


Nota Técnica

Efecto de la densidad de siembra, fertilización potásica y almacenamiento de los bulbos sobre la concentración de alicina en ajo criollo morado (*Allium sativum* L.) determinada mediante HPLC

Effect of planting density, potassium fertilization and bulb storage condition on allicin concentration of purple creole garlic (*Allium sativum* L.) by HPLC method

Henry MUJICA¹, María PÉREZ DE CAMACARO², María Elena SANABRIA CHOPITE²  y Aracelis GIMÉNEZ².

¹Universidad Pedagógica Experimental Libertador (UPEL), Instituto Pedagógico de Barquisimeto "Luis Beltrán Prieto Figueroa". Departamento de Educación Técnica, Narquisimeto, estado Lara, Venezuela y ²Universidad Centrocidental Lisandro Alvarado (UCLA), Decanato de Agronomía, Posgrado de Agronomía. Frente a la Urbanización Terepaima, entre Redoma de Agua Viva y Urbanización Chucho Briceño, Cabudare, estado Lara
E-mail: mesanabria@ucla.edu.ve  Autor para correspondencia

Recibido: 01/10/2013 Fin de arbitraje: 29/11/2013 Revisión recibida: 12/12/2013 Aceptado: 22/12/2013

RESUMEN

El propósito del trabajo fue determinar las concentraciones de alicina en bulbos de ajo morado y su relación con la densidad de siembra, la nutrición con KNO₃ y las condiciones de almacenamiento, utilizando la técnica de HPLC. Para la etapa de campo se empleó un diseño en bloques al azar con arreglo de tratamientos en parcelas divididas, con tres densidades de siembra (100, 50 y 33,33 plantas m⁻²) y tres dosis de KNO₃ (25, 50 y 100 kg ha⁻¹). Para la etapa de almacenamiento el diseño fue completamente al azar, con arreglo de tratamientos en factorial 3²x2, distribuidos en dos lotes de 180 bulbos, uno almacenado a temperatura ambiente (25 ± 2 °C y 70% HR) y el otro refrigerado a 10 ± 2°C con 85% HR, durante 90 días. Las evaluaciones se realizaron al momento de la cosecha para todos los tratamientos aplicados en campo, y de allí se seleccionó el tratamiento con mayor concentración de alicina para evaluar su comportamiento a los 30, 60 y 90 dda. Como resultado, el tratamiento de 50 plantas m⁻² y 100 kg ha⁻¹ presentó el mayor nivel de alicina (12,3 mg g). Se registró una mayor concentración de alicina en los bulbos colocados a 10 °C, 85% HR. Además, se observó una reducción significativa del contenido de este compuesto en las dos condiciones estudiadas a medida que transcurrió el tiempo de almacenamiento, aunque la pérdida fue mayor en los bulbos almacenados a mayor temperatura y menor HR.

Palabras clave: *Allium sativum*, tiosulfatos, nutrición, almacenamiento

ABSTRACT

The purpose of this research was to determine the levels of purple garlic allicin and its relation to planting density, nutrition with KNO₃ and storage conditions using the technique of HPLC. For stage field design was used with random block arrangement of treatments in a split plot, with three planting densities (100, 50 and 33.33 plants m⁻²) and three doses of KNO₃ (25, 50 and 100 kg ha⁻¹). For the storage stage used a completely randomized design with factorial arrangement of treatments in 3² x 2, divided into two lots of 180 bulbs, one stored at room temperature (25 ± 2 °C and 70% RH) and the other cooled to 10 ± 2 °C with 85% RH for 90 days. Evaluations were performed at harvest time for all treatments applied field and hence the treatment was selected with the highest concentration of allicin to evaluate their behavior at 30, 60 and 90 das. As a result, treatment of 50 plants m⁻² and 100 kg ha⁻¹ had the highest content of allicin (12.3 mg g). A higher concentration of allicin was recorded in the bulbs placed at 10 °C, 85% RH. Furthermore, a significant reduction of the content of this compound in the two conditions studied as storage time is observed, the reduction was greater in the bulbs stored at higher temperatures and lower RH.

Key words: *Allium sativum*, thiosulfates, nutrition, storage

INTRODUCCIÓN

Las investigaciones sobre la biosíntesis de los constituyentes del olor y sabor en especies de *Allium*, se iniciaron con el descubrimiento de Stoll y Seebeck (1947) quienes determinaron la presencia de aliina en los tejidos de los bulbos de ajo, como una fuente estable del dialil tiosulfato (Alicina). Luego,

Lancaster *et al.* (2000) propusieron una vía de síntesis que requiere al péptido γ -glutamyl como intermediario y que conduce a la producción de los compuestos del aroma.

Una característica significativa de las especies de *Allium* es la presencia de compuestos organo-azufrados, cuya composición y cantidad están

fuertemente afectadas por factores genéticos y ambientales (Randle, 1997; Kamenetsky *et al.*, 2005). Los mayores generadores de estas sustancias son aminoácidos no volátiles, incluyendo al alquenol cisteín sulfóxidos (ACSOs) y dipéptidos relacionados (Kasuga *et al.*, 2001; Rybak *et al.*, 2004). Las diferencias en la intensidad del sabor entre las especies de este género se debe a la presencia de varios precursores y a la proporción en la cual ellos son acumulados, los cuales derivan del S-alk(en)il-L-cisteín sulfóxido (Randle y Lancaster, 2002).

La alicina es un compuesto sulfuroso natural que representa alrededor del 70% de los tiosulfinatos producidos cuando aliina, isoaliina y metiina interactúan con la enzima alinasa, luego de que los bulbos maduros son estrujados o dañados (Arnault *et al.*, 2003; Shadkchan *et al.*, 2004). El ajo fresco o procesado, contiene pequeñas cantidades de alicina, las cuales se han asociado con algunas propiedades saludables como antimicrobial y anti-inflamatorio (Kasuga *et al.*, 2001; Shadkman *et al.*, 2004), además la disminución de la agregación plaquetaria y la prevención de la arterosclerosis (Miron *et al.*, 2003).

La mayoría de los bulbos intactos presentan el precursor no volátil S-alk(en)il-L-cisteín sulfóxido. La enzima alinasa cataliza la conversión de este compuesto a tiosulfinatos, mientras el piruvato y el amonio son formados como subproductos (Nishimura *et al.*, 2000). Los tiosulfinatos son relativamente inestables, cuando son almacenados por largos períodos y temperaturas superiores a 25 °C ya que pasan a formar di, tri y polisulfuros mas complejos (Kubec *et al.*, 2007).

Los compuestos S-metil-L-cisteín sulfóxido (metiina), S-alil-L-cisteín sulfóxido (aliina) y S-trans-1-propenil-L-cisteín sulfóxido (isoaliina) han sido reportados como constituyentes de ajo, cebolla y ajo porro, siendo este último el precursor del factor lacrimógeno de la cebolla (Vagen y Sliestad, 2008). La metiina ha sido el mayor componente detectado en algunas especies de *Allium*, mientras que aliina e isoaliina se han encontrado en menor cantidad (Kubec *et al.*, 2002). La proporción de tiosulfinatos para especies silvestres varía entre 0,006 y 0,309% (Krest *et al.*, 2002).

Los derivados del cisteín sulfóxido están presentes en todas las partes de la planta de *Allium*. Así, la metiina, aliina e isoaliina fueron aislados de bulbos, tallos, hojas y flores de *Allium siculum* y son

los metabolitos secundarios más comunes en la mayoría de las especies de este género (Krest *et al.*, 2002; Keusgen *et al.*, 2002; Kubec *et al.*, 2000). Sin embargo, la concentración relativa de esos derivados también puede cambiar con el tiempo de almacenamiento del órgano en estudio y las condiciones que se utilicen para su conservación.

En Venezuela la información sobre la fisiología poscosecha del ajo durante el almacenamiento es aún escasa, sobre todo el aspecto bioquímico ha sido poco estudiado, considerando que el olor característico del ajo proviene de la mezcla de varios sulfuros producidos en el metabolismo secundario. En este sentido, este trabajo tuvo como propósito evaluar el efecto de la densidad de siembra, la nutrición con KNO₃ y las condiciones de almacenamiento sobre la concentración del metabolito llamado alicina en bulbos de ajo criollo morado.

MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo de campo se llevó a cabo en la Finca San Isidro, situada en la localidad de Monte Carmelo, estado Lara, a una altitud de 1.700 msnm. El manejo agronómico estuvo basado en el plan aplicado normalmente por los productores de la zona, es decir, en la fertilización se aplicaron 90 kg.ha⁻¹ de urea a los 10 días después de la siembra (dds), 70 kg.ha⁻¹ de fórmula completa (12-24-12) al inicio de la bulbificación y 70 kg.ha⁻¹ de 12-12-17 en plena bulbificación (75 dds). Se utilizó riego por aspersión, aplicado en intervalos de 3 días. El control de malezas se realizó con Hache Uno 2000® (Fluazifop-p-butil) (1 L.ha⁻¹) a los 15 y 45 dds. Para la presencia de Thrips se empleó Amidor® (Metamidofos) (1 L.ha⁻¹).

Se utilizó un diseño de experimento en bloques al azar (cinco bloques) con arreglo de tratamientos en parcelas divididas, donde en la parcela principal se emplearon tres densidades de siembra: D₁ = 100 plantas m⁻² (5 cm entre plantas y 20 cm entre hileras), D₂ = 50 plantas m⁻² (10 cm entre plantas y 20 cm entre hileras) y D₃: 33 plantas m⁻² (15 cm entre plantas y 20 cm entre hileras); mientras que en las sub-parcelas se aplicaron tres dosis de potasio: K₁ = 25 kg ha⁻¹, K₂ = 50 kg ha⁻¹ y K₃ = 100 kg ha⁻¹, empleando como fuente el Nitrato de Potasio (KNO₃).

Para el ensayo de almacenamiento, los bulbos se colocaron sobre mesones en bandejas plásticas en un cuarto a temperatura ambiente (25 ± 2 °C y 70% Humedad relativa (HR) y en cavas de refrigeración

(10 ± 2 °C con 85% HR), durante 90 días bajo condiciones controladas de temperatura y HR. Se estableció un diseño completamente al azar con arreglo de tratamientos en factorial $3^2 \times 2$. Las determinaciones de alicina se hicieron al momento de la cosecha para todos los tratamientos aplicados en campo, y de allí se seleccionó el tratamiento con mayor concentración de alicina (50 plantas m^{-2} y 100 kg ha^{-1} de KNO_3), para evaluar su comportamiento a los 30, 60 y 90 días después del almacenamiento (dda). Se realizaron análisis de varianza y pruebas de media según Tukey con un nivel de $P < 0,05$ para los niveles, factores e interacciones que resultaron significativos utilizando el paquete estadístico Statistic para Windows 8.0.

Para la preparación del extracto se utilizaron bulbos de ajo criollo morado previamente liofilizados en un equipo Labconco Freezone-6 a 0,22 mBar durante 72 horas, y se siguió el método descrito por Perotto *et al.* (2008). Se tomó 1 g de la muestra triturada se homogenizó con 10 mL de agua destilada y se dejó en reposo durante 10 min. Luego se colectaron 5 mL y se centrifugó a 14000 rpm por 5 min, pasado este tiempo se extrajo 1 mL del sobrenadante y se mezcló con 1 mL de metanol absoluto. Esta mezcla fue centrifugada a 14000 rpm durante 5 minutos y se tomó 1 mL del sobrenadante para inyectar en el cromatógrafo.

La separación de la alicina en los extractos de ajo se llevó a cabo mediante Cromatografía Líquida de Alto Performance (HPLC) utilizando un cromatógrafo Waters® modelo 486 en fase inversa, con una columna Symetry C_{18} de 3,5 μm de tamaño de partícula y de 4,6 x 100 mm de diámetro y largo, respectivamente y un detector ultravioleta Waters 410, operado a una longitud de onda de 205 nanómetros (nm), recomendado para el estándar alicina de Catalyst R&D®.

Se utilizó una elución isocrática en metanol: agua (50:50% v/v) como fase móvil a un flujo de 1

mL min^{-1} (Sarah, 2005). Se inyectaron 10 μL del extracto metanólico en el equipo HPLC a 25 °C. Los tiempos de retención y el espectro de absorción obtenidos para cada muestra fueron comparados con el estándar comercial alicina de Catalyst R&D®. La cuantificación se realizó por el método de la curva del estándar $Y=44164X-11951$, utilizando diferentes concentraciones que fueron inyectadas en el cromatógrafo (0,0169; 0,0793; 0,1230; 0,1775 y 0,2550 g mL). Se inyectaron 12,2 μg mL; 57,1 μg mL; 88,5 μg mL; 12,8 μg mL y 18,4 μg mL del estándar. Los resultados fueron expresados como $mg g^{-1}$ de masa seca.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Perfil de separación de la alicina

El perfil de separación generado por el cromatograma de las muestras de ajo criollo morado al momento de la cosecha es mostrado en la Figura 1. En todos los tratamientos, un pico presentó un espectro similar al estándar de la alicina, con tiempo de retención (Tr) de 5,57 min y una absorbancia de 205 nm. Este Tr coincide parcialmente con Perotto *et al.* (2008) quienes aplicaron la técnica de HPLC y reportaron la presencia de alicina en ajo argentino indicando un Tr 5,83 min e igual longitud de onda. Asimismo, Leelarungrayub *et al.* (2006) reportaron un cromatograma típico para muestras de cebollín donde además de otros compuestos destaca la alicina con un Tr de 4,62 min.

Cuantificación de la alicina

En el Cuadro 1 se presentan los resultados de la cuantificación de la alicina determinados en los bulbos de ajo morado al momento de la cosecha. Los tratamientos aplicados en campo afectaron el contenido de éste compuesto, estableciéndose una interacción altamente significativa entre la densidad y las dosis de KNO_3 , correspondiendo las mayores concentraciones ($13,3 mg g^{-1}$) a los bulbos donde se

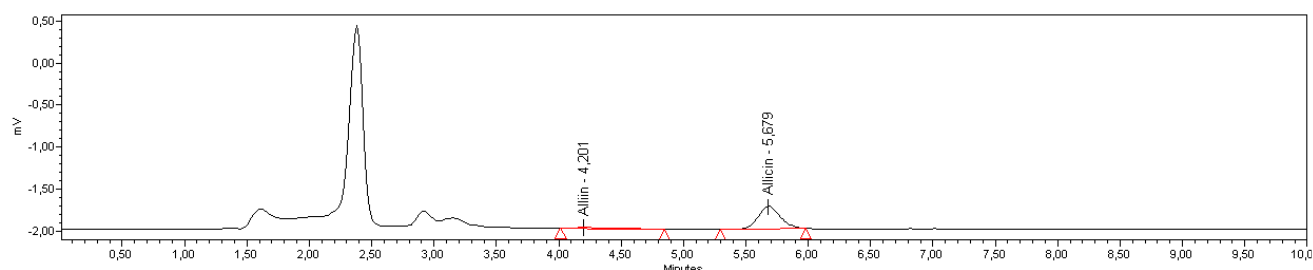


Figura 1. Cromatograma de las muestras de ajo criollo morado (*Allium sativum* L.) mostrando la separación de alicina al momento de la cosecha.

utilizó la densidad de 50 plantas m⁻² y se aplicaron 100 kg ha⁻¹ (Datos no mostrados).

En los resultados presentados se pudo observar que tanto la densidad como la aplicación adicional de KNO₃ en campo, tuvieron un efecto significativo sobre el contenido de alicina en los bulbos de ajo. En el caso de los bulbos provenientes de las parcelas con bajas poblaciones se registró la mayor cantidad de alicina, en comparación con aquellos de las poblaciones más densas; mientras que en las dosis de KNO₃, se observó una respuesta lineal, debido a que a medida que se aumentó la cantidad del fertilizante también se incrementaron los contenidos de este compuesto en los bulbos (Cuadro 1).

La explicación del efecto del KNO₃ aplicado en campo sobre la concentración de alicina observado en este ensayo, podría estar asociado con el papel del K en la formación de los precursores del aroma. El K pudiera estimular la hidrólisis del S-alk(en)il-L-cisteín sulfóxido para que reaccione con la enzima alinasa y produzca algunos sulfuros volátiles (Yoo *et al.*, 2006; Losák *et al.*, 2010), entre los cuales está la alicina. Una explicación alternativa pudiera ser que el aporte de nitrógeno al suelo favorece la síntesis de proteínas en el ajo (cebolla), y por tanto la producción de la enzima aliina (Huchette *et al.*, 2007).

También se ha demostrado el efecto del N sobre este proceso enzimático en cebolla, ya que la

alinasa en un primer paso transforma 2 moléculas de aliina en 2 de ácido alilsulfénico, 2 de ácido pirúvico y 2 de amoníaco (McCallum *et al.*, 2005). Otros estudios en nutrición mineral han indicado que la suplencia de N en exceso tiende a reducir la síntesis y acumulación de compuestos fitoquímicos, mientras que la deficiencia tiene un efecto opuesto (Leskovar *et al.*, 2009).

Por otro lado, Keusgen *et al.*, (2002) consideró que el perfil del aroma en *Allium* dependió del patrón parental utilizado. Así, se puede establecer una muy buena correlación entre el tiosulfonato producido y el precursor del aroma. De acuerdo con estos autores, dependiendo de la especie involucrada, los híbridos corresponden más o menos a un “tipo ajo”, caracterizado por mayores niveles de los disulfuros di-2-propenilo y metil-1,2-propenilo, o un “tipo cebolla”, conteniendo predominantemente los disulfuros di-propilo y 1-propenil propilo en la fracción del aroma.

Esta aseveración también se corresponde con la actividad de la enzima alinasa, la cual debe ser suficiente para garantizar la total conversión del sulfóxido de cisteína a componentes volátiles del aroma (Losák *et al.*, 2010). Al respecto, Leelarungrayub *et al.* (2006) correlacionaron una mayor actividad de esta enzima con la producción de disulfuros en cebollín.

Una consideración importante es que los valores promedio de alicina presentes en el mejor tratamiento de campo (12,38 mg g⁻¹) y encontrados al momento de la cosecha, son superiores a los 0,28 mg g⁻¹ de ajo reportado por Cantwell *et al.* (2003). De igual manera, son similares a los 12 mg g⁻¹ reportados por Perotto *et al.* (2008) en ajo morado argentino y superiores a 9,0 mg g⁻¹ en ajo australiano (Sterling y Eagling, 2001). Las discrepancias en estos valores pueden ser atribuidas al genotipo y el método de análisis. Se ha demostrado que la síntesis de alicina es diferente en algunas especies de *Allium* posiblemente por “la ausencia del sulfóxido precursor” o la falta de un sistema de reducción capaz de reducir n-propil a n-alil derivados (Leelarungrayub *et al.*, 2006).

Las diferencias encontradas con respecto a otros estudios también podrían explicarse, además de los factores genéticos y ambientales (Sara *et al.*, 2005), a las condiciones de cultivo y el tiempo de cosecha (Sterling y Eagling, 2001), los cuales influyen en el estado fisiológico de la planta y pueden

Cuadro 1. Efecto de la densidad de siembra y la fertilización con KNO₃ sobre el contenido de alicina (mg g⁻¹) en el bulbo de ajo criollo morado (*Allium sativum* L.), al momento de la cosecha.

Tratamiento	Contenido de alicina (mg g ⁻¹)
Densidad (plantas m ⁻²) (De)	
33	8,86 b
50	12,54 a
100	7,95 c
Dosis KNO ₃ (kg ha ⁻¹) (Do)	
25	6,57 c
50	11,56 b
100	12,22 a
De x Do	**
Promedio	9,78
Coeficiente de variación (%)	1,61

† Medias seguidas por letras distintas son significativamente diferentes según Tukey (p < 0,05)

contribuir con las alteraciones cuantitativas de estos compuestos en los bulbos (Kopsell y Lefsrud, 2009). Variaciones significativas en las concentraciones de aliina, isoaliina y alicina han sido determinadas entre accesiones y entre plantas de ajo crecidas bajo diferentes condiciones ambientales (Kamenetsky *et al.*, 2005).

Asimismo, la cantidad de precursores del S-alil cisteín sulfóxido necesarios para aumentar el nivel de alicina formado en el tejido de ajo puede provenir de aquellos péptidos γ -glutamyl acoplados a la cadena (Lancaster y Shaw, 2001; Gorinstein *et al.*, 2008) y que no fueron detectados por la metodología utilizada. Por lo tanto, la concentración de este compuesto pudiera ser mayor, pero también se pueden producir pérdidas inevitables durante su purificación (Hu *et al.*, 2002).

Por otra parte, en el Cuadro 2 se presenta la evolución del contenido de alicina en los bulbos para el tratamiento de 50 plantas m⁻² y 100 kg ha⁻¹ durante el almacenamiento a 25 °C, 70% HR y 10 °C, 85% HR, respectivamente. Se puede observar que a partir de los 60 dda se encontraron diferencias significativas entre las 2 condiciones de almacenamiento, registrando una mayor concentración de alicina en los bulbos colocados a 10 °C, 85% HR.

Asimismo, a partir de los 30 dda el contenido de alicina en los bulbos registró una disminución significativa en las dos condiciones estudiadas, aunque esta pérdida fue más drástica durante el tiempo de almacenamiento a 25 °C y 70% HR comparado con las muestras colocadas a 10 °C y 85% HR, debido a que en la primera condición la reducción fue 6,79 mg g⁻¹ y en la segunda 2,62 mg g⁻¹.

Esta respuesta pudiera atribuirse a la degradación térmica del S-alk(en)il-cisteín sulfóxido formando mono, di, tri y tetrasulfuros, así como grupos di-metilos (Arnault *et al.*, 2003; Kubec *et al.*,

2007). De igual manera, la conservación de las concentraciones de alicina en los bulbos almacenados a bajas temperaturas (0 °C y 1 °C) fue observado previamente por Cantwell *et al.* (2003) y Sterling y Eagling (2001).

En esta investigación se pudieron observar variaciones en las concentraciones de alicina en las dos condiciones de almacenamiento. Estos resultados no concuerdan con Huchette *et al.* (2007) quienes no encontraron efecto directo de la temperatura sobre las cantidades de su precursor aliina en bulbos de ajo, pero señalaron que ella pudiera interactuar con los carbohidratos y alterar su acumulación afectando la conversión a alicina.

CONCLUSIONES

La densidad y la aplicación de KNO₃ en campo tuvieron un efecto significativo sobre la concentración de alicina en ajo criollo morado. En todos los tratamientos aplicados en campo se determinó la presencia de este compuesto, pero los bulbos desarrollados en las poblaciones de 50 plantas m⁻² y fertilizadas con 100 kg ha⁻¹, presentaron la mayor cantidad del metabolito.

Durante el almacenamiento del ajo criollo morado se registró una mayor concentración de alicina en los bulbos colocados a 10 °C, 85% HR. Además, se observó una reducción significativa del contenido de este compuesto tanto a 25 °C, 70% HR como a 10 °C, 85% HR a medida que transcurrió el tiempo de almacenamiento, aunque la pérdida fue mayor en los bulbos colocados a mayor temperatura y menor HR.

Las variaciones en el contenido a alicina observado en los bulbos de ajo morado durante el almacenamiento pudieran estar relacionadas con el material genético parental y las condiciones utilizadas para su conservación.

Cuadro 2. Cambios en el contenido de alicina (mg g⁻¹) en el bulbo de ajo criollo morado (*Allium sativum* L.) para el tratamiento 50 plantas m⁻² y 100 kg ha⁻¹ de KNO₃, luego de 30, 60 y 90 días bajo dos condiciones de almacenamiento.

Condición de Almacenamiento	Contenido de alicina (mg g ⁻¹)		
	Días después del almacenamiento		
	30	60	90
Ambiente (25 ± 2 °C, 70% HR)	15,44 a	10,47 b	8,65 b
Refrigerada (10 ± 2 °C, 85% HR)	15,87 a	14,57 a	13,25 a

† Medias de los tratamientos según Tukey (p < 0,05)

LITERATURA CITADA

- Arnault, I.; J. P. Christides, N. Mandon, T. Haffner and R. Kahane. 2003. High-performance ion-pair chromatography method for simultaneous analysis of alliin, deoxyalliin, allicin and dipeptide precursors in garlic products using multiple mass spectrometry and UV detection. *J. Chromatogr.* 991 (1): 69-75.
- Cantwell, M. I.; G. Hong, J. Kang and X. Nie. 2003. Controlled atmospheres retard sprout growth, affect compositional changes, and maintain visual quality attributes of garlic. *Acta Hort.* 600: 791-794.
- Gorinstein, S.; H. Leontowicz, M. Leontowicz, J. Namiesnik, N. Najman, J. Drzewieki and S. Trakhtenberg. 2008. Comparison of the main bioactive compounds and antioxidant activities in garlic and white and red onions after treatment protocols. *J. Agric. Food Chem.* 56 (12): 4418-4426.
- Hu, Q.; Q. Yang, O. Yamato, M. Yamasaki, Y. Maede and T. Yoshihara. 2002. Isolation and identification of organosulfur compounds oxidizing canine erythrocytes from garlic (*Allium sativum* L.). *J. Agric. Food Chem.* 50: 1059-1062.
- Huchette, O.; I. Arnault, J. Auger, C. Bellamy, L. Trueman, B. Thomas, S. Ochatt and R. Kahane. 2007. Genotype, nitrogen fertility and sulfur availability interact to affect flavour in garlic. (*Allium sativum* L.). *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 82: 79-88.
- Kamenetsky, R.; I. London, F. Khassanov, C. Kik, A. Van Heusden, M. Vrieling, K. Burger Meijer, J. Auger, I. Arnault and H. Rabinowitch. 2005. Diversity in fertility potential and organo-sulfur compounds among garlic from Central Asia. *Biodiversity and Conservation* 14: 281-295.
- Kasuga, S.; N. Uda, E. Kyo, M. Ushijima, N. Morihara and Y. Itakura. 2001. Pharmacological activities of aged garlic extract in comparison with other garlic preparations. *J. of Amer. Soc. for Nutr. Sci.* 22: 1080S-1084S.
- Keusgen, M.; H. Schulz, J. Glodex, I. Krest, H. Kruger, N. Herchert and J. Keller. 2002. Characterization of some *Allium* hybrids by aroma precursors, aroma profiles and allinase activity. *J. Agric. Food Chem.* 50: 2884-2890.
- Kopsell, D. A. and M. G. Lefsrud. 2009. Pre-harvest cultural growing conditions can influence carotenoid phytochemical concentrations in vegetable crops. *Acta Hort.* 841: 283-293.
- Krest, I.; J. Glodek and M. Keusgen. 2002. Cysteine sulfoxides and alliinase activity of some *Allium* species. *J. Agric. Food Chem.* 48: 3753-3760.
- Kubec, R.; S. Kim, D. McKeon and R. Musah. 2002. Isolation of S-n-butylcysteine sulfoxide and six n-butyl-containing thiosulfinates from *Allium siculum*. *J. Natural Prod.* 65: 960-964.
- Kubec, R.; J. Velisek and M. Musah. 2007. Allium discoloration: the color-forming potential of individual thiosulfinates and amino acids: structural requirements for the color-developing precursors. *J. Agric. Food Chem.* 54: 3491-3497.
- Kubec, R.; M. Svobodová and J. Velisek. 2000. Distribution of A-alk(en)ylcysteine sulfoxide in some *Allium* species. Identification of a new flavor precursor S-ethylcysteine sulfoxide (ethiin). *J. Agric. Food Chem.* 48: 428-433.
- Lancaster, J. E.; M. L. Shaw and E. F. Walton. 2000. S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides, allinase and aroma in *Leucocoryne*. *Phytochemistry* 55: 127-130.
- Lancaster, J. E. and M. L. Shaw. 2001. Metabolism of γ -glutamyl peptides during development, storage and sprouting in onion bulb. *Phytochemistry* 30: 2857-2859.
- Leelarungrayub, N.; V. Rattanapanone, N. Chanarat and J. Gebicki. 2006. Quantitative evaluation of the antioxidant properties of garlic and shallot preparations. *Nutrition* 22: 266-274.
- Leskovar, D. I.; K. Crosby and J. L. Jifón. 2009. Impact of agronomic practices on phytochemicals and quality of vegetable crops. *Acta Hort.* 841: 317-322.
- Losák, T.; J. Hlusék, S. Kraemar and A. Martensson. 2010. Effect of nitrogen and sulfur fertilization on yield, nitrates and cysteine and methionine content in onion (*Allium cepa* L.). *Acta Hort.* 852: 297-301.
- McCallum, J.; N. Porter, B. Searle, M. Shaw, B. Bettjeman and M. McManus. 2005. Sulfur and nitrogen fertility affects flavour of field-grown onions. *Plant Soil* 269: 151-158.

- Miron, T.; M. Mironchik, D. Mirelman, M. Wilchek and A. Rabinkov. 2003. Inhibition of tumor growth by novel approach: *in situ* allicin generation using alliinase delivery. *Mol. Cancer Therapy* 2: 1295-1301.
- Nishimura, H.; T. Takahashi, C. Wijaya, A. Satoh and T. Ariga. 2000. Thermochemical transformation of sulfur compounds in Japanese domestic *Allium victorialis* L. *Biofact.* 3: 257-263.
- Perotto, M. C.; V. Conci, E. Cafrune, P. Alochis and R. Bracamonte. 2008. Differences in the response of garlic cultivars to the eradication of five viruses. *Phyton Intern. J. of Experim. Botany* 25: 233-240.
- Randle, W. M. 1997. Genetic and environmental effects influencing flavor in onion. *Acta Hort.* 433: 299-304.
- Randle, W. M. and J. E. Lancaster. 2002. Sulphur compounds in *Alliums*. In: Rabinowitch H.D. y Currah L. (eds) *Allium Crop Science: Recent Advances*. CAB International, Wallingford, United Kingdom. p. 329-356.
- Rybak, M.; E. Calvey and J. Harnly. 2004. Quantitative determination of allicin in garlic: supercritical fluid extraction and standard addition of alliin. *J. Agric. and Food Chem.* 52 (4): 682-687.
- Sara, A.; M. Bergquist, U. Gertsson, P. Knuthsen and M. Olsson. 2005. Flavonoids in baby spinach (*Spinacia oleracea* L.): Changes during plant growth and storage. *J. Agric. Food Chem.* 53 (24): 9459-9464.
- Sarah, M. M. 2005. Studies on some biologically active natural products from *Tulbaghia alliacea*. A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science in the Department of Chemistry at the University of the Western Cape. 172 p.
- Shadkchan, Y.; E. Shemesh, D. Mirelman and T. Miron. 2004. Efficacy of alliin, the reactive molecule of garlic, in inhibiting *Aspergillus spp* in vitro, and in a murine model of disseminated aspergillosis. *J. of Antimicrobial Chemotherapy* 53: 832-836.
- Sterling, S. J. and D. R. Eagling. 2001. Agronomics and allicin yield of Australian grown garlic (*Allium sativum* L.). *Acta Hort.* 555: 63-69.
- Stoll, A. and E. Seebeck. 1947. Alliin the pure mother substances of garlic oil. *Experientia* 3: 114-115.
- Vagen, I. and R. Slimestad. 2008. Amount of characteristic compounds in 15 cultivars of onion (*Allium cepa* L.) in controlled field trials. *J. Sci. Food Agric.* 88: 404-411.
- Yoo, K. S.; L. Pike, K. Crosby, R. Jones and D. Leskovar. 2006. Differences in onion pungency due to cultivars, growth environment and bulb sizes. *Scientia Hort.* 110: 144-149.