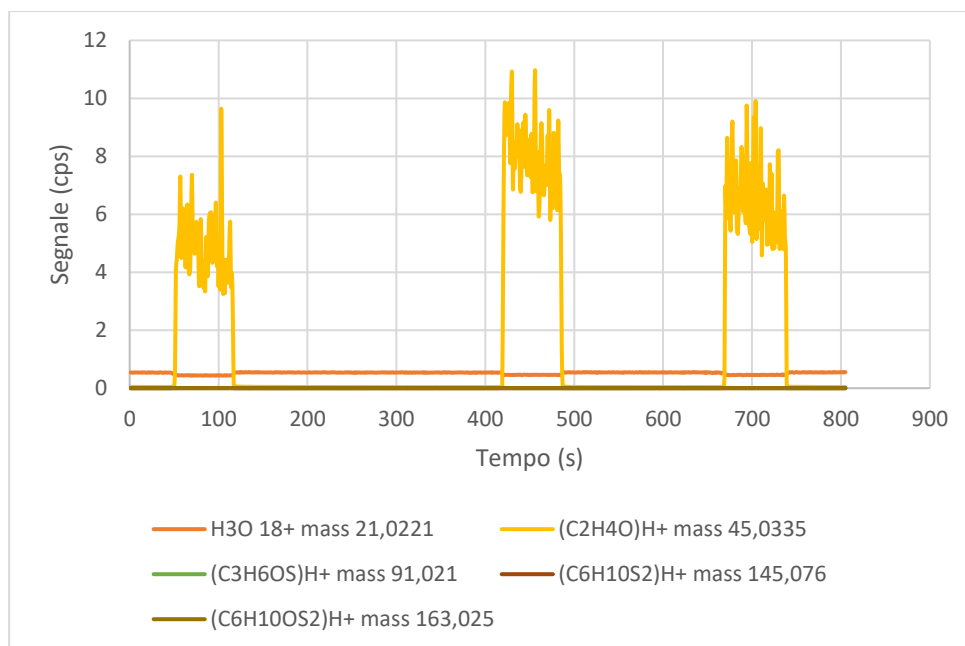


Figura 47: Analisi dei VOC di 3 mele relative alla pianta in cui è stata iniettata la formulazione con allicina

Osservano le Figure 46 e 47, in cui si riportano i segnali delle masse di interesse rispettivamente per le mele non trattate e trattate con la formulazione di allicina, non si notano differenze di segnale per nessuna delle masse monitorate. Sia per allicina che per, acido sulfenico e disolfuro di diallile si è notato un segnale pari a zero per tutto il minuto di analisi. Di conseguenza non si rileva alcuna presenza di allicina. Per avere una conferma definitiva dell'assenza di composti legati all'allicina nei frutti delle piante trattate sarebbero necessarie ulteriori analisi dei VOC in mele raccolte a tempi minori dal trattamento e attraverso panel test.

3.4 Analisi foglie macinate in azoto liquido con HPLC-QQQ-MS

Per estrarre i composti di interesse, nello specifico allicina e abamectina dalla fase solida di foglie macinate è stata utilizzata una metodica basata sulla procedura normata QuEChERS per analisi multiresiduali, la quale prevede una prima fase di estrazione ed una successiva di purificazione. L'utilizzo dell'acetonitrile è dovuto alla miscibilità in acqua e in composti organici, il suo impiego è importante per matrici acquose. La dispersive-SPE eseguita utilizzando un'ammina primaria e secondaria (PSA) è necessaria per rimuovere efficacemente molti componenti polari della matrice, come gli acidi organici, alcuni pigmenti polari e gli zuccheri. Prima di analizzare le foglie campionate dalle piante di mele trattate sono state eseguite delle prove preliminari per verificare

che il metodo di estrazione e di analisi fossero adeguati per l'allicina. Foglie di mele di piante non trattate sono state macinate in azoto liquido, poi sono stati aggiunti quantitativi di soluzioni di abamectina e di allicina in formulazione per ottenere rispettivamente una concentrazione di 10 e 1 mg/Kg. L'analisi è stata eseguita con tecnica Multiple Reaction Monitoring (MRM) che consente una rivelazione selettiva di transizioni caratteristiche. In particolare, con il primo quadrupolo viene selezionato lo ione molecolare, o il frammento di interesse, il quale viene frammentato nel secondo quadrupolo. Il terzo quadrupolo, invece, seleziona solo uno dei frammenti derivanti dallo ione molecolare la cui corrente ionica viene registrata dallo strumento. Questo approccio consente di aumentare notevolmente il rapporto segnale/rumore, aumentando di conseguenza il limite di rilevabilità dei composti di interesse. Le transizioni ione precursore > ione frammento selezionate in questo studio sono le seguenti: m/z 163>73 per allicina e m/z 895>183 per abamectina.

Nello spettro cromatografico (Figura 48) si riporta l'intensità ionica percentuale in funzione del tempo di ritenzione (min).

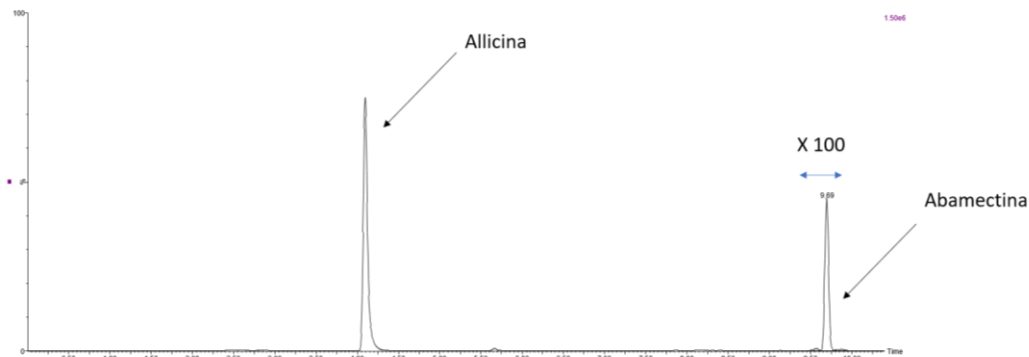


Figura 48: Spettro cromatografico con tracce sovrapposte di allicina (segnale della transizione m/z 163>73) e abamectina (segnale della transizione m/z 895>183) in formulazione. Il segnale dell'abamectina è stato incrementato di 100 volte. Sulle ordinate è riportato il tempo di ritenzione (min) mentre su asse ascisse è riportata la percentuale di intensità ionica.

Si osservano due picchi a tempo di ritenzione di 4,09 min e 9,69 min relativi rispettivamente all'allicina (campione contaminato con formulazione di allicina) e all'abamectina (campione contaminato con formulazione di abamectina) contenuta nei campioni contaminati. Le concentrazioni ottenute dall'analisi sono riportate nella Tabella 15.

Tabella 15: Concentrazioni dichiarata e riscontrata mediante analisi MRM nei campioni di foglie macinate contaminati con la formulazione di allicina e abamectina

Campione foglie macinate contaminato	Conc. dichiarata (mg/Kg)	Conc. riscontrata (mg/Kg)
Formulazione allicina	1	< 0,005
Formulazione abamectina	10	34,97

Il campione contaminato con la formulazione di abamectina ha una concentrazione 3 volte superiore a quella dichiarata. Tale aumento potrebbe essere dovuto a una non corretta dispersione della soluzione aggiunta all'interno del campione, però viene ritenuto valido. Nonostante, dunque, siano necessari degli ulteriori accorgimenti, il metodo di analisi risulta comunque essere valido per la quantificazione dell'abamectina. Per il campione contaminato con la formulazione di allicina, invece, la quantità determinata dall'analisi è molto inferiore rispetto all'aggiunta di contaminazione. Ciò rappresenta una problematica significativa che verosimilmente è imputabile al metodo di estrazione utilizzato in quanto probabilmente non adatto all'analita di interesse. Visti i problemi riscontrati con il metodo, i campioni di foglie raccolti a seguito delle iniezioni endoterapiche non sono ancora stati analizzati, in quanto si richiedono ulteriori prove per la messa a punto del metodo analitico.

Nella Figura 49 si osserva lo spettro cromatografico relativo ad un campione di foglie macinate non contaminato (bianco).

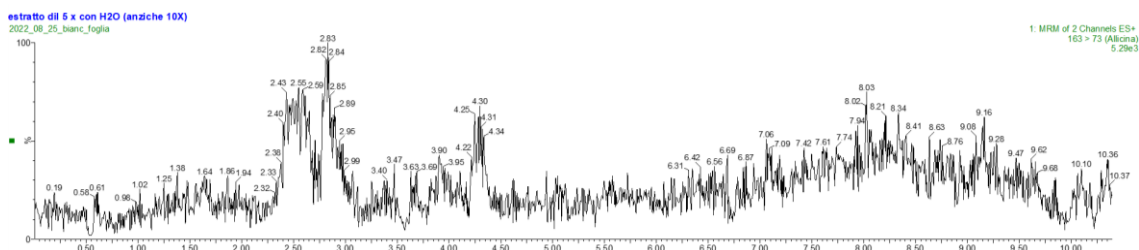


Figura 49: Spettro cromatografico in cui sulle ordinate è riportato il tempo di ritenzione (min) mentre su asse ascisse è riportata la percentuale di intensità ionica per il campione non contaminato per la transizione m/z 163>73. L'intensità assoluta massima del segnale nello spettro è più di 100 volte inferiore rispetto all'intensità assoluta massima dello spettro riportato nella Figura 48. Non si notano picchi al tempo di eluizione dell'allicina (4,09 min), evidenziando come il bianco sia privo di allicina.

Anche il bianco è stato sottoposto alla medesima preparativa del campione prima di essere iniettato, lo spettro non presenta picchi di ritenzione relativi all'allicina o alla abametina.

CAPITOLO 4: CONCLUSIONI

Il lavoro svolto in questo progetto di tesi ha permesso innanzitutto di ottimizzare il metodo di sintesi dell'allicina a partire dalla scelta dell'agente ossidante. La sintesi con acqua ossigenata, infatti, produce risultati migliori in termini di quantità di allicina prodotta. Lo studio ha inoltre permesso di migliorare alcuni parametri di sintesi, come pH e tempo di reazione, che hanno permesso di ottimizzare il processo. Inoltre, è stato possibile sviluppare un metodo analitico, mediante HPLC-UV-DAD, grazie al quale è possibile determinare la purezza del prodotto di sintesi e il grado di conversione dal reagente di partenza.

Nell'ottica dell'utilizzo dell'allicina in formulazione come fitofarmaco, la prova di degradazione eseguita ha inoltre permesso di dimostrare che le componenti utilizzate in formulazione aumentano notevolmente la stabilità dell'analita a temperatura ambiente e che la conservazione a -20°C è sufficiente per prevenire la degradazione dell'allicina, sia pura che in formulazione, per almeno 8 giorni dalla sintesi.

Il risultato di maggiore interesse è stato però ottenuto con la tecnica del PTR-MS, grazie al quale è stato possibile sviluppare un metodo di analisi robusto che consente di osservare la formazione dei composti volatili solforosi formati per danneggiamento di uno spicchio di aglio. Questo metodo permette di identificare non solo le varietà di aglio a maggiore contenuto di allicina, ma consente di distinguere tra loro diverse varietà. Con il metodo elaborato, infatti, si sono potute distinguere nettamente le varietà di Voghiera, Nubia e Piacentino ed è stato possibile individuare l'aglio di Nubia come quello che porta al maggior quantitativo di allicina. Il metodo potrà quindi essere utile in vista della selezione e dello sviluppo di varietà di aglio a partire dalle quali realizzare estratti, contenenti ad esempio allicina, per endoterapia o altre applicazioni.

Infine, le prove endoterapiche realizzate sulle piante di melo hanno permesso di evidenziare delle criticità, legate all'analita di interesse, nel metodo di estrazione e analisi normati che vengono comunemente utilizzati nell'analisi di multiresiduali (come pesticidi e fitofarmaci). Il lavoro svolto in questo progetto di Tesi ha permesso di sviluppare diversi metodi analitici, seppur per alcuni in modo preliminare, di grande rilevanza, vista la complicata natura chimico-fisica dell'allicina. I risultati ottenuti

forniscono infatti importanti indicazioni sulla sintesi, conservazione e determinazione dell'allicina e costituiscono la base per ulteriori prove future di utilizzo nell'endoterapia.

BIBLIOGRAFIA

1. Rivlin, R. S. Historical Perspective on the Use of Garlic. *The Journal of Nutrition* 2001, 131 (3), 951S-954S.
2. <http://antropocene.it/2020/05/10/aglio/> ; accesso in rete 14/07/2022
3. [https://www.ars.usda.gov/midwest-area/madison-wi/vegetable-crops-research/docs/simon-garlic-origins/#:~:text=In%20the%20Old%20World%2C%20Egyptian,back%20as%204000%20years%20ago](https://www.ars.usda.gov/midwest-area/madison-wi/vegetable-crops-research/docs/simon-garlic-origins/#:~:text=In%20the%20Old%20World%2C%20Egyptian,back%20as%204000%20years%20ago;); accesso in rete 14/07/2022
4. https://agricolturabiologicaonline.eu/?Schede_tecniche_di_coltivazione_ortaggi:Aglio_%3A_Coltivazione_e_propriet%C3%A0; accesso in rete 14/07/2022
5. https://ec.europa.eu/info/food-farming-fisheries/plants-and-plant-products/fruits-and-vegetables/garlic_it; accesso in rete 14/07/2022
6. El-Saber Batiha, G.; Magdy Beshbishy, A.; G. Wasef, L.; Elewa, Y. H. A.; A. Al-Sagan, A.; Abd El-Hack, M. E.; Taha, A. E.; M. Abd-Elhakim, Y.; Prasad Devkota, H. *Chemical Constituents and Pharmacological Activities of Garlic (Allium Sativum L.): A Review*. *Nutrients* 2020, 12 (3), 872.
7. Ankri, S.; Mirelman, D. *Antimicrobial Properties of Allicin from Garlic*. *Microbes and Infection* 1999, 1 (2), 125–129.
8. Stoll, A.; Seebeck, E. *Über Alliin, die genuine Muttersubstanz des Knoblauchöls. 1. Mitteilung über Allium-Substanzen*. *HCA* 1948, 31 (1), 189–210.
9. Borlinghaus, J.; Albrecht, F.; Gruhlke, M.; Nwachukwu, I.; Slusarenko, A. *Allicin: Chemistry and Biological Properties*. *Molecules* 2014, 19 (8), 12591–12618.
10. Zhang, H.; Chingin, K.; Zhu, L.; Chen, H. *Molecular Characterization of Ongoing Enzymatic Reactions in Raw Garlic Cloves Using Extractive Electrospray Ionization Mass Spectrometry*. *Anal. Chem.* 2015, 87 (5), 2878–2883.
11. Laakso, I.; Seppänen-Laakso, T.; Hiltunen, R.; Müller, B.; Jansen, H.; Knobloch, K. *Volatile Garlic Odor Components: Gas Phases and Adsorbed Exhaled Air Analysed by Headspace Gas Chromatography-Mass Spectrometry*. *Planta Med* 1989, 55 (03), 257–261.
12. Jacob, C.; Anwar, A. *The Chemistry behind Redox Regulation with a Focus on Sulphur Redox Systems*. *Physiol Plant* 2008, 133 (3), 469–480.

13. Kuettner, E. B.; Hilgenfeld, R.; Weiss, M. S. *The Active Principle of Garlic at Atomic Resolution*. *Journal of Biological Chemistry* 2002, 277 (48), 46402–46407.
14. Cruz-Villalon, G. *Synthesis of Allicin and Purification by Solid-Phase Extraction*. *Analytical Biochemistry* 2001, 290 (2), 376–378.
15. Nikolic, V.; Stankovic, M.; Nikolic, L.; Cvetkovic, D. *Mechanism and Kinetics of Synthesis of Allicin*. 2004, 5.
16. Hussain, H.; Al-Harrasi, A.; Green, I. R.; Ahmed, I.; Abbas, G.; Rehman, N. U. *Meta-Chloroperbenzoic Acid (MCPBA): A Versatile Reagent in Organic Synthesis*. *RSC Adv.* 2014, 4 (25), 12882–12917.
17. Overberger, C. G.; Cummins, R. W. *Mechanism of the Oxidation of p,p'-Dichlorobenzyl Sulfide by Peroxybenzoic and Para Substituted Peroxybenzoic Acids*. *J. Am. Chem. Soc.* 1953, 75 (17), 4250–4254.
18. M Madesclaire – Tetrahedron. *Synthesis of sulfoxides by oxidation of thioethers*. Elsevier Volume 42, Issue 20, 1986, Pages 5459-5495
19. Ilić, D.; Nikolić, V.; Stanković, M.; Nikolić, L.; Stanojević, L.; Mladenović-Ranisavljević, I.; Šmelcerović, A. *Transformation of Synthetic Allicin: The Influence of Ultrasound, Microwaves, Different Solvents and Temperatures, and the Products Isolation*. *The Scientific World Journal* 2012, 2012, 1–7.
20. Iciek, M.; Kwiecień, I.; Włodek, L. *Biological Properties of Garlic and Garlic-Derived Organosulfur Compounds*. *Environ. Mol. Mutagen.* 2009, 50 (3), 247–265.
21. Thomson, M.; Ali, M. *Garlic [Allium Sativum]: A Review of Its Potential Use as an Anti-Cancer Agent*. *CCDT* 2003, 3 (1), 67–81.
22. Iberl, B.; Winkler, G.; Knobloch, K. *Products of Allicin Transformation: Ajoenes and Dithiins, Characterization and Their Determination by HPLC*. *Planta Med* 1990, 56 (02), 202–211.
23. Chung, L. Y. *The Antioxidant Properties of Garlic Compounds: Allyl Cysteine, Alliin, Allicin, and Allyl Disulfide*. *Journal of Medicinal Food* 2006, 9 (2), 205–213.
24. Block, E. *The Chemistry of Garlic and Onions*. *Sci Am* 1985, 252 (3), 114–118.
25. Slusarenko, A. J.; Patel, A.; Portz, D. *Control of Plant Diseases by Natural Products: Allicin from Garlic as a Case Study*. *Eur J Plant Pathol* 2008, 121 (3)

26. alliperelló, A.; Gruhlke, M.; Slusarenko, A. J. *Effect of garlic extract on seed germination, seedling health, and vigour of pathogen-infested wheat*. Journal of Plant Protection Research 2013, 53 (4), 317–323.
27. Borlinghaus, J.; Albrecht, F.; Gruhlke, M.; Nwachukwu, I.; Slusarenko, A. *Allicin: Chemistry and Biological Properties*. Molecules 2014, 19 (8), 12591–12618.
28. Mirelman, D.; Monheit, D.; Varon, S. *Inhibition of Growth of Entamoeba Histolytica by Allicin, the Active Principle of Garlic Extract (Allium Sativum)*. Journal of Infectious Diseases 1987, 156 (1), 243–244.
29. Ankri, S.; Miron, T.; Rabinkov, A.; Wilchek, M.; Mirelman, D. *Allicin from Garlic Strongly Inhibits Cysteine Proteinases and Cytopathic Effects of Entamoeba Histolytica*. Antimicrob Agents Chemother 1997, 41 (10), 2286–2288.
30. Solorzano, E.R.; Dal Maso, E.; Pastore, P.; Montecchio, L.; Frasconi, M. “New sap-compatible formulation”, WO 2019/064219 A1, 2019
31. Montecchio, L.; Risato, D.; Presti, N. “Tool for insertion into tree or shrubs and injection or infusion device comprising said tool”, WO 2013/010909 A1, 2013
32. <https://www.newpharm.it/wp-content/uploads/2022/05/bitecare-ENG-1.pdf>; accesso in rete 20/07/2022
33. <https://www.agrodolce.it/2021/06/30/variet%C3%A0-di-aglio-italiane/>; accesso in rete 22/08/2022
34. <https://www.dissapore.com/cucina/tipi-di-aglio-variet%C3%A0-da-conoscere/>; accesso in rete 22/08/2022
35. file:///C:/Users/utente/Downloads/DOP__IGP_e_STG_Registrati_agg_21.06.22.pdf; accesso in rete 22/08/2022
36. Small, L. D.; Bailey, J. H.; Cavallito, C. J. *Alkyl Thiolsulfinates*. J. Am. Chem. Soc. 1947, 69 (7), 1710–1713.
37. Bogialli, S.; Dal Maso, E.; Frasconi, M.; Montecchio, L.; Pastore, P.; Solorzano, E.R. “Allicin based formulation”, WO 2019/171207 A1, 2019
38. Anastassiades, M.; Lehotay, S. J.; Štajnbaher, D.; Schenck, F. J. *Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce*. Journal of AOAC INTERNATIONAL 2003, 86 (2), 412–431.
39. Freeman, F.; Angeletakis, C. N. *Formation of Elusive Vic-Disulfoxides and OS-Sulphenyl Sulfinates during the m-Chloroperoxybenzoic Acid (MCPBA) Oxidation of*

- Alkyl Aryl Disulfides and Their Regioisomeric Sulfinothioic Acid S-Esters*. J. Org. Chem. 1985, 50 (6), 793–798.
40. https://hmdb.ca/spectra/ms_ms/2236807; accesso in rete 13/09/2022
41. Ferary, S.; Thibout, E.; Auger, J. *Direct Analysis of Odors Emitted by Freshly Cut Allium Using Combined High-Performance Liquid Chromatography and Mass Spectrometry*. Rapid Commun. Mass Spectrom. 1996, 10 (11), 1327–1332.
42. https://hmdb.ca/spectra/c_ms/29425; accesso in rete 13/09/2022
43. <http://www.nist.gov/srd/nist1a.cfm>; accesso in rete 13/09/2022
44. Brodnitz, M. H.; Pascale, J. V.; Van Derslice, Linda. *Flavor Components of Garlic Extract*. J. Agric. Food Chem. 1971, 19 (2), 273–275.
45. Block, Eric.; Ahmad, Saleem.; Catalfamo, J. L.; Jain, M. K.; Apitz-Castro, Rafael. *The Chemistry of Alkyl Thiosulfinate Esters. 9. Antithrombotic Organosulfur Compounds from Garlic: Structural, Mechanistic, and Synthetic Studies*. J. Am. Chem. Soc. 1986, 108 (22), 7045–7055.
46. <https://www.phenomenex.com.cn/Info/WebDocumentServe/reversedguide.pdf>; accesso in rete 25/08/2022
47. Lawson, L.; Wang, Z.-Y.; Hughes, B. Identification and HPLC Quantitation of the Sulfides and Dialk(en)yl Thiosulfinates in Commercial Garlic Products. *Planta Med* 1991, 57 (04), 363–370

RINGRAZIAMENTI

Arrivata alla fine di questo percorso universitario desidero ringraziare innanzitutto il mio relatore Luca Cappellin per la disponibilità e l'opportunità datami di poter svolgere il progetto all'interno della Fondazione Edmund Mach. Inoltre, Iulii e Silvia per il costante aiuto competente, il tempo dedicatomi e le risate per sdrammatizzare.

Un ringraziamento alla mia famiglia per l'opportunità datami di studiare fuori sede sostenendomi nelle mie convinzioni, mia mamma per avermi letteralmente fatto la valigia 5 anni fa e avermi detto "NO adesso te vai", il mio papi per tutte le sue esclamazioni "E io pago!" ma in realtà era super orgoglioso e avrebbe fatto di tutto, mia sorella per aver evitato che accostassi colori improponibili nelle presentazioni e alla cartina dell'aglio (lo ho scritto sotto minaccia).

Alla quarta fila che accorreva subito in soccorso per gli esami e calcoli dell'ultimo minuto: grazie Anna per la determinazione che trasmetti, grazie Martina per tua sensibilità e i gelati Alla Romana e un ringraziamento particolare a Monica per gli audio da 10 min, i continui ce la dobbiamo fare per autoconvincimento e per aver deciso assieme a me, che tutti gli esami che avevamo da fare non erano e sufficienza riportandoci alle superiori a studiare storia. Grazie perché ho trovato delle vere amiche con cui condividere questo percorso ognuna con i propri punti deboli e limiti che abbiamo superato aiutandoci costantemente.

Grazie alle mie amiche di sempre: Gaia per dimostrarmi che bisogna rincorrere i propri sogni anche se poi non sempre si realizzano, Ilenia per il tuo coraggio, Chiara per ricordarmi di essere più serena che 20 anni si hanno una volta sola e Sara per non scordarmi che bisogna prendersi del tempo per sé stessi. Dal sostegno continuo tra i banchi di scuola alle fatiche con lo zaino grazie per essere rimaste con me nonostante ognuna abbia preso la propria strada.

Alle mie scolte o come le chiamo io le mie ragazze che mi hanno accolto a braccia aperte e mi hanno permesso di tornare a coltivare una delle mie passioni. Vi ringrazio perché con voi riesco a dimenticarmi di tutto il resto e passare dei fine settimana spensierati con delle persone che stimo e apprezzo. Mi avete sostenuto molto in questi anni passo dopo passo lungo la strada che stiamo percorrendo insieme.

Grazie davvero a Lorenzo che in 5 anni di università e di relazione ha fatto molti sacrifici stando a 120km l'uno dall'altro e vedendosi il sabato e la domenica tra scout, genitori e amici. Grazie di cuore per avermi sostenuto, sopportato tutte le mie ansie e per aver creduto in me ancora prima che io lo facessi con me stessa.

Infine, ringrazio me stessa per aver deciso di intraprendere questo percorso e decido di continuare nonostante tutte le insicurezze. Io che ho preso 12/30 al primo esame che non pensava di passare matematica che è la stessa che ora ha capito che un voto è solo una prestazione, che le cose davvero importanti sono altre. Un grazie particolare a tutte le persone che in questi ultimi mesi davvero mi sono state accanto scrivendomi per sapere come stavo, chiedendomi di andare a fare serata o semplicemente stando in silenzio perché sapevano e hanno rispettato il mio desiderio.

Dedico questo traguardo a tutti voi che conoscete quanto sia stato difficile e importante questo percorso per me, grazie per averlo reso unico.

GRAZIE, GRAZIE, GRAZIE

Alessia

