



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

LEONARDO FARIAS SERAFIM

ESTUDO EXPERIMENTAL E COMPUTACIONAL DAS PROPRIEDADES
VIBRACIONAIS E CITOTÓXICAS DE NUTRACÊUTICOS DO ALHO

FORTALEZA

2015

LEONARDO FARIAS SERAFIM

ESTUDO EXPERIMENTAL E COMPUTACIONAL DAS PROPRIEDADES
VIBRACIONAIS E CITOTÓXICAS DE NUTRACÊUTICOS DO ALHO

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Química
da Universidade Federal do Ceará, como
requisito parcial para a obtenção do título
de mestre em Química.
Área de Concentração: Físico-Química.

Orientador:
Prof. Dr. Pedro de Lima Neto.

Coorientador:
Prof. Dr. Valder Nogueira Freire.

FORTALEZA

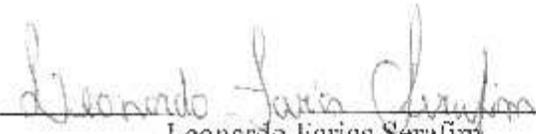
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- S487e Serafim, Leonardo Farias.
 Estudo experimental e computacional das propriedades vibracionais e citotóxicas de
nutracêuticos do alho / Leonardo Farias Serafim. – 2015.
 120 f. : il. color.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento
de Química Analítica e Físico-Química, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza,
2015.
 Área de Concentração: Físico-Química.
 Orientação: Prof. Dr. Pedro de Lima Neto.
 Coorientação: Prof. Dr. Valder Nogueira Freire.
1. Alho. 2. Antibacterianos. 3. Radicais livres (Química). 4. Anticarcinógenos. I. Título.

CDD 541.3

Esta Dissertação foi aprovada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Química, área de concentração Físico-química, outorgada pela Universidade Federal do Ceará, em cuja Biblioteca de Ciências e Tecnologia/UFCE encontra-se à disposição dos interessados.


Leonardo Farias Seralim

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 31/07/2015.

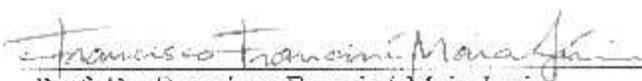
EXAMINADORES:



Prof. Dr. Pedro de Lima Neto
Universidade Federal do Ceará – UFC



Prof. Dr. Valder Nogueira Freire
Universidade Federal do Ceará – UFC



Prof. Dr. Francisco Franciné Maia Júnior
Universidade Federal Regional do Semi-árido – UFERSA

*Dedico essa dissertação
a Deus,
amigos próximos
e aos bons espíritos.*

AGRADECIMENTOS

A todos os colaboradores do grupo de Química Teórica, especialmente os professores Édson Teixeira, Otília e Claudia, sem os quais meu trabalho não seria possível.

Aos Professores Pedro de Lima Neto e Valder Freire por me guiarem durante todo este tempo e por acreditarem no meu potencial.

A minha família pelo suporte emocional e financeiro durante toda minha jornada.

Aos meus amigos de graduação Bruno Ramon e Ana Beatriz pelos conselhos em todas as horas difíceis, e que mesmo distante não se esquecem da nossa amizade.

Ao meu amigo de graduação Raphael Braga pela amizade em todas as fases da minha vida.

A minha amiga e vizinha Ana Márcia pelas lições ensinadas e aprendidas pelas loucuras e todas as confusões que nos metemos.

Ao meu colega de graduação Pedro Felipe, do laboratório de Modelagem e Simulação 3D pela ajuda no script do Forcite.

Aos meus colegas de laboratório: Aurélio, Alexandre, Thais, Xilitol e Lute, pelo companheirismo e pelos momentos de descontração.

Aos meus colegas Ito e Bruno pela ajuda na síntese das partículas de carbonato de cálcio.

A minha colega Jamila pelos conselhos religiosos e momentos de descontração.

RESUMO

A atividade citotóxica e bactericida do extrato de alho, em três linhagens de células tumorais (HCT-166, SF-295 e OVCAR-8) e em quatro culturas de bactérias: duas gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228) e duas gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e *Escherichia coli* ATCC 11303), foi investigada neste trabalho. Visando melhorar a biodisponibilidade e o direcionamento destes nutracêuticos para células alvo (tumores ou bactérias), um sistema de liberação de fármacos baseado na adsorção do extrato de alho em micropartículas de carbonato de cálcio foi desenvolvido. Adicionalmente, simulações computacionais no formalismo DFT (*Density Functional Theory*) foram realizadas para a determinação das propriedades estruturais e vibracionais de duas moléculas, alliina e metiina, presentes neste extrato aquoso. A molécula de alliina, espécie de maior concentração no extrato aquoso utilizado, foi usada como modelo teórico para cálculos de potenciais de interação do extrato de alho e das micropartículas de carbonato de cálcio. Os códigos GAUSSIAN, Forcite e Dmol3, assim como o funcional meta-híbrido M06-2X e o funcional puro GGA na sua formulação BPE foram usados nas simulações. Os espectros vibracionais obtidos para a molécula de alliina revelaram intensas absorções em: 1637, 1592, 1519, 1430, 1397, 1390, 1357 1018, 544 cm^{-1} na região do infravermelho, principalmente associadas a vibrações dos grupos carboxila, amino e sulfóxido, e em: 1643, 1429, 1404, 1316, 1297, 1207, 790, 744, 693, 588, 503 cm^{-1} no espectro Raman, associados a vibrações da cadeia carbônica. O espectro na região do infravermelho da molécula de metiina é semelhante ao da alliina, porém, seu espectro Raman revela bandas de absorção que podem diferenciar as duas espécies, principalmente a ausência do pico observado em 1643 cm^{-1} referente ao grupo alila. Os espectros vibracionais teóricos calculados indicam uma ótima correlação com os espectros experimentais obtidos, tanto para moléculas puras como para o extrato produzido em laboratório. Os cálculos de potenciais de interação sugerem a adsorção dos nutracêuticos em pelo menos quatro camadas de solvatação em torno das micropartículas de carbonato de cálcio, o que promove sua lenta liberação, elevando sua biodisponibilidade. Os testes de citotoxicidade revelaram inibição do crescimento tumoral de cerca de 93%, nas as três linhagens de células tumorais, e atividade bactericida nas duas colônias de bactérias gram-positivas estudadas, o que comprovou o efeito sinérgico do extrato de alho com o carbonato de cálcio e sua eficácia como sistema de liberação de nutracêuticos. Estes resultados demonstram o potencial de aplicação na prática farmacêutica do uso de micropartículas de carbonato de cálcio modificadas com extrato de alho para combate a células tumorais e a ações bactericidas

ABSTRACT

The cytotoxic and bactericidal activities of garlic extract were tested in three tumor cell lines (HCT-166, SF-295 e OVCAR-8) and four bacteria cultures: two gram-positives (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228) and two gram-negatives (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e *Escherichia coli* ATCC 11303). Aiming to improve the bioavailability and cell targeting (tumor or bacteria) of these nutraceuticals, a drug delivery system based on the adsorption of garlic extract on calcium carbonate microparticles was developed. Additionally, computer simulations within the Density Functional Theory (DFT) formalism were accomplished to find the structural and vibrational properties of two molecules, alliin and methiin, present in garlic extract. alliin the highest concentration specie present in garlic extract was used as theoretical model to represent the garlic extract on the potential interaction calculations with calcium carbonate microparticles. The computer codes GAUSSIAN, Forcite and Dmol3, with the Meta hybrid M06-2X and the pure GGA-PBE Exchange-correlation functional were used to implement the computations. The vibrational spectra recorded for the alliin unveiled intense absorption peaks at: 1637, 1592, 1519, 1430, 1397, 1390, 1357 1018, 544 cm^{-1} on IR spectrum, mainly assigned to the carboxyl, amine and sulfoxide groups vibrations, and at 1643, 1429, 1404, 1316, 1297, 1207, 790, 744, 693, 588, 503 cm^{-1} on Raman spectrum, associated to the carbon chain vibrations. The methiin IR spectrum is similar to alliin's, but, its Raman spectrum unveiled absorption bands which may differentiate both molecules, mainly for the absence of the absorption peak observed at 1643 cm^{-1} , ascribed to the allyl group vibration. The calculated theoretical vibrational spectra showed a good agreement with the experimental data. The interaction potential calculations suggests the adsorption of at least four solvation layers of the nutraceuticals around the calcium carbonate microparticles, this fact allow the slowly release of the species, preserving its bioavailability. The cytotoxicity tests showed tumor cells growth inhibition of 93% for the three tumor cell line studied, and bactericidal activity on gram-positives bacteria cell cultures, which proved the synergetic effect of garlic extract with calcium carbonate and its efficacy as drug delivery system. Those results shows the application potential of the calcium carbonate microparticles modified with garlic extract on the treatment of cancer and as antibacterial agent.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química geral do alho	10
Tabela 2 – Quantidade recuperada dos compostos organossulfurados	11
Tabela 3 – Parâmetros estruturais da Alliina	25
Tabela 4 – Atribuições dos modos vibracionais da Alliina	28
Tabela 5 – Parâmetros estruturais da Metiina	34
Tabela 6 – Atribuições dos modos vibracionais da Metiina	37
Tabela 7 – Atividade citotóxica das micropartículas	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Alguns vegetais da família do alho.....	3
Figura 2 – Compostos organossulfurados com atividade antioxidante	4
Figura 3 – Saponinas esteroides presentes em extrato de alho envelhecido	6
Figura 4 – Compostos organossulfurados presentes no extrato de alho	12
Figura 5 – Tamanho médio de algumas estruturas em nanômetros	13
Figura 6 – Distribuição das estruturas de protonação da alliina.....	17
Figura 7 – Formula estrutural plana e conformeros da alliina.....	25
Figura 8 – Espectro na região do infravermelho da alliina	27
Figura 9 – Espectro Raman da alliina	29
Figura 10 – Principais modos da alliina.....	30
Figura 11 – Espectros do extrato de alho comercial	31
Figura 12 – Espectros das moléculas de alliina e allicina	32
Figura 13 – Formula estrutural plana e confômero da metiina.....	34
Figura 14 – Espectro na região do infravermelho da metiina	36
Figura 15 – Espectro Raman da metiina	38
Figura 16 – Principais modos da metiina	39
Figura 17 – Espectros do extrato de alho produzido em laboratório	40
Figura 18 – Estrutura da nanopartícula de carbonato de cálcio	43
Figura 19 – Microscopia de varredura eletrônica da micropartícula pura.....	44
Figura 20 – Estrutura da superfície de carbonato de cálcio	45
Figura 21 – Gráfico de potencial de interação com nanopartícula	46
Figura 22 – Camadas de solvatação da alliina em carbonato de cálcio.....	47
Figura 23 – Função de distribuição radial	48

Figura 24 – Gráfico de potencial de interação com superfície	49
Figura 25 – Microscopia de varredura eletrônica da micropartícula modificada.....	51
Figura 26 – Estrutura de interação de menor energia	53
Figura 27 – Espectros teóricos da nanopartícula	54
Figura 28 – Espectro na região do infravermelho da micropartícula	55
Figura 29 – Histograma da atividade bactericida em bactérias gram-positivas.....	60
Figura 30 – Histograma da atividade bactericida em bactérias gram-negativas	61

SUMÁRIO

1 Introdução.....	1
1.1 Aspectos históricos	1
1.2 O alho no combate aos radicais livre	3
1.3 O alho no combate as doenças cardiovasculares.....	5
1.4 O alho no combate ao câncer	6
1.5 A atividade bactericida do Alho	9
1.6 A composição do alho	9
1.7 Entrega de nutracêuticos para o tratamento de câncer	12
1.8 Escopo da dissertação.....	14
2 Metodologia e simulações computacionais.....	16
2.1 Propriedades estruturais	16
2.1.1 Estado de protonação.....	16
2.1.2 Estudo dos confôrmeros.....	17
2.2 Propriedades vibracionais	18
2.3 Dinâmica molecular.....	19
2.4 Extração dos compostos organossulfurados.....	19
2.5 Síntese das micropartículas	20
2.6 Medidas espectroscópicas e microscópicas	20
2.7 Testes de citotoxicidade.....	21
2.8 Testes de concentração inibitória e bactericida mínima.....	22
3 A molécula de alliina.....	24
3.1 Propriedades estruturais	24
3.2 Propriedades vibracionais.....	26
3.2.1 Espectro na região do infravermelho	26
3.2.2 Espectro Raman	29

3.3 Aplicação no controle de qualidade de suplementos alimentares	31
4 A molécula de metiina	34
4.1 Propriedades estruturais	34
4.2 Propriedades vibracionais	35
4.2.1 Espectro na região do infravermelho	35
4.2.2 Espectro Raman	38
4.3 Extrato de alho produzido em laboratório	40
5 Entrega por carbonato de cálcio.....	42
5.1 Preparo das estruturas.....	42
5.2 Cálculos de potenciais de interação.....	42
5.2.1 Adsorção em nanopartícula	46
5.2.2 Adsorção em superfície	46
5.3 Espectros vibracionais teóricos.....	49
5.4 Espectro experimental na região do infravermelho	53
5.5 Ensaio biológico	56
5.5.1 Atividade anticâncer	56
5.5.2 Atividade bactericida.....	58
6 Conclusões	62
7 Apêndice A.....	64
8 Apêndice B.....	78
Referências bibliográficas.....	99

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Históricos

Durante séculos a humanidade tem explorado os benefícios de plantas medicinais para a cura, prevenção ou tratamento de várias patologias. Pesquisas realizadas nas últimas décadas produziram evidências suficientes para que possamos concluir que uma dieta rica em frutas, legumes e vegetais é capaz de nos proteger de vários tipos de patologias e até mesmo alguns tipos de câncer. O efeito preventivo de diversos vegetais, como por exemplo: o brócolis, o tomate e o alho, são amplamente apoiados por dados epidemiológicos e, por isso, vários tipos de plantas, e suas moléculas constituintes, têm chamado a atenção dos pesquisadores [1-4].

Em 1989, Stephen DeFelice introduziu o termo “nutracêutico” na comunidade científica. Este termo foi criado pela junção dos termos “nutrição” e “farmacêuticos”. De acordo com DeFelice, os nutracêuticos são definidos como “alimentos ou partes de alimentos que fornecem benefícios à saúde, incluindo a prevenção e tratamento de doenças” [2]. O licopeno no tomate, os carotenoides na cenoura, a genisteína na soja, o lupeol em frutas como manga, uva e morango, e os compostos organossulfurados presentes no alho, são exemplos de substâncias presentes em alimentos, e conhecidos pelos seus benefícios à nossa saúde quando incluídos na nossa dieta, tendo como principais efeitos: atividade antioxidante, prevenção de câncer de pulmão, pele, estômago, próstata e outros [1, 2, 3].

O alho, *allium sativum*, é uma planta medicinal que teve seus benefícios explorados desde a antiguidade. No Egito antigo, o alho fez parte da alimentação diária dos egípcios, principalmente da classe trabalhadora, fornecendo-os mais força e disposição para a realização de sua jornada de trabalho, tornando-os mais produtivos [5]. Na Roma e na Grécia antigas, o alho também servia de alimento para soldados e marinheiros. O império Romano introduziu o cultivo do alho em várias civilizações em seu processo de colonização, principalmente pelo norte europeu [5,6]. O nosso conhecimento sobre o cultivo, culinária e aplicações medicinais deste nutracêutico foram frutos de extensivos trabalhos arqueológicos, principalmente

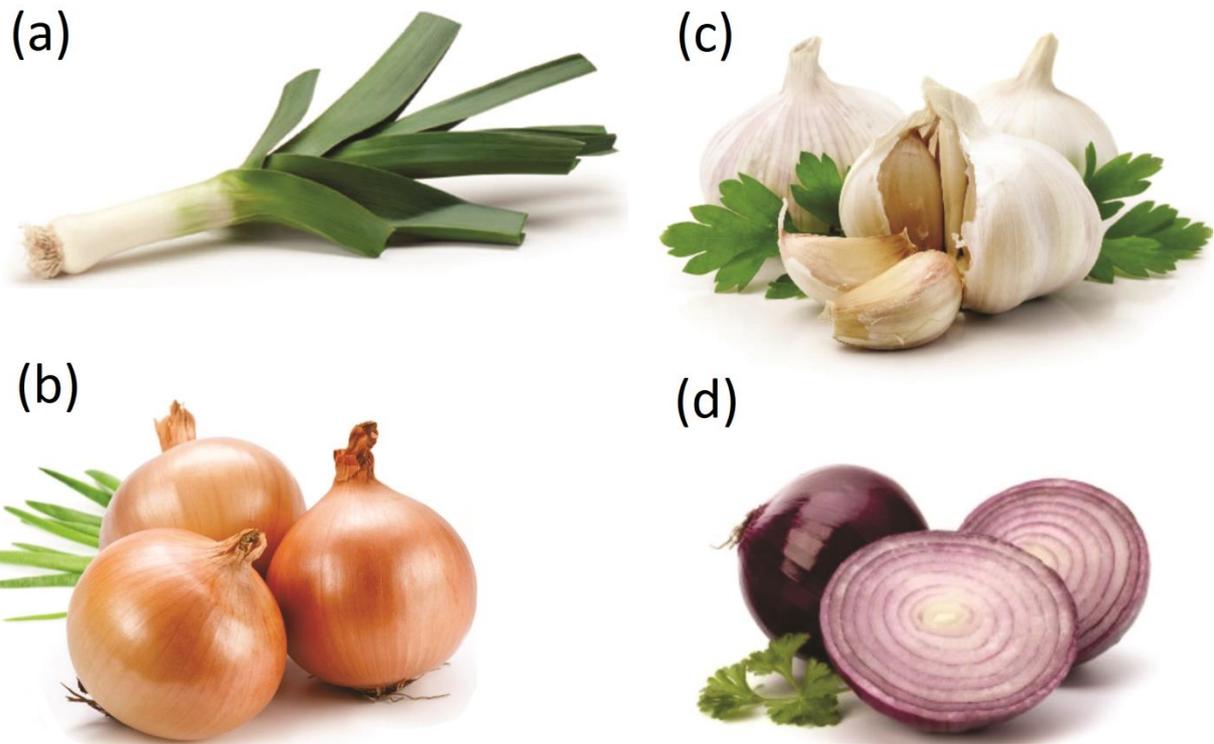
análises de pictogramas ou outros tipos de expressões artísticas encontradas em papiros, tábuas de argila e paredes de cavernas, e até mesmo alguns exemplares encontrados intactos em sarcófagos e outras relíquias enterradas nas pirâmides do Egito [5]. Um exemplo notório de registo histórico do uso do alho é a tábua culinária de Yale, da Mesopotâmia. Datando entre 1600-1700 A.C, este documento é o registro histórico mais antigo encontrado por arqueólogos. Neste artefato, escrituras sugerem a existência de até seis variedades de alhos, porém apenas três puderam ser identificadas (alho, cebola e alho-porró), estes nutracêuticos eram manipulados de forma conjunta, sendo macerados ou picados, pois desta forma proporcionava-se um melhor sabor à mistura [5].

Dioscórides, um autor greco-romano, considerado o criador da farmacognosia, escreveu uma obra, *De materia medica*, dividida em cinco livros com informações de cerca de 600 plantas medicinais, 35 fármacos de origem animal e 90 de origem mineral, na qual recomendava o consumo do alho por ele “limpar as artérias”. Sua obra constituiu principal fonte de informações sobre plantas medicinais desde o século I até o século XVIII, também vale ressaltar que o processo circulação sanguínea foi descoberto apenas centenas de anos depois [1, 2].

O gênero *Allium* é o maior e mais importante da família *Alliaceae*, contendo 690 espécies. Além dos exemplares bastante conhecidos alho e cebola, várias outras espécies são cultivadas principalmente para fins culinários, entre eles: alho-poró (*Allium porrum* L.), chalota (*Allium ascalonicum* Hort.), alho de urso (*Allium ursinum* L.), alho-elefante (*Allium ampeloprasum* L. Var. *ampeloprasum*), cebolinha (*Allium schoenoprasum* L.) e cebolinha chinesa, (*Allium ruberosum* L.). Ao longo da história da civilização humana, as propriedades terapêuticas do alho tem sido amplamente valorizadas. Alguns exemplares do gênero *Allium* comumente encontrados em feiras e supermercados no Brasil estão ilustrados na Figura 1.

Na última década, mais de 1000 publicações científicas, têm o alho como foco principal, sendo considerado um dos melhores nutracêuticos, devido ao seu potencial e sua variedade de aplicações, principalmente em doenças crônicas associadas ao envelhecimento, como: arterosclerose, derrame cerebral, câncer, envelhecimento cerebral, arritmia cardíaca e formação de catarata, incluindo também o aumento de disposição e melhoramento da circulação sanguínea.

Figura 1. Exemplos do gênero *Allium* comumente encontrados em feiras e mercados no Brasil, nomes comerciais: (a) Alho-poró, (b) Cebola argentina, (c) Alho e (d) Cebola roxa.



1.2 O alho no combate aos radicais livres

O oxigênio é essencial para a vida devido ao seu uso na produção de energia, no processo de respiração aeróbica. Porém, associado a este processo, existe a formação de radicais livres.

Os radicais livres são responsáveis por desencadear vários processos no corpo humano, como o próprio envelhecimento, o aparecimento de doenças degenerativas e até alguns tipos de câncer. Estes radicais são normalmente neutralizados por enzimas produzidas por células, pequenas moléculas como a glutathione, vitaminas e minerais [6]. Os compostos organossulfurados presentes no alho, foram apontados em diversos estudos como sendo efetivos contra doenças causadas pelos radicais livres [6, 7, 8]. Estas moléculas são capazes de estimular as enzimas envolvidas no processo de desativação dos radicais livres, melhorando suas atividades, porém, a eficácia destes compostos orgânicos ou de suplementos a base de alho, variam de acordo com sua estrutura ou processo de fabricação [6, 7, 8]. Em um estudo onde se avaliou a capacidade de quatro compostos

organossulfurados (*alil*-cisteína, alliina, alicina e sulfeto de alila, mostrados na Figura 2) de capturar os radicais: superóxido, hidroxila, e peróxido de hidrogênio [8]. Os resultados deste estudo indicam que as espécies estudadas possuem diferentes mecanismos de atuação, por exemplo, a alliina mostrou-se bastante eficaz, em baixas concentrações, na captura do radical peróxido enquanto seus análogos exibiram pouca ou nenhuma atividade. Por outro lado a molécula de alicina mostrou-se bastante eficiente na inibição da formação de ácido úrico pela enzima xantina oxidase.

Figura 2. Compostos organossulfurados com atividade antioxidantes presentes em maiores quantidades em suplementos de extrato de alho envelhecidos: (a) Alicina, (b) SAC, (c) Sulfeto de Alila e (d) SAMC.



O composto organossulfurados presente no extrato de alho envelhecido, SAC (S-*alil*-L-cisteína) foi avaliado juntamente com outro composto, SAMC (S-*alil*-mercaptocisteína), também exibindo atividades antioxidantes *in vitro* e *in vivo*, sendo capazes de desativar radicais de oxigênio e nitrogênio [9] e até mesmo reduzir a citotoxicidade induzida por $K_2Cr_2O_7$ [10].

Extratos de alho ou suplementos alimentares a base de alho que passam por um processo de envelhecimento durante a sua fabricação possuem uma elevada concentração destes dois compostos organossulfurados antioxidantes (SAC e SAMC) como também compostos fenólicos (alixina), N-Fructosil glutamato, N-Fructosil arginina e selênio [11] o que explica seus efeitos benéficos à saúde quando consumidos regularmente. Um exemplo de suplemento composto de extrato de alho envelhecido é mostrado na Figura 2, com suas principais moléculas constituintes, responsáveis por sua atividade antioxidante.

1.3 O alho no combate as doenças cardiovasculares

As doenças cardiovasculares, ou doenças que afetam diretamente o coração ou os vasos sanguíneos, lideram o ranking mundial, representando 31.16% das causas de morte segundo a WHO (*World Health Organization*). Existem três principais grupos de fatores de risco, responsáveis pela ocorrência das doenças cardiovasculares, são eles: os hábitos alimentares, o estilo de vida e os fatores incontroláveis [12]. Relacionado ao estilo de vida, estão o tabagismo, alcoolismo, sedentarismo e estresse. Ligados aos fatores incontroláveis incluem-se: hereditariedade, gênero e idade (os riscos de doenças cardiovasculares são maiores em homens do que em mulheres antes da menopausa) [12, 13].

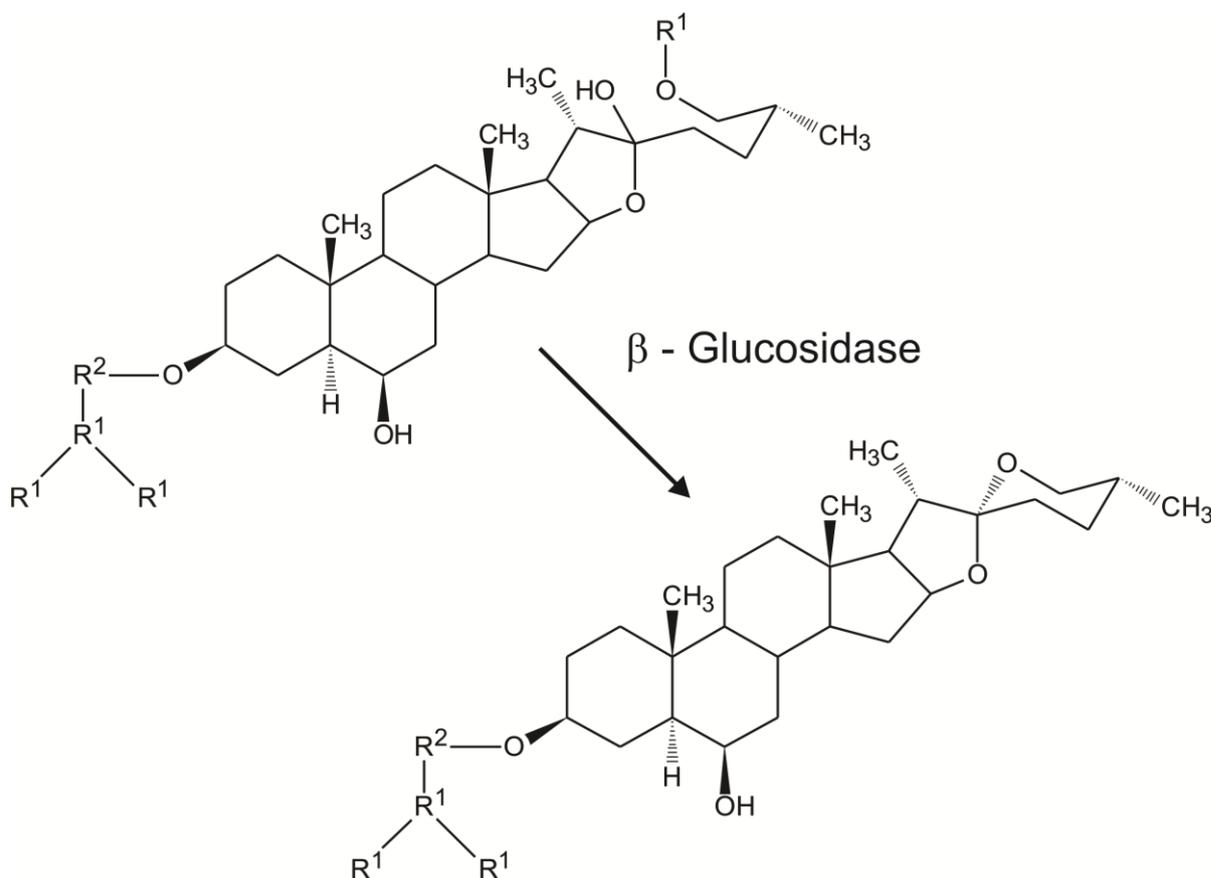
O mais importante fator no controle das doenças cardiovasculares é a dieta. A hiperlipidemia, que consiste em valores elevados de gorduras no sangue (colesterol, triglicerídeos ou ambos), hipertensão, diabetes e obesidades são as condições clínicas atribuídas à dieta, que mais aumentam a incidência de doenças cardiovasculares [12, 13, 14]. Os nutracêuticos têm se destacado no tratamento e prevenção de doenças cardiovasculares, possuindo um importante papel no tratamento de: insuficiência cardíaca congestiva, arritmias, hipertensão arterial, angina e hiperlipidemia [2].

Altos níveis de colesterol e triglicerídeos no plasma sanguíneo estão intimamente associados com a arteriosclerose e doenças cardíacas isquêmicas. O alho exerce seu efeito antilipêmico aumentando a excreção do colesterol pelo organismo, o que conseqüentemente reduz sua concentração no plasma sanguíneo, e também inibindo as enzimas chaves envolvidas na sua biossíntese, no próprio organismo, promovendo um balanço favorável da taxa HDL: LDL [7].

A habilidade do alho, e de outras plantas do gênero *Allium*, de reduzir os níveis de colesterol no sangue tem sido atribuída não somente a seus compostos organossulfurados, mas também a uma variedade de saponinas e sapogeninas esteroides (estrutura mostrada na Figura 3). Estas substâncias, presentes em suplementos a base de extrato de alho envelhecido, são responsáveis pela inibição da absorção do colesterol pelo intestino, como já mencionado anteriormente, que

facilitam a sua excreção [15], estudos recentes indicam que o consumo diário de um dente de alho, é capaz de baixar em até 9% os níveis de colesterol no sangue [7].

Figura 3. Saponinas esteroides presentes em extrato de alho envelhecido: (a) Proto-Eruboside-B, sendo convertida pela enzima β -Glucosidase em (b) Eruboside. R¹ representa o grupo β -D-Glucopiranosil e R² β -D-Galactopiranosil.



1.4 O alho no combate ao câncer

Os hábitos alimentares têm grande impacto na ocorrência do câncer. A mudança de hábitos alimentares, ou reeducação alimentar, é, provavelmente, a alternativa mais barata, prática e efetiva para a diminuição do risco de câncer ou modificação do comportamento de tumores já existentes. Aproximadamente 30 a 40 % dos tipos de câncer, podem ser prevenidos com uma alimentação saudável, controle de peso e prática periódica de atividade física [16]. Isto significa que, através do consumo de alimentos que ajudam a manter o bem estar do corpo, e a redução do consumo de alimentos como carne vermelha ou carnes processadas,

que podem aumentar o risco de câncer, substituindo-as por alimentos de origem vegetal, podemos evitar a ocorrência de diversos tipos de câncer. Existe uma crescente necessidade de identificação destes perfis dietéticos, bem como caracterização de alimentos nutracêuticos e suas moléculas bioativas e, particularmente, um grupo de nutracêuticos que tem despertado bastante interesse pelas suas propriedades quimiopreventivas são os pertencentes ao gênero *Allium* [16].

Em uma meta-análise de 21 estudos, com um total de 543.220 indivíduos, foi concluído que um elevado consumo de vegetais do gênero *Allium*, está diretamente associado com a redução do risco de câncer de estômago [16, 17, 18]. Uma análise mais específica de cada vegetal (cebola, alho, alho-poró, cebolinha chinês, cebolinha verde, talo de alho e cebola galês) mostrou atividades bastante semelhantes, com exceção das folhas de cebola, para cada vegetal. De maneira geral, o consumo de 20 gramas por dia (aproximadamente o peso de um bulbo de alho) está associado, estatisticamente, com a diminuição de 9 % da incidência de deste tipo de câncer [18].

Em um segundo estudo, realizado em um total de 3.057 indivíduos, foi avaliado a atividade preventiva da cebola e do alho, contra alguns tipos de câncer (colorretal, de laringe, de ovário, da cavidade oral, de esôfago, de próstata, de mama e renal) [19]. O consumo moderado de alho teve efeito preventivo em tumores de câncer renal e colorretal; o consumo elevado de alho teve efeito significativo em todos os tipos de câncer estudados, menos em tumores de mama e próstata (estes dois últimos tumores estão mais associados com fatores hormonais) [19].

O mecanismo de ação dos compostos organossulfurados, ainda não foi completamente elucidado, porém, é amplamente aceito que estes compostos atuem de múltiplas maneiras, principalmente impedindo a ativação carcinogênica, indução de enzimas de fase dois, indução de apoptose, inibição da progressão do ciclo de divisão celular, modificações de histonas e inibição de angiogêneses e metástases [16].

Espécies químicas cancerígenas, frequentemente requerem a ativação metabólica mediada pelo citocromo P450 (uma superfamília de hemoproteínas abreviada como CYP450), que por uma reação de monooxigenase pode oxidar tais

espécies a formas ainda mais tóxicas [20]. Por outro lado, a inativação destas espécies cancerígenas é realizada pela indução de enzimas de fase dois (ex. glutathiona S-transferase, NADPH: quinona oxidorreductase). Muitos modelos animais usados na investigação de nutracêuticos com atividade anticancerígena são baseados na ativação carcinogênica do citocromo P450. O citocromo P450 2E1 (CYP2E1) é responsável pelo metabolismo de muitas espécies carcinogênicas de baixa massa molecular (ex. nitrosaminas, acetaminofeno, benzeno). Os compostos organossulfurados foram capazes de inibir a ação da CYP2E1 por um mecanismo de inibição por substrato, em estudos realizados em camundongos com câncer induzidos por tetracloreto de carbono e N-nitrodimetilamina [21, 22].

Outro mecanismo de atuação dos compostos organossulfurados é a ativação de enzimas de fase dois. As enzimas envolvidas em reações de fase dois são reconhecidas pelas suas habilidades de facilitar a excreção de substâncias cancerígenas do corpo. Tem-se observado que os compostos organossulfurados presentes no alho são capazes de melhorar o processo de detoxificação destas enzimas, entre elas NQO1 (uma enzima envolvida na detoxificação de quinonas) através de um experimento realizado em camundongos [22]. Em outro experimento realizado por Singh e colaboradores, avaliou-se a atividade de cinco compostos (sulfeto de alila, DAS, dissulfeto de alila, DADS, trissulfeto de alila, DATS, sulfeto de propila, DPS, e dissulfeto de propila, DPDS) em tumores de câncer induzidos por benzopireno, em camundongos [23, 24]; os resultados revelaram que os compostos com o grupo alila, são potentes ativadores de atividade da enzima NADPH: quinona oxidorreductase, enquanto os compostos com grupo propila tiveram pouca ou nenhuma atividade.

Um último mecanismo de ação é denominado de apoptose. Os organismos multicelulares normalmente eliminam células defeituosas, eficientemente através de um processo chamado de apoptose, resultando em uma morte celular programada [25]. Este efeito foi primeiramente observado por Milner e colaboradores, que estudaram o efeito dos compostos derivados do alho em células humanas de câncer de cólon [26]. Os compostos organossulfurados estudados por Milner causaram a apoptose imediato das células cancerígenas pelo aumento da concentração de cálcio intracelular e a interrupção do ciclo celular na fase G2/M. Resultado

semelhante foi obtido em linhagens de células H359 e H460 de câncer de pulmão quando expostas a DATS [27, 28, 29]. Em tumores de câncer de próstata, em células de linhagem PC-3 e DU145, DATS mostrou-se indutor de apoptose pelo mecanismo de hiperfosforilação da Bcl-2 (uma família de genes e proteínas que regulam a permeabilidade da membrana externa da mitocôndria) [30]. Como dito anteriormente, os grupos de enxofre e alila são importantes descritores da atividade anticâncer do alho, e é importante destacarmos que os compostos organossulfurados agem de maneira seletiva, induzindo apoptose em células cancerígenas, causando pouco ou nenhum dano às células normais, tornando estas espécies bastante apropriadas para o tratamento do câncer [20,31].

1.5 A atividade bacteriana do alho

A atividade antibacteriana do alho já foi comprovada na inibição de crescimento de bactérias gram-positivas e gram-negativas. As espécies de bactérias, sensíveis aos compostos organossulfurados incluem: *Pseudomonas*, *Proteus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Micrococcus*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium* e *Clostridium* [32-36], algumas das quais são resistentes à penicilina, estreptomicina, doxiciclina, cefalexina e outros antibióticos. Diferentemente da sua aplicação no câncer, os compostos organossulfurados também inibem o crescimento de bactérias benéficas, presentes na flora intestinal, porém as enterobactérias danosas ao corpo humano mostraram-se mais susceptíveis aos compostos organossulfurados principalmente devido a uma maior sensibilidade a Allicina [33, 34].

A allicina é considerada o principal agente bactericida presente no extrato de alho. A inibição de certas proteínas contendo o grupo tiol, através de uma reação com os compostos tiosulfinais, é o principal mecanismo bactericida do alho [33].

1.6 A composição do alho

A composição geral do alho está mostrada na Tabela 1. O alho é composto majoritariamente de água (65%), o restante de seu peso é composto de

carboidratos, compostos organossulfurados, proteínas, fibras e aminoácidos livres. No alho também encontramos uma elevada concentração de saponinas, fosforo, potássio, enxofre, zinco, moderados níveis de selênio, vitaminas A e C, e baixos níveis de cálcio, magnésio, sódio, ferro, manganês e vitaminas do complexo B. A maior parte destas espécies, cerca de 97%, são solúveis em água, com apenas 0.15 a 0.7% de compostos solúveis em óleo [8].

O alho contém compostos organossulfurados exclusivos, que como dito anteriormente, são responsáveis pela maior parte dos efeitos terapêuticos e consequentemente principais temas de suas investigações científicas.

Uma metodologia de análise desenvolvida por Ichikawa e colaboradores, que consiste em uma simples extração ácida (HCl 0.1M) de uma determinada quantidade de dentes de alho descascados e uma posterior análise por HPLC, permitiram a identificação e quantificação de sete destes compostos, sendo eles três peptídeos: γ -L-glutamil-S-(2-propenil)-L-cisteína (GSAC), γ -L-glutamil-S-(trans-1-propenil)-L-cisteína (GSPC), γ -L-glutamil-S-metil-L-cisteína (GSMC) e seus respectivos sulfóxidos derivados: sulfóxido de S-(2-propenil)-L-cisteína (alliina), sulfóxido de S-(trans-1-propenyl)-L-cisteína (isoalliina), sulfóxido de S-metil-L-cisteína (metiina), e também um composto cíclico, (1S, 3R, 5S)-5-metil-1,4-tiazina-3-ácioicarboxílico-1-óxi (cicloalliina), suas estruturas estão mostradas na Figura 4 [37].

Tabela 1. Composição química geral do Alho.	
Componente	Quantidade (fração mássica %)
Água	62-68
Carboidratos	26-30
Proteínas	1.5-2.1
Amino ácidos: comuns	1-1.5
Amino ácidos: sulfóxidos de cisteína	0.6-1.9
γ -Glutamil-cisteínas	0.5-1.6
Lipídios	0.1-0.2
Fibras	1.5
Total de compostos sulfurados	1.1-3.5
Enxofre	0.23-0.37
Nitrogênio	0.6-1.3
Minerais	0.7
Vitaminas	0.015
Saponinas	0.04-0.11
Total de compostos solúveis em óleo	0.15(Inteiro) - 0.7(Cortado)
Total de compostos solúveis em água	97

Fonte: Adaptado de [8]

Estes compostos foram caracterizados e quantificados por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), com taxa de recuperação entre 97.1 e 102.3%. A Tabela 2 mostra a quantidade recuperada de cada espécie em miligrama por grama de alho analisado [37].

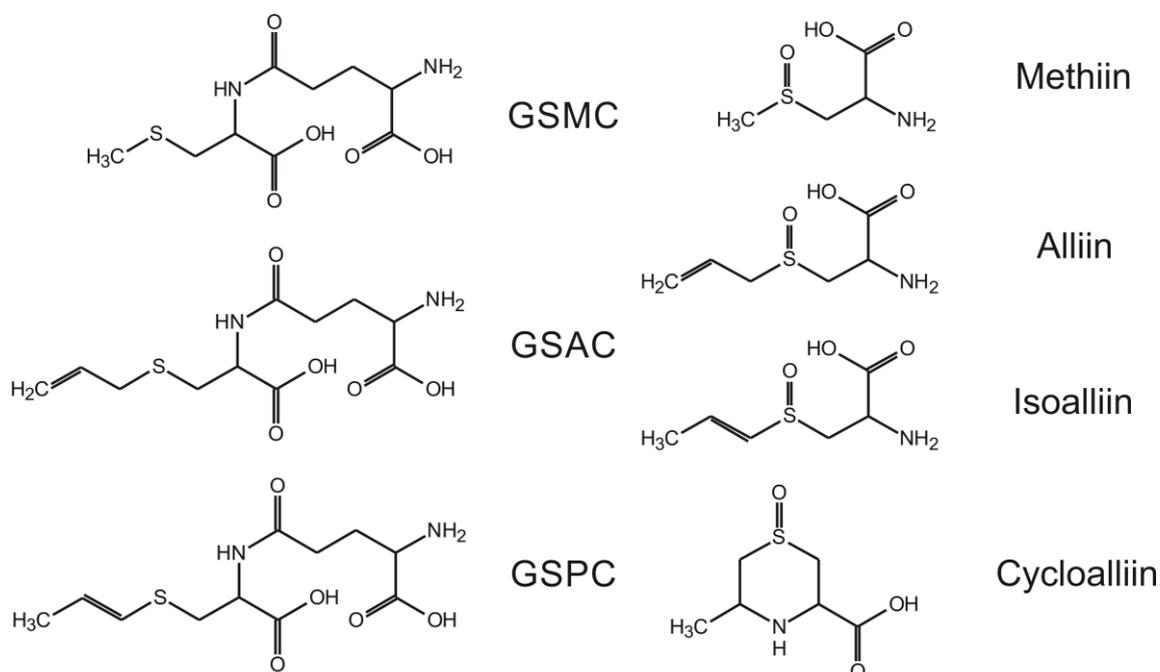
Durante o processo de extração Ichikawa e colaboradores, destacam a importância da utilização de uma solução ácida, como o ácido clorídrico, a fim de aumentar a solubilidade destes compostos em água, e neutralizar a ação da enzima Aliinase, que se desnatura irreversivelmente em pH 3.

Tabela 2. Quantidade original de cada composto organossulfurado recuperado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) segundo a metodologia de Ichikawa e colaboradores.	
Compostos	Quantidade original (mg/g)
Aliina	19.8
Isoaliina	0.967
Metiina	1.157
Cicloaliina	0.795
GSAC	3.54
GSPC	5.02
GSMC	0.231

Fonte: adaptado de [37]

Esta enzima é liberada quando o alho é cortado ou macerado, convertendo os compostos organossulfurados em tiosulfinais (allicina, DADS, DATS, etc), podendo comprometer a análise. Os compostos tiosulfinais, como citados anteriormente, apesar de também exibirem atividades terapêuticas promissoras, não serão foco deste trabalho, por serem instáveis, voláteis, pouco solúveis em água e consequentemente não estarem presentes em quantidades significantes, no extrato aquoso de alho [37, 38, 39].

Figura 4. Compostos organossulfurados presentes no extrato de alho, sem a ação da enzima Aliinase.



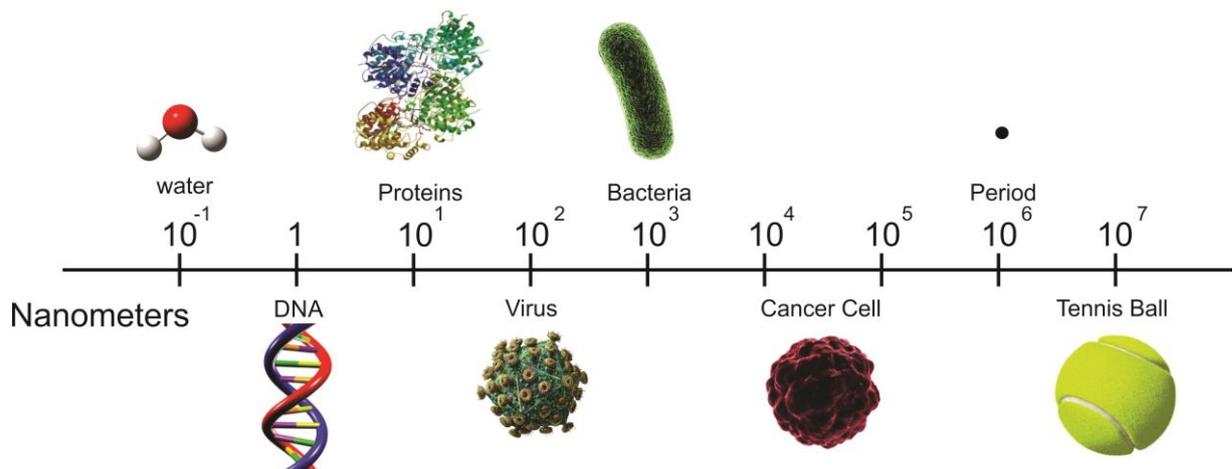
Como podemos observar na Tabela 2, a alliina é o composto organossulfurado de maior abundância recuperado no extrato de alho e considerada a substância “Parental” do alho, pois é a sua reação enzimática (com a alliinase) que dá origem aos demais compostos orgânicos presentes no alho (allicina, DADS, DATS, etc). Em um estudo envolvendo camundongos, 10 minutos após a ingestão de alliina (10 mg/animal), este composto foi encontrado distribuído em: 7.2% no estômago, 22.4% no intestino e 2.5% no fígado, sem a produção de allicina ou de seus metabólitos [40]. Em outro experimento, a alliina permaneceu com biodisponibilidade de 16.5% no plasma sanguíneo, 4 horas após sua ingestão (60mg/kg do animal) [41].

1.7 Entrega de nutracêuticos para o tratamento de câncer

Os produtos naturais são fontes valiosas de compostos com atividades medicinais. Recentemente estes agentes dietéticos têm chamado à atenção tanto de cientistas como da população em geral devido as suas propriedades terapêuticas, principalmente, a de combate e prevenção de diversos tipos de câncer [42, 43].

Muitos compostos fitoquímicos naturais são pouco absorvidos pelo corpo humano devido a sua baixa solubilidade, por isso, a administração destes fitoquímicos bioativos requer o uso de um veículo que “carregue” uma quantidade efetiva destas espécies até um determinado alvo biológico [43, 44]. Os alvos destes compostos podem variar, como por exemplo: corrente sanguínea, órgãos, tecidos, células e etc. Dentre algumas estratégias para superar a instabilidade, baixa solubilidade ou elevar a biodisponibilidade destes nutraceuticos estão o aprisionamento, encapsulamento ou a adsorção destas espécies em materiais de escala nanométrica (ver Figura 5). O uso terapêutico da nanotecnologia, tipicamente, envolve o carregamento de pequenas moléculas, peptídeos, proteínas ou ácidos nucleicos até seus alvos biológicos, por intermédio de uma matriz polimérica, ou nanopartícula; este ramo da ciência tem revolucionado o tratamento de câncer e outras desordens inflamatórias [43-48].

Figura 5. Tamanho médio de algumas estruturas com escala convertida para nanômetros.



Vários sistemas de entrega de droga como lipossomos, micelas, emulsões, polímeros, nano e micropartículas têm mostrado resultados bastante promissores para o controle e tratamento do câncer. A preparação de nano e micropartículas de carbonato de cálcio tem sido tema de vários estudos devido a suas aplicações em biotecnologia, medicina, ciências de materiais, indústrias e etc [49-53].

1.8 Escopo da dissertação

Apesar de anos de estudos das propriedades terapêuticas do alho e seus compostos organossulfurados, apenas dois trabalhos apresentam informações de suas propriedades vibracionais (espectros IR e Raman) [54, 55]. Abbehausen e colaboradores publicaram exclusivamente o espectro infravermelho da alliina, na região de $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$, analisando apenas alguns modos vibracionais [54]. Xial e colaboradores forneceram ambos os espectros vibracionais, IR e Raman, nas regiões de $600 - 3600$ e $200 - 3200 \text{ cm}^{-1}$ respectivamente [55]. No trabalho de Xial e colaboradores, os principais picos de absorção foram atribuídos a prováveis modos vibracionais, porém nenhum dos autores das publicações envolvendo os compostos organossulfurados utilizou modelos teóricos para explicar suas propriedades estruturais ou vibracionais, sendo seus trabalhos fundamentados em conhecimentos acumulados de espectroscopia experimental.

O objetivo deste trabalho é realizar cálculos usando o formalismo da teoria do funcional da densidade (DFT), para explicar as propriedades estruturais, vibracionais e eletrônicas dos compostos organossulfurados presentes no alho. No capítulo 1 – Introdução, está apresentado um pouco do histórico do uso do alho, dos tempos antigos até a contemporaneidade. No capítulo 2 – Metodologia e simulações computacionais, estão apresentadas as técnicas metodológicas aplicadas neste trabalho. Nos capítulos 3 e 4, são apresentados os resultados obtidos das simulações computacionais das propriedades estruturais e vibracionais das moléculas de alliina e metiina, assim como aplicações destes resultados na identificação destes compostos em produtos comerciais. No capítulo 5 – Entrega por carbonato de cálcio, a interação entre o extrato de alho e as micropartículas de carbonato de cálcio é explicada por métodos clássicos e quânticos. Os resultados dos testes biológicos (citotoxicidade e concentração bactericida mínima) também são apresentados no final deste capítulo, provando o efeito sinérgico do extrato de alho e do carbonato de cálcio para entrega de drogas. O capítulo 6 descreve as principais conclusões deste trabalho. Dois apêndices encerram este trabalho: Apêndice A – Fundamentos Teóricos, onde constam resumidos os princípios teóricos fundamentais por trás das simulações realizadas, e Apêndice B – Artigo

Publicado, com o documento submetido a revista *Journal of Raman Spectroscopy* como parte da exigência para a conclusão do curso de Mestrado em Química da UFC.

2 METODOLOGIA E SIMULAÇÕES COMPUTACIONAIS

2.1 Propriedades estruturais

A identificação dos confôrmeros de menor energia das moléculas estudadas, na fase gasosa, com a aplicação do modelo de solvatação implícita PCM (*polarizable continuum model*), para correções dos efeitos do solvente, é de grande importância para o cálculo das propriedades estruturais, vibracionais e eletrônicas. Por se tratar de um sistema aquoso, também se faz necessário o conhecimento dos possíveis estados de protonação da espécie em função do pH do meio, pois pode existir uma diferença na distribuição de carga nas espécies, ocasionada pela troca de prótons com as moléculas de solvente, que podem ocasionar erros nos cálculos das propriedades caso negligenciadas.

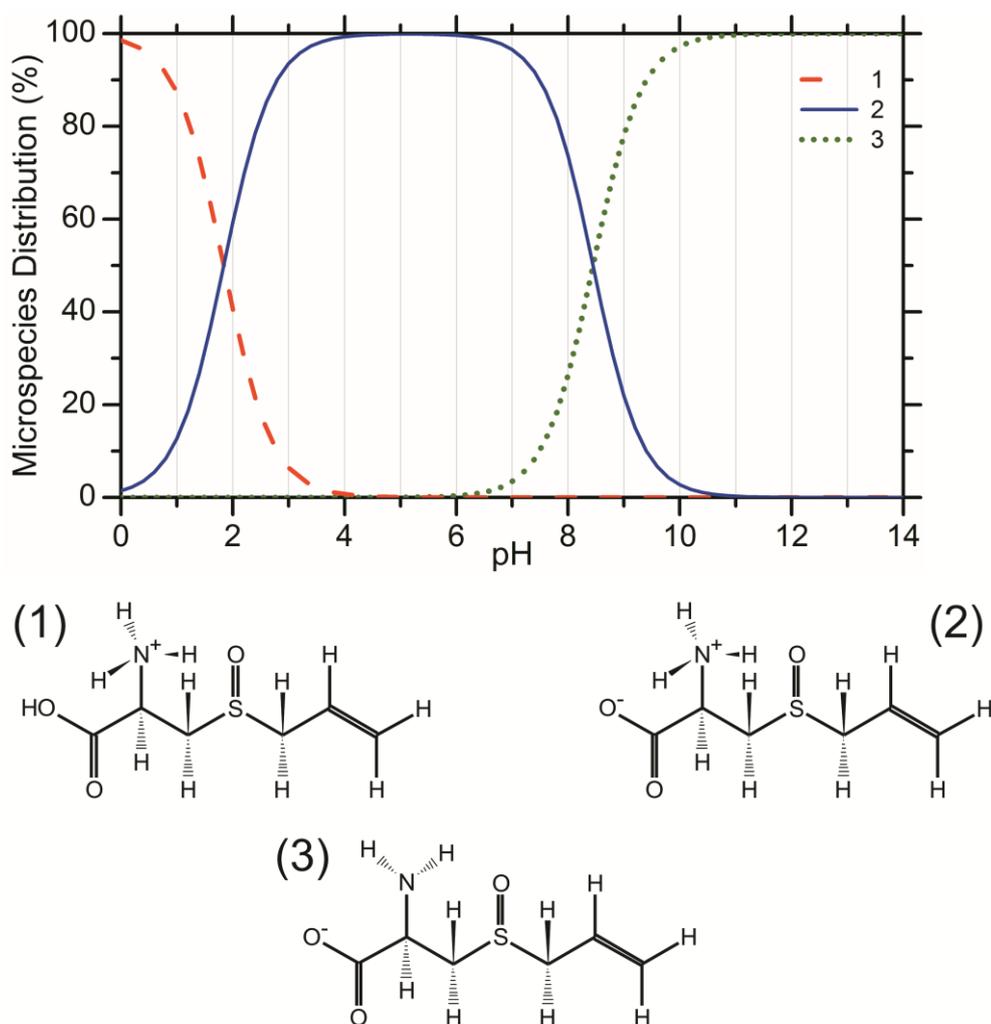
2.1.1 Estado de protonação

As moléculas de aliina e metiina por serem derivadas do aminoácido cisteína, possuem uma distribuição de espécies semelhante à deste aminoácido. Estes compostos possuem dois grupos funcionais, um carboxílico e um amino, que são capazes de trocar prótons com a água, portanto, para esta molécula, existem três possíveis estados de protonação em meio aquoso. A Figura 6 mostra a distribuição das espécies para a molécula de aliina no intervalo de pH de 0 a 14.

O software Marvin Sketch, empregado nesta etapa, calcula a distribuição de estruturas ao longo do pH a partir dos respectivos valores de pK_A , obtidos por um banco de dados próprio, com base na fórmula estrutural plana das moléculas. A variação de pK_A considerada foi de -10 a 20 e a faixa de pH de 0 a 14, considerando a temperatura de 298.15 K. Não foi utilizado nenhum dado experimental e não se verificou a ocorrência de tautômeros. Das três estruturas existentes em equilíbrio, a estrutura zwitteriônica das duas moléculas, foram utilizadas para os cálculos das propriedades estruturais e vibracionais, devido à sua predominância na faixa de pH do extrato utilizado (levemente ácido). O valor de pK_A do grupo carboxila e amino da

molécula de aliina são 1.84 e 8.45 respectivamente. Estas constantes são utilizadas na construção da curva de protonação desta molécula.

Figura 6. Distribuição das estruturas de protonação da molécula de Aliina em função do pH, na faixa de 0 – 14, com três possíveis estruturas: (1) protonada predominando de 0 – 2, (2) zwitteriônica predominado de 3 – 8 e (3) desprotonada predominado de 9 – 14.



2.1.2 Estudo dos confôrmeros

Após o estudo da estrutura predominante no pH levemente ácido, a etapa seguinte constituiu em um *scan* (varredura), com a utilização do software Gaussian 09. Nesta etapa um diedro foi selecionado para uma rotação de 11 ângulos de 30° totalizando uma varredura de 360°, gerando 12 estruturas. A estrutura de menor energia e as estruturas que tiveram energias relativas inferiores a kT , foram então estabilizada com o funcional M06-2X da teoria do funcional da densidade, com o

conjunto de funções de base gaussianas 6-311, duas funções difusas, as funções de polarização de orbitais d e p (6-311++G(d,p)) e o modelo de polarização contínua (PCM), utilizando a constante dielétrica da água.

Para os cálculos de otimização de geometria apresentados no capítulo 5, devido ao elevado número de átomos do sistema, os funcionais puros GGA (*Generalized Gradient Approximation*) em sua formulação PBE (*Perdew – Burke – Ernzerhof*), e LDA na sua formulação PWC (*Perdew and Wang*), foram utilizados com o conjunto de base numérica DNP, no software Dmol3, disponível na suíte *Materials Studio*.

2.2 Propriedades vibracionais

O cálculo dos modos vibracionais, apresentados nos capítulos 3 e 4, foram realizados com as estrutura estabilizadas dos confôrmeros de menor energia obtidos pelo *scan*, usando o funcional de Minnessota, M06-2X e o conjunto de bases 6-311 ++ G (d,p), junto com o modelo PCM para a correção dos efeitos do solvente. A ausência de frequências negativas foi usada como critério na avaliação da qualidade de convergência do confôrmero estudado. A interpretação dos espectros teóricos foi feita com o auxílio do visualizador do programa Gaussian 09, que mostra os vetores de deslocamento dos átomos participantes nos modos vibracionais, e também com o programa VEDA4, que faz uma análise da distribuição de energia potencial (PED).

Para o cálculo das propriedades vibracionais apresentados no capítulo 5, devido ao elevado número de átomos do sistema, uma estrutura de menor energia, gerada por um cálculo de mecânica molecular foi escolhida para otimização. A partir desta estrutura, as propriedades vibracionais foram calculadas com os funcionais puros GGA em sua formulação PBE, e LDA na sua formulação PWC, utilizando o conjunto de base numérica DNP, no software Dmol3. A análise das frequências teóricas e experimentais foi feita por meio da comparação visual entre os dois espectros, atribuindo aos modos experimentais, prováveis modos teóricos.

2.3 Dinâmica Molecular

As simulações da adsorção da molécula de alliina na superfície da nanopartícula de carbonato de cálcio foram realizadas por cálculos de dinâmica molecular clássica. Primeiramente o sistema (alliina e nanopartícula de carbonato de cálcio) foi otimizado usando o campo de força clássico Universal (UFF). A estrutura resultante foi submetida a um cálculo de *annealing* clássico usando o software Forcite da suíte *Materials Studio*. Cada ciclo de *annealing* foi programado com uma temperatura mínima de 200 K e máxima de 300 K com 50 rampas de aquecimento e 100 passos de 1 fs por rampa. Para este cálculo, o conjunto foi considerado como canônico (NVT) onde as variáveis: quantidade de massa (N), volume (V) e temperatura (T) são conservadas. O controle da temperatura foi feito com um termostato do tipo *nosé*. Algumas estruturas obtidas por este procedimento foram selecionadas como *inputs* para os cálculos de potencial de adsorção. A energia de adsorção da molécula de alliina sob a superfície da nanopartícula de carbonato de cálcio foi definida como a diferença de energia entre o sistema total (Alliina mais nanopartícula) e a energia de cada componente calculada separadamente. Um perfil de energia de adsorção (distância versus energia potencial) foi avaliado para as estruturas selecionadas.

Para avaliar as camadas de solvatação existentes no sistema nanopartícula – alliina, foram realizados cálculos de dinâmica molecular de uma única nanopartícula de carbonato de cálcio inserida em uma caixa quadrada com 60 Å de largura interagindo com 40 moléculas de Alliina. A densidade do sistema foi aproximada pela densidade da água a temperatura ambiente (aproximadamente 1 g/cm³). O conjunto foi tratado como isotérmico – isobárico (NPT), com um controle de temperatura do tipo *nosé* e um controle de pressão do tipo *berendsen*. As interações de longo alcance foram tratadas usando uma malha de partícula do tipo *Ewald*.

2.4 Método de extração dos compostos organossulfurados

Dentes de alho descascados foram congelados em nitrogênio líquido e em seguida macerados utilizando gral e pistilo. Do pó resultante foi retirada alíquota de

10 g, a este foi adicionada 200 mL de solução aquosa 0.1 M de HCl feita a partir de água tipo 1 e ácido clorídrico P.A. A mistura foi mantida sobre agitação em frasco de erlenmeyer, utilizando mesa agitadora a 100 rpm, por um período de 1 h, a temperatura ambiente. O extrato resultante foi centrifugado a 9000 rpm, com 20 °C por 10 minutos, em seguida, o sobrenadante foi filtrado em papel filtro e congelado em balão de liofilização. Após o congelamento em banho de álcool o extrato foi liofilizado. O pó de extrato aquoso de alho liofilizado foi utilizado para os testes biológicos e modificação de micropartículas de carbonato de cálcio.

2.5 Síntese das micropartículas

Para a síntese das micropartículas, duas soluções foram preparadas: a primeira composta de 147 mg de cloreto de cálcio dissolvidos em 40 mL de água destilada e a segunda foi composta de 200 mg de CTAB (Brometo de Cetrimônio) dissolvidos em 20 mL de água destilada. As duas soluções foram então misturadas a 50 °C sob agitação constante por 4 horas, dando origem a uma emulsão. Uma terceira solução, composta de 100 mg de carbonato de sódio dissolvidos em 100 mL de água destilada, foi gotejada lentamente sobre a emulsão, formada pelas duas soluções iniciais, a temperatura ambiente e agitação de 350 rpm. Após o término do gotejamento, a solução permaneceu em agitação durante 1 hora e em seguida foi filtrada ou centrifugada, para a separação das micropartículas.

2.6 Medidas espectroscópicas e microscópicas

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro Perkin – Elmer na região de 400 – 4000 cm^{-1} com 2 cm^{-1} de resolução. O espectro Raman foi obtido em espectrômetro da marca Bruker Vertex 70 com módulo RAM II, equipado com microscópio Olympus, usando laser de Nd - YAG (1064 nm), e mesma resolução do espectrofotômetro Infravermelho. Para as fotos das micropartículas, foi utilizado um microscópio de varredura FEQ Quanta 450 ambiental com EDS/EBSD, estágio de resfriamento e aquecimento

2.7 Testes de citotoxicidade

Os testes de citotoxicidade foram realizados com as linhagens tumorais: HCT-116 (Colorretal Humano), Ovcar-8 (Ovário Humano) e SF-295 (Glioblastoma Humano), que foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA), tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂. As amostras foram diluídas em DMSO P.A. estéril e as substâncias foram testadas na concentração de 50 µg/mL, pelo método MTT.

Análise de citotoxicidade pelo método do MTT vem sendo utilizada no programa de *screening* do *National Cancer Institute* dos Estados Unidos (NCI), que testa mais de 10.000 amostras a cada ano [56]. É um método rápido, sensível e barato. Foi descrita primeiramente por Mosman [57], tendo a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazólio (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação [58].

As linhagens celulares utilizadas foram plaqueadas nas concentrações de 0.7 x 10⁵ céls/mL (HCT-116), 0,1 x 10⁶ céls/mL (OVCAR-8) e 0,1 x 10⁶ células/mL (SF-295). As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5 % de CO₂ a 37 °C. Ao término deste, as mesmas foram centrifugadas e o sobrenadante foi removido. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução de MTT (sal de tetrazólio), e as placas foram incubadas por 3 horas. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 150 µL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595 nm.

Os experimentos foram analisados segundo a média ± desvio padrão da média (DPM) da porcentagem de inibição do crescimento celular, usando o programa GraphPad Prism. Cada amostra foi testada em triplicata em dois experimentos independentes. Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas: amostras sem atividade (SA), com pouca atividade (PA, inibição de crescimento celular variando de 1 a 50%), com atividade

moderada (MO, inibição de crescimento celular variando de 50 a 75%) e com muita atividade (MA, inibição de crescimento variando de 75 a 100%).

2.8 Testes de concentração inibitória e bactericida mínima

Os micro-organismos utilizados neste estudo foram as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228; e as bactérias Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e *Escherichia coli* ATCC 11303.

A partir de uma cultura estoque mantida em caldo de Triptona de Soja (TSB) contendo 20% de glicerol à -80 °C, as bactérias foram cultivadas em Agar Triptona de Soja (TSA) e incubadas a 37 °C durante 24 horas. Após o crescimento, cerca de cinco colônias isoladas foram removidas e inoculadas em 5 mL de caldo de Triptona de Soja (TSB) e incubadas durante 18 horas a 37 °C sob agitação constante. Previamente a realização dos ensaios, as células foram centrifugadas a 5000 rpm durante 5 minutos a 4 °C e lavadas com NaCl 150 mM estéril. Em seguida, a concentração final da suspensão de bactérias foi ajustada para 1×10^6 células/mL em TSB através de curvas de calibração previamente determinadas para cada bactéria.

A concentração inibitória e bactericida mínima (CIM e CBM) para cada uma das amostras foi determinada pelo método de microdiluição em placas de poliestireno de 96 poços. As amostras foram diluídas em TSB contendo 4% de dimetilsulfóxido (DMSO, v/v) em concentrações que variaram de 3.9 a 500 µg/mL e incubados juntamente com os micro-organismos previamente ajustados a 1×10^6 células/mL. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 horas a 120 rpm. Passado esse tempo, as placas foram analisadas visualmente e a CIM foi considerada como a menor concentração das amostras que inibiu completamente o crescimento visível das bactérias. Para confirmação dos resultados de CIM, a densidade óptica de cada poço foi mensurada a 640 nm (OD₆₄₀) usando uma leitora de microplacas automática (SpectraMax I3). Para determinar a CBM, uma alíquota de 10µL de cada um dos poços que apresentaram CIM foi retirada e esse volume foi inoculado em placas de petri contendo meio TSA. As placas foram então

incubadas a 37 °C por 24 horas e foi considerado CBM a menor concentração capaz de inibir completamente o crescimento microbiano nas placas.

3 A MOLÉCULA DE ALLIINA

3.1 Propriedades Estruturais

O conhecimento do confômero de menor energia é crucial para o estudo teórico de uma molécula, pois muitas de suas propriedades físicas e químicas estão associadas ao arranjo espacial dos seus átomos. Até o presente momento, não existe nenhum dado cristalográfico da estrutura da molécula de Alliina, então para entendermos as preferências conformacionais da Alliina, uma cálculo de *scan* foi realizado. O cálculo do *scan* consiste em gerar uma superfície de energia potencial na molécula (SEP) a partir de uma equação que relaciona a energia potencial e a superfície geométrica. Esta função é então diferenciada em relação às coordenadas cartesianas para que possa ser analisada sua variação em relação à rotação do diedro selecionado. No caso da Aliina, o diedro selecionado para a rotação foi o H10C9C12H13, mostrado na Figura 7(a).

A realização do *scan* nesta molécula é importante, pois existe a possibilidade da formação de ligações de hidrogênio intramoleculares. A varredura do diedro selecionado nos permite avaliar a formação destas interações. Como resultado pode-se observar que as estruturas de maiores energia têm apenas a ligação H19O22 estabelecida, e o grupo amino está afastado do grupo sulfóxido impedindo qualquer tipo de interação. À medida que o hidrogênio H20 se aproxima do átomo de oxigênio O16 do grupo sulfóxido, nas primeiras seis estruturas, a ligação de hidrogênio H2O16 é estabelecida, contribuindo para a formação de um mínimo de energia. Duas estruturas estáveis foram encontradas, ambas possuem as duas ligações de hidrogênio estabelecidas, H19O22 e H2O16, com comprimentos 1.955 e 1723 Å para o confômero 1 e 2.036 e 1.818 Å para o confômero 2. Na Tabela 3 constam informações estruturais destes dois confômeros.

A energia das demais estruturas obtidas foi normalizada pelo valor de energia da estrutura mais estável (de menor energia). A diferença de energia entre os dois confômero, mostrados na Figura 7 (2) e (3) é de apenas 0.165 kcal/mol.

Figura 7: (1) Fórmula estrutural plana da Alliina com a numeração dos átomos, (2) confômero de menor energia encontrado, (3) segundo confômero estável da molécula de Alliina, com + 0.164 kcal/mol de energia. As ligações de hidrogênio estão mostradas em Å.

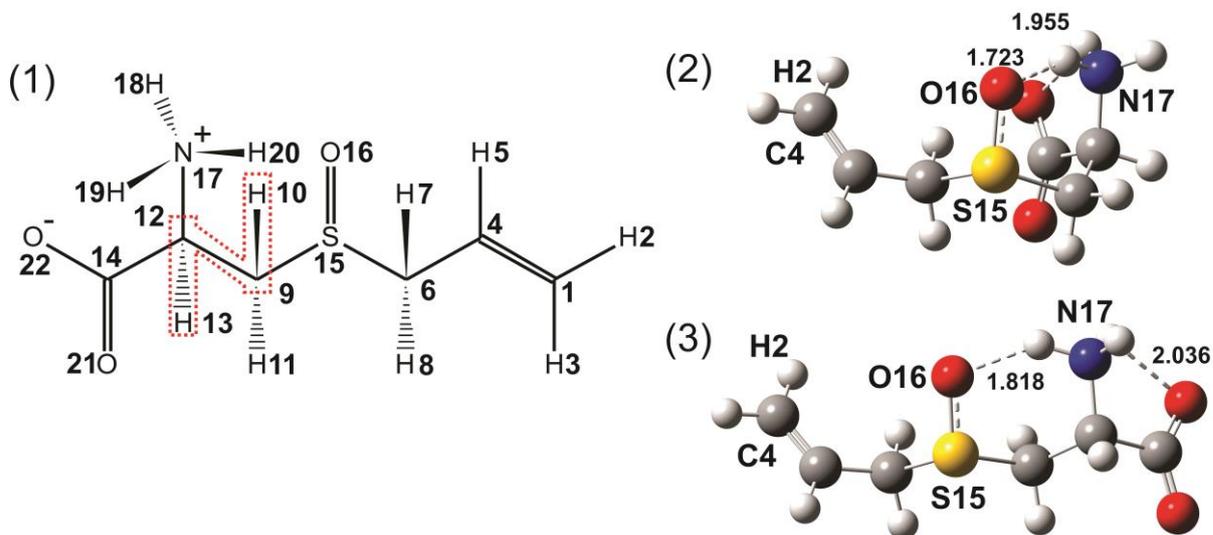


Table 3. Parâmetros estruturais calculados para os confômero da molécula de Alliina, comprimentos e ângulos de ligações estão mostrados em angstroms e graus respectivamente.

Atoms	Bound lenght		Atoms	Bound angle	
	Conformer 1	Conformer 2		Conformer 1	Conformer 2
C1H3	1.0853	1.0851	H2C1H3	117.48	117.48
C1H2	1.0833	1.0833	H2C1C4	121.24	121.19
C1C4	1.3285	1.3284	C1C4H5	120.45	120.47
C4H5	1.0862	1.0861	H5C4C6	116.64	116.61
C4C6	1.4951	1.4940	C4C6H8	112.88	112.30
C6H7	1.0911	1.0917	H8C6S15	106.16	105.63
C6H8	1.0917	1.0927	C6S15C9	101.57	97.34
C6S15	1.8308	1.8294	O16S15C9	104.54	103.42
S15O16	1.5415	1.5367	H11C9C12	111.30	108.91
S15C9	1.8261	1.8234	C9C12H13	107.36	111.21
C9H10	1.0901	1.0937	C13C12N17	107.48	108.40
C9H11	1.0910	1.0902	N17C12C14	108.31	108.15
C9C12	1.5226	1.5226	O22C14O21	129.96	103.31
C12H13	1.0913	1.0893			
C12C14	1.5627	1.5652			
C12N17	1.4979	1.4975			
N17H18	1.0189	1.0204			
N17H19	1.0322	1.0298			
N17H20	1.0462	1.0380			
C14O21	1.2377	1.2378			
C14O22	1.2489	1.2469			

3.2 Propriedades vibracionais

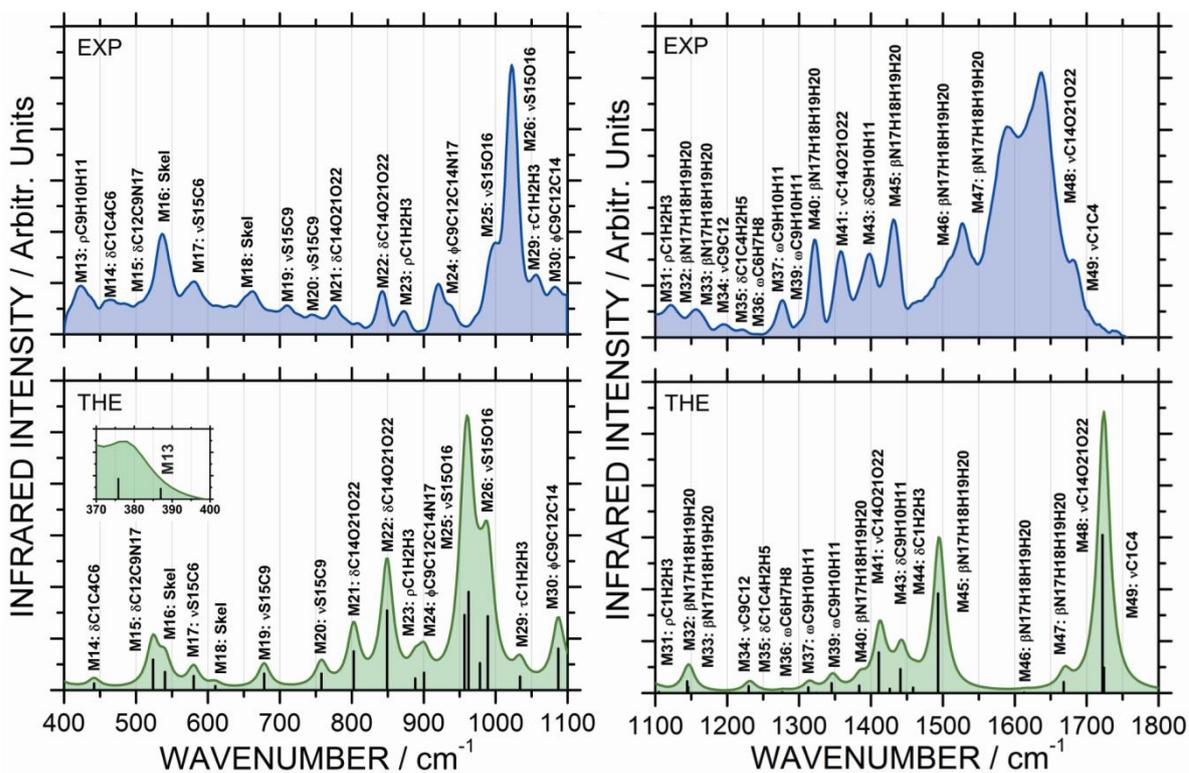
3.2.1 Espectro na Região do Infravermelho

A molécula allina, por ser derivada do aminoácido cisteína, possui bandas características de um aminoácido em seu espectro infravermelho, como mostra a Figura 8. Os *stretchings* simétrico e assimétrico do grupo carboxila são observados em 1356 e 1637 cm^{-1} , que podem ser aproximados pelos modos vibracionais teóricos M41 (1412 cm^{-1} , +2 cm^{-1} erro) e M48 (1723 cm^{-1} , +86 cm^{-1} erro) respectivamente. Os picos de absorção do grupo amina são observados em 4 números de onda: 1357, 1430, 1519 e 1592 cm^{-1} que podem ser aproximados por M40 (1385 cm^{-1} , +28 cm^{-1} erro), M45 (1494 cm^{-1} , +64 cm^{-1} erro), M46 (1614 cm^{-1} , +95 cm^{-1} erro) e M47 (1669 cm^{-1} , +77 cm^{-1} erro). Os demais modos da região de altos números de onda aparecem com baixas intensidades e envolvem vibrações da cadeia carbônica. Os as absorções em 1397, 1318 e 1294, aproximadas pelos modos M43 (1442 cm^{-1} , +45 cm^{-1} erro), M39 (1346 cm^{-1} , +28 cm^{-1} erro) e M37 (1314 cm^{-1} , +20 cm^{-1} erro) envolvem respectivamente vibrações do tipo *angular deformation* e duas vibrações do tipo *wagging*.

Na região de baixos números de onda, 400 – 1100 cm^{-1} , existe uma grande banda de absorção devido à vibração do grupo sulfóxido, também presente em todos os outros compostos organossulfurados análogos a allina, na região de 1018 e 989 cm^{-1} , associados aos modos teóricos M26 (962 cm^{-1} , -56 cm^{-1} erro) e M25 (989 cm^{-1} , -33 cm^{-1} erro) que tem a vibração ν_{S15O16} com maior contribuição para a energia potencial. As absorções em menores números de onda possuem baixas intensidades, as absorções observadas em 421, 462, 521 e 544 são atribuídas aos modos teóricos M13 (378 cm^{-1} , -43 cm^{-1} erro), M14 (441 cm^{-1} , -21 cm^{-1} erro), M15 (523 cm^{-1} , +2 cm^{-1} erro) e M16 (540 cm^{-1} , -4 cm^{-1} erro). Os *stretchings* do átomo de enxofre e os átomos de carbono diretamente ligados a ele são observados em três modos: M17, M19 e M20, com números de onda experimentais: 584, 701 e 746 cm^{-1} respectivamente. Os modos M17 e M20 são *stretchings* do átomo de enxofre e o carbono C6 enquanto que o modo M19 é um *stretching* do átomo de enxofre e o carbono C9.

Os elevados desvios observados em alguns números de onda em relação aos números de ondas teóricos, principalmente em modos vibracionais que envolvem átomos que participam de ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares, ocorrem devido ao modelo em fase gás utilizado que não leva em conta estas interações e nem tão pouco a presença física do solvente que diretamente altera as constantes de força e massa no cálculo do oscilador harmônico.

Figura 8: Espectro na região do Infravermelho experimental (EXP) e teórico (THE) da molécula de Alliina na região de 400 – 1800 cm^{-1} . Os símbolos ρ , β , ν , ω , δ e ϕ descrevem as vibrações *rocking*, *bending*, *stretching*, *wagging*, *angular deformation* e *out of plane deformation* nesta respectiva ordem.



Os dados espectroscópicos publicados no trabalho pioneiro de Xial *et al.* possuem várias discrepâncias em relação aos dados medidos neste trabalho devido possivelmente a uma maior quantidade de água na amostra ou pureza inferior. Os maiores desvios observados foram nos modos $\nu_{\text{C14O21O22}}$ (-20 cm^{-1} experimental, -106 cm^{-1} teórico), $\delta_{\text{C14O21O22}}$ (-103 cm^{-1} experimental, -105 cm^{-1} teórico) e ν_{S15O16} (-30 cm^{-1} experimental, $+86 \text{ cm}^{-1}$ teórico). A Tabela 4 contém a atribuição completa dos modos vibracionais dos espectros Infravermelho e Raman

experimentais e suas correspondências com os modos teóricos calculados na faixa estudada. Como não podemos confiar cegamente nas atribuições do software veda, a Figura 9 ilustra alguns dos principais modos que compõem a assinatura molecular da Alliina, para inspeção visual.

Tabela 4. Números de onda calculados para molécula de Alliina, ω em cm^{-1} , com seus respectivos números de onda experimentais correlacionados. Os desvios de cada modo teórico, Δ em cm^{-1} e % também são mostrados.

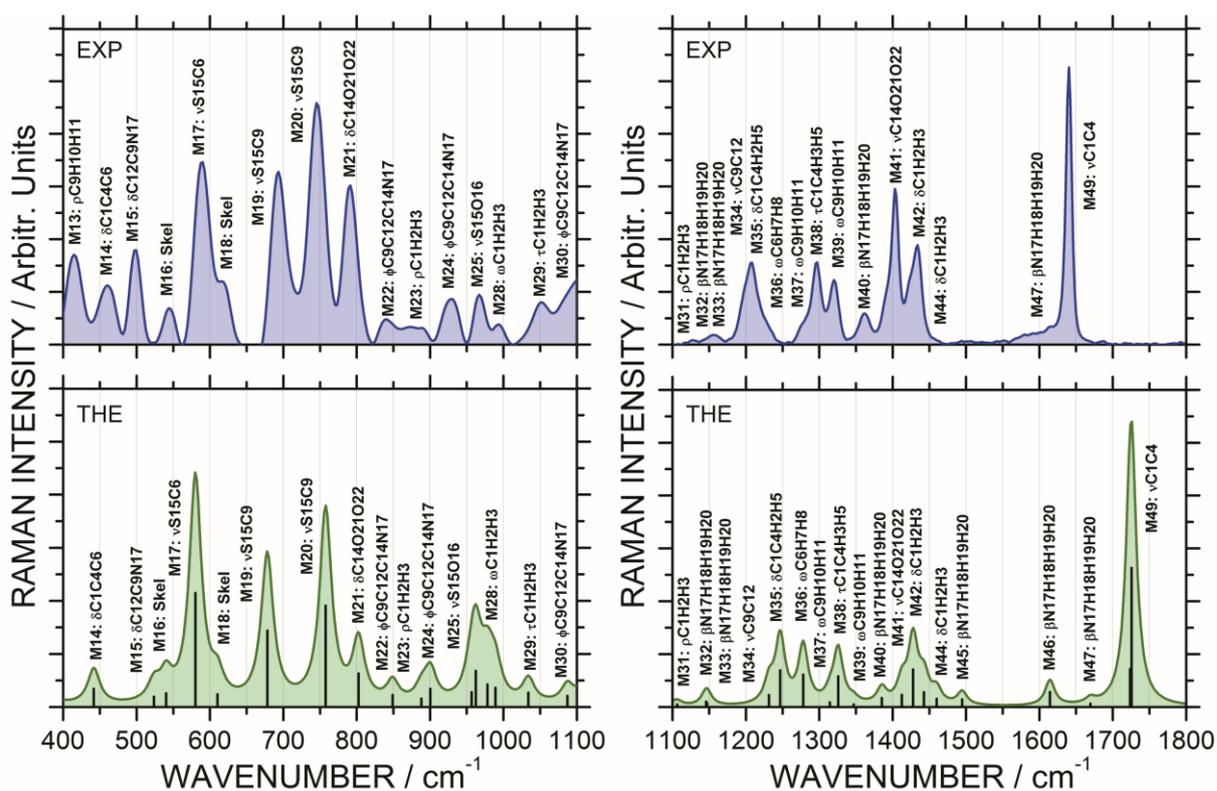
Mode	ω_{THE}	Experimental		Δ_{IR} (%)	Δ_{Raman} (%)	Mode Assignment (PED%)
		IR	Raman			
M13	378	421	416	-43 (10.2)	-38 (9.1)	$\rho\text{C9H10H11}(38)$, $\beta\text{N17H18H19H20}(15)$
M14	441	462	460	-21 (4.5)	-19 (4.1)	$\delta\text{C1C4C6}(74)$
M15	523	521	503	+2 (0.3)	+20 (3.9)	$\rho\text{C9H10H11}(10)$, $\delta\text{C12C9N17}(60)$
M16	540	544	542	-4 (0.7)	-2 (0.3)	Skel
M17	580	584	588	-4 (0.7)	-8 (1.3)	$\nu\text{S15C6}(42)$, $\phi\text{C1C4C6}(26)$
M18	610	613	619	-3 (0.4)	-9 (1.4)	Skel
M19	678	701	693	-23 (3.2)	-15 (2.1)	$\nu\text{S15C9}(63)$
M20	757	746	744	+11 (1.4)	+13 (1.7)	$\nu\text{S15C6}(25)$, $\tau\text{C1H2H3}(24)$
M21	802	786	790	+16 (2.0)	+12 (1.5)	$\delta\text{C14O21O22}(37)$,
M22	849	841	840	+8 (0.9)	+9 (1.0)	$\delta\text{C14O21O22}(40)$, $\rho\text{C9H10H11}(13)$
M23	888	872	873	+16 (1.8)	+15 (1.7)	$\rho\text{C1H2H3}(68)$, $\rho\text{C6H7H8}(13)$, $\rho\text{C9H10H11}(10)$
M24	900	930	930	-30 (3.2)	-30 (3.2)	$\phi\text{C9C12C14N17}(33)$
M25	956	989	972	-33 (3.3)	-16 (1.6)	$\nu\text{S15O16}(33)$, $\rho\text{C1H2H3}(11)$, $\rho\text{C9H10H11}(10)$
M26	962	1018	---	-56 (5.5)	---	$\nu\text{S15O16}(63)$, $\rho\text{C1H2H3}(20)$
M27	978	1039	---	-61 (5.8)	---	Skel
M28	989	---	989	---	0	$\omega\text{C1H2H3}(96)$
M29	1033	1054	1054	-21 (1.9)	-21 (1.9)	$\tau\text{C1H2H3}(92)$
M30	1087	1084	1100	+3 (0.2)	-13 (1.1)	$\phi\text{C9C12C14}(52)$
M31	1106	1118	1124	-12 (1.0)	-18 (1.6)	$\rho\text{C1H2H3}(40)$, $\tau\text{C6H7H8}(41)$
M32	1145	1146	1147	-1 (0)	-2 (1.0)	$\beta\text{N17H18H19H20}(69)$
M33	1147	1156	1157	-9 (0.7)	-10 (0.8)	$\nu\text{C9C12}(14)$, $\beta\text{N17H18H19H20}(48)$
M34	1231	1194	1196	+37 (3.0)	+35 (2.9)	$\nu\text{C9C12}(14)$, $\tau\text{C9H10H11}(15)$
M35	1246	1214	1207	32 (2.6)	+39 (3.2)	$\tau\text{C7H7H8}(15)$, $\tau\text{C9H10H11}(10)$, $\delta\text{C1C4H2H5}(67)$
M36	1278	1272	1277	+6 (0.4)	+1 (0)	$\omega\text{C6H7H8}(76)$, $\rho\text{C1H2H3}(10)$, $\tau\text{C9H10H11}(10)$
M37	1314	1294	1291	+20 (1.5)	+23 (1.7)	$\omega\text{C9H10H11}(37)$, $\beta\text{N17H18H19H20}(20)$
M38	1325	---	1297	---	+28 (2.1)	$\tau\text{C1C4H3H5}(88)$, $\omega\text{C6H7H8}(10)$
M39	1346	1318	1316	+28 (2.1)	+30 (2.2)	$\omega\text{C9H10H11}(49)$
M40	1385	1357	1361	+28 (2.0)	+24 (1.7)	$\beta\text{N17H18H19H20}(43)$
M41	1412	1390	1404	+2 (1.5)	+8 (0.5)	$\nu\text{S14O21O22}(70)$, $\delta\text{C9H10H11}(10)$
M42	1427	---	1429	---	-2 (0.1)	$\delta\text{C1H2H3}(89)$, $\delta\text{C9H10H11}(10)$
M43	1442	1397	---	+45 (3.2)	---	$\delta\text{C9H10H11}(84)$
M44	1460	---	1453	---	+7 (0.4)	$\delta\text{C1H2H3}(89)$, $\delta\text{C9H10H11}(10)$
M45	1494	1430	---	+64 (4.4)	---	$\beta\text{S17H18H19H20}(77)$
M46	1614	1519	---	+95 (6.2)	---	$\beta\text{A17H18H19H20}(87)$
M47	1669	1592	1593	+77 (4.8)	+76 (4.7)	$\beta\text{A17H18H19H20}(98)$
M48	1723	1637	---	+86 (5.2)	---	$\nu\text{C1C4}(16)$, $\nu\text{A14O21O22}(82)$
M49	1725	1645	1643	+70 (4.8)	+82 (4.9)	$\nu\text{C1C4}(70)$, $\nu\text{A14O21O22}(10)$

The symbols: ν , δ , ϕ , τ , ρ , ω and β stand for stretching, in-plane angular deformation, out-of-plane deformation, twisting, rocking, wagging and bending modes in this respective order, subscripts A and S stand for symmetric and asymmetric respectively and the term skel is assign to a vibration mode which the PED is distributed throughout the whole molecular skeleton.

3.2.2 Espectro Raman

O espectro Raman, mostrado na Figura 9, revela informações importantes sobre a cadeia carbônica dos compostos organossulfurados. Existe uma relação entre a estrutura dos compostos organossulfurados e sua atividade biológica. A presença do grupo alila terminal e o tamanho da cadeia de enxofre são dois fatores bastante conhecidos que descrevem a capacidade destas moléculas de inibirem o crescimento de células tumorais e também de as induzirem a uma morte programada (apoptose).

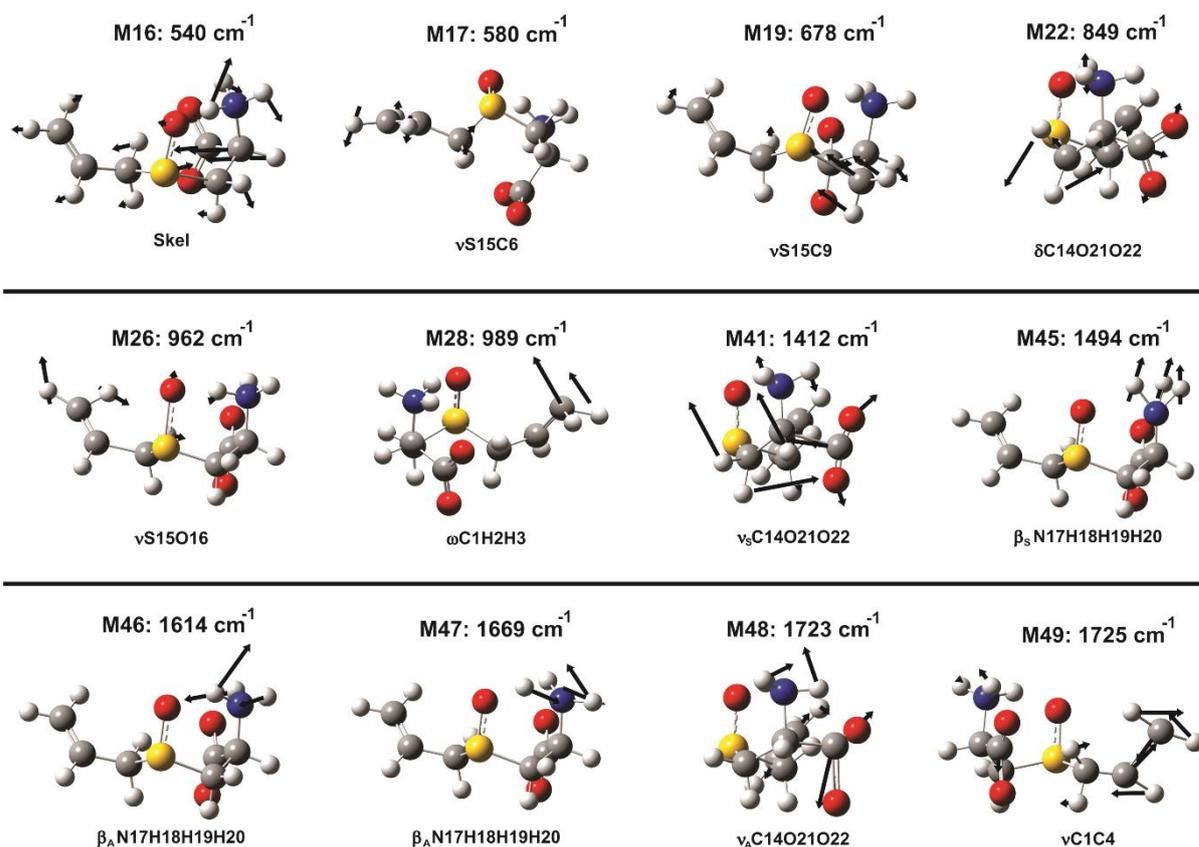
Figura 9: Espectro Raman experimental (EXP) e teórico (THE) da molécula de Alliina na região de 400 – 1800 cm^{-1} . Os símbolos ρ , β , ν , ω , δ e ϕ descrevem as vibrações *rocking*, *bending*, *stretching*, *wagging*, *angular deformation* e *out of plane deformation* nesta respectiva ordem.



O pico de absorção mais intenso no espectro Raman ocorre em 1643 cm^{-1} , correspondendo com o modo M49 (1725 cm^{-1} , +82 cm^{-1} erro). Esta vibração está associada ao *stretching* dos átomos de carbono C1 e C4 que compõem o grupo terminal alila. Outras vibrações associadas a este mesmo grupo ocorrem em menores intensidades nos números de ondas: 1453, 1429, 1297, 1124, 1054 e 989,

correspondendo aos modos teóricos M44 (1460 cm^{-1} , $+7\text{ cm}^{-1}$ erro), M42 (1427 cm^{-1} , -2 cm^{-1} erro), M38 (1325 cm^{-1} , $+28\text{ cm}^{-1}$), M31 (1106 cm^{-1} , -18 cm^{-1} erro), M29 (1033 cm^{-1} , -21 cm^{-1} erro) e M28 (989 cm^{-1}). Estas vibrações ocorrem na forma de *angular deformation* em altos números de onda, convertendo-se na forma de *twisting*, *wagging* e *rocking* à medida que o número de onda decresce. Os modos vibracionais característicos dos aminoácidos não são ativo no espectro Raman. As vibrações do grupo amina aparecem com baixíssimas intensidades se comparadas com as intensidades do infravermelho, porém o modo M41, correspondente ao stretching simétrico do ácido carboxílico, aparece com mais intensidade no espectro Raman.

Figura 10: Principais modos discutidos que compõem a assinatura molecular da Alliina.



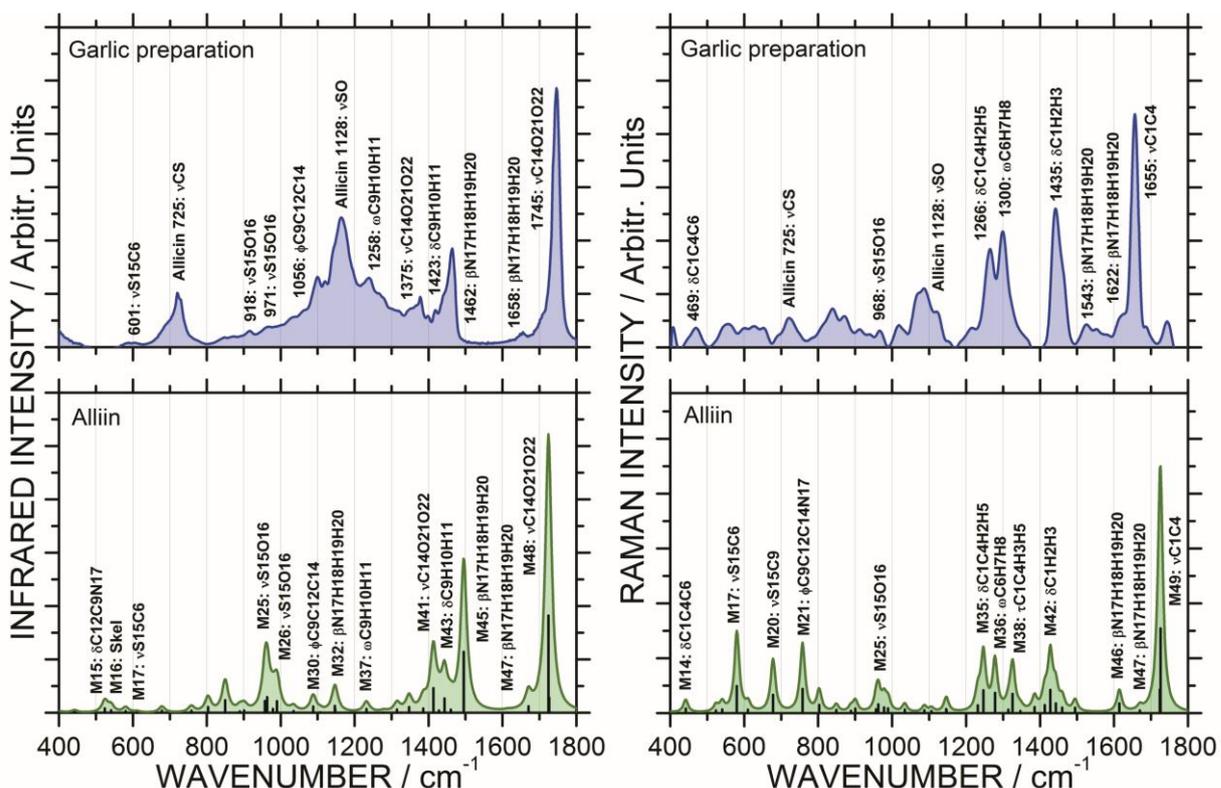
Em regiões de baixos números de onda, existem quatro picos de absorção com alta intensidade: 790 , 744 , 693 e 588 cm^{-1} estes modos podem ser atribuídos a M21 (802 cm^{-1} , $+12\text{ cm}^{-1}$ erro), M20 (757 cm^{-1} , $+13\text{ cm}^{-1}$ erro), M19 (678 cm^{-1} , -15 cm^{-1} erro) e M17 (580 cm^{-1} , -8 cm^{-1} erro). A primeira absorção refere-se à vibração $\delta\text{C14O21O22}$. As outras três vibrações observadas nesta região também aparecem

no espectro Infravermelho, porém com menor intensidade, e estão associadas aos *stretchings* do átomo de enxofre e seus dois átomos de carbono adjacentes.

3.3 Aplicação no controle de qualidade de suplementos alimentares

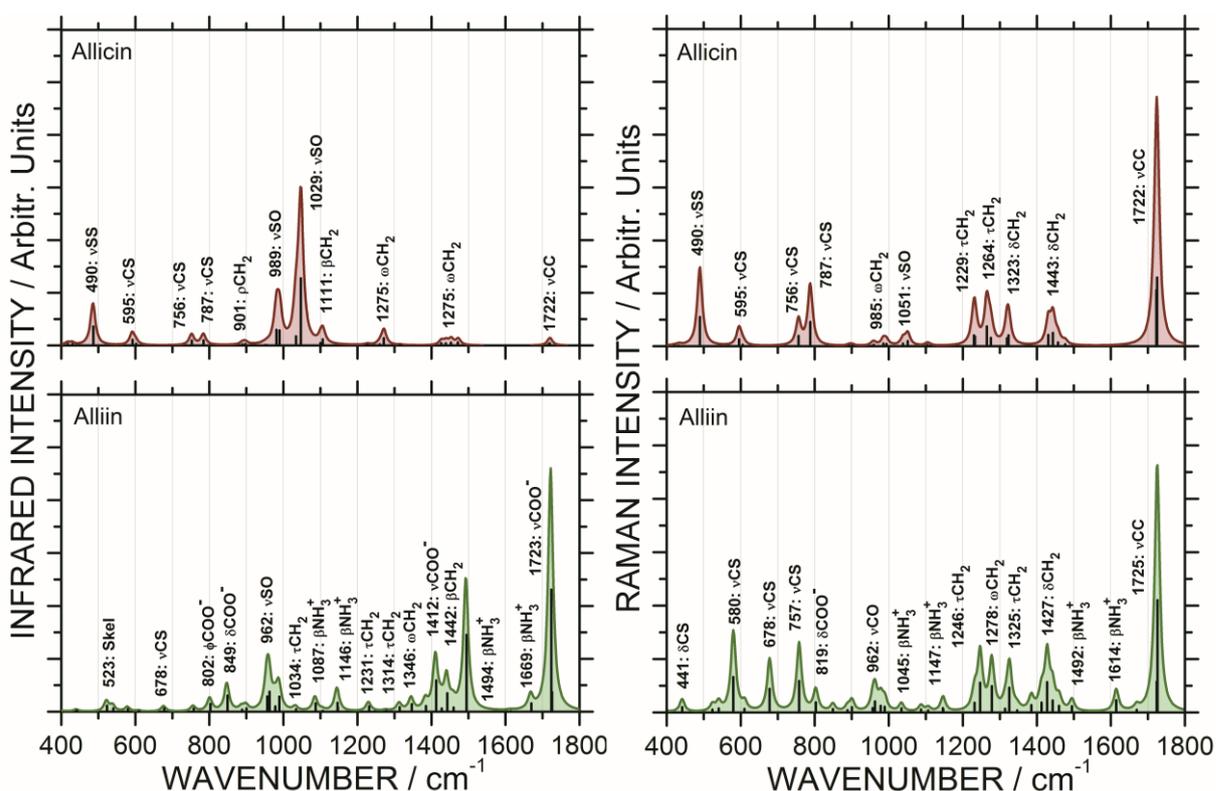
Existem disponíveis no mercado diversos suplementos alimentares a base de alho, as suas composições podem variar de acordo com o processo de manufatura, eles se dividem em quatro principais grupos: óleo essencial de alho, óleo de alho macerado, pó de alho e extrato de alho envelhecido. Para demonstrar a utilidade dos dados espectroscópicos discutidos na sessão anterior, o espectro Raman e Infravermelho de dois destes grupos foram medidos: pó de alho sem cheiro, mostrado na Figura 11, e óleo de alho (não apresentado nesta sessão). Os dois espectros obtidos foram comparados e não se observou nenhuma diferença entre eles.

Figura 11: Espectro na região do Infravermelho e Raman, experimentais do extrato de alho comercial e espectro teórico da molécula de Alliina, na região de 400 – 1800 cm^{-1} . Os símbolos ρ , β , ν , ω , δ e ϕ descrevem as vibrações *rocking*, *bending*, *stretching*, *wagging*, *angular deformation* e *out of plane deformation* nesta respectiva ordem.



O espectro Infravermelho do pó de alho sem cheiro revela doze importantes bandas de absorções. As bandas observadas em 1754, 1658 e 1462 cm^{-1} correspondem aos modos M48, M47 e M45 do espectro teórico da molécula de alliina. Estes três modos vibracionais, associados aos modos de vibração dos grupos amina e ácido carboxílico são totalmente ausentes no espectro da molécula de allicina. O espectro experimental da molécula de Allicina ainda não foi publicado, porém o seu espectro teórico está exposto na Figura 12. As bandas de absorção observadas em 1128 e 725 cm^{-1} , estão correlacionadas ao *stretching* do grupo tiosulfinato (tio éster) e ao *stretching* entre átomos de enxofre e carbono respectivamente, o que evidencia a presença das duas espécies no suplemento analisado.

Figura 12: Espectro na região do Infravermelho e Raman, teóricos das moléculas de Allicina e Alliina, na região de 400 – 1800 cm^{-1} . Os símbolos ρ , β , ν , ω , δ e ϕ descrevem as vibrações *rocking*, *bending*, *stretching*, *wagging*, *angular deformation* e *out of plane deformation* nesta respectiva ordem.



O espectro Raman não oferece nenhuma informação relevante sobre a assinatura molecular de cada composto ao ponto que se possam diferenciar os dois compostos, pois ambos apresentam espectro Raman muito semelhante. Porém a

intensa absorção observada em 1655 cm^{-1} , que é atribuída à vibração do grupo alila, presente em ambas as moléculas, está intimamente relacionada à atividade anticâncer dos compostos organossulfurados presentes no alho. Apoptose é um processo de morte celular programada que ajuda a manter o equilíbrio natural entre a morte celular e a produção de células novas, através da destruição de excesso células anormais ou comprometidas. Como dito anteriormente, as moléculas presentes nos suplementos à base de alho podem variar de acordo com o processo de manufatura e que a estrutura molecular dos compostos organossulfurados tem um importante impacto na sua atividade biológica. A presença do grupo alila nos compostos organossulfurados é um importante descritor das atividades de inibição de crescimento de células cancerígenas e potência de indução de apoptose. A metodologia de análise desenvolvida neste trabalho sugere que a presença e intensidade do modo vibracional observado em 1655 cm^{-1} , que está relacionado com o *stretching* entre os carbonos da dupla ligação no grupo alila, possa ser usado como um indicador de qualidade de qualquer suplemento a base de alho que prometa alguma atividade anticâncer.

4 A MOLÉCULA DE METIINA

4.1 Propriedades Estruturais

Apesar de não apresentar atividade anticâncer comprovada, devido principalmente à ausência do descritor alila em sua estrutura, a metiina apresenta atividade antioxidante apreciável, e serve como precursor dos tiosulfatos, com atividade anticancerígena comprovada, através da reação enzimática com a enzima aliinase.

Figura 13: (1) Fórmula estrutural plana da Metiina com a numeração dos átomos, (2) confômero de menor energia encontrado. As ligações de hidrogênio estão mostradas em Å.

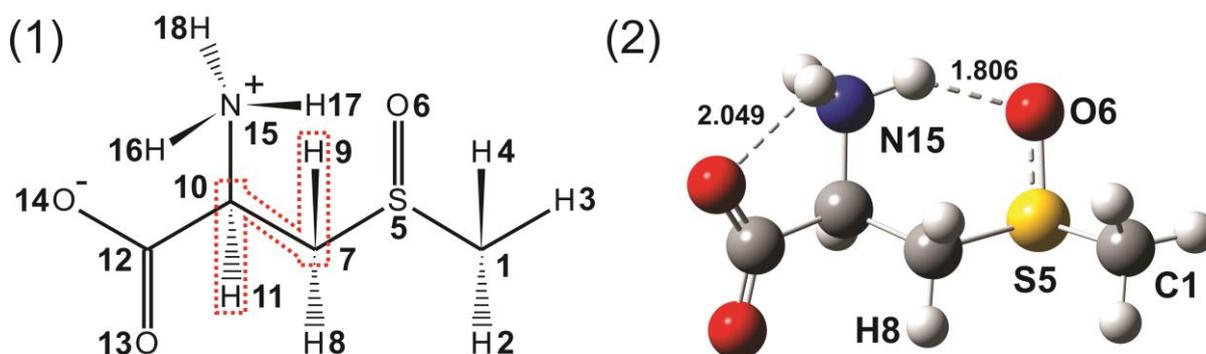


Tabela 5. Parâmetros estruturais calculados para o confômero da molécula de Metiina, comprimentos e ângulos de ligações estão mostrados em angstroms e graus respectivamente.

Atoms	Bound length	Atoms	Bound angle
C1H3	1.0882	H3C1H4	110.88
C1H2	1.0900	H2C1H4	111.58
C1H4	1.0895	C1S5O6	105.77
C1S5	1.8000	C1S5C7	97.60
S5O6	1.5391	C10C7S5	111.43
S5C7	1.8232	H8C6S15	106.16
C7H8	1.0903	N15C10C7	110.26
C7H9	1.0935	H16N15H18	106.76
C7H10	1.5220	H17N15H18	108.96
C10N15	1.4973	H16N15H17	113.09
N15H17	1.0389	C12O13O14	130.31
N15H16	1.0293		
N15H18	1.0203		
C10H11	1.0895		
C10C12	1.5647		
C12O13	1.2380		
C12O14	1.2469		

Assim como a molécula de aliina, até o presente momento, não existe nenhum dado cristalográfico da estrutura da molécula de metiina. Então, para entendermos as preferências conformacionais da metiina, um cálculo de *scan* foi

realizado através da rotação do diedro H9C7C10H11, gerando 12 estruturas ao longo de 360°. Para a molécula de metiina, apenas um confôrmero foi encontrado. O confôrmero possui duas ligações de hidrogênio intramoleculares, O14H16 medindo 2.049 Å e O6H17 medindo 1.806 Å. A Figura 13 mostra a estrutura plana e a estrutura convergida da molécula de Metiina, e a Tabela 5 contém informações de seus parâmetros estruturais.

4.2 Propriedades Vibracionais

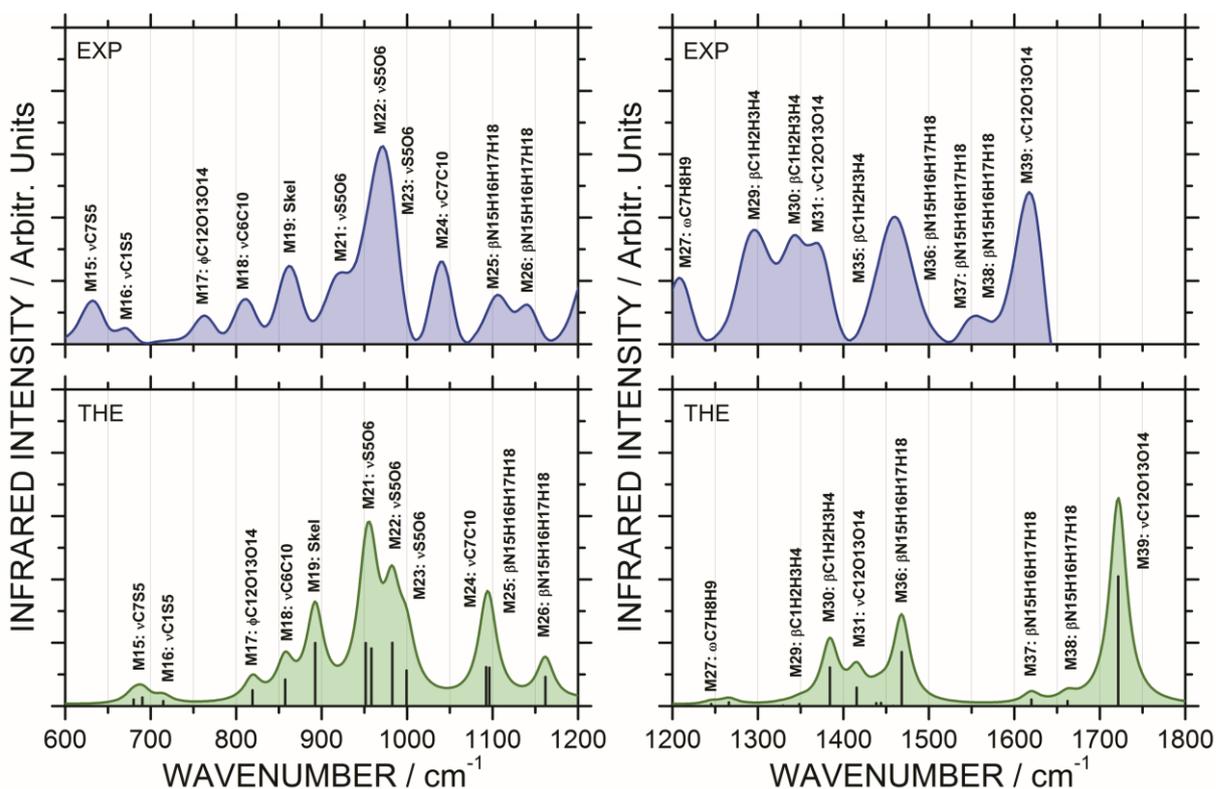
4.2.1 Espectro na Região do Infravermelho

A molécula de metiina, assim como a molécula de aliina, é um aminoácido não proteico derivado da cisteína (ou Metionina) e possui bandas características destes aminoácidos no espectro infravermelho, como mostra a Figura 14. Os dados experimentais apresentados nesta sessão foram retirados e adaptados do artigo de Xial e colaboradores [55].

Na região de altos números de onda, observamos um intenso sinal, aproximadamente em 1644 cm⁻¹, que é atribuído ao *stretching* assimétrico do grupo carboxílico, descrito pelo modo teórico M39 (1721 cm⁻¹, +77 cm⁻¹ erro). As vibrações do tipo *stretching* simétricos deste grupo ocorrem em menores números de onda, 1395 e 1423 cm⁻¹, sendo atribuídos aos modos M31 (1384 cm⁻¹, +14 cm⁻¹ erro) e M32 (1423 cm⁻¹, +8 cm⁻¹ erro). Os modos vibracionais do grupo amino, nesta região, são observados em três números de onda, sendo um *bending* assimétrico de alta intensidade, e dois *bendings* assimétricos de baixa intensidade. Estes picos de absorção foram identificados em 1568, 1551 e 1481, sendo aproximados pelos modos teóricos M38 (1662 cm⁻¹, +94 cm⁻¹ erro), M37 (1619 cm⁻¹, +68 cm⁻¹ erro), M36 (1468 cm⁻¹, +8 cm⁻¹ erro). Outras vibrações importantes foram detectadas em 1450, 1433, 1345, 1319, 1307 e 1233 e estão associados a vibrações da cadeia carbônica principalmente envolvendo o grupo terminal metila (C1H2H3H4), estes modos foram associados aos modos teóricos M35 (1458 cm⁻¹, +8 cm⁻¹ erro), M34 (1443 cm⁻¹), M30 (1348 cm⁻¹, +3 cm⁻¹ erro), M29 (1329 cm⁻¹, +10 cm⁻¹ erro), M28 (1266 cm⁻¹, -41 cm⁻¹ erro) e M27 (1245 cm⁻¹, +39 cm⁻¹ erro) nesta respectiva ordem.

Na região de baixos números de onda, a principal banda de absorção é formada pelas absorções em 971, 948 e 922 cm^{-1} , que correspondem ao *stretching* dos átomos de enxofre e oxigênio do grupo sulfóxido, sendo atribuídos aos modos teóricos M22 (982 cm^{-1} , +11 cm^{-1} erro), M21 (958 cm^{-1} , +32 cm^{-1} erro) e M20 (951 cm^{-1} , +29 cm^{-1} erro). Modos de stretching entre o átomo de enxofre e seus carbonos adjacentes são observados nos menores números de onda, 677 e 641 cm^{-1} , com pouca intensidade, correspondendo aos modos M16 (714 cm^{-1} , +37 cm^{-1} erro) e M15 (690 cm^{-1} , +49 cm^{-1} erro). Como não podemos confiar cegamente nas atribuições calculadas pelo software VEDA, a Figura 16 mostra os principais modos vibracionais discutidos nesta sessão, com os vetores de deslocamento, frequência e atribuições.

Figura 14: Espectro na região do Infravermelho experimental (EXP) e teórico (THE) da molécula de Metiina na região de 600 – 1800 cm^{-1} . Os símbolos ρ , β , ν , ω , δ e ϕ descrevem as vibrações *rocking*, *bending*, *stretching*, *wagging*, *angular deformation* e *out of plane deformation* nesta respectiva ordem.



O trabalho publicado por Xial e colaboradores, novamente, possui algumas discrepâncias com as atribuições propostas por este trabalho. De modo geral, 9 das 23 atribuições realizadas diferem das atribuições calculadas pelo software VEDA e da própria inspeção visual. Os picos observados em 641 e 867 cm^{-1}

¹, foram atribuídos por δCOO^- e ρCH_2 respectivamente. As absorções em 948 e 971 cm^{-1} , são preferencialmente atribuídas por Xial e colaboradores por θCC , e θCC , θCN (o símbolo ' θ ' descreve a vibração *stretching* no trabalho de Xial). Os picos de absorção observados em 1233 e 1395 cm^{-1} , foram relacionados com os modos ρNH_3^+ e δCH_2 , e finalmente, a vibração do tipo *stretching* simétrico do grupo carboxila, foi atribuído ao pico detectado em 1481 cm^{-1} .

Tabela 6. Números de onda calculados para molécula de Metiina, ω em cm^{-1} , com seus respectivos números de onda experimentais correlacionados. Os desvios de cada modo teórico, Δ em cm^{-1} e % também são mostrados.

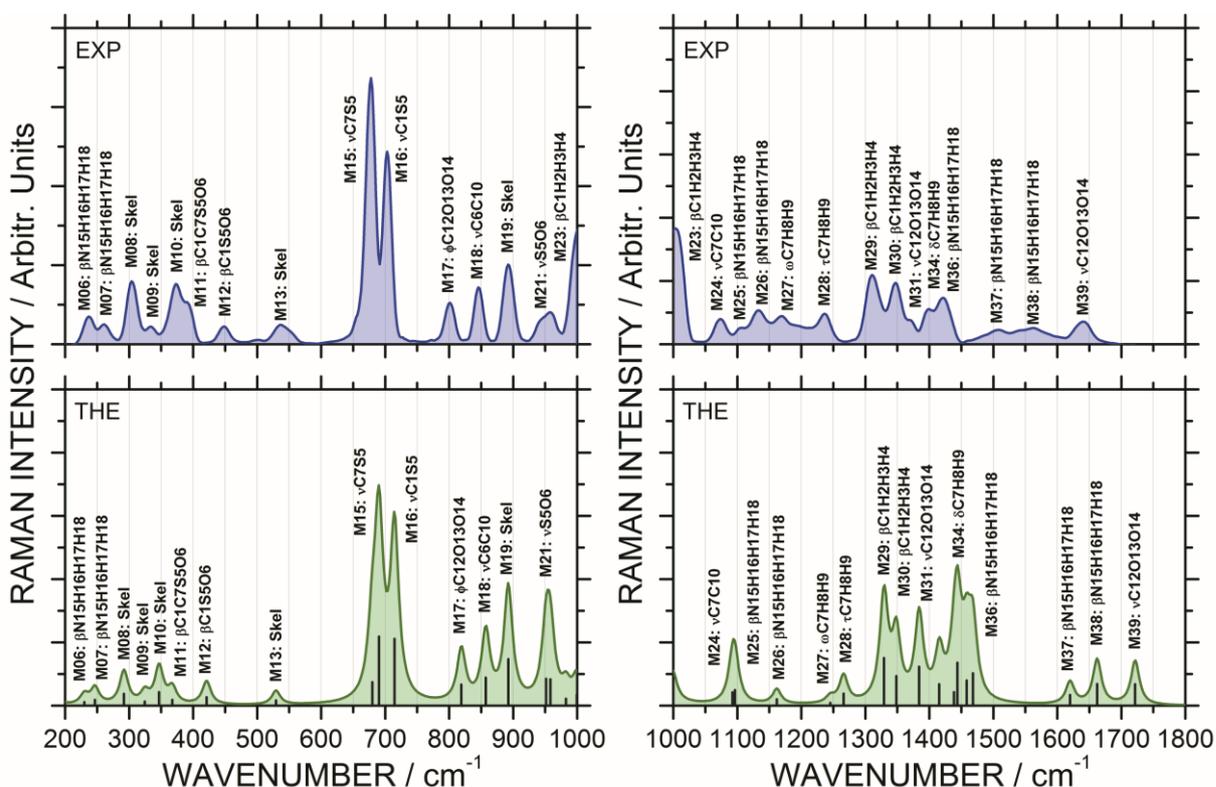
Mode	ω_{THE}	Experimental		Δ_{IR}	Δ_{Raman}	Mode Assignment (PED%)
		IR	Raman			
M06	229	---	236	---	-7 (2.9)	$\beta_{\text{S}}\text{N15H16H17H18(40)}$, $\beta_{\text{S}}\text{C1H2H3H4(35)}$
M07	246	---	259	---	-13 (5.0)	$\beta_{\text{S}}\text{N15H16H17H18(78)}$
M08	291	---	301	---	-10 (3.3)	Skel
M09	324	---	335	---	-11 (3.2)	Skel
M10	346	---	371	---	-25 (6.7)	Skel
M11	367	---	386	---	-19 (4.9)	$\beta_{\text{S}}\text{C1C7S5O6(50)}$
M12	421	---	448	---	-27 (6.0)	$\delta\text{C1S5O6(44)}$, $\rho\text{C7H8H9(10)}$
M13	529	---	536	---	-7 (1.3)	Skel
M14	679	---	653	---	26 (3.9)	Skel
M15	690	641	676	+49 (7.6)	+14 (2.1)	$\nu\text{C7S5(74)}$
M16	714	677	702	+37 (5.4)	+12 (1.7)	$\nu\text{C1S5(80)}$
M17	819	768	803	+51 (6.6)	+16 (2.0)	$\phi\text{C12O13O14(58)}$
M18	857	818	846	+39 (4.7)	+11 (1.3)	$\nu\text{C6C10(38)}$, $\rho\text{C7H8H9(21)}$
M19	890	867	893	+23 (2.6)	-3 (0.3)	Skel
M20	951	922	946	+29 (3.1)	+5 (0.5)	$\nu\text{S5O6(59)}$
M21	958	948	960	+32 (3.5)	-2 (0.2)	$\nu\text{S5O6(59)}$, $\beta_{\text{A}}\text{C1H2H3H4(20)}$,
M22	982	971	998	+11 (1.1)	-16 (1.6)	$\nu\text{S5O6(55)}$, $\beta_{\text{A}}\text{C1H2H3H4(23)}$,
M23	999	1004	1011	+9 (0.9)	-12 (1.2)	$\beta_{\text{A}}\text{C1H2H3H4(52)}$
M24	1092	1068	1073	+53 (5.1)	+19 (1.8)	$\nu\text{C7C10(51)}$, $\nu\text{C10N15(13)}$
M25	1096	1104	1125	-8 (0.7)	-29 (2.5)	$\beta_{\text{A}}\text{N15H16H17H18(43)}$, $\tau\text{C7H8H9(19)}$
M26	1161	1169	1171	+19 (1.7)	+27 (2.4)	$\beta_{\text{A}}\text{N15H16H17H18(30)}$, $\nu\text{C7C10(20)}$
M27	1245	1233	1198	+39 (3.2)	+47 (3.9)	$\omega\text{C7H8H9(82)}$
M28	1266	1307	1241	-41 (3.1)	-25 (2.0)	$\tau\text{C7H8H9(47)}$, $\beta_{\text{A}}\text{N15H16H17H18(14)}$
M29	1329	1319	1314	+10 (0.7)	+15 (1.1)	$\beta_{\text{S}}\text{C1H2H3H4(65)}$, $\omega\text{C7H8H9(20)}$
M30	1348	1345	1344	+3 (0.2)	+4 (0.3)	$\beta_{\text{S}}\text{C1H2H3H4(80)}$
M31	1384	1395	1398	+14 (1.0)	+10 (0.7)	$\nu_{\text{S}}\text{C12O13O14(48)}$
M32	1415	1423	1424	+8 (0.5)	+25 (1.8)	$\nu_{\text{S}}\text{C12O13O14(30)}$
M33	1438	---	1440	---	-2 (0.1)	$\beta_{\text{A}}\text{C1H2H3H4(84)}$, $\delta\text{C7H8H9(10)}$
M34	1443	1443	1413	0	+30 (2.1)	$\delta\text{C7H8H9(88)}$, $\beta_{\text{A}}\text{C1H2H3H4(10)}$
M35	1458	1450	---	+8 (0.1)	---	$\beta_{\text{A}}\text{C1H2H3H4(82)}$
M36	1468	1481	1433	+8 (0.5)	+35 (2.4)	$\beta_{\text{S}}\text{N15H16H17H18(78)}$
M37	1619	1551	1533	+68 (4.4)	+86 (2.6)	$\beta_{\text{A}}\text{N15H16H17H18(92)}$
M38	1662	1568	1564	+94 (6.0)	+98 (6.3)	$\beta_{\text{A}}\text{N15H16H17H18(90)}$
M39	1721	1644	1664	+77 (4.7)	+57 (3.4)	$\nu_{\text{A}}\text{C12O13O14(91)}$

The symbols: ν , δ , ϕ , τ , ρ , ω and β stand for stretching, in-plane angular deformation, out-of-plane deformation, twisting, rocking, wagging and bending modes in this respective order, subscripts A and S stand for symmetric and asymmetric respectively and the term skel is assign to a vibration mode which the PED is distributed throughout the whole molecular skeleton.

4.2.2 Espectro Raman

A espectroscopia Raman é uma técnica bastante útil para diferenciar os compostos organossulfurados presentes no alho por fornecer informações sobre sua cadeia carbônica. O pico de absorção associado ao grupo terminal alila, normalmente observado em torno de 1650 cm^{-1} , é totalmente ausente no espectro Raman da metiina.

Figura 15: Espectro Raman experimental (EXP) e teórico (THE) da molécula de Metiina na região de $200 - 1800\text{ cm}^{-1}$. Os símbolos ρ , β , ν , ω , δ e ϕ descrevem as vibrações *rocking*, *bending*, *stretching*, *wagging*, *angular deformation* e *out of plane deformation* nesta respectiva ordem.

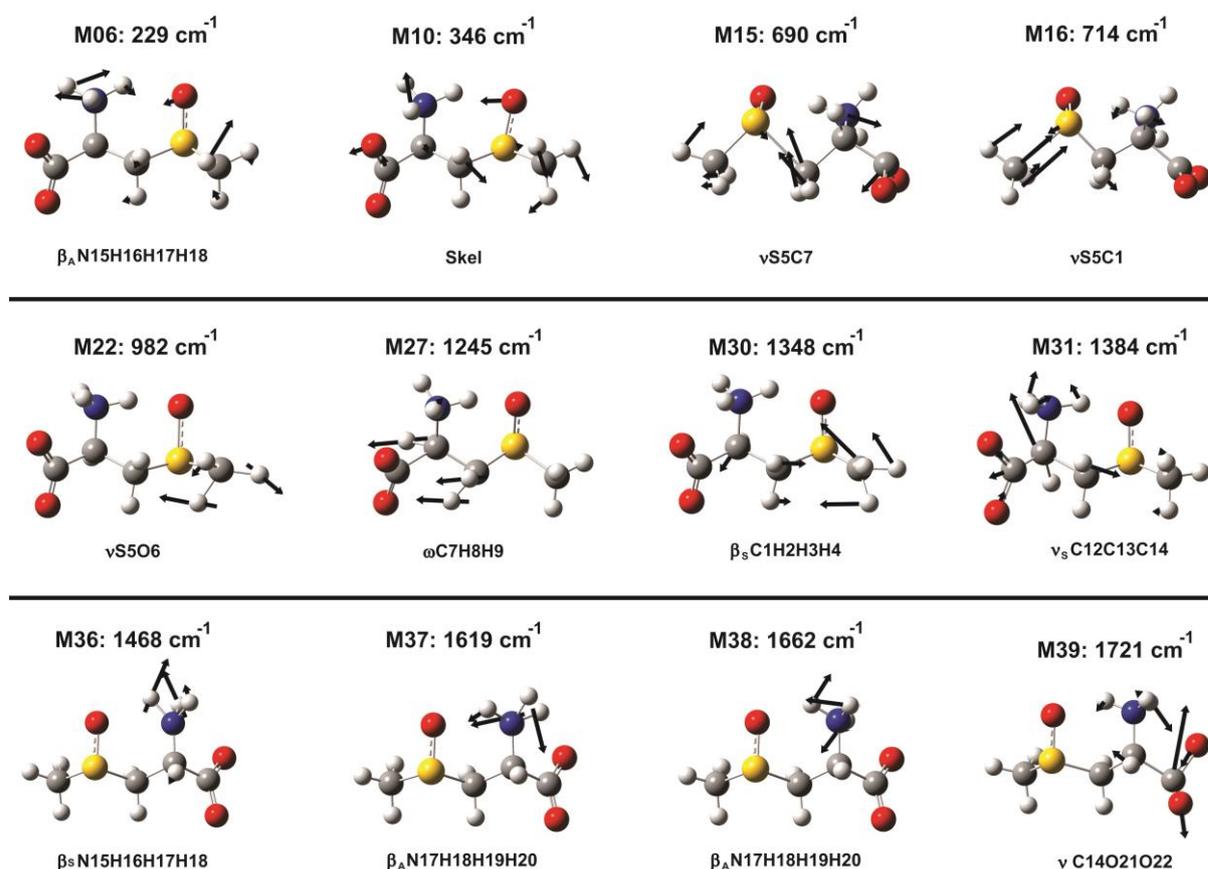


Em altos números de onda, os modos vibracionais relacionados aos grupos carboxila e amino, aparecem com intensidades inferiores as do espectro infravermelho. As absorções destes dois grupos, em 1664 , 1564 , 1533 e 1433 cm^{-1} , estão associadas aos modos M39 (1721 cm^{-1} , $+57\text{ cm}^{-1}$ erro), M38 (1662 cm^{-1} , $+98\text{ cm}^{-1}$ erro) M37 (1619 cm^{-1} , $+86\text{ cm}^{-1}$ erro) e M36 (1468 cm^{-1} , $+35\text{ cm}^{-1}$ erro) respectivamente. Ainda nesta região observamos três absorções de alta intensidade: 1344 , 1314 e 1011 cm^{-1} , estes picos estão relacionadas ao *bending* simétrico do

grupo metila no final da cadeia, podendo ser correlacionados aos modos M30 (1348 cm^{-1} , +10 cm^{-1} erro), M29 (1329 cm^{-1} , +15 cm^{-1} erro) e M23 (999 cm^{-1} , -12 cm^{-1} erro).

Em menores valores de números de onda, observamos dois picos de alta intensidade: 702 e 676 cm^{-1} , que também são detectados no espectro infravermelho, mas com baixas intensidades, associados aos modos teóricos M16 (714 cm^{-1} , +12 cm^{-1} erro) e M15 (690 cm^{-1} , +14 cm^{-1} erro). Outras absorções relevantes foram detectadas em 960, 898, 840 e 803 cm^{-1} , e estão associados aos modos teóricos M21 (958 cm^{-1} , -2 cm^{-1} erro), M19 (890 cm^{-1} , -3 cm^{-1} erro), M18 (857 cm^{-1} , +11 cm^{-1} erro) e M17 (819 cm^{-1} , +16 cm^{-1} erro) respectivamente.

Figura 16: Principais modos discutidos que compõem a assinatura molecular da Metiina.

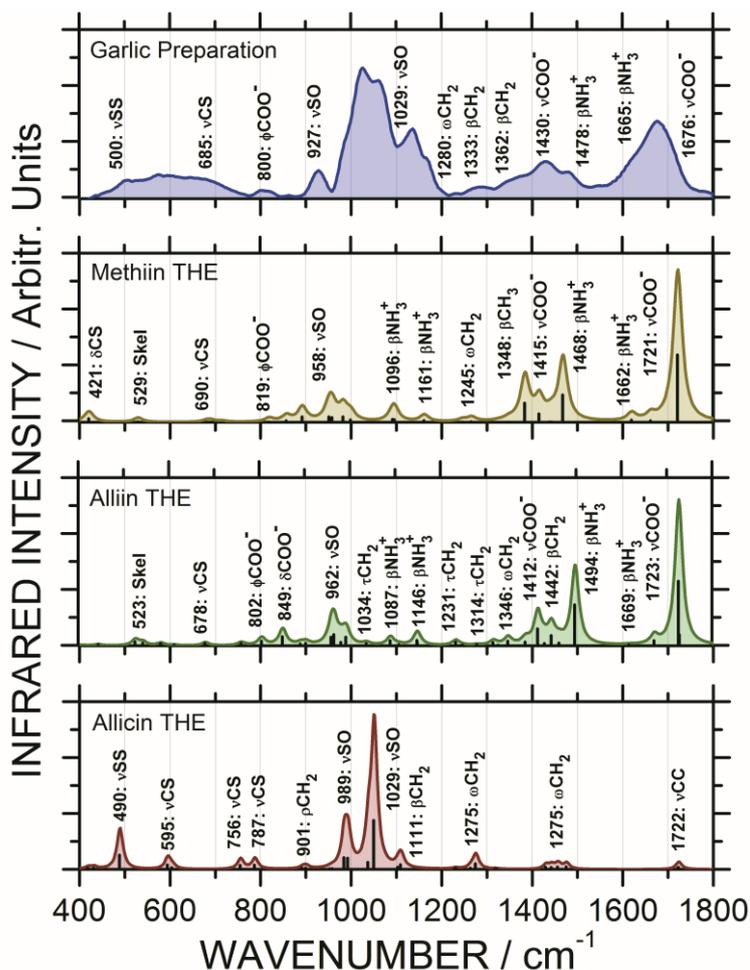


No trabalho de Xial e colaboradores, os picos de absorções detectados em 448 e 1440 cm^{-1} , no espectro Raman, são preferencialmente atribuídos por um *twisting* do grupo amino e um *stretching* simétrico do grupo carboxílico respectivamente (τNH_3^+ e θCOO^-).

4.3 Extrato de alho produzido em laboratório

Como a química do alho é bastante complexa e a simulação computacional de todos os constituintes do alho exigiria um elevado custo computacional, a molécula de alliina, por ser a mais abundante no extrato de alho, foi escolhida como aproximação para a realização de todos os cálculos clássicos e quânticos que serão apresentados nas sessões seguintes. Os espectros das moléculas de metiina e allicina, já apresentados anteriormente, também foram usados como suporte para regiões aonde as propriedades vibracionais da alliina não descrevem bem o sistema.

Figura 17: Espectro na região do Infravermelho, experimental do extrato de alho e espectro teórico das moléculas de Metiina, Alliina e Allicina, na região de 400 – 1800 cm^{-1} . Os símbolos ρ , β , ν , ω , δ e ϕ descrevem as vibrações *rocking*, *bending*, *stretching*, *wagging*, *angular deformation* e *out of plane deformation* nesta respectiva ordem.



Na Figura 17 está mostrado o espectro na região do infravermelho do extrato de alho produzido no laboratório. No espectro infravermelho do extrato de alho, observamos cinco regiões bem definidas: 1750 – 1600 cm^{-1} que corresponde à região de *stretching* assimétrico de carboxilas, onde a alliina e metiina (também cicloalliina e isoalliina, porém, em concentrações bastante inferiores) são os principais contribuintes para sua formação, uma segunda região compreendida entre 1600 – 1350 cm^{-1} , onde novamente estes compostos contribuem para a sua ocorrência devido à presença do grupo amina, uma terceira região compreendida entre 1350 – 1100 cm^{-1} , onde ocorrem às vibrações da cadeia carbônica, onde todos os compostos orgânicos contribuem para esta ocorrência (vibrações de grupos aminos também podem ser observadas nesta região, em fase com os demais modos vibracionais), uma quarta região detectada entre 1100 – 900 cm^{-1} , é considerada a assinatura molecular dos compostos organossulfurados presentes no alho, nesta região ocorrem os *stretching* dos grupos sulfóxidos (alliina, metiina, etc) e tio sulfóxidos (allicina) sendo caracterizados por picos de média intensidade em torno de 950 – 1050 cm^{-1} e elevadas intensidades em torno de 1050 – 1100 cm^{-1} respectivamente. Uma última região formada por uma banda de absorção bastante larga, compreendida entre 800 – 400 cm^{-1} , ocorre principalmente devido aos *stretchings* de átomos de carbono – enxofre (alliina, metiina, etc e allicina) e enxofre – enxofre (Allicina).

5 ENTREGA POR CARBONATO DE CÁLCIO

5.1 Preparo das estruturas

O carbonato de cálcio existe em três estruturas minerais na natureza, na seguinte ordem de abundancia: Calcita, Aragonita e Vaterita. Todos os experimentos realizados neste trabalho tiveram como material de partida a calcita, da mesma forma, os modelos teóricos desenvolvidos, foram construídos a partir dos dados cristalográficos, publicados por Elliot, do polimorfo calcita [59].

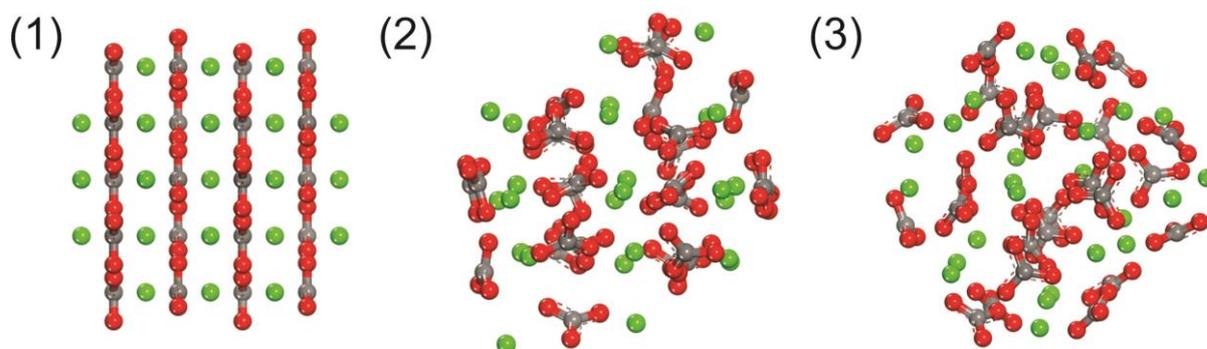
A célula cristalina da calcita, polimorfo mais estável a pressão ambiente, apresenta estrutura trigonal romboédrica, na qual os átomos de cálcio são coordenados a três átomos de oxigênio. O objetivo desta etapa do trabalho é preparar um carreador de moléculas para ampliar os efeitos terapêuticos do alho, assim como elaborar um modelo teórico para adsorção do extrato de alho nesta estrutura. Para obtermos um modelo mais realístico possível, a partir da estrutura cristalina da calcita, foi criado um *nanocluster*, de 7 Å de raio e carga total zero, contendo 25 átomos de cálcio e 25 grupos de carbonato, que foi otimizado pelo campo de força clássico universal (UFF) usando o algoritmo de otimização do software Forcite.

Como se pode notar, pela Figura 18(1), a estrutura obtida após a otimização, ainda apresenta as camadas de átomos de cálcio e grupos de carbonato bem definidas. Tais formações estruturais podem causar erros nos cálculos de interação, pois, uma molécula submetida a uma interação com esta nanoestrutura estaria interagindo diretamente com átomos de Ca^{2+} , ou grupos de CO_3^{2-} , dependendo do plano de contato, então, para criar uma superfície mais dispersa, um cálculo de estimulação de *annealing*, clássico, foi realizado, também usando o campo de força clássico universal. Pode-se observar, na Figura 18(3), que após a realização deste cálculo, as camadas de átomos de cálcio as camadas de moléculas de carbonato foram misturadas promovendo uma melhor dispersão de carga na estrutura final.

Em um estudo realizado por Fernandez-Gonzalez e colaboradores, aonde foi estudado a estabilidade de nanoestruturas de carbonato de cálcio (Calcita e Aragonita), verificou-se que a energia destas estruturas decresce de maneira

irregular com o aumento do número de pares (Carbonato e Cálcio), mas nunca alcança a energia da estrutura cristalina do mineral que lhe deu origem [51]. Os átomos de cálcio que ocupam as camadas mais internas, em *nanoclusters* de geometria esférica, possuem sua esfera de coordenação completa, enquanto que os átomos da superfície externa estão com suas esferas de coordenação incompletas, e podem interagir livremente com outras espécies [51].

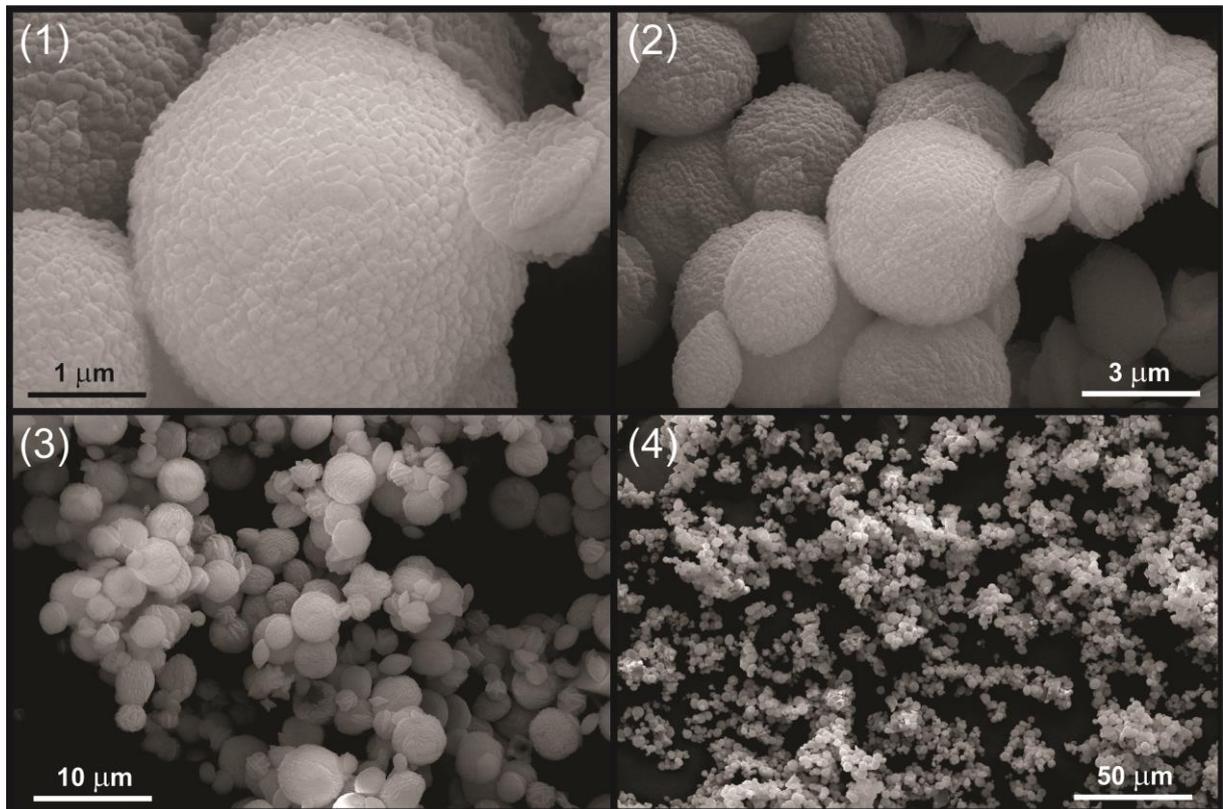
Figura 18: Estrutura da nanopartícula, de 7 Å de raio, construída a partir de dados cristalográficos do cristal de carbonato de cálcio (calcita): (1) estrutura construída, ainda com a simetria da calcita, (2) estrutura otimizada, (3) estrutura otimizada após o *annealing*.



As partículas de carbonato de cálcio sintetizadas em laboratório têm dimensões superiores às do modelo esférico desenvolvido (ver Figura 19), então, para avaliarmos a influência do tamanho da estrutura na sua interação com outra espécie, e tornar o modelo ainda mais fiel aos resultados obtidos experimentalmente, uma superfície de dimensões 20x20x5 Å, carga neutra e composta por 41 pares de carbonato e cálcio, foi preparada segundo os mesmos passos descritos anteriormente.

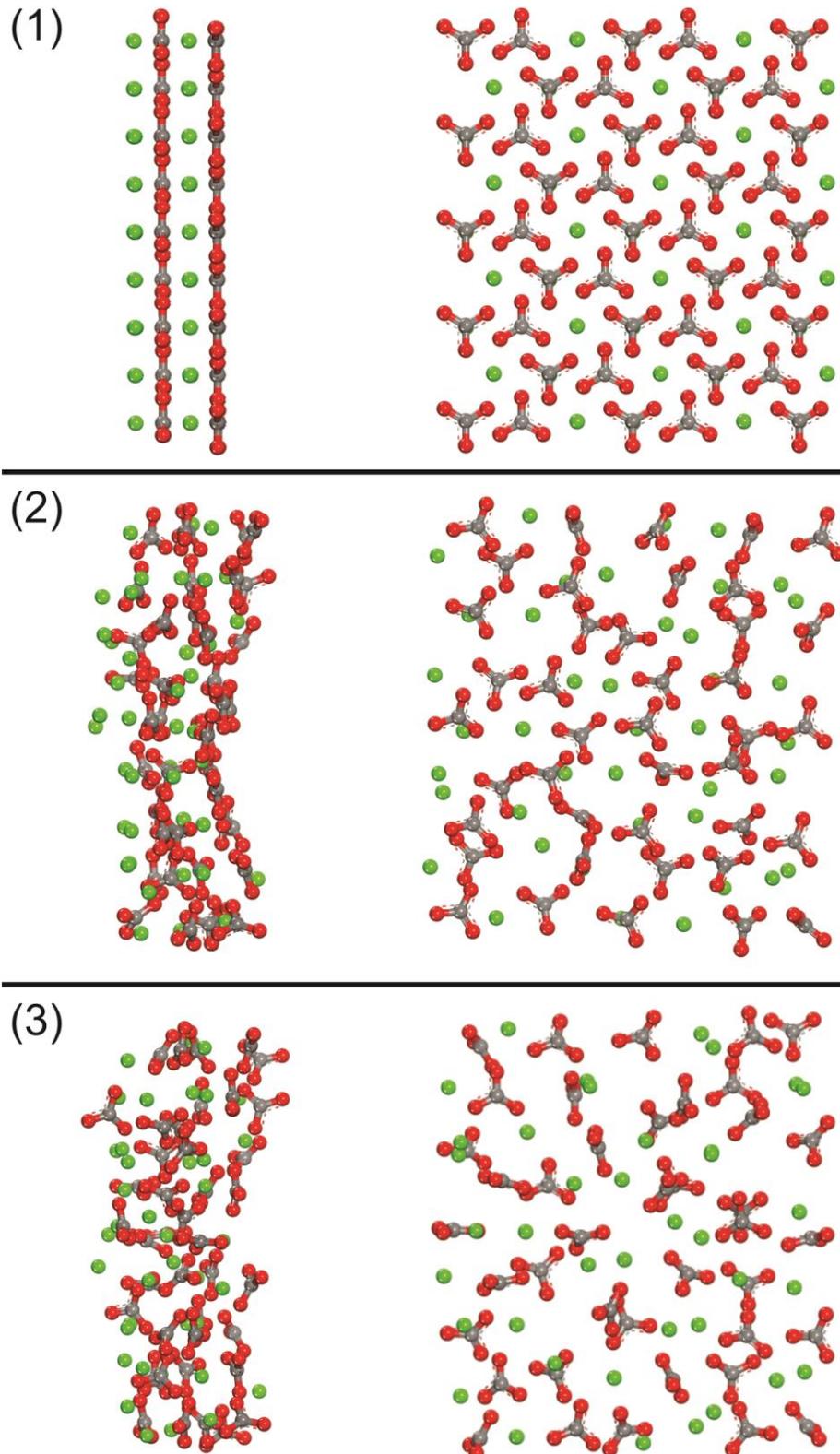
A superfície retangular de carbonato de cálcio é bem menos estável que em sua geometria esférica principalmente pelo fato de possuir vários átomos de cálcio com esfera de coordenação incompleta. Em sua estrutura otimizada pós *annealing*, como mostra a Figura 20(3), também observamos a mistura entre as camadas de cálcio e carbonato, proporcionando uma maior dispersão de carga e tornando o modelo mais realístico.

Figura 19: Fotos de microscopia de varredura eletrônica (MEV) de micropartículas de carbonato de cálcio (não carregadas) em diferentes escalas: (1) 1 μm , (2) 3 μm , (3) 10 μm e (4) 50 μm .



Como se pode observar nas imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura, mostradas na Figura 19, as micropartículas de carbonato de cálcio sintetizadas em laboratório possuem diâmetro entre 3 – 5 μm e geometria esférica com algumas imperfeições. O tamanho ideal que uma nanopartícula precisa ter para alcançar um tumor deve ser menor que 100 nm (0.1 μm) para conseguir passar pelo baço, fígado e pela junção entre as células endoteliais dos vasos sanguíneos que alimentam o tumor [61]. As micropartículas sintetizadas, da forma que estão (descarregadas) não seriam tão eficientes para o tratamento de câncer caso seu mecanismo de ação dependesse de cruzar tais barreiras e atuar no meio intracelular.

Figura 20: Estrutura da superfície de $20 \times 20 \times 5$ Å, construída a partir de dados cristalográficos do cristal de carbonato de cálcio (calcita), lado esquerdo (plano YZ) e lado direito (plano XY): (1) estrutura construída, ainda com a simetria da calcita, (2) estrutura otimizada, (3) estrutura otimizada após o *annealing*.

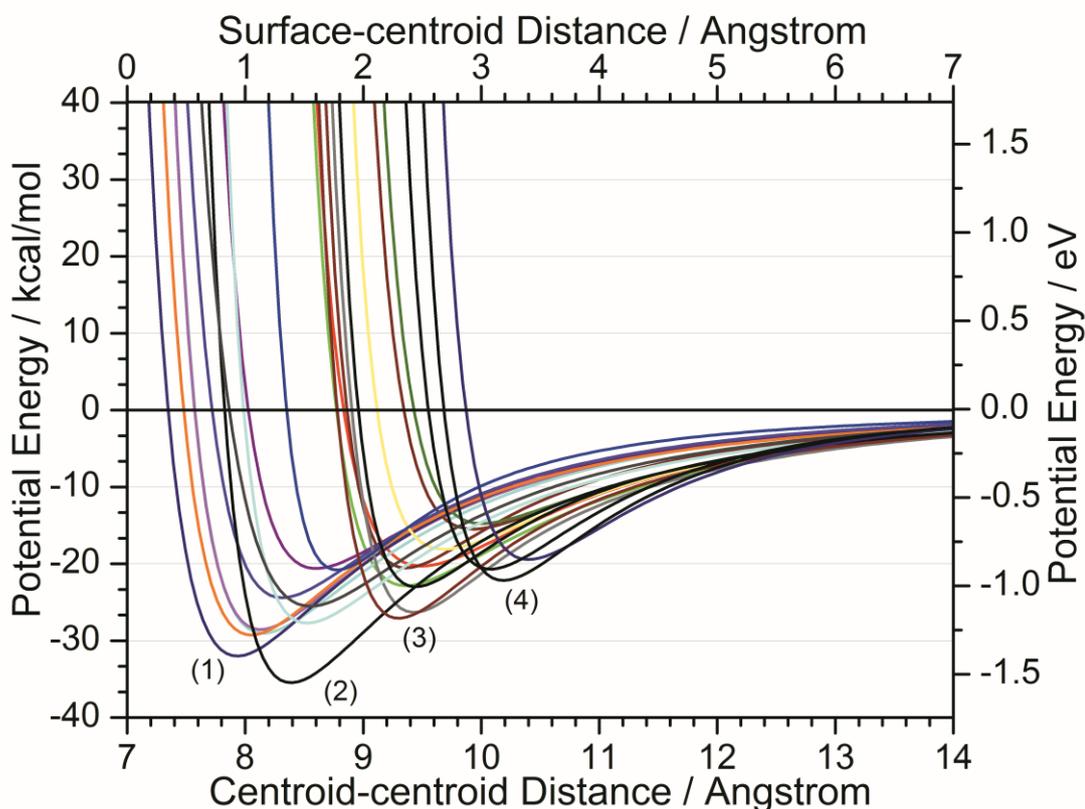


5.2 Cálculos de potenciais de interação

5.2.1 Adsorção em Nanopartícula

A Figura 21 mostra a variação da energia potencial em kcal/mol e eV ao longo da distância entre os dois centroides (allina e nanopartícula). O mínimo de energia ocorre a aproximadamente a uma distância de 8.4 Å e equivale a -34.47 kcal/mol (-1.49 eV). Outras três regiões de interações estáveis também são observadas nas distâncias de 7.8, 9.4 e 10.4 Å, com valores de energia de -32.01 kcal/mol (-1.39 eV), -27.08 kcal/mol (-1.17 eV) e -22.04 kcal/mol (-0.95 eV) respectivamente.

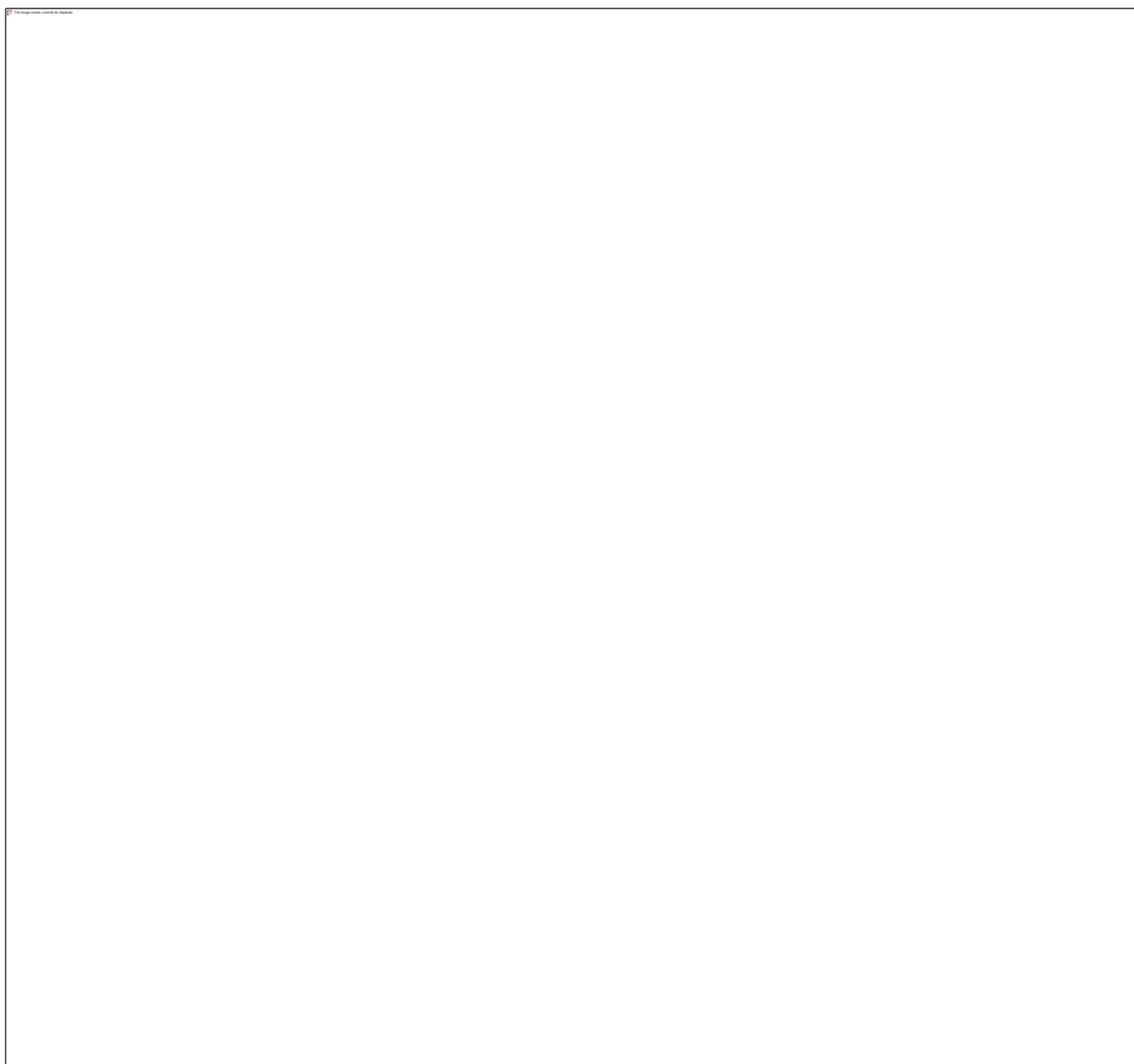
Figura 21: Gráfico de potencial de interação clássico da Allina com nanopartícula de carbonato de cálcio, neutra de 7 Å de raio. Os índices (1, 2, 3 e 4) indicam em ordem crescente de distância os mínimos de energia de cada camada de solvatação (órbitas).



Estas estruturas podem ser associadas a quatro diferentes arranjos conformacionais de adsorção da molécula de Allina sobre a nanoestrutura de Carbonato de Cálcio. A dinâmica molecular realizada em uma caixa com uma

nanopartícula e 40 moléculas de allina indica a existência de “órbitas” de interação, devido à simetria esférica da nanopartícula. As moléculas de allina se agrupam formando órbitas de interação de diferentes raios ao redor da nanopartícula, mostradas com mais detalhes na Figura 22.

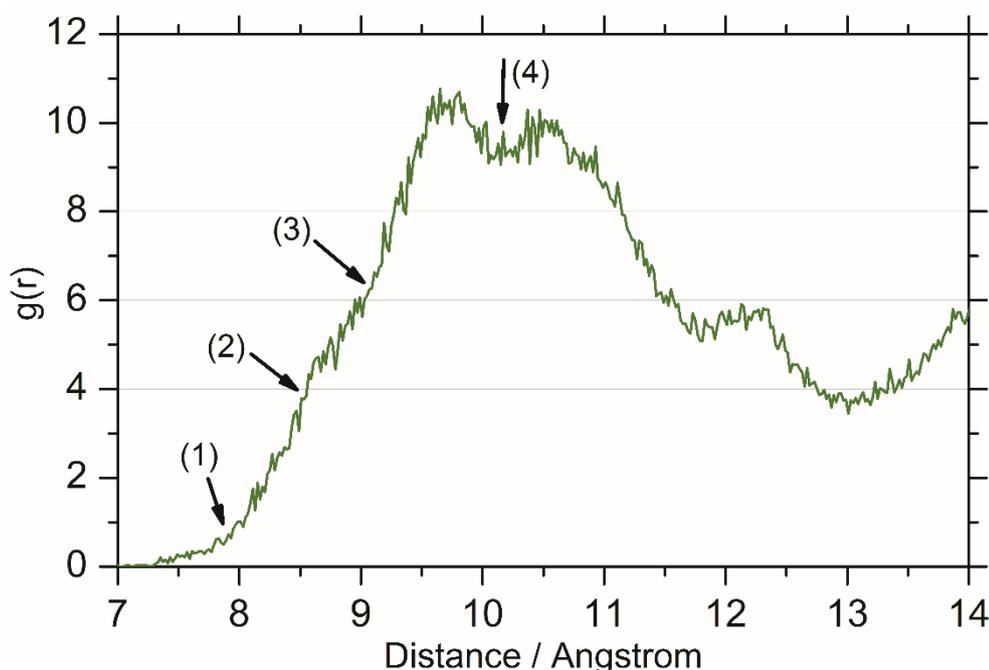
Figura 22: Órbitas de interação de uma nanopartícula de carbonato de cálcio e algumas moléculas de Allina, gerada por dinâmica molecular. Os raios apresentados correspondem aos valores destacados pelas setas na Figura 23.



Os grupos sulfóxido, amino (carregado positivamente) e o grupo carboxílico (carregado negativamente) são os principais agentes formadores de ligações de hidrogênio entre as moléculas de allina e de interações do tipo íon dipolo com a nanopartícula, devido a sua elevada polaridade, que contribuem para a estabilização

destas camadas de solvatação (órbitas). Estes diferentes perfis de adsorção, com uma ampla variedade de raios e energias de interações obtidas, comprovam a eficiência do carbonato de cálcio como carreador de fármacos, pois, as moléculas de drogas adsorvidas em camadas mais externas, menos energéticas, são liberadas primeiro enquanto que as moléculas interagindo em órbitas mais internas são liberadas posteriormente. Desta maneira o sistema de entrega de droga desenvolvido preserva a biodisponibilidade dos agentes terapêuticos dentro do organismo, elevando sua concentração nos órgãos ou tecidos de interesse, podendo também diminuindo sua toxicidade ou efeitos colaterais indesejados, e ainda preservar sua estrutura química contra possíveis ataques de agentes externos, presentes no organismo, que possam interagir ou reagir com as moléculas, causando modificações estruturais que possam acarretar na inativação do princípio ativo.

Figura 23: Função de distribuição de pares, gerada por dinâmica molecular de uma nanopartícula interagindo com 40 moléculas de Alliina. Os valores destacados correspondem às órbitas de interação mostradas na Figura 21.



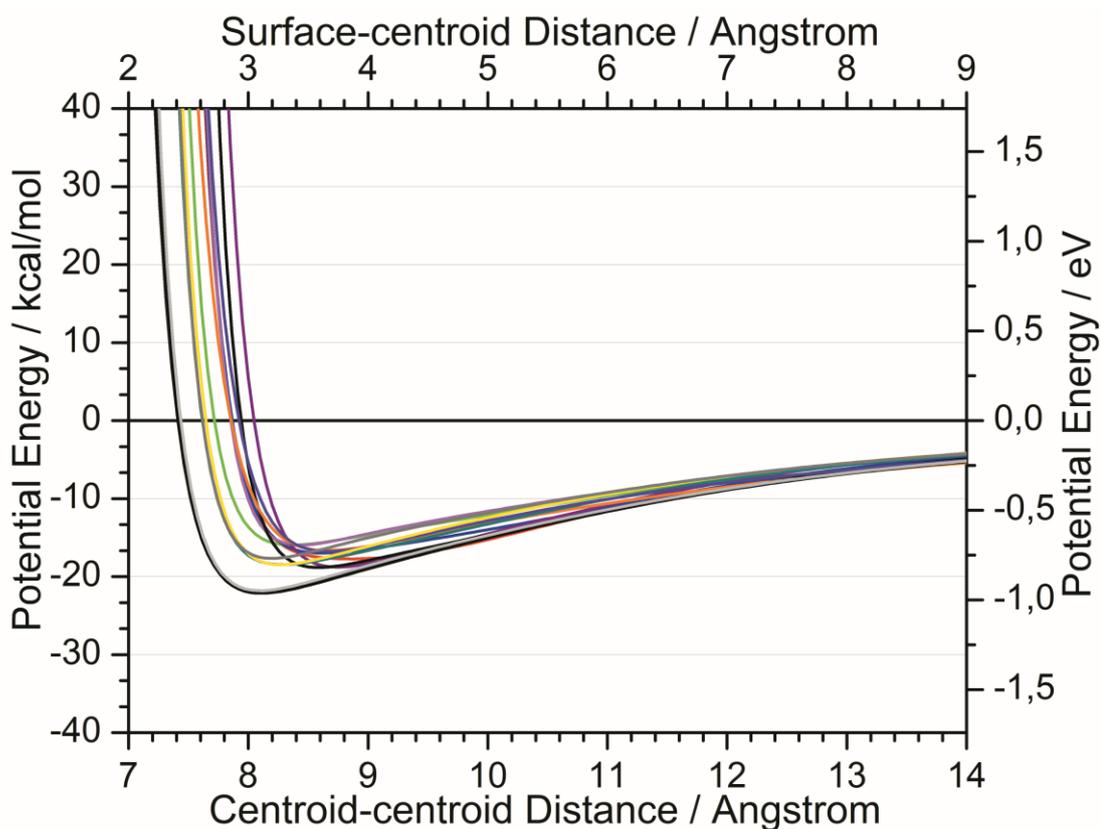
A função de distribuição radial gerada por dinâmica molecular de uma nanopartícula e 40 moléculas de alliina está mostrada na Figura 23. Podemos observar a existência de pelo menos quatro camadas de solvatação. As três

primeiras camadas, observadas nas distancias 7.8, 8.4 e 9.4 Å estão bastante próximas formando uma grande aglomeração de moléculas que se estende até um raio aproximado de 10 Å.

5.2.2 Adsorção sobre uma Superfície

A Figuras 24 mostra a variação da energia potencial em kcal/mol e eV ao longo da distância entre os dois centroides (alliina e Superfície). Como se pode observar, o perfil adsorção de uma molécula de alliina em uma superfície de carbonato de cálcio (artifício usado para simular o efeito de uma nanopartícula de dimensões muito superiores as da molécula adsorvida) tende a um mesmo valor de energia e a um mesmo raio de interação.

Figura 24: Gráfico de potencial de interação clássico da Alliina com superfície de carbonato de cálcio, neutra com dimensões 20x20x5 Å.

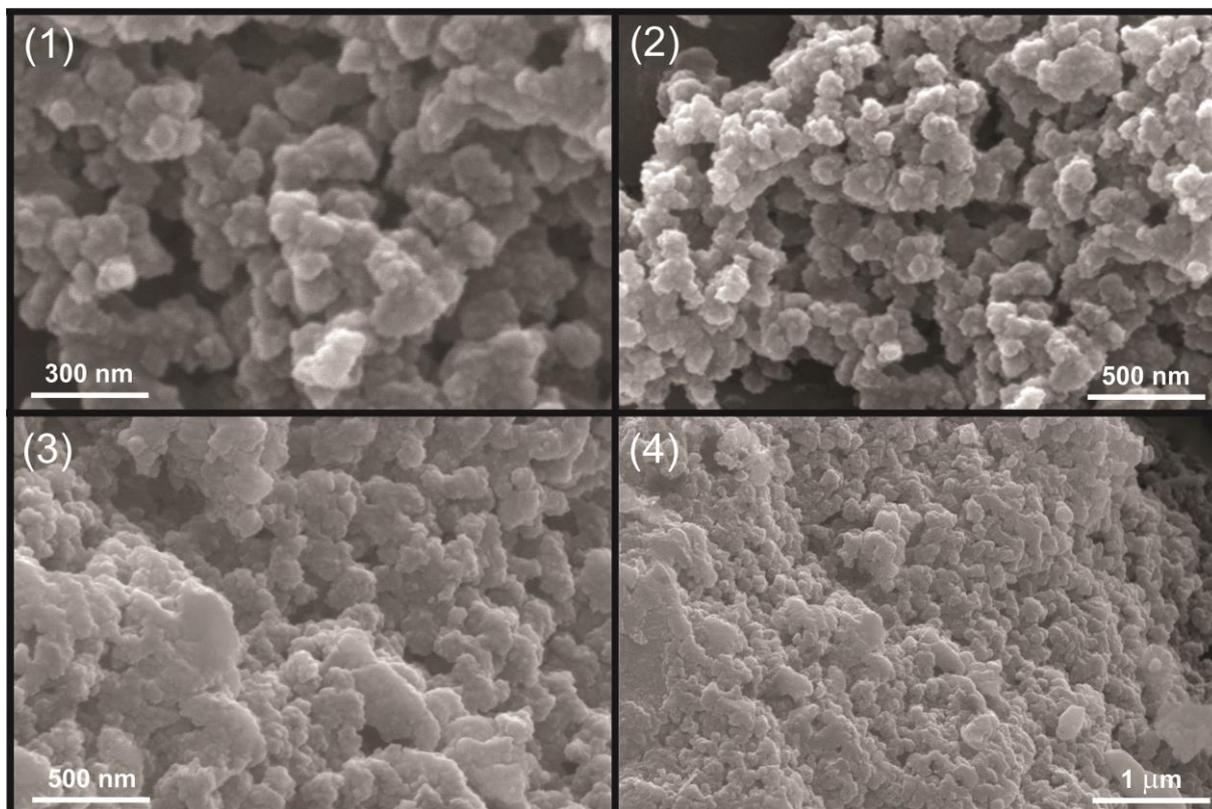


Este perfil de adsorção é menos eficiente para a entrega de drogas, pois, a existência de apenas um “sítio” de adsorção na estrutura, diminui a sua capacidade de carregamento de moléculas, além de libera-las de maneira mais rápida do que na estrutura de dimensões inferiores. Os resultados deste estudo realçam a importância no controle do tamanho do nanomaterial a ser fabricado, e melhor descreve o sistema de entrega de droga desenvolvido experimentalmente (ver Figura 25) ao nível de energias de adsorção.

Valores semelhantes de energia de interação foram observados por Freeman e colaboradores [53, 60] onde foi estudada a interação de quatro espécies: metanol, ácido metanoico, éter dimetílico e água, com uma superfície finita de carbonato de cálcio (em dois de seus polimorfos). Os valores de energia obtidos para as quatro espécies foram respectivamente 0.7, 0.7, 0.55 e 0.8 eV. Em seus trabalhos, Freeman e colaboradores relatam a importância da presença física da água no modelo utilizado, pois, esta é capaz de formar camadas de solvatações mais internas que conseqüentemente alteram significativamente o perfil de interação das moléculas orgânicas e a superfície da nanoestrutura de carbonato de cálcio.

O cálculo de dinâmica molecular da superfície de carbonato de cálcio, em uma caixa com 40 moléculas de alliina (não mostrados neste trabalho) não apresentou resultados relevantes, pois esta geometria não se mostrou estável nas condições impostas pela dinâmica molecular, convertendo-se rapidamente numa estrutura semiesférica ao final do processo.

Figura 25: Fotos de microscopia de varredura eletrônica (MEV) de micropartículas de carbonato de cálcio carregadas com extrato de alho liofilizado em diferentes escalas: (1) 300 nm, (2, 3) 500 nm e (4) 1 μm .



Como se pode observar na Figura 25, as micropartículas de alho possuem estruturas bastante diferentes das estruturas de carbonato de cálcio puras (ver Figura 19) que lhes deram origem. A adsorção do extrato de alho liofilizado faz com que a superfície do material fique modificada dando origem a um produto final com estrutura mais desorganizada (amorfo). O pH ácido do extrato de alho é outro fator que contribui para a formação destas imperfeições, pois o carbonato de cálcio é um sal de caráter básico, o que desfavorece sua nucleação.

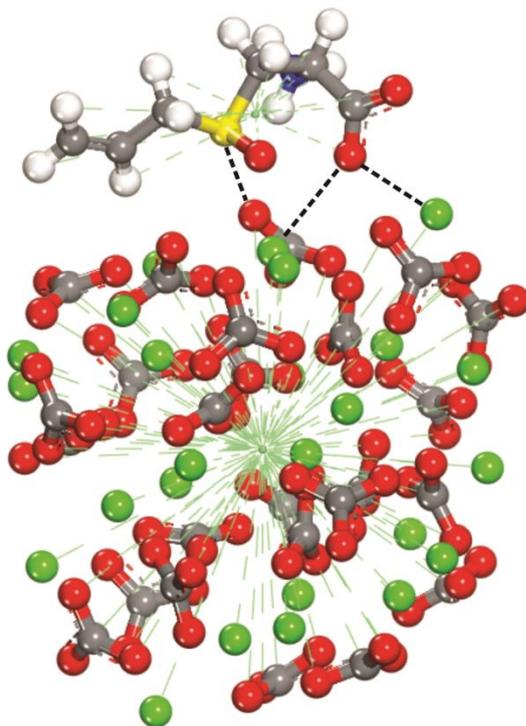
Em um recente estudo publicado por Coman e colaboradores [62], nanopartículas de ouro, também modificadas com extrato de alho foram sintetizadas e caracterizadas para uso em SERS (Surface-enhanced Raman Spectroscopy). O diâmetro das nanopartículas obtidas por Coman, analisados por microscopia de transmissão eletrônica, mostraram-se dependentes da quantidade de agente redutor (extrato de alho fervido) utilizado. As quantidades de extrato de alho fervido

utilizadas por Coman foram: 50, 100, 200, 250, 300, 500, 750 e 1000 μl . As amostras preparadas com 50 e 100 μl mostraram superfícies assimétricas, nanopartículas polidispersas e instabilidade, enquanto que os melhores resultados foram obtidos com o uso de quantidades mais elevadas de extrato de alho, sendo as nanopartículas sintetizadas com 250 e 1000 μl de extrato de alho escolhidas para discussão, com diâmetros médios de 14 e 9 nm respectivamente. De acordo com estes resultados, o uso de um volume maior de extrato de alho no preparo das nanopartículas de carbonato de cálcio poderiam acarretar em um diâmetro médio menor no final do processo de nucleação, o que poderia melhorar a atividade anticâncer ou bactericida das partículas pois, com diâmetros menores, elas poderiam atravessar barreiras celulares e agir no interior das células alvo.

5.3 Espectros Vibracionais Teóricos

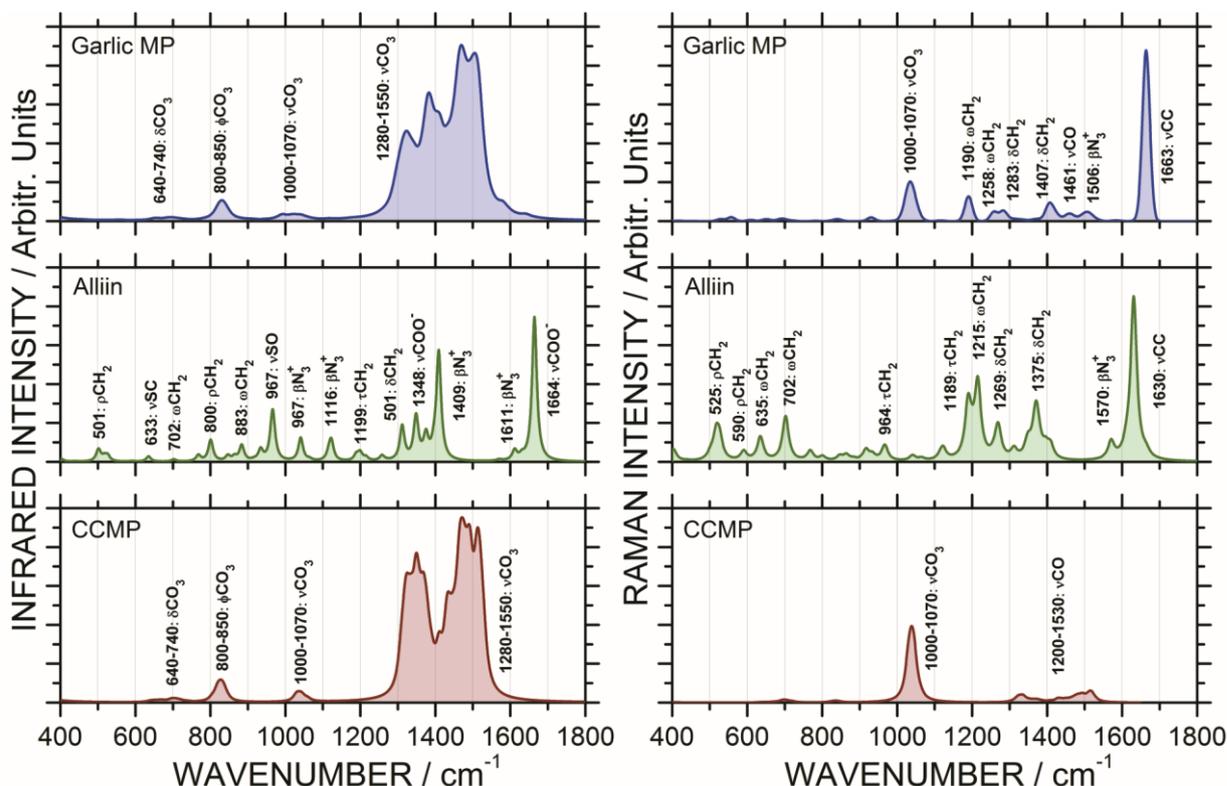
A estrutura de menor energia (Ver Figura 26) foi otimizada com o funcional puro GGA na sua formulação PBE (devido a elevada quantidade de átomos no sistema), e usada para os cálculos das propriedades vibracionais. Os espectros na região do Infravermelho e Raman teóricos da nanopartícula de carbonato de cálcio (CCMP), Alliina e da estrutura nanopartícula-Alliina (Garlic MP) estão mostrados na Figura 27.

Figura 26: Estrutura de menor energia após otimização quântica usando o funcional GGA da DFT e base numérica DNP. As linhas tracejadas indicam interações de curto alcance entre a molécula de Alliina e a nanopartícula de carbonato de cálcio.



Os picos de absorção do carbonato de cálcio prevalecem no espectro Infravermelho da nanopartícula-alliina (Garlic MP), cobrindo os possíveis modos do grupo amino e carboxila provenientes da Alliina, que aparecem na mesma região. O espectro Infravermelho das duas estruturas (CCMP e Garlic MP) pode ser dividido em quatro regiões distintas: 640 – 740 cm^{-1} de deformação angular, 800 – 850 cm^{-1} de deformação fora do plano, 1000 – 1070 cm^{-1} de *stretching* simétrico e 1280 – 1550 cm^{-1} de *stretching* assimétrico.

Figura 27: Espectro Infravermelho e Raman, teóricos da Allina, e das nanopartículas pura (CCMP) e carregada com Allina (Garlic MP), na região de 400 – 1800 cm^{-1} . Os símbolos ρ , β , ν , ω , δ e ϕ descrevem as vibrações *rocking*, *bending*, *stretching*, *wagging*, *angular deformation* e *out of plane deformation* nesta respectiva ordem.



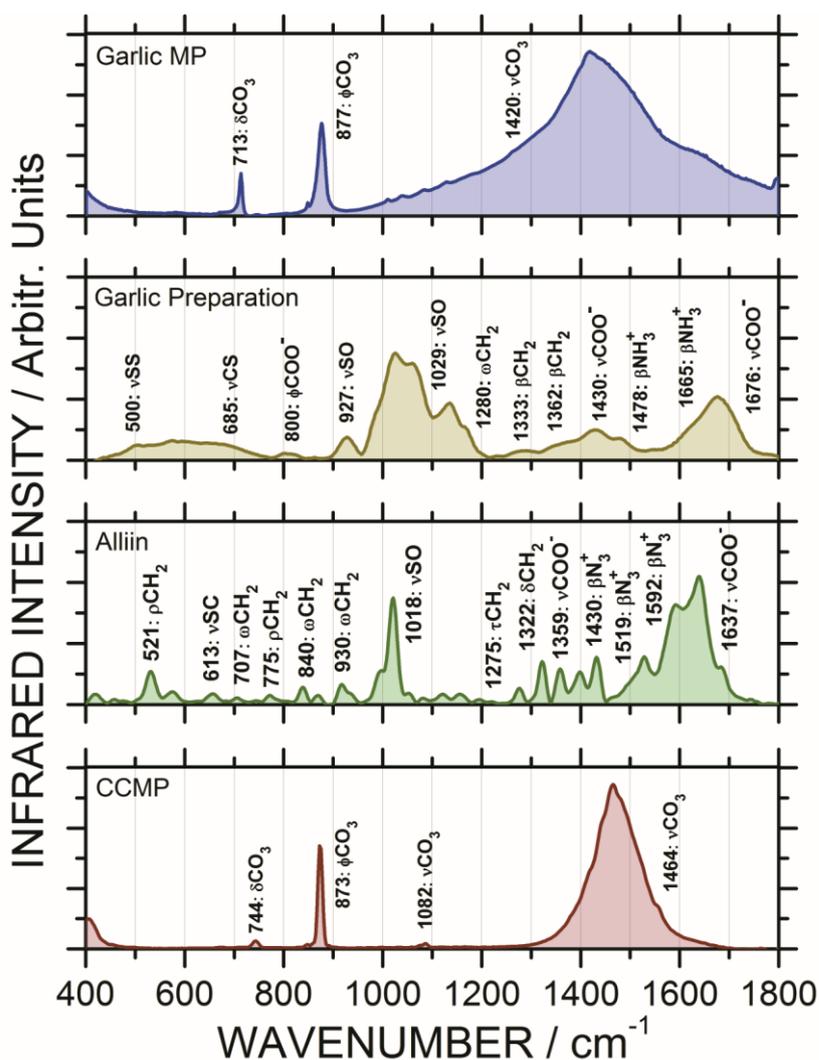
Os espectro na região do infravermelho e Raman da molécula de allina, já foram discutidos anteriormente no capítulo 3, com o funcional M06-2X, e não apresenta discrepâncias relevantes com os espectros calculados com o funcional GGA.

O espectro Raman revela mais claramente a assinatura molecular da allina na nanopartícula. O modo vibracional do grupo alila observado em 1630 cm^{-1} na molécula de Allina e em 1663 cm^{-1} na estrutura nanopartícula-allina (Garlic MP) é o modo mais intenso observado no espectro Raman, que não interage com o carbonato de cálcio devido a sua natureza apolar. Outros modos relacionados a vibrações da cadeia carbônica e do grupo amino são observados em 1506, 1461, 1407, 1283, 1258 e 1190 cm^{-1} . O modo vibracional relacionado ao *stretching* simétrico do carbonato, no espectro da nanopartícula pura também aparece no espectro Raman da estrutura nanopartícula-allina, com maior intensidade que no espectro Infravermelho, na região compreendida entre 1000 – 1070 cm^{-1} .

5.4 Espectro Experimental na Região do Infravermelho

Assim como no espectro teórico, o espectro experimental na região do infravermelho, mostrado na Figura 28, existe a predominância dos modos vibracionais relacionados ao carbonato de cálcio para a micropartícula modificada com extrato de alho. A assinatura molecular esperada para a alliina (gerada pela presença dos grupos amino e carboxílico) encontra-se coberta pela longa banda de *stretching* simétrico do grupo carbonato.

Figura 28: Espectro na região do Infravermelho da Alliina, extrato de alho, das micropartículas pura (CCMP) e carregada com extrato de alho (Garlic MP), na região de 400 – 1800 cm^{-1} . Os símbolos ρ , β , ν , ω , δ e ϕ descrevem as vibrações *rocking*, *bending*, *stretching*, *wagging*, *angular deformation* e *out of plane deformation* nesta respectiva ordem.



5.5 Ensaios Biológicos

5.5.1 Atividade Anticâncer

Para avaliar a atividade anticâncer do extrato de alho liofilizado e também a capacidade das micropartículas de amplificar tais resultados, uma análise de citotoxicidade, pelo método MTT, bastante utilizado pelo programa de *screening* do *National Cancer Institute* dos estados unidos, foi aplicada em três linhagens de células tumorais: SF-295 Glioblastoma Humano, HCT-166 Colorretal Humano e OVCAR-8 Ovário humano. A atividade citotóxica das amostras está apresentada na Tabela 7 com seus respectivos valores de percentual de inibição em (GI%).

Tabela 7. Atividade citotóxica das três amostras analisadas e respectivos valores percentuais de inibição (GI%), em três linhagens de células tumorais.			
Amostras	SF-295 Glioblastoma Humano	HCT-166 Colorretal Humano	OVCAR-8 Ovário Humano
MP de Carbonato de Cálcio	12.37 ± 3.71 %	---	0.11 ± 1.05 %
Extrato de alho	48.29 ± 6.13 %	35.52 ± 1.96 %	15.91 ± 4.77 %
MP de Alho	93.01 ± 0.08 %	92.53 ± 3.13 %	93.38 ± 1.31 %

As micropartículas (MP) de carbonato de cálcio puras obtiveram pouca ou nenhuma atividade nas três culturas de células analisadas. O extrato de alho liofilizado teve atividade moderada na linhagem de célula SF-295 (48.29 ± 6.13%) e pouca atividade nas linhagens HCT-166 (35.52 ± 1.96%) e OVCAR-8 (15.91 ± 4.77%). As micropartículas modificadas com extrato de alho ampliaram consideravelmente a atividade citotóxica do extrato de alho nas três linhagens estudadas, chegando a valores em torno de 93.01 ± 0.08% (SF-295), 92.53 ± 3.13% (HCT-166) e 93.38 ± 1.31% (OVCAR-8).

Como citato anteriormente, a atividade do extrato de alho está intimamente relacionada aos compostos organossulfurados, principalmente os que possuem o grupo alila em suas estruturas, sendo a allicina, a espécie mais citada como protagonista da atividade anticâncer [63], embora haja controvérsias [64], uma vez que a allicina só é formada na presença da allina, e é quimicamente instável, não sendo detectada na urina ou sangue do indivíduo, poucas horas após sua ingestão segundo um experimento realizado em camundongos [64].

Resultados semelhantes foram obtidos por Ghazanfari e colaboradores [65] que estudaram a atividade do extrato de alho aquoso, submetido a processos de envelhecimento (24, 46 e 72 h) em diferentes concentrações (5, 2, 1, 0.1, 0.01 mg/mL) em três linhagens de células tumorais humanas: MCF-7 (câncer de mama), AGS (câncer de estômago) e HT-29 (câncer de colón). O extrato de alho apresentou atividade citotóxica significativa em concentrações superiores a 1 mg/mL em tumores de linhagem AGS (máximo de 80% de inibição), em concentrações superiores a 2 mg/mL em tumores de linhagem MCF-7 (máximo de 70% de inibição), enquanto que as células de linhagem HT-29 não foram significativamente afetadas (Máximo de 30% de inibição), em todas as concentrações estudadas. De maneira geral, o extrato de alho envelhecido por 72 h teve atividade superior aos extratos envelhecidos por 24 e 48 h, nas culturas de células estudadas por Ghazanfari, nas mesmas concentrações utilizadas, isto sugere que os metabólitos secundários da allina (allicina, DADS, DATS, etc) possuem elevada atividade anticâncer para os tumores estudados, pois estes compostos estão em concentrações predominantes neste tipo de extrato.

Em um recente estudo publicado por Bhuiyan e colaboradores [66], a atividade citotóxica do extrato aquoso de alho, também envelhecido (24h e 48h), extraído em pH fisiológico e em duas temperaturas: ambiente e submetido a um tratamento térmico a 100 °C, foi testada na linhagem de célula tumoral HUT-78 (linfoma). As concentrações utilizadas por Bhuiyan foram 5, 10 e 50 mg/mL e os respectivos percentuais de inibições obtidos foram: 41.86, 53.17 e 97.42% para o extrato de 24h frio, 39.28, 64.08 e 97.17% para o extrato de 48h frio, enquanto que os extratos submetidos ao tratamento térmico causaram um percentual de inibição de: 11.51, 47.81 e 96.23% para o extrato envelhecido por 24h e 38.89, 60.32 e 96.72% para o extrato de alho envelhecido por 48h.

Em ambos os estudos [65, 66], a atividade citotóxica do extrato de alho se mostrou altamente dependente da dosagem aplicada, e um pouco dependente do tempo de envelhecimento ao qual o extrato de alho é exposto. Os ensaios de citotoxicidade, segundo a metodologia MTT, realizados nesta sessão utilizou uma concentração constante de 0.045 mg/ml da amostra (que contém uma quantidade efetiva certamente bastante inferior de extrato de alho adsorvido nas micropartículas

de carbonato de cálcio pois o rendimento de adsorção não foi avaliado) e são comparáveis aos resultados obtidos por Ghazanfari usando a dosagem de 5 mg/mL e de Bhuiyan usando a dosagem de 50 mg/mL. Este resultado prova o efeito sinérgico do extrato de alho com o carbonato de cálcio e demonstram o potencial de aplicação das micropartículas de carbonato de cálcio, na prática farmacêutica, como carreador de fármacos ou nutracêuticos para o tratamento de vários tipos de câncer, principalmente por diminuir a quantidade necessária do princípio ativo para a obtenção do efeito desejado, ou no caso dos nutracêuticos, dispensar algumas etapas de extração ou purificação, que podem causar efeitos colaterais (devido a concentração de possíveis espécies tóxicas ao organismo) e que agregam mais custo ao produto final.

5.5.2 Atividade Bactericida

As micropartículas modificadas por extrato de alho, assim como as micropartículas de carbonato de cálcio puras, foram usadas em testes de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM), em duas espécies de bactérias gram-positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (Figura 29), e duas gram-negativa: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e *Escherichia coli* ATCC 11303 (Figura 30).

As micropartículas de alho exibiram atividade bactericida em concentrações superiores a 62.5 µg/mL (125 e 250 µg/mL) em colônias de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, e em concentrações superiores a 125 µg/mL (250 µg/mL) em colônias de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, ambas gram-positivas, enquanto que o carbonato de cálcio puro não exibiu atividade significativa em nenhuma das quatro culturas de bactérias cultivadas, em nenhuma concentração estudada (máxima de 250 µg/mL). Estes resultados diferem dos resultados publicados na literatura pois, de maneira geral, as bactérias gram-negativas são mais sensíveis ao alho do que as bactérias gram-positivas, como comprova o experimento realizado por Perry e colaboradores [67], que estudaram o a atividade bactericida do extrato, com ampicilina como controle, usando a técnica de AFM (*Atomic Force Microscopy*). O tratamento de uma cultura de *Escherichia coli* com uma solução de alho (25 mg/mL)

por 12 horas causa uma alteração na bactéria, fazendo-as perder a forma de bacilo, a se agruparem e causar danos a sua parede celular, permitindo o vazamento do citoplasma. Os autores também relatam que as bactérias *Staphylococcus aureus* tem uma parede celular mais espessa, com menor conteúdo de lipídeos e maior quantidade de polissacarídeos, se comparada a parede celular da *Escherichia coli*

Os compostos tiosulfatos, produtos da reação enzimática da alliinase com os aminoácidos alliina e metiina, são os mais citados na literatura como protagonistas da atividade bactericida do alho. A allicina, um destes tiosulfatos, possui cerca de 1% da potencia da penicilina (antibiótico bastante conhecido), porém, com a vantagem de atuar em bactérias gram-positivas e gram-negativas [6]. Como o extrato de alho utilizado na síntese das micropartículas, foi preparado com uma metodologia que favorece a extração dos aminoácidos (alliina, metiina, etc), impedindo a reação enzimática (extração ácida), obteve-se um resultado inferior aos dados da literatura, necessitando de uma dose mais elevada para alcançar o efeito das substancias isoladas, devida a baixa concentração destes tiosulfatos no extrato de alho preparado.

Figura 29: Gráfico em histograma da atividade bactericida das micropartículas de alho, e carbonato de cálcio livre em colônias das bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

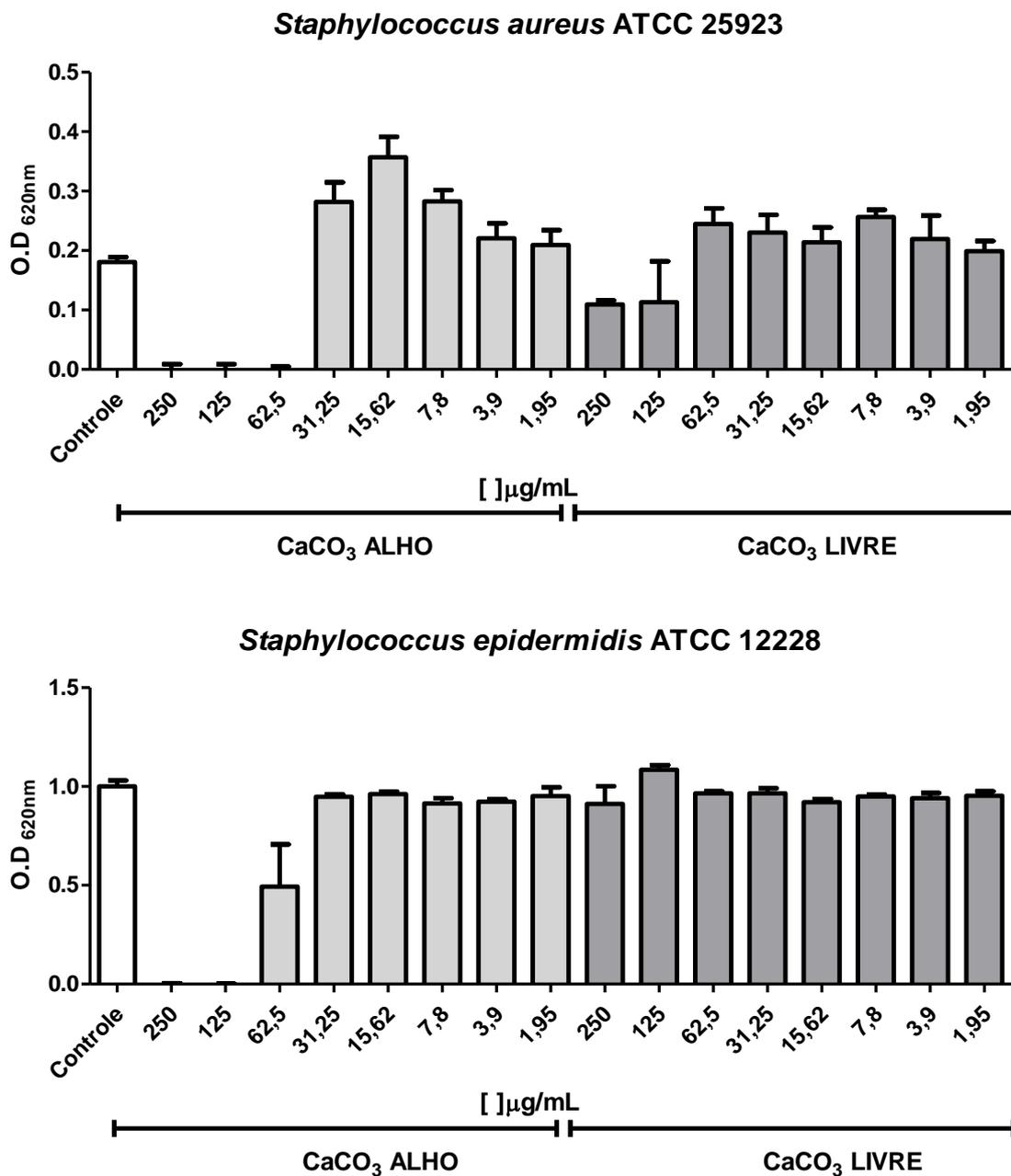
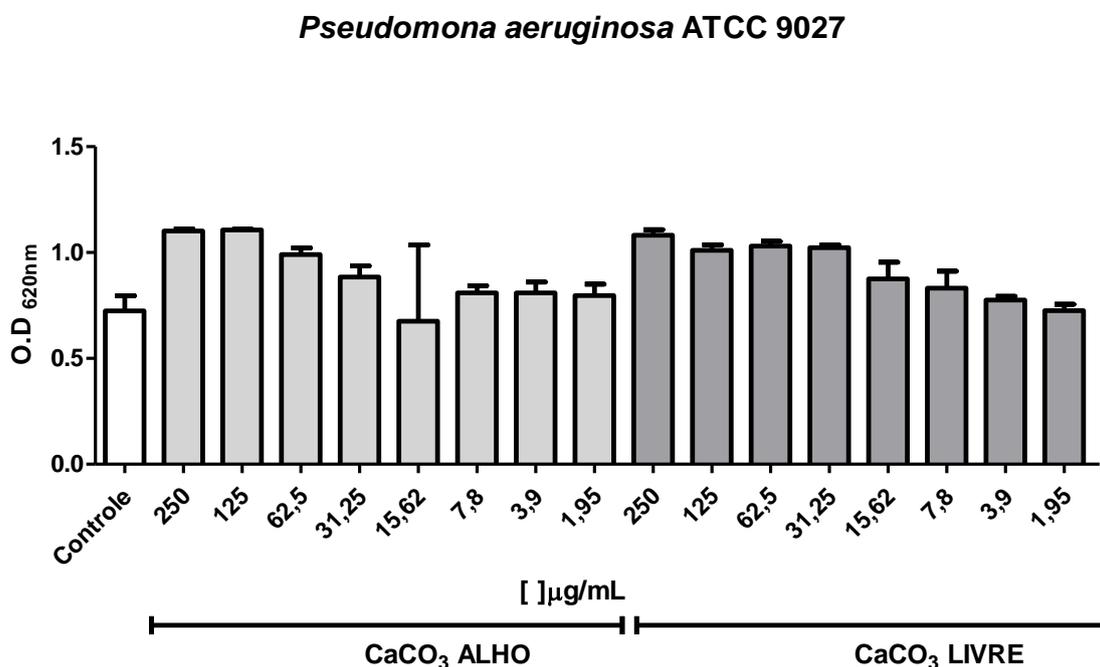
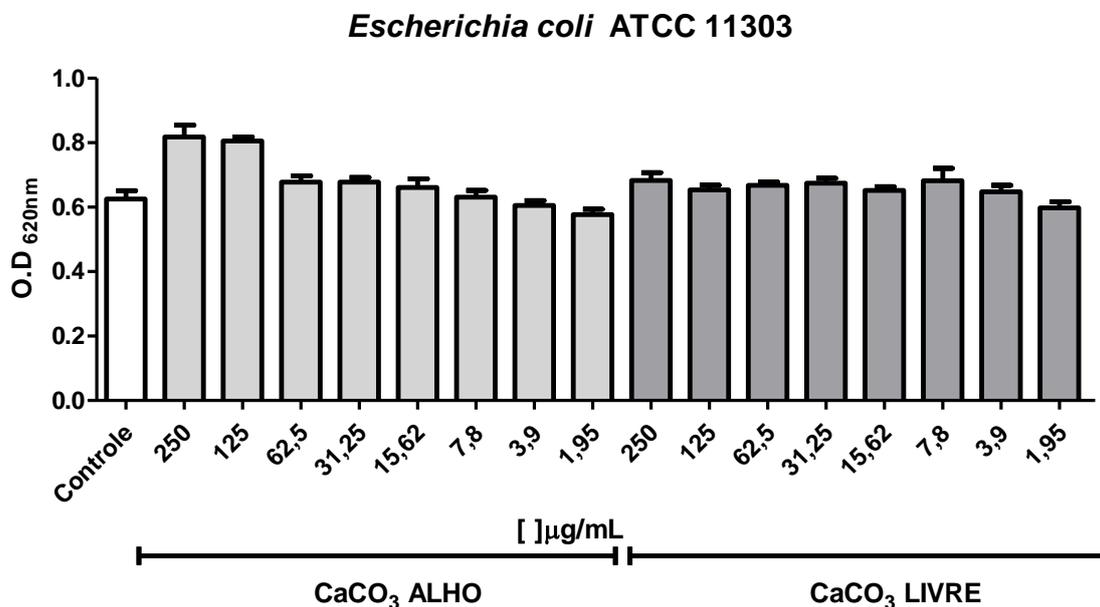


Figura 30: Gráfico em histograma da atividade bactericida das micropartículas de alho, e carbonato de cálcio livre em colônias das bactérias Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e *Escherichia coli* ATCC 11303.



6 CONCLUSÕES

No presente trabalho, cálculos computacionais usando o formalismo da Teoria do Funcional da Densidade (DFT) foram usadas com sucesso para descrever as propriedades estruturais e vibracionais da aliina e da metiina. A metodologia de cálculo usando o princípio da Teoria do Funcional Densidade mostrou a ótima correlação obtida entre os espectros calculados destas moléculas, para região do infravermelho e para o Raman, e os correspondentes espectros experimentais. Adicionalmente, este estudo permitiu identificar às principais bandas de absorção da aliina e que foram observadas experimentalmente em: 989, 1018, 1390, 1430, 1519, 1592, 1637 cm^{-1} , no espectro na região do infravermelho, e em 588, 693, 744, 790, 1404, 1429, 1693 cm^{-1} , no espectro RAMAN, como sendo devido aos grupos funcionais sulfóxido, amino e carboxila.

Os espectros teóricos, Infravermelho e Raman, da molécula de metiina foram calculados para explicar seus espectros experimentais, publicados no trabalho pioneiro de Xial e colaboradores. As principais absorções foram observadas em: 676, 702, 803, 846, 893, 960, 1011, 1314 e 1344 cm^{-1} no espectro Raman e: 971, 1481, 1551, 1568, 1644 cm^{-1} no Infravermelho, tais absorções foram associadas aos modos teóricos: 690, 714, 819, 857, 890, 958, 999, 1329, 1348 cm^{-1} e: 982, 1468, 1619, 1662 e 1721 cm^{-1} . Os dados espectroscópicos das moléculas de aliina, metiina e allicina foram usados para avaliar o espectro do extrato de alho liofilizado produzido em laboratório, caracterizando a presença destas moléculas.

Por fim, os estudos das propriedades vibracionais sugere que esta metodologia pode ser usada no controle de qualidade de extrato aquoso de alho na prática industrial e farmacêutica, como, por exemplo, a identificação do modo vibracional relacionado com o grupo aliila ($\omega_{\text{exp}} = 1693 \text{ cm}^{-1}$, $\omega_{\text{the}} 1725 \text{ cm}^{-1}$) presente em alguns compostos organossulfurados, responsável por muitas das atividades dos destes compostos, que serve como parâmetro de avaliação da atividade anticâncer destes suplementos nutricionais.

Adicionalmente, os estudos de interação da aliina com partículas de carbonato de cálcio sugerem a adsorção de múltiplas camadas, o que favorece uma

melhor liberação dos nutracêuticos no organismo preservando sua biodisponibilidade e diminuindo seus possíveis efeitos colaterais.

Os testes biológicos realizados com as micropartículas modificadas com extrato de alho, mostraram atividade inibitória nas três linhagens de células tumorais estudadas (glioblastoma, câncer de ovário e câncer colorretal humanos) e atividade bactericida em colônias de bactérias Gram-positivas em concentrações de 62.5 mg/mL (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) e 125 mg/mL (*Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228), provando seu efeito sinérgico e a capacidade do carbonato de cálcio para entrega de droga. Estes resultados demonstram o potencial de aplicação na prática farmacêutica do uso de micropartículas de carbonato de cálcio modificadas com extrato de alho para combate a células tumorais e a ações bactericidas

APÊNDICE A

A.1 Mecânica Molecular

A.1.1 Campo de Força Clássico

O modelo de campo de força atômico descreve os sistemas físicos como um conjunto de átomos unidos por forças interatômicas. Particularmente, ligações químicas resultam do tipo de interação atômica que contribuem para a formação de uma molécula. A interação é descrita pelo potencial $U(r_1, \dots, r_N)$, que representa a energia potencial de N átomos interagindo em função de suas posições cartesianas $r_i = (x_i, y_i, z_i)$. Dado um potencial, a força que atua sobre um átomo i é determinado pelo seu gradiente em relação ao seu deslocamento.

$$F_i = -\nabla_{r_i} U(r_1, \dots, r_N) = -\left(\frac{\partial U}{\partial x_i}, \frac{\partial U}{\partial y_i}, \frac{\partial U}{\partial z_i}\right) \quad [1]$$

A noção de “átomos em moléculas” é apenas uma aproximação do formalismo quântico no qual moléculas são compostas por interações de elétrons e núcleos, no qual os elétrons estão deslocalizados e compartilhados por vários núcleos, resultando em uma nuvem eletrônica que dá origem à ligação química. O problema de achar um modelo de potencial realístico, que possa mimetizar as verdadeiras superfícies energéticas não é uma tarefa fácil. Os modelos de campo de força atômicos e de dinâmica molecular clássica são baseados em potenciais empíricos com uma funcional específico.

$$U(r_1, \dots, r_N) = \sum_{bonds} \frac{a_i}{2} (l_i - l_{i0})^2 + \sum_{angles} \frac{b_i}{2} (\theta_i - \theta_{i0})^2 + \sum_{torsion} \frac{c_i}{2} [1 - \cos(n\omega_i - \gamma_i)] \\ + \sum_{atom\ pairs} 4\varepsilon_{ij} \left(\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right) + \sum_{atom\ pairs} k \frac{q_i q_j}{r_{ij}}$$

Fisicamente, os dois primeiros termos descrevem energias de deformação dos comprimentos de ligação l_i e ângulos de ligação θ_i dos seus respectivos valores de equilíbrio l_{i0} e θ_{i0} . A forma harmônica destes termos (com a adição das constantes de força a_i e b_i) assegura a precisão na estrutura química das moléculas, mas impossibilita a simulação de eventos químicos como quebras ou formação de ligações. O terceiro termo descrever rotações em torno da ligação química, que são descritos por termos periódicos de energia. O quarto termo descreve as forças de Van der Waals repulsivas e atrativas na forma do potencial de Lennard-Jones, e o último termo é a própria lei de Coulomb.

A.1.2 Dinâmica Molecular Clássica

Na dinâmica molecular clássica, a evolução de um sistema constituído de partículas interagindo entre si, é descrito pelas soluções da equação de movimento de Newton, onde $r_i(t) = (x_i(t), y_i(t), z_i(t))$ é o vetor posição de uma partícula i de massa m_i e F_i é a força atuando nesta partícula em um instante t .

$$F_i = m_i \frac{d^2 r_i(t)}{dt^2} \quad [3]$$

Para integrar esta equação diferencial de segunda ordem, a força atuando nas partículas, assim como suas posições e velocidades iniciais, deve ser especificada. Devida à natureza de muitos corpos deste tipo de problema, esta equação de movimento é resolvida numericamente. As trajetórias são definidas pelas velocidades e pelo vetor posição e eles descrevem a evolução temporal do sistema no espaço. A medida que as partículas se movem, suas trajetórias são mostradas e analisadas, podendo nos fornecer várias propriedades a nível molecular.

A.1.3 Integração das Equações de Movimento

O objetivo de integrar numericamente as equações de movimento de Newton, é encontrar uma expressão que define a posição $r_i(t + \Delta t)$ em um tempo $t + \Delta t$ em termos de uma posição já conhecida, em um tempo t . Por causa da simplicidade e estabilidade, o algoritmo de Verlet é bastante utilizado em simulações de dinâmica molecular. A equação deste algoritmo pode ser derivada da expansão de Taylor na posição r_i :

$$r_i(t + \Delta t) \cong 2r_i(t) - r_i(t - \Delta t) + \frac{F_i(t)}{m_i} \Delta t^2 \quad [4]$$

A trajetória exata de uma partícula corresponderia no limite de um passo de integração infinitesimal, porém, é desejável o uso de um largo número de passos para que se possam simular trajetórias mais longas. Na prática Δt é determinado por rápidos movimentos no sistema, e ligações envolvendo átomos leves vibram com períodos de vários femtossegundos, logo Δt deve ser de uma escala menor que femtossegundos para assegurar uma convergência na integração.

A.2 Mecânica Quântica

A.2.1 Teoria do Funcional da Densidade

A teoria do funcional da densidade (*Density Functional Theory* – DFT) é o método mais amplamente utilizado para o estudo da estrutura eletrônica de sólidos e moléculas. Muitos problemas abordados usando métodos *ab initio* pós-Hartree-Fock podem ser resolvidos utilizando-se DFT sem perda de acurácia. De fato, sistemas com até centenas de átomos podem ser estudados e suas propriedades previstas podem ser comparadas com dados experimentais a um custo computacional que corresponde a uma fração do usado para aplicar métodos tradicionais que incluem a energia de correlação eletrônica como, por exemplo, teoria da perturbação e métodos *coupled cluster*. O desenvolvimento de funcionais de troca e correlação

mais precisos e de algoritmos eficientes de integração numérica impulsionaram fortemente a adoção de simulações DFT em física da matéria condensada e química quântica.

O uso da densidade eletrônica, $\rho(r)$, como variável básica na descrição de um sistema eletrônico remonta ao início do século XX, quando Drude (1900) aplicou a teoria dos gases a um metal, considerando este como um gás homogêneo de elétrons, para desenvolver a sua teoria sob condução térmica e elétrica. Desde então vários modelos (Drude, Drude-Sommerfeld, Thomas-Fermi, Thomas-Fermi-Dirac) foram propostos e aperfeiçoados. O modelo de Thomas-Fermi utiliza-se de argumentos estatísticos para aproximar a distribuição de um gás de elétrons e desenvolver o funcional da energia do sistema usando a densidade eletrônica. Esse modelo foi, em seguida, aperfeiçoado para incluir a energia de troca para um gás de elétrons desenvolvida por Dirac. O Funcional da energia E de Thomas-Fermi-Dirac (TFD) é dado por:

$$E_{TFD}(\rho) = C_F \int \rho(r)^{\frac{5}{3}} + \int \rho(r)v(r)dr + \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(r_1)\rho(r_2)}{|r_1 - r_2|} dr_1 dr_2 - C_x \int \rho(r)^{\frac{3}{4}} dr \quad [5]$$

Onde:

$$C_F = \frac{3}{10} (3\pi^2)^{\frac{2}{3}} \text{ e } C_x = \frac{3}{4} \left(\frac{3}{\pi}\right)^{\frac{1}{3}} \quad [6]$$

Na equação [5] os quatro termos da direita, correspondem, respectivamente a energia cinética, ao potencial externo, ao potencial de coulomb e a energia de troca. Os termos ρ e r são respectivamente a densidade eletrônica e as coordenadas espaciais.

A publicação de dois teoremas por Hohenberg e Kohn em 1964, consolidou o uso da densidade eletrônica, $\rho(r)$, como variável básica e lançou os fundamentos da teoria do funcional da densidade moderna. A partir do formalismo de Hohenberg e Kohn, conceitos importantes na descrição química, tais como: potencial químico, dureza química, além dos princípios dos ácidos e bases de Pearson, e o da equalização da eletronegatividade de Sanderson, podem ser calculados, em

princípio de modo exato. Kohn e Shan, em 1965, propuseram uma forma de aproximar o funcional da energia eletrônica, o método KS, que permitiu a implementação prática de cálculos DFT.

O desenvolvimento da metodologia computacional para fazer cálculos no formalismo da teoria do funcional da densidade, leva a equações matemáticas semelhantes as equações Hartree-Fock-Roothan. Porém, apesar da semelhança, os resultados de cálculos DFT incorporam a correlação eletrônica em certa medida, por conta da inexatidão dos funcionais.

A.2.1.1 Teoremas de Hohenberg e Kohn

O Hamiltoniano de um sistema eletrônico molecular com M núcleos e N elétrons, na aproximação e Born-Oppenheimer, desprezando-se os efeitos relativísticos, é dado, em unidades atômicas, por:

$$\widehat{H}_{BO} = - \underbrace{\sum_i^N \frac{1}{2} \nabla_i^2}_{\widehat{T}} - \underbrace{\sum_A^M \sum_i^N \frac{Z_A}{|R_A - r_i|}}_{\widehat{U}} + \underbrace{\sum_{i < j}^N \sum_j^N \frac{1}{|r_i - r_j|}}_{\widehat{V}_e} + \underbrace{\sum_{B < A}^M \sum_A^N \frac{Z_A Z_B}{|R_A - R_B|}}_{E_{rep}} \quad [7]$$

Onde i e j são índices que especificam os elétrons do sistema, A e B especificam os núcleos atômicos, r_i e R_A , as coordenadas, respectivamente, do elétron i e do núcleo A , e Z_A é o número atômico do átomo A . Na mesma equação \widehat{T} é o operador energia cinética, \widehat{V}_e é o operador que representa a energia potencial repulsiva elétron-elétron e \widehat{U} é o potencial externo que atua sobre os elétrons devido as cargas nucleares, Z_A :

$$\widehat{U} = \sum_A^M \sum_i^N - \frac{Z_A}{|R_A - r_i|} = \sum_i^N v(r_i) \quad [8]$$

A densidade eletrônica é descrita por:

$$\rho(r) = \int \dots \int \Psi(r_1, r_2, \dots, r_N) * \Psi(r_1, r_2, \dots, r_N) dr_1 dr_2 \dots dr_N \quad [9]$$

Onde $\Psi(r_1, r_2, \dots, r_N)$ é o estado fundamental do sistema. A energia total do sistema é dada então por:

$$E_0 = \int \Psi(r_1, r_2, \dots, r_N) * \widehat{H}_{BO} \Psi(r_1, r_2, \dots, r_N) dr_1 dr_2 \dots dr_N = \langle \Psi | \widehat{H}_{BO} | \Psi \rangle \quad [10]$$

O Potencial externo pode ser separado em um funcional trivial da densidade eletrônica e nesse caso, a energia total do estado fundamental eletrônico é descrito da seguinte forma:

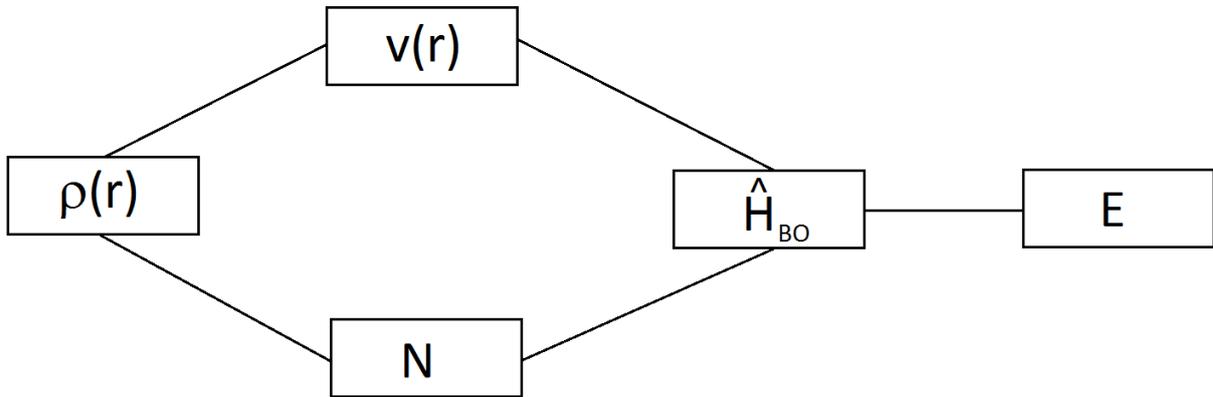
$$E_0 = \langle \Psi | \widehat{T} + \widehat{V}_e | \Psi \rangle + \int \rho(r) v(r) dr \quad [11]$$

O hamiltoniano do sistema de muitos elétrons é definido pelo número de elétrons N , e pelo potencial externo no qual os elétrons se movem.

A.2.1.2 O Primeiro Teorema de Hohenberg e Kohn

O primeiro teorema de Hohenberg Kohn (HK) estabelece que o potencial externo é um funcional único de $\rho(r)$ a menos de uma constante aditiva. Em outras palavras, ele prova que a densidade eletrônica de um sistema determina o potencial externo junto com o número de elétrons, N , sendo possível a partir daí, portanto, encontrar o hamiltoniano do sistema. Na Figura A.1 está representada a interdependência das variáveis básicas do primeiro teorema:

Figura A1. Interdependência das variáveis básicas DFT no primeiro teorema de Hohenberg-Kohn



Como a energia do sistema é calculada mediante a resolução da equação de Schrödinger, $\widehat{H}_{BO}\Psi = E\Psi$, a energia de um sistema eletrônico é determinada pela densidade eletrônica $\rho(r)$, ou seja:

$$E = E_\nu(\rho) \quad [12]$$

O índice ν é colocado para explicar a dependência no potencial externo $\nu(r)$.

A.2.1.3 O Segundo Teorema de Hohenberg e Kohn

O segundo teorema de HK estabelece que, para qualquer aproximação da densidade eletrônica, $\tilde{\rho}(r)$ com $\tilde{\rho}(r) \geq 0$ e $\int \tilde{\rho}(r)dr = N$, a energia total no estado fundamental será sempre maior ou igual a energia exata do sistema, ou seja:

$$E|\rho| \geq E|\rho_0| = E_0 \quad [13]$$

Pode-se, então, definir um funcional universal:

$$F|\rho| = \langle \Psi | \hat{T} + \hat{V}_e | \Psi \rangle \quad [14]$$

Pois \hat{T} e \hat{V}_e são comuns a todos os sistemas eletrônicos. É preciso observar que $\tilde{\rho}(r)$ define seu próprio $\tilde{v}(r)$ e, conseqüentemente, o Hamiltoniano \tilde{H} e $\tilde{\Psi}(r_1, r_2, \dots, r_N)$. Pode-se usar uma função $\tilde{\Psi}(r_1, r_2, \dots, r_N)$ para aproximar o estado fundamental para

o sistema submetido ao potencial externo $v(r)$. De acordo com o princípio variacional temos:

$$E_0 = E_v(\rho) = F(\rho) + \int \rho(r)v(r)dr \leq E_v(\tilde{\rho}) = F(\tilde{\rho}) + \int \tilde{\rho}(r)v(r)dr \quad [15]$$

Os dois teoremas de HK provam que é possível achar o estado fundamental de um sistema eletrônico submetido a um potencial externo usando a densidade eletrônica tridimensional como variável básica em vez da função de onda de N -elétrons, que é muito mais complicada.

Para a maioria dos problemas químicos em que o cálculo da estrutura eletrônica é necessário, o potencial externo pode ser determinado ou uma aproximação razoável pode ser proposta. O segundo teorema de HK fornece uma estratégia para se determinar a estrutura eletrônica: o princípio variacional. Porém, dada uma densidade eletrônica tentativa, $\tilde{\rho}(r)$ como se pode garantir que $\tilde{\rho}(r)$ é v -representável? Isto é, como é possível assegurar que $\tilde{\rho}(r)$ determina o verdadeiro potencial externo? Uma outra questão surge quando se considera a N -representatividade da densidade eletrônica. Diz-se que a densidade eletrônica é N -representável se ela pode ser obtida a partir de uma função de onda antissimétrica. Ou seja, a densidade eletrônica, dada pela equação [9], deve produzir uma função de onda antissimétrica de muitos corpos $\Psi(r_1, r_2, \dots, r_N)$. Essa condição é mais fácil de se garantir e uma densidade eletrônica tentativa razoável é N -representável se forem satisfeitas estas condições:

$$\begin{aligned} \rho(r) &\geq 0 \\ \int \rho(r)dr &= N \\ \int \left| \nabla \rho(r)^{\frac{1}{2}} \right|^2 dr &< \infty \end{aligned}$$

O problema da v -representatividade pode ser contornado por meio da busca restrita de Levy (*Levy constrained Search*). Segundo Parr e Yang.

$$F(\rho) = \langle \Psi_0 | \hat{T} + \hat{V}_e | \Psi_0 \rangle = \min_{\psi \rightarrow \rho} \langle \Psi | \hat{T} + \hat{V}_e | \Psi \rangle \quad [16]$$

Ou sejam a procura restrita consiste em testar todas as densidades tentativas e, para cada uma delas, encontrar as funções de onda que minimizem $F(\rho)$ e que gerem aquela densidade eletrônica. Substituindo a Equação [16] na Equação [15] encontramos:

$$E_0 = \min_{\rho} \left\{ \min_{\psi \rightarrow \rho} \langle \Psi | \hat{T} + \hat{V}_e | \Psi \rangle + \int \rho(r)v(r)dr \right\} = \min_{\rho} E_v(\rho) \quad [17]$$

A minimização interna está restrita a todas funções de onda Ψ que dão origem à mesma densidade ρ , assim como a minimização externa é feita com base em todas as funções possíveis ρ .

A.2.2 As Equações de Kohn-Sham

A densidade eletrônica do estado fundamental satisfaz o principio estacionário tal como requerido pelo principio variacional, dado pela Equação [15]

$$\delta \left\{ E_v(\rho) - \mu \left[\int \rho(r)dr - N \right] \right\} = 0 \quad [18]$$

O multiplicador de Lagrange, μ , é o potencial químico eletrônico, o qual quantifica a tendência dos elétrons de escaparem do sistema em equilíbrio.

Kohn e Sham reescreveram a equação da energia total, tornando explícita a repulsão elétron-elétron de Coulomb e definindo uma nova função universal $G(\rho)$:

$$E_v = G(\rho) + \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(r_1)\rho(r_2)}{|r_1 - r_2|} dr_1 dr_2 + \int \rho(r)v(r)dr \quad [19]$$

Em que:

$$G(\rho) = T_s(\rho) + E_{xc}(\rho) \quad [20]$$

Onde $T_s(\rho)$ é o funcional de energia cinética de um sistema de elétrons que não interagem, mas que tem a mesma densidade eletrônica do sistema de elétrons interagentes. $E_{xc}(\rho)$ inclui não só o termo de interação elétron-elétron não-classica (troca e correlação) mas também a parte residual da energia cinética, $T(\rho) - T_s(\rho)$, em que $T(\rho)$ é a energia cinética exata para o sistema de elétrons interagentes.

De acordo com Kohn e Sham, o sistema de referência de elétrons não-interagentes possui um hamiltoniano com potencial local efetivo $v_{ef}(r)$:

$$H^{KS} = \frac{1}{2}\nabla^2 + v_{ef}(r) \quad [21]$$

Para achar a função de onda Ψ^{KS} do estado fundamental do sistema de referencia de elétrons não-interagentes, descrito pelo hamiltoniano acima, deve-se utilizar uma aproximação parecida com a do método Hartree-Fock. A função de onda Ψ^{KS} é escrita como um produto antissimétrico de N funções de onda de um elétrons, $\Psi_i(r_i)$, de acordo com o determinante de Slater:

$$\Psi^{KS} = \frac{1}{\sqrt{N!}} \begin{vmatrix} \psi_1^{KS}(r_1) & \psi_2^{KS}(r_1) & \cdots & \psi_N^{KS}(r_1) \\ \psi_1^{KS}(r_2) & \psi_2^{KS}(r_2) & \cdots & \psi_N^{KS}(r_2) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \psi_1^{KS}(r_N) & \psi_2^{KS}(r_N) & \cdots & \psi_N^{KS}(r_N) \end{vmatrix} \quad [22]$$

Os orbitais Koh-Sham (KS) ψ_i^{KS} , são obtidos a partir da equação de Schrödinger de um elétrons:

$$\left(-\frac{1}{2}\nabla^2 + v_{et}\right)\psi_i^{KS} = \varepsilon_i\psi_i^{KS} \quad [23]$$

A conexão entre esse sistema hipotético e o sistema real pode ser estabelecida escolhendo-se o potencial efetivo de forma que a densidade eletrônica resultante seja igual a densidade eletrônica do estado fundamental:

$$\rho_s(r) = \sum_i^N 2|\psi_i^{KS}(r)|^2 = \rho_0(r) \quad [24]$$

A energia cinética é calculada mediante um procedimento autoconsistente:

$$T_s(\rho) = \sum_i^N \left\langle \psi_i^{KS} \left| -\frac{1}{2} \nabla_i^2 \right| \psi_i^{KS} \right\rangle \quad [25]$$

O potencial efetivo é obtido minimizando-se a expressão da energia, com a restrição de que as funções de um elétron sejam ortonormais, ou seja $\langle \psi_i^{KS} | \psi_j^{KS} \rangle = \delta_{ij}$:

$$v_{ef}(r) = v(r) + \int \frac{\rho(r_1)}{|r - r_1|} dr_1 + v_{xc}(r) \quad [26]$$

Em que:

$$v_{xc} = \frac{\delta E_{xc}(\rho)}{\delta \rho(r)} \quad [27]$$

É o potencial de troca e correlação. As Equações 23, 26 e 27 definem o esquema de Kohn-Sham autoconsistente – KS-SCF, (*Kohn Sham Self Consistent Field*), como o potencial efetivo $v_{ef}(r)$ dependa da densidade eletrônica, $\rho(r)$, as equações de Kohn-Sham são resolvidas por meio de um procedimento autoconsistente.

A.2.4 Funcionais de troca e correlação

A.2.4.1 Aproximação da Densidade Local (LDA)

A base da LDA está em considerar a energia de troca e correlação E_{xc} para um sistema de densidade $\rho(r)$ como sendo a energia de troca e correlação para um gás de elétrons uniforme com a mesma densidade, que é conhecida de forma precisa. Ela ainda supõe que a densidade varia suavemente nas proximidades de r , ou seja, a energia de troca e correlação de um elétron em um dado ponto

depende da densidade eletrônica nesse ponto, em vez de depender da densidade eletrônica em todos os pontos do espaço. Dessa forma a energia de troca e correlação será escrita como:

$$E_{xc}\rho(r) = \int \rho(r)\varepsilon_{xc}^h\rho(r)dr \quad [28]$$

E o potencial v_{xc} :

$$v_{xc}\rho(r) = \frac{d}{d\rho(r)}\left(\rho(r)\varepsilon_{xc}^h\rho(r)\right) \quad [29]$$

Uma das sugestões para o calculo da E_{xc} , é separar os termos de troca (que para o caso do gás homogêneo pode ser obtido facilmente) e de correlação, assim teremos:

$$E_{xc}\rho(r) \cong E_{xc}^{LDA}\rho(r) = \int \rho(r)[\varepsilon_x\rho(r) + \varepsilon_c\rho(r)]dr \quad [30]$$

Uma extensão da LDA para casos não restritos ou para sistemas de camadas abertas (ou seja, sistema em que a configuração eletrônica apresenta elétrons não emparelhados) leva à aproximação da densidade de spin local LSDA (Local Spin-Density Approximation). Para incluir esse efeito, consideraremos a função do spin $\xi(\sigma)$, que pode ser escrita da forma:

$$E_{xc}^{LSDA}\left(\rho_\alpha(r),\rho_\beta(r)\right) = \int \rho(r)\varepsilon_{xc}\left(\rho_\alpha(r),\rho_\beta(r)\right)dr \quad [31]$$

Em que uma correção análoga a Equação [30] pode ser feita. Ainda pode-se usar a distribuição de densidade de spin para descrever onde os elétrons $\alpha(\uparrow)$ e $\beta(\downarrow)$ estão localizados em um dado sistema, ou seja calcular a diferença $\rho_\alpha(r)-\rho_\beta(r)$. Assim, em um sistema em que todos os elétrons estão emparelhados, a densidade de spin

é zero em todos os pontos do espaço, enquanto que qualquer sistema que contenha elétrons desemparelhados irá mostrar regiões de densidade de spin não nulas.

A.2.4.2 Aproximação do Gradiente Generalizado (GGA)

Em sistemas que apresentam na densidade eletrônica $\rho(r)$ heterogeneidades significativas, métodos baseados na aproximação local da densidade (LDA e LSDA) não oferecem a precisão desejada (como ocorre para a maior parte das aplicações na química e na biologia), levando a erros de forma não sistemática, por exemplo, nos comprimentos e nas energias de ligação. Um avanço, no sentido de resolver essa pendência que a LDA deixa, consiste em introduzir a dependência com o gradiente da densidade $\rho(r)$ na expressão do funcional dado pela Equação [28] para um sistema de camada aberta, esse funcional pode ser genericamente escrito da seguinte forma:

$$E_{xc}^{GGA}(\rho_\alpha(r), \rho_\beta(r)) = \int f(\rho_\alpha(r), \rho_\beta(r), \nabla\rho_\alpha(r), \nabla\rho_\beta(r)) dr \quad [32]$$

Também no formalismo da GGA, o funcional E_{xc}^{GGA} é geralmente dividido em duas partes, uma contendo os termos do funcional de troca E_x^{GGA} e a outra, do funcional de correlação E_c^{GGA} . Na publicação de Filippi et al., em 1994, é feita uma comparação entre funcionais de densidade exatos e aproximados para um modelo que pode ser resolvido exatamente usando alguns funcionais mais utilizados.

Existem também os chamados funcionais híbridos, que são formados a partir de uma mistura de uma fração do termo de troca de Hartree-Fock no funcional de troca da DFT, a partir de dados experimentais para sistemas moleculares conhecidos, contendo parâmetros ajustáveis. O uso desses funcionais faz com que alguns autores questionem a DFT como sendo uma teoria de primeiros princípios ou *ab initio*. Para referências podemos citar alguns funcionais mais conhecidos [68-77].

Embora o uso da GGA melhore consideravelmente a descrição de ligações (principalmente ligações de hidrogênio) quando comparado com a LDA sem que

haja um aumento proibitivo do custo computacional, a descrição de ligações fracas (Forças de Van der Waals) permanece problemática.

Vibrational Profile of the Garlic's Bioactive Organosulfur Compound Alliin

Leonardo Farias Serafim, ^{a*} Pedro de Lima-Neto, ^a Pedro Jataí, ^b Otília D. L. Pessoa, ^b Francisco Adilson M. Sales, ^c Ewerton Wagner Santos Caetano, ^d Valder Nogueira Freire ^c

^a Departamento de Química Analítica e Físico-Química, Universidade Federal do Ceará, 60440-900 Fortaleza, CE Brazil

^b Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, 60440-900 Fortaleza, CE Brazil

^c Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará, 60455-760 Fortaleza, CE, Brazil.

^d Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, 60040-531 Fortaleza, CE, Brazil.

* Correspondence to: Leonardo Farias Serafim, Departamento de Química Analítica e Físico-Química, Universidade Federal do Ceará, 60440-900 Fortaleza, CE Brazil. E-mail: leoserafim89@gmail.com

Abstract

The infrared (IR) and Raman spectra of the most abundant organosulfur compound present in intact garlic, alliin, were measured. In order to interpret them, density functional theory (DFT) calculations of the isolated gas phase molecule were performed using the polarized continuum model to take solvation into account. The wavenumbers of the alliin vibrational modes were computed using the DFT M06-2X hybrid functional and a 6-311++G(d,p) basis set. Normal mode assignments were made combining visual inspection of the atomic displacements with data from the potential energy distribution (PED). A comparison between the DFT-calculated IR and Raman spectra of the lowest energy conformer and experiment unveiled relevant vibrational group signatures in the 400-1800 cm⁻¹ wavenumber range, with infrared absorption bands at 1637, 1592, 1519, 1430, 1397, 1390, 1357 and 1018 cm⁻¹ related to carboxyl, amine and sulfoxide group vibrations. The Raman spectrum reveals intense lines at 1643, 1404, 744, 693 and 619 cm⁻¹, which are due to the carboxyl, sulfoxide and also the terminal allyl groups. The obtained vibrational spectra were employed to identify alliin molecular fingerprints in a commercial garlic extract sample.

Keywords: Garlic; Alliin; Density functional theory; Infrared; Raman

Introduction

Through the centuries, humankind has explored the potential benefits of the *Allium* genus, which include garlic, onion, leek, scallion, shallot and chive. Garlic, in particular, was part of the daily diet since ancient times, especially for the working class since it was believed to provide more strength, improving work performance [1, 2]. Garlic is also used in many cultures as a medicinal plant, a disease-preventive medicinal food with hypolipidemic, antiplatelet, and pro-circulatory effects [3]. It acts against cold and flu symptoms through immune enhancement, and exhibits anticancer and chemopreventive activities - as a matter of fact, there is evidence that garlic inhibits the growth of cancer tumor cells (enhanced garlic consumption is closely related with reduced cancer incidence) [4], although the mechanism behind this effect is not completely understood. Finally, several clinical reports and meta-analyses revealed cholesterol-lowering effects of garlic supplementation in humans [5,6] (half to one clove of garlic may have a cholesterol-lowering effect of up to 9% [7] due to the presence of saponins which inhibit cholesterol intestinal absorption [8]).

The major part of garlic composition is water, and the bulk of its dry weight is due to fructose-containing carbohydrates followed by sulfur compounds, protein, fibers and free amino acids. Garlic also contains high levels of saponins, phosphorus, potassium, sulfur, zinc, moderate levels of selenium and vitamins A and C, and low levels of calcium, magnesium, sodium, iron, manganese and B-complex vitamins [9]. The unique garlic organosulfur compounds provide its typical flavor and odor and are essentially involved in its remarkable medicinal properties. The major organosulfur compounds in intact garlic are γ -Glutamyl-S-allyl-L-cysteines and S-allyl-L-cysteine sulfoxides [10, 11]. Recently, an analytical method with a rapid and simple sample preparation was reported quantifying four sulfoxides and three γ -Glutamyl peptides in garlic, where their compounds were simply extracted with 90% methanol solution and prepared for analysis by high-performance liquid chromatography. The main organosulfur compounds in garlic powder are Alliin, (19.8 mg/g); Isoalliin, (0.967 mg/g); Methiin, (1.157 mg/g); Cycloalliin, (0.795 mg/g), GSAC – γ -L-Glutamyl-S-(2-propenyl)-L-cysteine, (3.54 mg/g); GSPC – γ -L-Glutamyl-S-(*trans*-1-propenyl)-L-

cysteine, (5.02 mg/g); and GSMC – γ -L-Glutamyl-S-methyl-L-cysteine, (0.231 mg/g)^[12]. Different processing methods and extract preparation procedures directly impact the final concentration of garlic chemical constituents ^[13], but in practically all cases alliin is the most abundant and important organosulfur compound present in intact garlic. It is also the main substrate for alliinase (a vacuolar enzyme that is released when garlic is smashed or cut), which converts alliin into allicin, a poorly water soluble thiosulfinate responsible for the fresh garlic aroma ^[14]. Due to its instability, allicin can rapidly decompose into other thiosulfates which may also have medicinal properties ^[15, 16].

Due to the garlic medicinal applications, there are many garlic supplements in the international market such as essential and macerate oils, aged extracts and powders. For the later, it is known from bioavailability studies that they release allicin at a level equivalent to that observed for crushed raw garlic ^[5]. However, since allicin is thought to be a transient compound, it rapidly decomposed into other sulphur-containing compounds (meaning that it is not a genuinely active principle of garlic) ^[5, 13]. It is important to have a way to probe the constituents of garlic supplements. In this respect, vibrational spectroscopy is a very practical method due to its low cost and fast/non-destructive sample preparation techniques. However, in the case of garlic, detailed studies on the vibrational features behind the infrared and Raman spectra of their main chemical constituents alliin, methiin, allicin, etc. must be carried out. Indeed, despite the medicinal properties of allium species have been studied for centuries, there are only two works ^[17,18] with limited information on the vibrational spectroscopic (FT-IR and FT-Raman) characterization of alliin.

The first work, by Abbehausen *et al.* ^[17], reported exclusively the IR spectra of alliin in the 400-4000 cm^{-1} range, analyzing only a few modes with assignments based on cumulated experimental spectroscopic knowledge. No theoretical calculation on the alliin vibrational features was performed in their studies. In particular, they highlighted a strong and sharp band at 1022 cm^{-1} , which was assigned to a SO stretching mode. Peaks at 1650 and 1394 cm^{-1} were related, respectively, to asymmetric and symmetric stretching modes of the carboxylate group, and two bands at 1516 and 1538 cm^{-1} were assigned to amine group

deformations. They also showed that the IR spectrum of alliin has a broad band in the range 2700-3100 cm^{-1} corresponding to multiple NH_2 and CH_2 stretching modes. In the second work, Xiao *et al.* [18] have carried out infrared and Raman spectral analysis of alliin and methiin in the 600-3600 and 200-3200 cm^{-1} wavenumber ranges, respectively. They also attempted to assign the vibrational modes of alliin using empirical data. Intense alliin IR absorption peaks were detected and assigned at 617w (δCOO^-), 691w (νSC), 744w (δCOO^-), 783w (ρCH_2 , δCOO^-), 850w (ρCH_2), 919s (ωCH_2), 964m ($\nu\text{C-C}$), 989m (νCC , νCN), 1048w (νSO , νCN), 1131m (ρNH_3^+), 1229w (τCH_2), 1301s (ωCH_2 , ρCH), 1342s (ωCH_2 , ρCH), 1418vs (νCOO^-), 1496vs (δNH_2), 1582s (δNH_2), 1617s (δNH_2), and 3080vs cm^{-1} (νNH_2 , νCH_2).

In this work, a detailed study on the vibrational profile of garlic's bioactive organosulfur compound alliin is performed for the first time. The infrared and Raman spectra of the molecule in the 400-1800 cm^{-1} wavelength range were measured as well. In order to achieve the best interpretation of the spectra, a scan search on the potential energy surface of alliin within the density functional theory (DFT) framework was carried out to find the best conformer. Water solvation effects were described by applying the polarized continuum model (PCM). After the conformational search, two alliin configurations were found to be stable at room temperature; the IR and Raman spectra of the smallest total energy conformer was calculated and used for comparison with the measurements we have performed. A very good agreement was obtained between experiment and DFT-calculated vibrational spectra (wavenumber deviations smaller than 5%), but several discrepancies were noted in comparison with the data of Abbehausen *et al.*[17] and Xiao *et al.* [18]. Finally, a comparison of the obtained results with the vibrational spectra of a commercial garlic extract preparation was performed, providing strong evidence that alliin is one of its main molecular components.

Experimental and Computational Procedures

Sample Preparation and Spectroscopic Measurements

The infrared and Raman measurements were performed in alliin powder (title compound S-allyl-L-cysteine, chemical formula $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NO}_3\text{S}$) with at least 90% purity,

which was purchased from Sigma-Aldrich Company and used without further purification. A commercial odorless garlic extract supplementation purchased from a local market source was used for the evaluation of alliin concentration.

The FT-IR spectrum was recorded using a Perkin-Elmer spectrometer in the 400–4000 cm^{-1} range with resolution of 2 cm^{-1} . The FT-Raman spectrum was recorded with a Bruker Vertex 70 spectrometer with Raman attachment RAM II that uses a 1064 nm Nd–YAG laser and a liquid-nitrogen cooled Ge detector line as the excitation source with the same range and resolution of the FT-IR spectrum. The measurements were performed in samples placed inside the hemispheric bore of an aluminum sample holder.

Computer Calculations

The alliin protonation state at physiological pH (7.2) was determined to have a zwitterion character using the Marvin Sketch Software ^[19], shown on Fig. S6 (Supporting information). The alliin zwitterion geometry was used in all calculations to obtain the structural and vibrational properties. The Gaussian 09 code ^[20] was employed to carry out the DFT computations taking into account water solvation effects within the polarized continuum model (PCM). The two most stable conformers were selected by scanning the dihedral angle H13C12C9H10 (see Fig. 1a) in 30° steps. The most stable structure (smallest total energy) was afterwards subjected to a new geometry optimization and checked out for the absence of imaginary wavenumbers in its vibrational spectrum. The meta-hybrid M06-2X exchange-correlation functional together with a 6-311++G (d, p) basis set were chosen (the M06-2X functional has a better performance than the popular B3LYP functional for the simulation of organic molecules ^[21, 22]) for these calculations. The geometry optimization thresholds adopted were: maximum force smaller than 1.5×10^{-5} Ha/Å, self-consistent field energy variation smaller than 10^{-7} Å and maximum atomic displacement smaller than 6×10^{-5} Å. A similar functional for DFT calculations were used previously by some of the authors of this paper in the investigation on phosphate group vibrational signatures of the osteoporosis drug alendronate ^[23], as well as in the study of the antipsychotic haloperidol binding to the human dopamine

D3 receptor [24]. On the other hand, equivalent convergence parameters and the popular B3LYP functional were used in their works about the four-level levodopa adsorption on C60 fullerene for transdermal and oral administration [25], and on the optical absorption of the antitrypanocidal drug benznidazol in water [26].

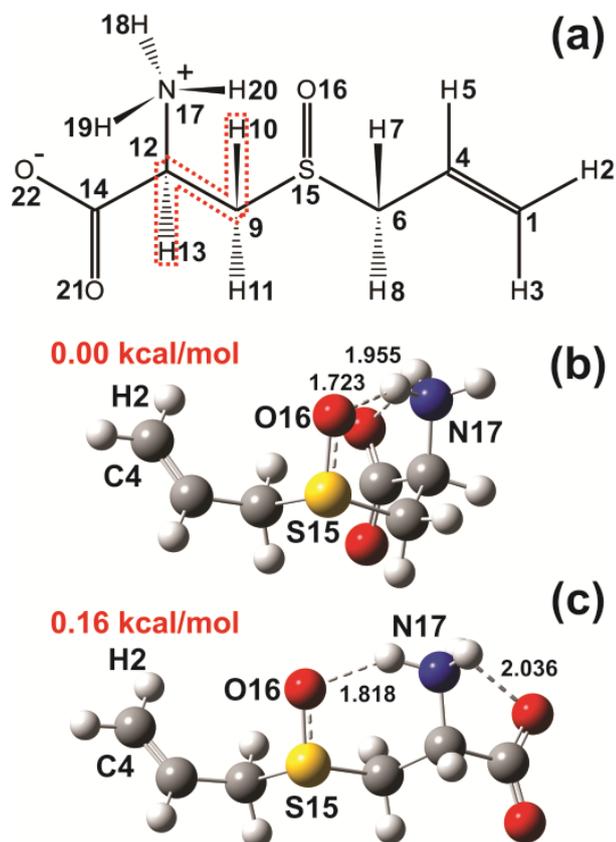


Figure 1. (a) The alliin planar structure with atom labels; (b) alliin smallest total energy conformer after DFT calculations; (c) the second smallest total energy alliin conformer at room temperature, which has a total energy 0.16 kcal/mol larger than the (b) structure. Hydrogen bond lengths (in Å) are also shown.

The alliin optimized structure was used to perform vibrational calculations, finding its sixty (60) vibrational modes. Their assignments were performed by visual inspection of the atomic displacements combined with the analysis of the potential energy distribution (PED) available in the VEDA code [27, 28]. See Table S5 (Supporting information) for the complete information of the whole vibrational spectra. Thirty seven calculated normal modes were used to interpret the alliin spectra obtained from our measurements, with eighteen modes in the 400-1100 cm^{-1} range (see Fig. 2

and Table 1) and nineteen modes in the 1100-1800 cm^{-1} range (see Fig. 3 and Table 2). A brief description of the alliin vibrations in the 1800-3600 cm^{-1} range is shown in Fig. S8 (Supporting information).

IR and Raman Profiles of Alliin

Molecular conformation plays an important role in the biological effects of biomolecules. To the best of our knowledge, no crystallographic data of alliin exists, and consequently it is not possible to take advantage of X-ray data to estimate alliin structure. Therefore, in order to understand the conformational preferences of Alliin, DFT-based calculations of its structure were performed by scanning the H10C9C6H7 dihedral angle. After this procedure, two possible structures of alliin were found differing by only 0.16 kcal/mol as a result of the scan, the first at 150° and the second at 300° . Additional information about the structural parameters of the alliin conformers is shown in Table S3 (Supporting information). It is important to remark that both alliin conformers at room temperature have very similar DFT-calculated IR and Raman spectra in the 400-1000 cm^{-1} range, see Fig. S7 (Supporting information). The DFT-calculated IR and Raman spectra discussed in the rest of the paper are that of the lowest energy alliin conformer.

A good agreement was obtained between our measurements and the DFT-calculated vibrational spectra (wavenumber deviations smaller than 5%), with some remarkable downward (upward) shifts for DFT-calculated wavenumbers in the 400-1100 (1100-1800) cm^{-1} range in comparison with the experimental data. Our measured IR and Raman spectra of alliin resemble two recently published works: the IR spectrum in the 500-3600 cm^{-1} of Abbehausen *et al.*^[17], and the IR and Raman spectra of Xiao *et al.*^[18] in the 600-3600 cm^{-1} and 200-3000 cm^{-1} ranges, respectively. Nevertheless, important discrepancies were found in the normal mode assignments (carried out here by visual inspection of the DFT-calculated modes and employing the PED approach) which the aforementioned authors (we highlight that our measured alliin spectra has better resolution and attenuated water effects in comparison to their results) based uniquely on the cumulated experimental common sense.

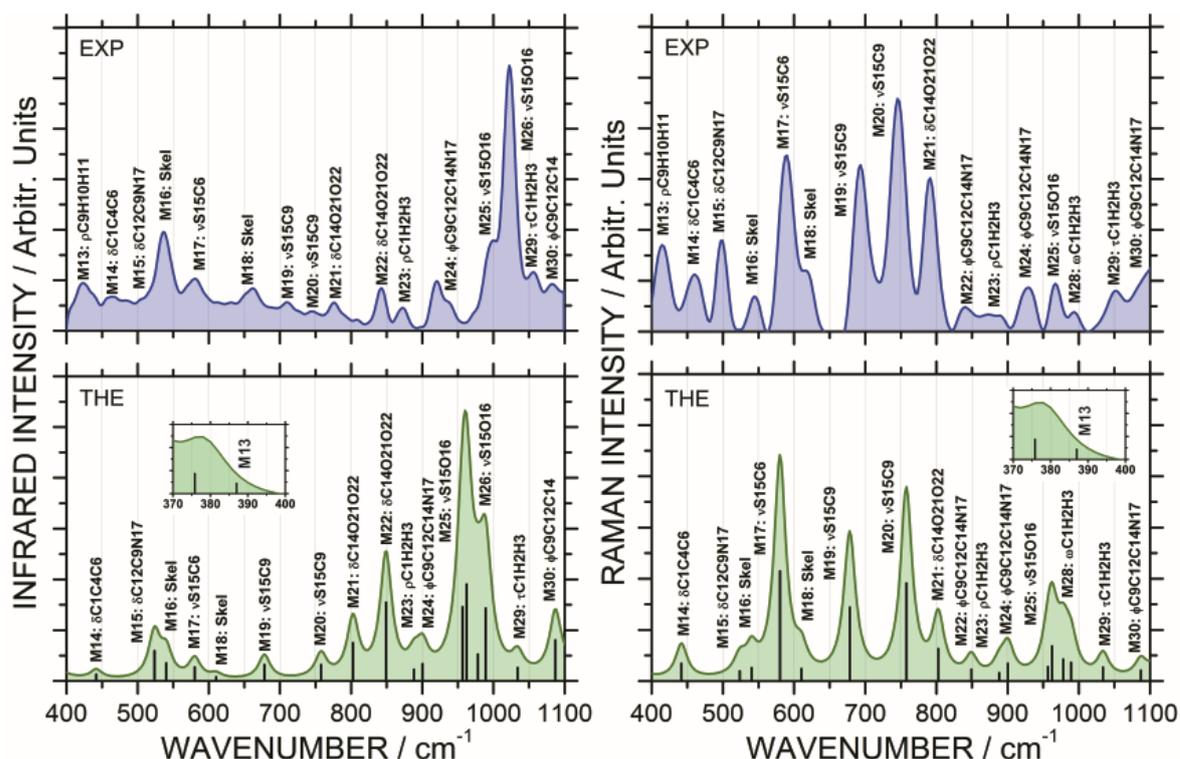


Figure 2. Infrared (left) and Raman spectra (right) of Alliin in the wavenumber range 400-1100 cm^{-1} . EXP and THE correspond to the measured and DFT-calculated spectra, in respective order. The symbols ρ , β , ν , ω , δ and ϕ stand respectively for rocking, bending, stretching, wagging, angular deformation and out of plane deformation motions. The normal modes M27 and M28 are not depicted in the figure due to space limitations. The insets show the DFT-calculated normal mode M13 at $\omega_{\text{THE}}=378 \text{ cm}^{-1}$.

The 400–1100 cm^{-1} Alliin Spectra

The IR (left) and Raman (right) spectra of Alliin in the 400-1100 cm^{-1} wavenumber range are shown in Fig. 2. At the top (bottom) panels the measured (DFT-calculated) spectra are depicted. One can note a downward shift of the theoretical normal mode wavenumbers in 400-1100 cm^{-1} range in comparison with the experiment. In this region there are three Skel (the whole molecule vibrates) and five sulfur-related modes (see Table 1 and Fig. 4, where the atomic displacements of some of the vibrational modes are shown, as well as the vibrational animations in the Supporting information). The main feature of the measured IR spectra of Alliin is a large structured peak originated from the normal modes M25, M26 and M29 (the modes M27 and M28 are not depicted in Fig. 2 due to the lack of space, but they are shown in Table 1), the first and second modes being assigned to sulfoxide stretching

vibrations at 956 cm⁻¹ and 962 cm⁻¹, respectively, and the third to the Skel mode at 978 cm⁻¹. Contrasting our results with the previous work of Abbehausen *et al.*¹⁷, the strong and sharp IR peak at 1022 cm⁻¹ matches our measured and DFT-calculated peaks at $\omega_{\text{THE}}=019$ cm⁻¹, $\omega_{\text{THE}}=962$ cm⁻¹, with estimated deviation of -57 cm⁻¹ (5.5%). However, their interpretation of the mode as a single SO stretching is only partially correct since our normal mode analysis reveals a S15O16 stretching (63%) coupled to a C1H2H3 rocking motion (20%).

The measured Raman spectra of Alliin in the wavenumber range 400-1100 cm⁻¹ reveals two structured peaks, the first due to the M17 and M18 normal modes and the second to M19, M20, and M21. The former is assigned to a sulfoxide stretching vibration at $\omega_{\text{Raman}}=585$ cm⁻¹ and a Skel vibration at 614 cm⁻¹, while the later corresponds to sulfoxide stretching vibrations S15C9 (63%) and ν S15C6 (25%) at $\omega_{\text{Raman}}=693$ cm⁻¹, a twisting τ C1H2H3 (24%) at $\omega_{\text{Raman}}=744$ cm⁻¹, and a deformation δ C14O21O22 (37%) at $\omega_{\text{Raman}}=790$ cm⁻¹ - see Fig. 2 and Table 1. Xiao *et al.*^[18] have suggested fifteen IR and Raman assignments to their experimental data in the 400-1100 cm⁻¹ wavenumber range, eleven of them being in partial or full disagreement with the assignments performed here based on a visual inspection of the DFT-calculated Alliin vibrational modes and PED analysis, see Table S4 (Supporting information).

In the 400-1100 cm⁻¹ wavenumber range, the DFT-calculated Alliin IR (Raman) spectrum is in very good agreement with the experiment. Wavenumber deviations are smaller than 6% (5%), the only exception being the M13 mode, as shown in Table 1. In a previously published work, Abbehausen *et al.*^[17] has indicated only one sharp band assigned to a SO stretching mode at 1022 cm⁻¹, which is in very good agreement with our M26 mode at $\omega_{\text{IR}}=1019$ cm⁻¹, $\omega_{\text{THE}}=962$ cm⁻¹, but which we assign to ν S15O16 (63%) and ρ C1H2H3 (20%) motions. In our study, we have obtained five sulfur-related modes, as pointed out in Table 1: ν S15C6 (42%) at $\omega_{\text{IR}}=585$ cm⁻¹, ν S15C9 (63%) at $\omega_{\text{IR}}=702$ cm⁻¹, ν S15C6 (25%) at $\omega_{\text{IR}}=746$ cm⁻¹, ν S15O16 (33%) at $\omega_{\text{IR}}=990$ cm⁻¹ and ν S15O16 (63%) at $\omega_{\text{IR}}=1019$ cm⁻¹.

The experimental IR absorption peaks observed at 421, 463, 522, 544 cm^{-1} are associated to the DFT-calculated modes M13 (378 cm^{-1} , $+43 \text{ cm}^{-1}$ deviation), M14 (442 cm^{-1} , -21 cm^{-1} deviation), M15 (524 cm^{-1} , $+2 \text{ cm}^{-1}$ deviation) and M16 (540 cm^{-1} , -4 cm^{-1} deviation), in this order. The normal modes M16, M17, M19 (see Fig. 4 and animation files 580_M17 and 678_M19) and M20 can be assigned to a Skeleton motion (M16) and the stretching of the carbon-sulfur bonds C6S15 and C9S15 (M17-M19). The IR absorption peaks observed at 786 and 841 cm^{-1} are molecular signatures related to the angular deformation of the carboxyl group, which are assigned to the DFT-calculated modes M21 (802 cm^{-1} , $+16 \text{ cm}^{-1}$ deviation) and M22 (849 cm^{-1} , $+8 \text{ cm}^{-1}$ deviation), shown in the animation file 849_M22), respectively; additionally, the mode M23 is related to the rocking vibration of three carbon atoms, C1, C6 and C9.

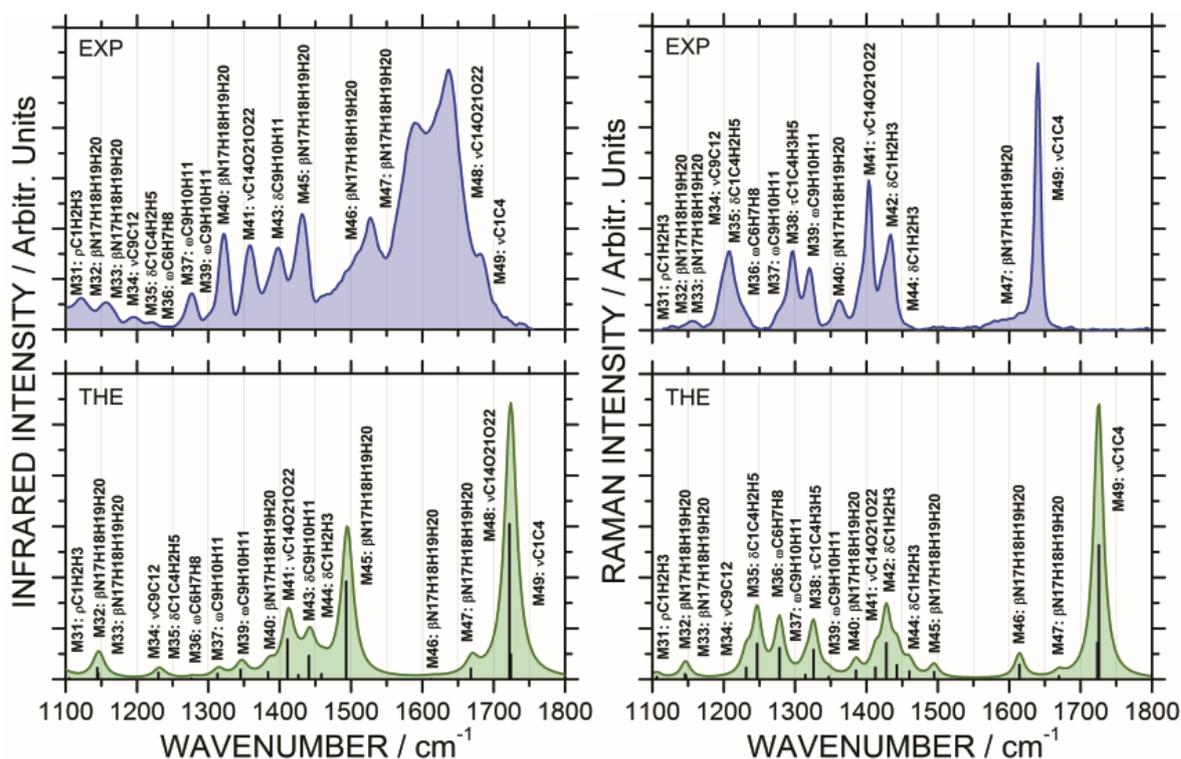


Figure 3. Infrared (left) and Raman spectra (right) of Alliin in the wavenumber range 1100-1800 cm^{-1} . EXP and THE correspond to the measured and DFT-calculated spectra, in respective order. The symbols ρ , β , ν , ω , δ and ϕ stand for rocking, bending, stretching, wagging, angular deformation and out of plane deformation respectively.

Alliin Spectra in the 1100–1800 cm⁻¹ range

Fig. 3 shows the experimental and DFT-calculated IR (left) and Raman (right) of alliin in the 1100-1800 cm⁻¹ wavenumber range. Differently from the lowest wavenumber range, there is now an upward shift of the theoretically computed normal modes in contrast with the measured spectral curves. The main characteristic of the experimental IR spectrum of Fig. 3 is the broad structure with its main peak located around 1600 cm⁻¹. It has contributions from the modes M46-M49 at $\omega_{\text{IR}} = 1519, 1592, 1637, \text{ and } 1645 \text{ cm}^{-1}$, with theoretical DFT wavenumbers ω_{THE} being, respectively, 1614 (+95 cm⁻¹, 6.2% deviation), 1669 (+75 cm⁻¹, 4.8% deviation), 1723 (+86 cm⁻¹, 5.2% deviation) and 1725 (+80 cm⁻¹, 4.8% deviation) cm⁻¹. The corresponding normal mode assignments are depicted in Fig. 3 and Table 2. Within the 1100-1800 cm⁻¹ range there are no Skel or sulfur-related modes (as occurred for the 400-1000 cm⁻¹ region), but mostly amine (M32, M33, M40, M45, M46, M47), carboxyl (M41, M48) and carbon backbone (M31, M34, M35, M36, M37, M39, M43, M49) vibrations.

The main feature of the measured Raman spectra of Alliin in the wavelength range 1100-1800 cm⁻¹ is a small isolated broad peak circa $\omega_{\text{Raman}} = 1643 \text{ cm}^{-1}$, $\omega_{\text{THE}} = 1725 \text{ cm}^{-1}$. It is composed principally from the modes M47 ($\omega_{\text{Raman}} = 1592 \text{ cm}^{-1}$, $\omega_{\text{THE}} = 1669 \text{ cm}^{-1}$, +77 cm⁻¹ (4.8%) deviation) and M49 ($\omega_{\text{Raman}} = 1645 \text{ cm}^{-1}$, $\omega_{\text{THE}} = 1725 \text{ cm}^{-1}$, +80 cm⁻¹ (4.8%) deviation). The M47 mode corresponds to an allyl group asymmetric bending, $\beta_{\text{AN17H18H19H20}}$ (98%), while the M49 mode is assigned to ν_{C1C4} (70%) and $\nu_{\text{AC14O21O22}}$ (10%). Other less intense vibrational modes related to the presence of the allyl group also occur at 1453, 1429, 989, 873 and 378 cm⁻¹, with the atoms C1, H2 and H3 responsible for the strongest vibrational contributions. Those peaks are ascribed to the modes M44 (1460 cm⁻¹, +7 cm⁻¹ deviation), M42 (1427 cm⁻¹, -2 cm⁻¹ deviation), M28 (989 cm⁻¹), M23 (888 cm⁻¹, +15 cm⁻¹ deviation) and M13 (416 cm⁻¹, -38 cm⁻¹ deviation). The first two peaks involve two deformations; the third peak involves a twisting, and the last peak a rocking motion. The amine group vibrations are also behind the peaks at 1593, 1361, 1157 and 1147 cm⁻¹, which correspond to the normal modes M47 (1669 cm⁻¹, +76 cm⁻¹

deviation), M40 (1361 cm⁻¹, +24 cm⁻¹ deviation), M33 (1147 cm⁻¹, -10 cm⁻¹ deviation), and M32 (1145 cm⁻¹, -2 cm⁻¹ deviation).

The vibrations of some of the DFT-calculated modes are shown in Fig. 4, and their corresponding animation files are included in the Supplementary Material. For the M16 mode at 540 cm⁻¹ we have a Skel vibration. The sulfoxide group normal mode M17 at 580 cm⁻¹ has assignments ν_{S15C6} (42%) and ϕ_{C1C4C6} (26%), while M22 at 849 cm⁻¹ has assignments ν_{S15C6} (42%) and ϕ_{C1C4C6} (26%). The M26 mode at 962 cm⁻¹ can be described as a S15O16 stretching (63%) combined with a C1H2H3 rocking (20%). The carboxylate group mode M22 at 849 cm⁻¹, on the other hand, corresponds to $\delta_{\text{C14O21O22}}$ (40%) and ρ_{C9H10H11} (13%) motions. M41 at 1412 cm⁻¹ has assignments $\nu_{\text{S14O21O22}}$ (70%) and δ_{C9H10H11} (10%), while M48 at 1723 cm⁻¹ has assignments $\nu_{\text{A14O21O22}}$ (82%) and ν_{C1C4} (16%). The amine group mode M45 at 1494 cm⁻¹ is assigned to a $\beta_{\text{S17H18H19H20}}$ (77%) vibration, and M46 at 1614 cm⁻¹ corresponds to a $\beta_{\text{A17H18H19H20}}$ (87%) motion. The M47 oscillation at 1669 cm⁻¹ consists mainly in the bending of the amine group ($\beta_{\text{A17H18H19H20}}$ (98%)). The M28 normal mode at 989 cm⁻¹ (ω_{C1H2H3} (96%)) and the M49 normal mode at 1725 cm⁻¹ (ν_{C1C4} (70%), $\nu_{\text{A14O21O22}}$ (10%)) are also depicted in Fig. 4.

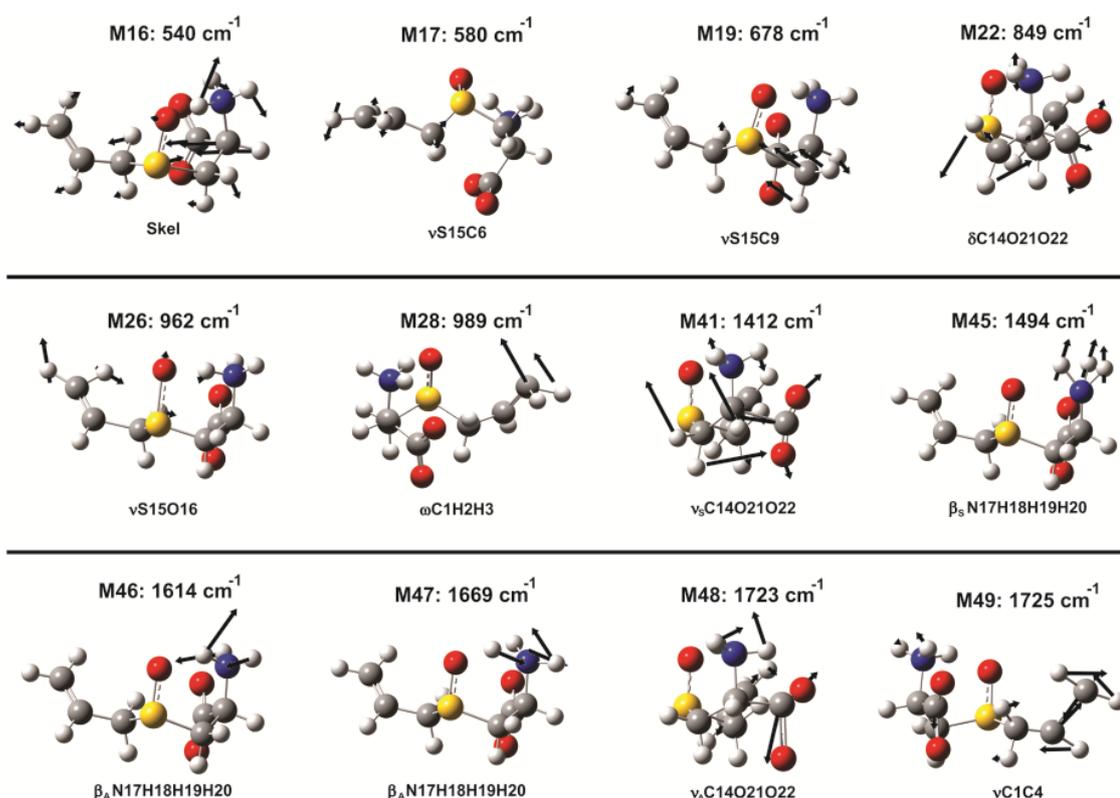


Figure 4. Visual representation of some selected Alliin vibrational modes with respective wavenumbers and assignments. The symbols: ν , δ , ϕ , τ , ρ , ω and β stand for stretching, in-plane angular deformation, out-of-plane deformation, twisting, rocking, wagging and bending modes in respective order, while subscripts A and S stand for symmetric and asymmetric respectively and the term Skel is applied to a vibration mode for which the PED is distributed throughout the whole molecular structure.

Vibrational Spectra of a Commercial Garlic Extract

To demonstrate the usefulness of the vibrational spectroscopy for a practical characterization of commercial garlic supplements, we have measured the IR and Raman of odorless garlic powder, which are shown in Fig. 5 together with the DFT-calculated Alliin vibrational spectra. A direct comparison of them strongly suggests that the former has Alliin as one of its main constituents. As a matter of fact, one can identify in the wavenumber interval $400\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$ that the garlic powder active modes can be correlated to at least thirteen (eight) of the DFT-calculated alliin IR (Raman) peaks. Besides, one can assign the normal modes at 725 cm^{-1} and 1128 cm^{-1} to CS and OS stretchings of alliin, respectively, as it can be inferred from the bottom panels of Fig. S7 (Supporting information).

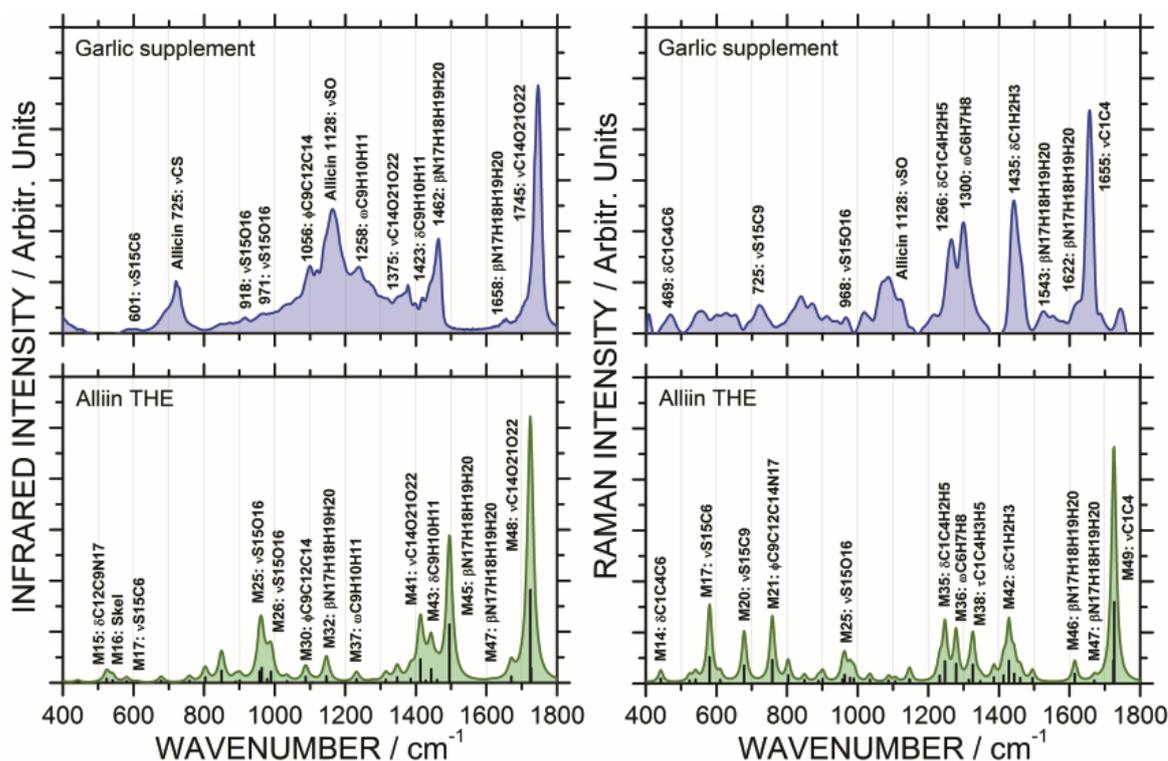


Figure 5. Infrared and Raman spectra of a commercial garlic extract preparation (top) and the corresponding DFT-calculated Alliin spectral curves in the 400-1800 cm^{-1} range. The symbols ρ , β , ν , ω , δ and ϕ stand for rocking, bending, stretching, wagging, angular deformation and out of plane deformation, respectively.

The garlic extract IR structures around 1745, 1658 and 1462 cm^{-1} are associated to vibrations of the carboxyl and amine groups, which are closely related to the theoretical normal modes M48, M47 and M45, in this order, which are absent in the alliin IR spectrum. For the Raman spectrum of the garlic extract, some intense bands occur at 1655, 1622, 1435, 1300 and 1266 cm^{-1} . The intense Raman band observed at 1655 cm^{-1} can be ascribed to the allyl group vibration (Alliin mode M49), which is present in both Alliin and alliin molecules.

Apoptosis is a process of programmed cell death, which helps to maintain a natural balance between cell death and cell renewal by destroying excess, damaged or abnormal cells. As stated before, garlic preparations may vary its molecular constitution, depending on its manufacturing process, and the molecular structure of garlic preparation constituents plays an important role on its activity. It is known that

the presence of the terminal allyl group in an organosulfur molecule is an important descriptor of its inhibitory action against the growth of cancer tumor cells and its potency to induce apoptosis [29,30]. The results of our work suggest that the presence and intensity of the vibrational mode observed in the Raman spectrum near 1655 cm^{-1} can be used to predict if a commercial garlic preparation has promising anticancer effects.

Conclusions

The vibrational spectra of Alliin, the most abundant organosulfur compound in garlic, were investigated through IR and Raman measurements in 90% pure grade samples. Density functional theory calculations were also carried out for the lowest energy Alliin conformer in order to interpret and assign the vibrational normal modes. A good agreement with previously published experimental data was obtained, but the vibrational assignments of our work are in many cases distinct, as these publications have not performed any theoretical calculations to describe in detail the molecular motions behind the main spectral features (their vibrational assignments were based exclusively in previously tabulated spectroscopic data for common sets of bonds/functional groups). Our DFT-based vibrational assignments allowed the identification of all sixty Alliin normal modes and the description of the IR and Raman spectral curves in the wavenumber ranges $400\text{-}1100$ and $1100\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$. As an application, the vibrational spectra of a commercial garlic extract were obtained, revealing a strong contribution of Alliin followed by allicin. In particular, we highlight the existence of a Raman signature near to 1655 cm^{-1} which can be used to indicate which garlic extracts are more effective against cancer cells.

Acknowledgements

V.N.F and P.L.N are senior researchers of the Brazilian National Research Council (CNPq) and would like to acknowledge the financial support received through the Brazilian Research agencies CNPq/MCTI (Edital Jovens Pesquisadores, Project Number 550579/2012-5). E. W. S. C. received financial support from CNPq project 307843/2013-0. The authors would like to acknowledge CENAPAD-UFC computer

processing facilities, which allowed us to perform the Gaussian 09 calculations. We also give special thanks to Professor Paulo de Tarso Cavalcante Freire from the Department of Physics at Federal University of Ceará for helping us with the Raman spectra measurements.

Supporting information

Additional supporting information can be found in the online version of this article at the publisher's web site.

References

- [1] B. Eric, *Garlic and other alliums*, RSC Publishing, Cambridge, **2010**.
- [2] R.S. Rivlin, *J. Nutr.* **2001** ; 131, 951.
- [3] H. Amagase, B.L. Petesch, H. Matsuura, S. Kasuga, Y. Itakura, *J. Nutr.* **2001** ; 131, 955.
- [4] S.D. Stan, S.Kar, G.D. Stoner, S.V. Singh, *J. Cell. Biochem.* **2008** ; 1004, 339.
- [5] M. Corzo-Martínez, N. Corzo, M. Villamiel, *Trends Food Sci. Tech.* **2007** ; 18 , 609.
- [6] A. Cardelle-Cobas, A. C. Soria, M. Corzo-Martínez, M. Villamiel, *Garlic Consumption and Health*, Nova Science Publishers, Madrid, **2010**.
- [7] L.C. Tapsell, I. Hemphill, L. Cobiac, S.C Patch, R.D. Sullivan, M. Fenech, S. Roodenrys, B.J. Keogh, M.P. Clifton, P.G. Williams, A.V. Fazio, E.K. Inge, *Med. J. Aust.* **2006** ; 21, 4.
- [8] H. Matsuura, *J. Nutr.* **2001** ; 131, 1000.
- [9] K. Rahman, *Ageing Res. Rev.* **2003** ; 2. 39.
- [10] V. Lanzotti, *J. Chromatogr. A.* **2006** ; 1112, 3.
- [11] S.G. Santhosha, J. Prakash, S.N. Prabhavathi, *Food Biosci.* **2013** ; 3, 59.
- [12] M. Ichikawa, N.Ide, J. Yoshida, H. Yamaguchi, K.Ono, *J. Agric. Food Chem.* **2006** ; 54, 1535.
- [13] H. Amagase, *J. Nutr.* **2006** ; 136, 716.
- [14] M. Iciek, I. Kwencien, L. Wlodek, *Environ. Mol. Mutagen.* **2009** ; 50, 247.
- [15] J. Borlinghaus, F. Albrecht, M.C.H. Grunhke, I.D. Nwachukwu, A.J. Slusarenko, *Molecules*, **2014** ; 19. 12591.
- [16] H. Fujisawa, K. Suma, K. Origuchi, H. Kumagai, T. Seki, T. Ariga, *J. Agric. Food Chem.* **2008** ; 56, 4229.
- [17] C. Abbehausen, S.F. Sucena, M. Lancelloti, T.A. Heinrich, E.P. Abrão, C.M. Costa-Neto, A. L. B. Formiga, P. P. Corbi, *J. Mol. Struct.* **2013** ; 1035, 421.

- [18] W. Xiao, L. Han-ping, Z. Chang-chun, L. Song-hao, *Spectrosc. Spect. Anal.* **2013** ; 33, 1570.
- [19] Marvin Sketch 15.2.16.0, **2015**.
<http://www.chemaxon.com/products/marvin/marvinsketch/> (accessed April 2, 2014).
- [20] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Norm., K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, D. J. Fox, Gaussian09 Revision D.01, Gaussian Inc., Wallingford, **2009**.
- [21] Y. Zhao, D. G. Truhlar, *Theor. Chem. Acc.* **2008** ; 120, 215.
- [22] Y. Zhao, D.G. Trhular, *Chem. Phys. Lett.* **2011** ; 502, 1.
- [23] J. R. Bezerra-Neto, P. de Lima-Neto, F. A. M. Sales, E. E. da Silva, L. O. Ladeira, V. N. Freire, E. W. S. Caetano, *J. Raman Spectrosc.* **2014** ; 45, 801.
- [24] G. Zanatta, G. Nunes, E. M. Bezerra, R. F. da Costa, A. Martins, E. W. S. Caetano, V. N. Freire, C. Gottfried, *ACS Chem. Neurosci.* **2014** ; 5, 1041.
- [25] N. F. Frazão, E. L. Albuquerque, U. L. Fulco, D. L. Azevedo, G. L. F. Mendonça, P. Lima-Neto, E. W. S. Caetano, J. V. Santana, V. N. Freire, *R. Soc. Chem. Adv.* **2012** ; 2, 8306.
- [26] E. M. Bezerra, J. R. Bezerra-Neto, F. A. M. Sales, R. P. dos Santos, A. M. C. Martins, P. de Lima-Neto, E. W. S. Caetano, E. L. Albuquerque, V. N. Freire, *Molecules* **2014** ; 4, 4145.

- [27] M. H. Jamróz, Vibrational Energy Distribution Analysis VEDA 4.0, **2014**.
<http://smmg.pl/index.php/software/sowtware-veda.html> (accessed April 2, 2014)
- [28] M. H. Jamróz, Spectrochim. Acta, Part A. **2013** ; 114, 220-230.
- [29] H.X.Cao, K.X.Zhu, J.G.Fan, L.Qiao, Anti-Cancer Agents Med. Chem. **2014** ; 6, 793.
- [30] Y. Shukla, N. Kalra, *Cancer Lett.* **2007** ; 247, 167.

Table 1. Alliin infrared and Raman modes in the wavenumber range 400-1100 cm^{-1} and respective normal mode assignments. ω is given in cm^{-1} . The deviation Δcm^{-1} (%) of each theoretical normal mode with respect to the experimental value is presented as well.

Mode	ω_{THE}	Experimental		Δ_{IR} (%)	Δ_{Raman} (%)	Mode Assignment – PED (%)
		IR	Raman			
M13	378	421	417	-43 (10.2)	-38 (9.1)	$\rho\text{C9H10H11}$ (38), $\beta\text{N17H18H19H20}$ (15)
M14	442	463	461	-21 (4.5)	-18 (4.1)	δC1C4C6 (74)
M15	524	522	503	+2 (0.3)	+21 (3.9)	$\delta\text{C12C9N17}$ (60), $\rho\text{C9H10H11}$ (10)
M16	540	544	543	-4 (0.7)	-2 (0.3)	Skel
M17	580	585	588	-4 (0.7)	-8 (1.3)	νS15C6 (42), ϕC1C4C6 (26)
M18	610	614	619	-4 (0.4)	-9 (1.4)	Skel
M19	678	702	693	-24 (3.2)	-15 (2.1)	νS15C9 (63)
M20	758	746	745	+12 (1.4)	+14 (1.7)	νS15C6 (25), τC1H2H3 (24)
M21	803	787	790	+16 (2.0)	+13 (1.5)	$\delta\text{C14O21O22}$ (37)
M22	849	841	840	+8 (0.9)	+9 (1.0)	$\delta\text{C14O21O22}$ (40), $\rho\text{C9H10H11}$ (13)
M23	888	873	873	+15 (1.8)	+15 (1.7)	ρC1H2H3 (68), ρC6H7H8 (13), $\rho\text{C9H10H11}$ (10)
M24	901	931	931	-30 (3.2)	-30 (3.2)	$\phi\text{C9C12C14N17}$ (33)
M25	956	990	972	-34 (3.3)	-16 (1.6)	νS15O16 (33), ρC1H2H3 (11), $\rho\text{C9H10H11}$ (10)
M26	962	1019	—	-57 (5.5)	—	νS15O16 (63), ρC1H2H3 (20)
M27	978	1040	—	-62 (5.8)	—	Skel
M28	989	—	990	—	0	ωC1H2H3 (96)
M29	1034	1055	1054	-21 (1.9)	-20 (1.9)	τC1H2H3 (92)
M30	1087	1085	1100	+2 (0.2)	-13 (1.1)	$\phi\text{C9C12C14}$ (52)

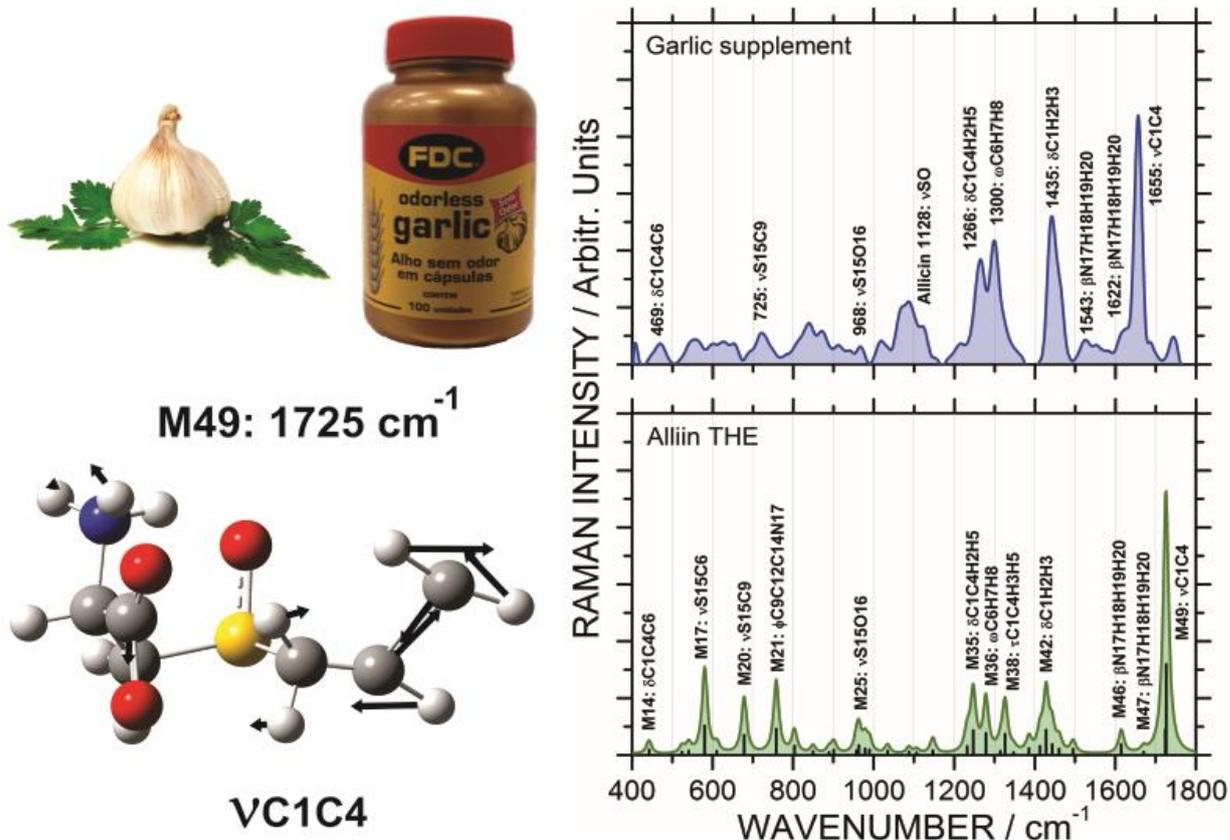
The symbols: ν , δ , ϕ , τ , ρ , ω and β stand for stretching, in-plane angular deformation, out-of-plane deformation, twisting, rocking, wagging and bending modes in respective order, and the term Skel depicts a vibration for which the PED analysis reveals contributions distributed throughout the whole molecular structure.

Table 2. Alliin infrared and Raman normal modes in the wavenumber range 1100-1800 cm^{-1} and respective assignments. ω is given in cm^{-1} ; the deviations Δcm^{-1} (%) of each theoretical normal mode with respect to the experimental values are provided as well.

Mode	ω_{THE}	Experimental		Δ_{IR} (%)	Δ_{Raman} (%)	Mode Assignment – PED (%)
		IR	Raman			
M31	1106	1118	1124	-12 (1.0)	-18 (1.6)	τC6H7H8 (41), ρC1H2H3 (40)
M32	1145	1146	1147	-1 (Zero)	-2 (1.0)	$\beta\text{N17H18H19H20}$ (69)
M33	1147	1156	1157	-9 (0.7)	-10 (0.8)	$\beta\text{N17H18H19H20}$ (48), νC9C12 (14)
M34	1231	1194	1196	+37 (3.0)	+35 (2.9)	$\tau\text{C9H10H11}$ (15), νC9C12 (14)
M35	1246	1214	1207	+32 (2.6)	+39 (3.2)	$\delta\text{C1C4H2H5}$ (67), τC7H7H8 (15), $\tau\text{C9H10H11}$ (10)
M36	1278	1272	1277	+6 (0.4)	+1 (0)	ωC6H7H8 (76), ρC1H2H3 (10), $\tau\text{C9H10H11}$ (10)
M37	1314	1294	1291	+20 (1.5)	+23 (1.7)	$\omega\text{C9H10H11}$ (37), $\beta\text{N17H18H19H20}$ (20)
M38	1325	—	1297	—	+28 (2.1)	$\tau\text{C1C4H3H5}$ (88), ωC6H7H8 (10)
M39	1346	1318	1316	+28 (2.1)	+30 (2.2)	$\omega\text{C9H10H11}$ (49)
M40	1385	1357	1361	+28 (2.0)	+24 (1.7)	$\beta\text{N17H18H19H20}$ (43)
M41	1412	1390	1404	+2 (1.5)	+8 (0.5)	$\nu\text{S}14\text{O21O22}$ (70), $\delta\text{C9H10H11}$ (10)
M42	1427	—	1429	—	-2 (0.1)	δC1H2H3 (89), $\delta\text{C9H10H11}$ (10)
M43	1442	1397	—	+45 (3.2)	—	$\delta\text{C9H10H11}$ (84)
M44	1460	—	1453	—	+7 (0.4)	δC1H2H3 (89), $\delta\text{C9H10H11}$ (10)
M45	1494	1430	—	+64 (4.4)	—	$\beta\text{S}17\text{H18H19H20}$ (77)
M46	1614	1519	—	+95 (6.2)	—	$\beta\text{A}17\text{H18H19H20}$ (87)
M47	1669	1592	1593	+77 (4.8)	+76 (4.7)	$\beta\text{A}17\text{H18H19H20}$ (98)
M48	1723	1637	—	+86 (5.2)	—	$\nu\text{A}14\text{O21O22}$ (82), νC1C4 (16)
M49	1725	1645	1643	+80 (4.8)	+82 (4.9)	νC1C4 (70), $\nu\text{A}14\text{O21O22}$ (10)

The symbols: ν , δ , ϕ , τ , ρ , ω and β stand for stretching, in-plane angular deformation, out-of-plane deformation, twisting, rocking, wagging and bending modes in this respective order. Subscripts A and S stand for symmetric and asymmetric, respectively, and the term Skel labels a vibration for which the PED is distributed throughout the whole molecular structure.

TOC ENTRY



TOC Entry. The infrared (IR) and Raman spectra of Alliin, the main organosulfur compound present in intact garlic. Density functional theory (DFT) calculations were performed for the Alliin most stable gas phase conformer, unveiling important vibrational signatures in the 400-1800 cm⁻¹ wavenumber range, especially infrared absorption bands at 1018, 1430, 1519, 1592, and 1637 cm⁻¹ and Raman lines at 588, 744, 1429 and 1643 cm⁻¹.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] S.L. Prabu, T.N.K.S. Prakash, C.D. Kumar, S.S. Kumar, T. Ragavendran. Nutraceuticals: A review. *Pharmacy*, 46, 8372-8377, 2012.
- [2] C.S. Ramaa, A.R. Shirode, A.S. Mundada, V.J. Kadam. Nutraceuticals – An emerging era in the treatment and prevention of cardiovascular diseases. *Current pharmaceutical biotechnology*, 7, 15-23, 2006.
- [3] J.C. Espín, M.T. García-Conesa, F.A. Tomás-Barberán. Nutraceuticals: Facts and fiction. *Phytochemistry*, 68, 2986-3008, 2007.
- [4] HHS. Fong. Integration of herbal medicine into modern medical practices: issues and prospects. *Integrative cancer therapies*, 3, 287-293, 2002.
- [5] R.S. Rivlin. Historical Perspective on the use of garlic. *The journal of nutrition*. 131, 951S-954S, 2001.
- [6] E. Block. Garlic and Other Alliums, The lore and the Science. RSC Publishing. Cambridge, 2010.
- [7] M.S. Butt, M.T. Sultan, M.S. Butt, J. Iqbal. Garlic: Nature's protection against physiological threats. *Critical reviews in food Science and nutrition*, 49, 538-551, 2009.
- [8] K. Rahman. Garlic and aging: new insights into an old remedy. *Ageing research reviews*, 2, 39-56, 2003.
- [9] L.Y. Chung. The Antioxidant Properties of Garlic Compounds Allyl cysteine, Alliin, Allicin, and Allyl Disulfide. *Journal of medicinal food*, 9, 205-213, 2006.

- [10] O.N.M Campos, D. Barrera, S.S. Murillo, D. Rocha, P.D Maldonado, N.M Patino, J.P. Chaverri. S-allylcysteine scavenges singlet oxygen and hypochlorous acid and protects LLC-PK cells of potassium dichromate-induced toxicity. *Food and chemical toxicology*, 45, 2030-2039, 2007.
- [11] C. Borek. Antioxidant Health Effects of Aged Garlic Extract. *The journal of Nutrition*, 131, 1010S-1015S, 2001.
- [12] Lau, B.H.S. Suppression of LDL Oxidation by Garlic compounds Is a possible mechanism of cardiovascular Health benefit. *The journal of nutrition*, 136, 765S-768S, 2006.
- [13] K. Rahman, G.M Lowe. Garlic and cardiovascular disease: A critical review. *The journal of Nutrition*, 136, 736S-740S, 2006.
- [14] C, Borek. Garlic reduces dementia and heart-disease risk. *The journal of nutrition*, 136, 810S-812S, 2006.
- [15] H. Matsuura. Saponins in garlic as modifiers of the risk of cardiovascular disease. *The journal of nutrition*, 131, 1000S-1005S, 2001.
- [16] S.D. Stan, S. Kar, G.D. Stoner, S.V. Singh. Bioactive food componentes and câncer risk reduction. *Journal of Cellular Biochemistry*, 104, 339-356, 2008.
- [17] H.L. Nicastro, S.A. Ross, J.A. Milner. Garlic and Onions: Their Cancer Prevention Properties. *Cancer Prevention Research*, 8, 1-9, 2015.
- [18] Y. Zhou, W. Zhuang, W. Hu, G.J. Liu, T.X. Wu, X.T. Wu. Consumption of Large Amounts of *Allium* Vegetables Reduces Risk for Gastric Cancer in a Meta-analysis. *Gastroenterology*, 141, 80-89, 2011.

- [19] C. Galeone, C. Pelucchi, F. Levi, E. Negri, S. Franceschi, R. Talamini, A. Giacosa, C. La Vecchia. Onion and Garlic use and Human Câncer. *American Journal of Clinical Nutrition*, 84, 1027-1032, 2006.
- [20] H.X. Cao, K.X. Zhu, J.G. Fan, L. Qiao. Garlic-Derived Allyl Sulfides in Cancer Therapy. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 14, 793-799, 2014.
- [21] J.F. Brady, M.H. Wang, J.Y. Hong, F. Xiao, Y. Li, J.S.H. Yoo, S.M. Ning, M.J. Lee, J.M. Fukuto, J.M. Gapac, C.S. Yang. Modulation of rat hepatic microsomal monooxygenase enzymes and cytotoxicity by diallyl sulfide. *Toxicology and applied pharmacology* 108, 342-354, 1991.
- [22] J.F. Brady, H. Ishizaki, J.M. Fukuto, M.C Lin, A. Fadel, J.M. Gapac, C.S. Yang. Inhibition of cytochrome P-450 2E1 by Diallyl sulfide and its metabolites. *Chemical research in toxicology*, 4, 642-647, 1991.
- [23] S.V. Singh, S.S. Pan, S.K. Srivastava, H. Xia, X. Hu, H.A. Zaren, J.L. Orchard. Differential Induction of NAD(P)H: Quinone Oxidoreductase by Anti-Carcinogenic Organosulfides from Garlic. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 244, 917-920, 1998.
- [24] S.H. Omar, N.A. Al-Wabel. Organosulfur compounds and possible mechanism of garlic in câncer. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 18, 51-58, 2010.
- [25] N. Khan, V.M. Adhami, H. Mukhtar. Apoptosis by dietary agents for prevention and treatment of prostate cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 17, R39-R52, 2010.
- [26] S.G. Sundaram, J.A. Milner. Diallyl disulfide induces apoptosis of human colon tumor cells. *Carcinogenesis*, 17, 669-673, 1996.
- [27] Y.A. Kim, D. Xiao, H. Xiao, A.A. Powolny, K.L. Lew, M. Reilly, Y. Zeng, Z. Wang, S.V. Singh. Mitochondria-mediated apoptosis by diallyl trisulfide in human protaste

cancer cells is associated with generation of reactive oxygen species and regulated by Bax/Bak. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6, 1599-1609, 2007.

[28] P. Murugavel, L. Pari, S.L. Sitasawad, S. Kumar. Cadmium induced mitochondrial injury and apoptosis in vero cells: protective effect of diallyl tetrasulfide from garlic. *International Journal of Biochemistry and Cellular Biology*, 39, 161-170, 2007.

[29] Y.B. Wang, J. Qin, X.Y. Zheng, Y. Bai, K. Yang, L.P. Xie. Diallyl trisulfide induces Bcl-2 and caspase-3 dependent apoptosis via downregulation of Akt phosphorylation in human T24 bladder cancer cells. *Phytomedicine*, 17, 363-368, 2010.

[30] D. Xiao, S. Choi, D.E. Johnson, V. Vogel, C.S. Johnson, D.L. Trump, Y.J. Lee, S.V. Singh. Diallyl trisulfide-induced apoptosis in human prostate cancer cells involves c-jun N-terminal Kinase and extracellular-signal regulated kinase-mediated phosphorylation of Bcl-2. *Oncogene*, 23, 5594-5606, 2004.

[31] V.M. Dirsch, A.L. Gerbes, A.M. Vollmar. Ajoene, a compound of garlic, induces apoptosis in human promyeloleukemic cells, accompanied by generation of reactive oxygen species and activation of nuclear factor kappaB. *Molecular Pharmacology*, 53, 402-407, 1998.

[32] M. Corzo-Martínez, N. Corzo, M. Villamiel. Biological properties of onions and garlic. *Food science and Technology*, 18, 6009-625, 2007.

[33] S. Ankri, D. Mirelman. Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes and infection*, 2, 125-129, 1999.

[34] J.C. Harris, S.L. Cottrell, S. Plummer, D. Lloyd. Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57, 282-286, 2001.

- [35] I.M. Bakri, C.W.I. Douglas. Inhibitory effect of garlic extract on oral bacteria. *Archives of Oral Biology*, 50, 645-651, 2005.
- [36] V. Lanzotti, F. Scala, G. Bonanomi. Compounds from *Allium* species with cytotoxic and antimicrobial activity. *Phytochemistry Review*, 13, 769-791, 2014.
- [37] M. Ichikawa, N. Ide, J. Yoshida, H. Yamaguchi, K. Onzo. Determination of seven organosulfur compounds in garlic by high-performance liquid chromatography. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54, 1535-1540, 2006.
- [38] V. Lanzotti. The analysis of onion and garlic. *Journal of chromatography A*, 1112, 3-22, 2006.
- [39] M. Iciek, I. Kwiecien, L. Wlodek. Biological Properties of Garlic and Garlic-Derived Organosulfur Compounds. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 50, 247-265, 2009.
- [40] Z. Guo, D. Muller, R. Pentz, G. Kress, C.P. Siegers. Bioavailability of sulphur containing ingredients of garlic in the rat. *Planta Medica*, 56, 692-693, 1990.
- [41] G. Lachmann, D. Lorenz, W. Radeck, M. Steiper. The pharmacokinetics of the S35 labeled garlic constituents alliin, allicin and vinylidithiine. *Arzneimittel Forschung*, 44, 734-743, 1994.
- [42] A.R.M Ruhul Amin, O. Kucuk, F.R Khuri, D.M. Shim. Perspectives for Cancer Prevention With Natural Compounds. *Journal of Clinical Oncology*, 27, 2712-1727, 2009.
- [43] H.B. Nair, B. Sung, V.R. Yadav, R. Kannappan, M.M. Chaturvedi, B.B. Aggarwal. Delivery of anti-inflammatory nutraceuticals by nanoparticles for the prevention and treatment of cancer. *Biochemical Pharmacology*, 80, 1833-1843, 2010.

- [44] Q. Huang, H. Yu, Q. Ru. Bioavailability and Delivery of Nutraceuticals Using Nanotechnology. *Journal of Food Science*, 75, R50-R57, 2010.
- [45] S.A. Mousa, D.J. Bharali, D. Armstrong. From Nutraceuticals to Pharmaceuticals to Nanopharmaceuticals: A case Study in Angiogenesis Modulation During Oxidative Stress. *Molecular Biotechnology*, 80, 37-72, 2007.
- [46] V. Sanna, G. Lubinu, P. Madau, N. Pala, S. Nurra, A. Mariani, M. Sechi. Polymeric Nanoparticles Encapsulating White Tea Extract for Nutraceutical Application. *Journal of Agricultural and food chemistry*, 63, 2026-2032, 2015.
- [47] N. Duraipandy, R. Lakra, S. K. Vinjimur, D. Samanta, K. S. Purna, M. S. Kiran. Caging of plumbagin on silver nanoparticles imparts selectivity and sensitivity to plumbagin for targeted cancer cell apoptosis. *Metallomics*, 6, 2025-2033, 2014.
- [48] Y. Levinson, G. Lev-Israeli, Y. D. Livney. Soybean β -Conglycinin Nanoparticles for delivery of hydrophobic nutraceuticals. *Food Biophysics*, 9, 332-340, 2014.
- [49] M. Fujiwara, K. Shiokawa, K. Morigaki, Y. Zhu, Y. Nakahara. Calcium carbonate microcapsules encapsulating biomacromolecules. *Chemical Engineering Journal*, 137, 14-22, 2008.
- [50] D. Quigley, C.L. Freeman, J. H. Harding, P.M. Rodger. Sampling the structure of calcium carbonate nanoparticles with metadynamics. *The Journal of Chemical Physics*, 134, 044703, 2011.
- [51] A. Fernandez-Gonzalez, L. Seivane-Fernandez, M.P. Rubio, J. Ferrer. A molecular Study of CaCO₃ cluster configurations. *Journal of Alloys and Compounds*, 1, 1-5, 2011.

- [52] H. Ruuska, P. Hirva, T. A. Pakkanen. Cluster Models for Calcite Surfaces: Ab Initio Quantum Chemical Studies. *Journal of Physical Chemistry B*, 103, 6734-6740, 1999.
- [53] C.L. Freeman, I. Asteriadis, M. Yang, J. H. Harding. Interactions of Organic Molecules with Calcite and Magnesite Surfaces. *Journal of Physical Chemistry C*, 113, 3666-3673, 2009.
- [54] C. Abbehausen, S.F Sucena, M. Lancellotti, T.A Heinrich, E.P Abrão, C.M Neto-Costa, A.L.B Formiga, P.P Corbi. Synthesis, spectroscopic characterization, DFT studies, and antibacterial and antitumor activities of a novel water soluble Pd(II) complex with L-alliin. *Journal of Molecular Structure*, 1035, 421-426, 2013.
- [55] W. Xiao, L. Han-ping, Z. Chang-chun, L. Song-hao. Infrared and raman spectral analysis of alliin and methiin. *Spectroscopy and spectral analysis*, 33, 1570-1574, 2013.
- [56] P. Skehan, R. Storeng, D. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J.T. Warren, H. Bodesch, S. Kenney, M.R. Boyd. New calorimetric cytotoxicity assay for anticancer – drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*, 82, 1109-1112. 1990.
- [57] T. Mossman. Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63, 1983.
- [58] M.V. Berridge, A.S. Tan, K.D. McCoy, R. Wang. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays the Use Tetrazolium salts. *Biochemica*, 4, 14-19, 1996.

- [59] N. Elliot. A redetermination of the Carbon-Oxygen Distance in Calcite and the Nitrogen-Oxygen Distance in Sodium Nitrate. *Journal of the American Chemical Society*, 59, 1380-1382, 1937.
- [60] C.L. Freeman, J.H. Harding, D.J. Cooke, J.A. Elliot, J.S. Lardge, D.M. Duffy. New Forcefields for Modeling Biomineralization Processes. *Journal of Physical Chemistry C*, 111, 11943-11951, 2007.
- [61] K. Cho, X. Wang, Z.G. Chen, D.M. Shin. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clinical Cancer Research*, 14, 1310-1316, 2008.
- [62] C. Coman, L.F. Leopold, O.D. Rugina, L.B. Tudoran, N. Leopold, M. Tofana, C. Socaciu. Green synthesis of gold nanoparticles by *Allium sativum* extract and their assessment as SERS substrate. *Journal of Nanoparticle Research*, 16, 2158, 2014.
- [63] J. Lee, S. Gupta, J.S. Huang, L.P. Jayathilaka, B.S. Lee. HPLC-MTT essay: Anticancer activity of aqueous garlic extract is from allicin. *Analytical Biochemistry*, 436, 187-189, 2013.
- [64] H. Amagase. Clarifying the real bioactive constituents of garlic. *The Journal of Nutrition*, 136, 716S-725S, 2006.
- [65] T. Ghazanfari, R. Yaraee, B. Rahmati, H. Hakimzadeh, J. Shams, M.R. Nadoushan-Jalali. *In vitro* cytotoxic effect of garlic extract on malignant and nonmalignant cell lines, *immunopharmacology and immunotoxicology*, 33, 603-608, 2011.
- [66] A.I. Bhuiyan, V.T. Papajani, M. Paci, S. Melino. Glutathione-Garlic Sulfur Conjugates: Slow Hydrogen Sulfide Releasing Agents for Therapeutic Applications. *Molecules*, 20, 1731-1750, 2015.

- [67] C.C. Perry, M. Weatherly, T. Beale, A. Randriamahefa. Atomic force microscopy study of the antimicrobial activity of aqueous garlic versus ampicillin against escherichia coli and staphylococcus aureus. *Science of Food and Agriculture*, 89, 958-964, 2009.
- [68] P. Hohenberg, W. Kohn. Inhomogeneous electron gas. *Physical Review B*, 136, 864-872, 1964.
- [69] H.M. James, A.S. Coolidge. The ground State of the Hydrogen Molecule. *Journal of Chemical Physics*, 1, 825-835, 1933.
- [70] P. Jurecka, J. Cerny, P. Hobza, R.D. Salahub. Density Functional Theory Augmented with an Empirical Dispersion Term. Interaction Energies and Geometries of 80 Noncovalent Complexes Compared with ab initio Quantum Mechanics Calculations. *Journal of Computational Chemistry*, 28, 555-569, 2007.
- [71] W. Kohn, L. Sham. Self-consistent equations including exchange and correlation effects. *Physical Review B*, 140, 1133-1138, 1965.
- [72] C.T. Lee, W.T. Yang, R.G. Parr. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron-density. *Physical Review B*, 37, 785-789, 1988.
- [73] J.P. Perdew. Density-functional approximation for the correlation-energy of the inhomogeneous electron-gas. *Physical Review B*. 33, 8822-8824, 1986.
- [74] J.P. Perdew, K. Burke, M. Ernzerhof. Generalized gradient approximation made simple. *Physical Review Letter*, 77, 3865-3868, 1996.
- [75] J.P. Perdew, K. Burke, M. Ernzerhof. Generalized gradient approximation made simple. *Physical Review Letter*, 78, 1396, 1997.

[76] Y. Zhao, D.G. Truhlar. The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals. *Theoretical Chemistry Account*, 120, 215-241, 2008.

[77] Y. Zhao, D.G. Truhlar, Applications and validations of the Minnesota density functionals. *Chemical Physics Letters*, 502, 1-13, 2011.