

Excmo. Sr. Director  
Excmos. Srs. Académicos  
Señoras y señores:

Sean mis primeras palabras de agradecimiento a esta Real Academia por haberme elegido para ocupar la plaza vacante correspondiente a la Medalla n° 35. De manera muy especial agradezco a los que con entusiasmo suscribieron y apoyaron mi presentación: Profesores, Miguel Rubio Huertos, Octavio Carpena Artes y Román Casares López acompañados de un entusiasta equipo.

Gracias también a aquellos catedráticos de la Facultad de Farmacia, algunos de ellos aquí presentes, que me inculcaron el espíritu farmacéutico y la vocación docente e investigadora, gracias a lo cual he llegado a la máxima distinción de un universitario. De manera destacada a Román Casares López, mi "maestro", a quien he de agradecerle, además de la propuesta y el discurso de contestación, sus enseñanzas, todo el apoyo que me ha dado y sobre todo su gran amistad.

A mis compañeros, colaboradores y amigos, gracias por seguirme demostrando su afecto.

A mi familia, que con tanto cariño y comprensión me han ayudado siempre, sobre todo en este discurso: mi hijo Salvador con sus dibujos, mi hija M<sup>a</sup> del Pilar, colaboradora durante tantos años en el estudio de los aromas, mi prima Lydia Becker, en la interpretación de idiomas y mi sobrina M<sup>a</sup> Isabel Villanúa por el tratamiento de textos.

Me queda agradecer, de una manera muy especial a mi esposa M<sup>a</sup> del Pilar Martí Pedret, que con su compañía, paciencia y callada resignación ha soportado y aceptado el tiempo que no le he dedicado, por mis actividades profesionales.

Ingreso en la vacante producida por el fallecimiento del Excmo. Sr. D. Nazario Díaz López, cuya gran personalidad e incansable actividad destacó en el ejercicio de la profesión primero y posteriormente en la Administración Pública, donde

ejerció importantes cargos, en los que alcanzó diversas metas, para la clase farmacéutica, a través de disposiciones oficiales (Ley de Sanidad Nacional, Centro Técnico de Farmacobiología, etc.)

Mi relación con él comienza en 1.946, cuando colaboramos en la Dirección General de Sanidad en el campo de los Inspectores Farmacéuticos Municipales, posteriormente como cofundadores de la Sociedad Española de Bromatología y como miembros de esta Real Academia. Él siempre me demostró su amistad, pero no podía sospechar que fuera yo, precisamente, el que ocuparía su vacante.

Dos años antes de promulgarse la "Instrucción General de Sanidad" de 1.904, que definió e incluyó a la Farmacia como profesión sanitaria; más concretamente el 25 de abril de 1.902, en un brumoso valle de las montañas de Cantabria, nació Nazario Díaz López, a quien apadrinó en el bautismo el boticario de Luena, que también se llamaba Nazario.

El periodo escolar y el bachiller lo cursó con los Padres Escolapios de Villacarriedo (Santander) y de Madrid (Colegio de San Antón) en la calle de Hortaleza, esquina a la de la Farmacia, pared por medio a la Facultad de Farmacia, donde se licenció y doctoró; en este mismo edificio en que actualmente tiene su sede esta Real Academia.

Como farmacéutico comenzó su vida profesional en el valle de Luena en donde abrió una "botica" gracias a que le prestaron 600 pesetas para ello.

Hasta 1.936 ejerció la profesión en la provincia de Santander (Alceda, Corvera, San Vicente de Toranzo) siendo Secretario Técnico del Colegio Oficial de Farmacéuticos de Santander y después Inspector Provincial de Farmacia.

El 26 de julio de 1.940 ganó en propiedad, por concurso la plaza de Jefe Técnico de los Servicios Farmacéuticos de la Dirección General de Sanidad.

El 16 de Octubre de 1.941, la Jefatura Técnica de los Servicios Farmacéuticos de la Dirección General de Sanidad se transformó en Inspección General de Farmacia siendo nombrado el Dr. Nazario Díaz López Inspector General de Farmacia, cargo que ocupó hasta su jubilación en 1.972; aún cuando en 1.964 la Inspección se transformó en Subdirección General de Farmacia no dejó de ser el Inspector General, pues su nombramiento lo fue por concurso público y no por libre designación o "digitalmente".

El Dr. Nazario Díaz López, que desde el 2 de marzo de 1.945 comenzó su labor en esta Real Academia de Farmacia, ingresó como Académico de Número el 23 de Abril de 1.949.

Su brillante discurso con el título de "Análisis elemental y comparado de legislación farmacéutica nacional" fue contestado por el Dr. Fernando Hergueta Vidal.

Su labor en la Academia fue muy activa, siendo:

Vocal de la Comisión de Hacienda (1.952)

Vocal de la Comisión de Admisiones (1.956 - 1.958)

Presidente de la Comisión de Higiene y Sanidad (1.963 - 1.986)

Vicesecretario (1.967 - 1.970)

Secretario Perpetuo (1.970 - 1.978)

Medalla Carracido de Plata.

Fue miembro de diversos Jurados para los Concursos Científicos. Representó a la Academia en diversos Tribunales de oposiciones.

Redactor de diversos informes concretos encargados a la Academia, como el célebre de la Talidomida.

No es este el momento de hacer una exhaustiva biografía suya, pero en los archivos de la Secretaría y de la Biblioteca de esta Academia, y en la Cátedra de Historia de la Farmacia en Madrid y en la prensa profesional farmacéutica, se puede consultar su labor y las obras publicadas por él.

Un recuerdo emocionado a su Memoria y un saludo para sus hijos.

Desde 1.955, en que comencé mi colaboración con la Commission International des Industries Agricoles, en materia de los Aditivos alimentarios, me orienté principalmente por aquellos que influyen en los caracteres organolépticos y más concretamente en 1.973 comencé mi colaboración con el "Centre de Recherches sur l'Aromatisation", que me introdujo en el sorprendente campo de los aromas.

El "Centre de recherche sur l'Aromatisation" se fundó en 1.969, con ocasión de una reunión en los Laboratorios GATTEFOSSE de Lyon, a la que asistieron los profesores, VERAIN, REVOL Y ROUZET y los Srs. GATTEFOSSE Y PEYRON. Comenzaron las actividades del Centro y en 1.970 se celebraron las I Journées sur l'Aromatisation en la Facultad de Farmacia de Grenoble (Francia) que se han ido celebrando ininterrumpidamente cada año.

En 1.977, en razón al aporte científico de los Profesores VILLANÚA de Madrid y FENAROLI de Milán, el Centro cambia de nombre, denominándose "Centre europeen pour la recherche sur l'Aromatisation".

El Centro es lazo de unión entre los Profesores universitarios. VERAIN (Grenoble), ROUZET (Nantes), REVOL (Lyon), FENAROLI (Milán), VILLANÚA (Madrid), TRAISNEL (Lille), DI GIACOMO (Reggio Calabria), LE MAGNEN (Paris), BOUCHERLE (Grenoble), los Técnicos de las Industrias productoras de aromas, alimentarias o farmacéuticas: PEYRON (Lautier-Grasse), MARION (Nestlé-Vevey), TEISSÈRE (Roure-Grasse), ZOLA (Adrian-Marsella), GARNERO (Robertet-Grasse), LANET (Roussel-Paris), HARIEL (Oril-Paris), BENTEJAL (Specia-Paris) y representantes de Organismos de la Administración: ARTIGES (Pharmacopee Europeenne), THEVENOT (Service de la repression des fraudes), BERNER (Manuel Suisse des denrees alimentaires), GRUNDSCHÖBER (I.O.F.I. International Organization of Food Industries), DEPLEDT (Institut National de la consommation), LALANNE (Ministere de la Santé. Paris).

Por ello pensé, que sería interesante que mi discurso de ingreso versara sobre "El maravilloso mundo de los Aromas".

# **EL MARAVILLOSO MUNDO DE LOS AROMAS**

Discurso pronunciado por el Excmo. Sr. D. León Villanúa Fungairiño, en la sesión pública, celebrada, el día 15 de febrero de 1990, para tomar posesión de la plaza de Académico de Número de la Real Academia de Farmacia.

# I. PSICOFISIOLOGIA DE LA ALIMENTACION

## 1.-EL APETITO Y LOS CARACTERES ORGANOLEPTICOS.

Entre los seres vivos existen algunos cuya elección del alimento se hace únicamente por "instinto" gracias a unos impulsos innatos orientados sin duda hacia las sustancias nutritivas que necesita su organismo. En esos seres vivos, situados en la parte inferior de la escala animal la absorción del alimento está desprovista de toda reacción afectiva. Por el contrario, en el hombre y en otros animales, dotados de un equipo sensorial y un sistema nervioso particular se comprueba fácilmente que el mecanismo de la elección de los alimentos está guiado esencialmente por un "placer", el encontrar sensaciones agradables, evitando las desagradables.

Hay que reconocer, por tanto, que el acto del consumo de los alimentos es un "acto psicofisiológico de naturaleza afectiva" guiado por los órganos de los sentidos. Vemos por tanto que el alimento no es solo indispensable para satisfacer la necesidad fisiológica vital de nutrirse si no que también posee un tono emotivo particular (place, se desea, gusta y se conoce). Por ello, la definición de alimento que da el Diccionario de la Lengua: "Alimento es cualquier sustancia que sirve para nutrir", debería ampliarse con las palabras "*que gusta y se conoce*".

El tono emotivo de los alimentos es de dos tipos diferentes: el placer y el desagrado, según su *localización* y también el *momento* de su percepción en el consumo.

Existe un placer muy localizado y muy especificado que se experimenta en la boca en el momento preciso en que el alimento entra en contacto con los receptores del "complejo sensorial de las mucosas bucal y nasal". Comprende cinco modalidades sensoriales: olfato, gusto, tacto bucal, sentido térmico y *kinestesia* (resistencia mecánica a la masticación). Dichas sensaciones se denominan globalmente la "*palatabilidad*" (cualidad de ser grato al paladar un alimento).

Otra sensación, "efecto post-ingestivo", que se experimenta en todo el cuerpo después de la absorción de los alimentos, es un sentimiento general mal localizado, pero que posee siempre una carga emotiva percibida de dos formas: placer (bien estar, gozo, euforia) o desagrado (malestar, pesadez, sufrimiento).

Entre los dos tipos de sensibilidad, la palatabilidad y el efecto post-ingestivo, existe una gran diferencia; los mensajes de la boca y la nariz tienen la precisión, sensibilidad y localización en los receptores de sensaciones exteriores (extrarreceptivos), mientras que las otras sensaciones del interior del cuerpo utilizan los intrarreceptivos menos precisos que los anteriores, pero cuyos mensajes se traducen en una sensación global (agradable o desagradable) denominada "*coenestesia*".

La importancia en el comportamiento alimentario de la palatabilidad y el efecto post-ingestivo varía según dos cuestiones: el "estado de necesidad" y el "tono emocional del alimento". Dicha importancia varía según los estados de "hambre" o de "saciedad" del organismo. Pero existe un término medio que es el "apetito" (gana de comer). Es una agradable sensación subjetiva difícil de definir, pero que todos conocemos y que si se incrementa, la sensación placentera del apetito se transforma en molesta, constituyendo el "*hambre*" (gana y necesidad de comer).

Nos preguntamos que es lo que produce la sensación de apetito y como está regulada para que aparezca tras unas horas de ayuno y desaparezca al comiendo dando paso a la sensación de "*saciedad*" (hartura producida por satisfacer con exceso el deseo de una cosa).

En el hombre y los animales superiores existen dos tendencias cuando no conocen un alimento: la curiosidad y la desconfianza. LORENZ descubrió que las especies "*eurifagas*" (que tienden a ensanchar su régimen alimentario) lo hacen por simple curiosidad; se trata de un fenómeno psíquico (interés por lo desconocido, deseo de saber o averiguar algo). Por el contrario las poblaciones de civilizaciones tradicionales o de sociedades industriales profesan desconfianza por los alimentos desconocidos.

El hombre ha heredado de sus antecesores de un pasado lejano un fenómeno biológico general compartido con sus congéneres: la poderosa vocación del placer de comer.

En los mamíferos y en los pájaros el amamantado o el cebado por las respectivas progenitoras son actos nutricionales que establecen un vínculo de amor con las crías.

El comportamiento alimentario del hombre está relacionado con ciertos factores:[1]

### -Externos

El alimento debe nutrir por su valor biológico debido a los nutrientes.

Pero el hombre no ha desarrollado su apetito natural por los nutrientes. Elige los alimentos por sus caracteres organolépticos que le recuerdan sensaciones agradables ya conocidas.

## -Internos

- a) Psicológicos: Estados de ánimo según tipos culturales y medios sociales.
- b) Fisiológicos: Necesidades metabólicas (hambre, sed); sensaciones digestivas y generales (apetito, saciedad, bienestar);
- c) Factores sensoriales: (gusto, olfato, tacto, vista y oído).

Gracias a los estudios de BROBECK, KENNEDY, ANAND, etc. [2] se sabe que en el hipotálamo existen una serie de centros nerviosos que regulan el apetito. Se han llegado a diferenciar unos centros laterales, cuyo estímulo produce hambre y unos centros más cercanos a la línea media, cuyo estímulo determina "*afagia*" (falta absoluta de apetito), así mismo hay estímulos sobre centros mediales que determinan la saciedad.

Hay dos principales teorías sobre que clase de estímulos actúan sobre dichos centros: la hipótesis de BROBECK que supone que sea la temperatura del cuerpo y por consiguiente la de la sangre, la que al bajar estimula el centro del apetito y al elevarse tras la comida lo paralice o estimule a los centros de la saciedad. Esta hipótesis es susceptible de objeciones, como la del buen apetito de los hipertiroideos, por ejemplo.

La teoría que parece más lógica es la de MAYER que indica que el nivel de glucemia, que disminuye en el ayuno y se eleva después de las comidas, influye sobre los centros respectivos, existiendo la posibilidad de la entrada de glucosa en las células de los tejidos y de los centros; de ahí el gran apetito de los diabéticos en los que la glucosa no entra adecuadamente en las células.

También es probable que, además de los estímulos indicados, existan otros que determinen conjuntamente la actividad de los centros apetito-saciedad a través de variaciones en la producción de insulina y no por estímulos nerviosos.

Los caracteres organolépticos (color, olor, sabor, tacto y oído) no solo tienen importancia en la elección de los alimentos, ya que también influyen sobre el funcionamiento digestivo: algunos estímulos desencadenantes (o cefálicos) hacen intervenir los órganos sensoriales (vista, olfato, gusto, tacto y oído) e incluso la memoria y afectividad del sujeto.

Las experiencias de PAWLOW J.P. le llevaron a distinguir dos tipos de reflejos: unos innatos anteriores a la experiencia y otros condicionados resultantes de la educación. La masticación de cualquier alimento provoca una secreción salivar, lo que es un reflejo innato. Pero la perspectiva de consumir un alimento favorito hace que "*la boca se vuelva agua*"; este es un reflejo condicionado. La masticación, la presencia de un alimento en la boca, los factores sensoriales, así como la memoria y el recuerdo de alimentos agradables, estimulan la secreción de tres pares de glándulas salivares (parótidas, submaxilares y sublinguales) y un reflejo esófago-salivar.

Por último, la secreción gástrica está dirigida por tres grupos de estímulos (cefálicos, gástricos e intestinales). Los cefálicos tienen un mecanismo nervioso y son transmitidos por el pneumogástrico; interviniendo así mismo reflejos innatos (estímulo masticatorio) y condicionados (caracteres organolépticos, hábitos alimentarios, recuerdo de un alimento agradable)



## 2.- LOS SENTIDOS

Nuestros sentidos del gusto y el olfato constituyen el más sorprendente de los laboratorios químicos. En una fracción de segundo pueden identificar la estructura química de compuestos cuyo análisis duraría días si se hicieran los métodos corrientes de análisis. Una nariz hábituada puede reconocer, por ejemplo, la casi totalidad de los integrantes de series homólogas de alcoholes, ácidos, aldehídos o mezclas complejas presentes en los alimentos.

Nuestros sentidos químicos son de gran importancia para nuestro bienestar. Determinan nuestra reacción frente a los alimentos y preparan la digestión. El olor de un bistec asado tiene un efecto inmediato en el metabolismo: se inicia la secreción de la saliva y de los jugos gástricos, incluso antes de empezar a comer. Al establecer unas condiciones favorables para la digestión, los factores determinantes del aroma de un alimento juegan un importante papel en la nutrición. [3,4,5].

### 2.1 SENTIDO DEL OLFATO

#### 2.1.1. CARACTERISTICAS ANATOMICAS Y FISIOLÓGICAS

El olfato es un sistema sensorial que presenta una estructura que transforma la energía que procede del medio ambiente.

Cuando respiramos, aspiramos el aire que penetra por las fosas nasales separadas por una fina pared de cartílago y hueso. El aire, con las sustancias olorosas, pasa a través de las cavidades nasales hasta la garganta. Por otra parte, las sustancias olorosas desde la boca pueden seguir la vía retranasal desde la garganta (Fig. 1).

El hombre enriquece su mucosa nasal de células olfativas. En la parte superior de la cavidad nasal hay una región esponjosa donde en una superficie de 10 cm<sup>2</sup> existen de 10 a 20 millones de receptores olfativos [6]. Cada uno de los receptores tienen vellosidades que penetran la mucosa que cubre el epitelio olfativo; que es un epitelio estratificado cuyas células entrelazadas forman una red entre cuyas mallas se insinúan las terminaciones de los nervios sensoriales [7] (Fig.2).

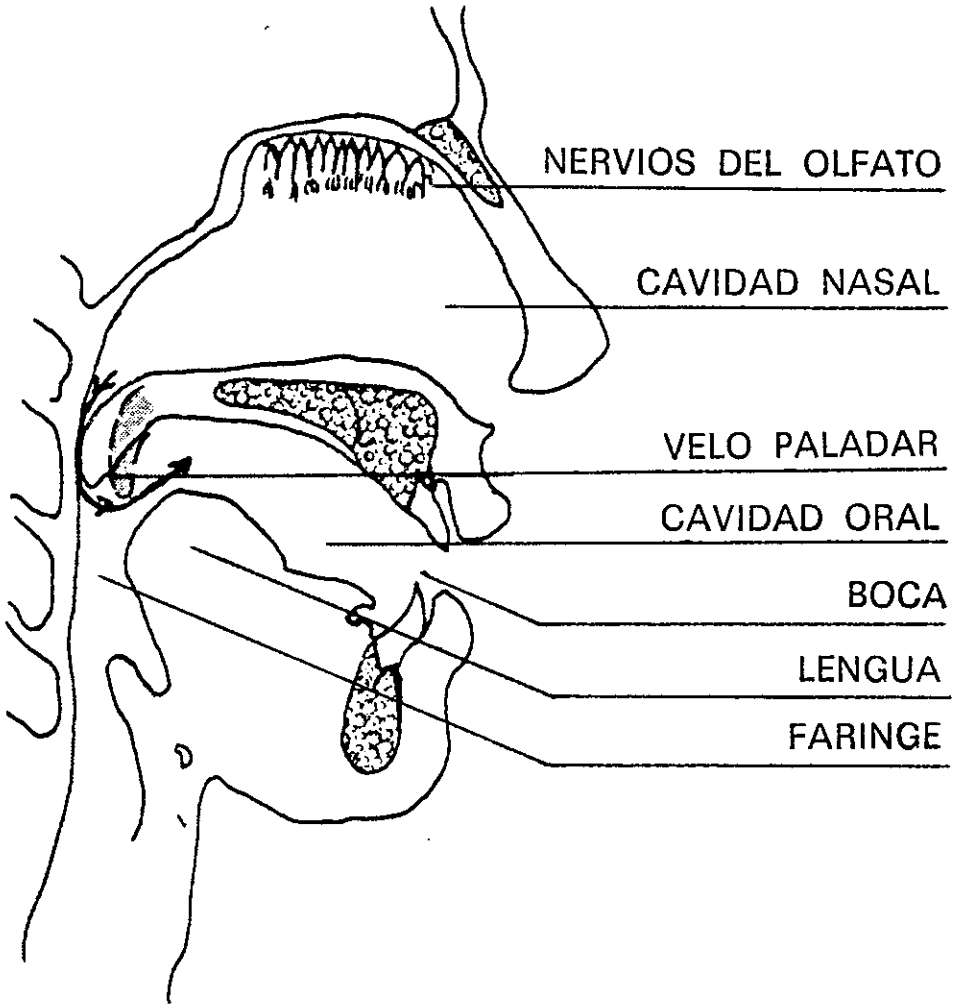


Fig. 1.

Se piensa que los olores estimulan dichas vellosidades y producen un cambio en el potencial eléctrico del receptor, lo que a su vez induce un impulso eléctrico que se transmite al cerebro a través del nervio olfativo.

Como todas las células nerviosas, las que constituyen el nervio olfativo tienen dos prolongaciones; de un lado las dendritas y de otro las axonas.

Mientras que las dendritas se extienden entre las células epiteliales para terminar en las vesículas claras que suben a la superficie de la mucosa; las axonas se reúnen en el otro extremo para formar el nervio olfativo que surge por un orificio de la lámina cribosa del etmoide. Así, alcanza el bulbo olfativo y seguidamente el cerebro. No importa en que parte del cerebro; en el comienzo era el rinoencéfalo o "cerebro del olfato".

La interacción del agente estimulante y el centro receptor depende fundamentalmente de los grupos funcionales de la estructura química de la molécula estimulante.

SADINI V [8] estudió el olor como base del análisis organoléptico de los alimentos, diseñando: el órgano del olfato y su funcionamiento; electrofisiología de la estimulación olfativa; valoración del estímulo y clasificación de los olores.

## 2.1.2. OLORES

HEIMERMANN [9,10] recapituló el mecanismo olfativo descomponiéndolo en cinco puntos:

- a) Sensación primaria: Fenómeno fisiológico del contacto de la molécula olorosa con la mucosa olfativa y posterior reacción neurofisiológica.
- b) La percepción: Toma de conciencia de la sensación. HEIMERMANN adoptó la definición de PETER CAWS:  
PERCEPCION = sensación + interpretación.
- c) Interpretación: Memoria. Bagaje cultural que percibe, que reconoce.
- d) Discriminación: "Descripción" y clasificación de los olores.
- e) Evaluación cualitativa: Calificación del olor en "agradable, indiferente, desagradable".

Para que una sustancia se pueda oler, debe reunir, en principio, dos condiciones: ser volátil a temperatura ambiente y ser liposoluble. Además debe existir una corriente de aire que transporte la molécula a los centros olfativos de la nariz. Todas las sustancias olorosas son gases o tienen una tensión de vapor alta y un punto de ebullición inferior a 300°C.

LINNEO, el padre de la taxonomía [11], que en el siglo XVIII empezó a establecer las normas para ordenar los seres vivos, intentó también clasificar las sustancias en función de sus olores, lo que fracasó más tarde por la falta de sustancias orgánicas que sirvieran de patrones de comparación.

En 1895 HENDRICK C. ZWAARDEMAKER estableció un sistema en el que todos los olores se agrupan en nueve tipos principales con subdivisiones en cada uno de ellos:

- |                          |   |
|--------------------------|---|
| 1.- Etéreo               | = Frutas, resinas, éteres.                            |
| 2.- Aromático            | = Alcanfor, clavo, lavanda, limón, almendras amargas. |
| 3.- Balsámico o fragante | = Flores, violeta, vainilla, cumarina.                |
| 4.- Ambrosiáceo          | = Ambar, almizcle.                                    |
| 5.- Aliáceo              | = Acido sulfhídrico, arsina, cloro.                   |
| 6.- Empireumático        | = Café tostado, benceno.                              |
| 7.- Caprino              | = Queso, grasa enranciada.                            |
| 8.- Repulsivo            | = Belladona, chinche.                                 |
| 9.- Nauseabundo o fétido | = Carroña, heces.                                     |

Dada la complejidad del gran número de olores naturales ha habido que modificar alguno de dichos nueve grupos.

Pero la clasificación de ZWAARDEMAKER NO es única, ya que CROCKER E.C. Y HENDERSON LL.F. han realizado otra en la que han reducido los olores a cuatro clases elementales:

- 1.- Fragante o dulce.
- 2.- Acido o agrio.
- 3.- Quemado o empireumático.
- 4.- Caprino o hircino.

## 2.2. SENTIDO DEL GUSTO

El estudio del sentido del gusto resulta de gran interés científico y tecnológico, debido a la función desempeñada en el reconocimiento, selección y aceptación de alimentos, medicamentos y otros productos químicos.

Aunque los procesos sensoriales de los sistemas táctil, auditivo y visual se conocen con bastante detalle, sin embargo con el gusto no empieza a conocerse hasta la actualidad su modo de acción a pesar de que con anterioridad se expusieron diversas teorías, rechazadas hoy por los estudios experimentales realizados.

Técnicas diversas aplicadas al estudio global del sentido del gusto, que podemos agrupar en tres: Técnicas bioquímicas y de farmacología molecular; técnicas

electrofisiológicas; técnicas psicofísicas y comportamentales; que no vamos a describir por apartarse de nuestro tema.

### 2.2.1. CARACTERÍSTICAS ANATÓMICAS Y FISIOLÓGICAS

El gusto, al igual que todos los sistemas sensoriales, presenta una estructura básica que le permite actuar como transformador de la energía química que le llega del medio ambiente.

Esta estructura básica está constituida por un *receptor*, precedido de estructuras accesorias (que modifican y acondicionan el estímulo químico que percibe el receptor), una *vía aferente* que transmite el estímulo a los centros nerviosos superiores (primarios y secundarios) y una *vía eferente* que devuelve el estímulo ya "*interpretado*".

A continuación haremos una breve descripción anatómica del sentido del gusto:

La antigua concepción de una subdivisión de la lengua en cuatro zonas gustativas parece hoy caducada. Actualmente la lengua sigue ejerciendo un papel primordial en la apreciación de los sabores, pero también se atribuye un papel no despreciable y a veces preponderante al paladar, la faringe, la laringe y la mucosa de la mejilla.

De una manera general se puede decir que la lengua detecta preferentemente los sabores salados y dulces y después el ácido y el amargo. El paladar detecta en un principio los sabores ácido y amargo en el velo del paladar y después el salado y el dulce en el paladar anterior. En cuanto a la bucofaringe parece que presenta afinidades equivalentes para los cuatro sabores.

#### 2.2.1.1. a) Receptores

Los receptores especializados del sentido del gusto se encuentran en la cavidad bucal, papilas y botones gustativos.

La superficie de la lengua está cubierta de numerosas protuberancias y crestas que se llaman papilas, también se encuentran en la epiglotis, el velo del paladar y la faringe, extendiendo de esta forma la recepción gustativa más allá de la lengua. Debe recordarse que las papilas no son las estructuras receptoras propiamente dichas, los receptores son los botones gustativos, pequeños conjuntos de células epiteliales modificadas, que se encuentran en las depresiones o surcos entre las papilas.

Podemos identificar cuatro clases de papilas [12,13] (Fig.3). Las papilas *filiformes*, que no contienen botones gustativos y sólo dan a la lengua su apariencia áspera. Las papilas *fungiformes*, con forma de hongo, aparecen principalmente sobre la punta y los laterales de la lengua, en ellas los botones gustativos se hallan dispersos en el epitelio superficial. Las papilas *foliadas* están formadas por una serie de tres a ocho pliegues paralelos ubicados sobre los laterales del fondo de la lengua y presentan los botones gustativos dispersos en los costados de los pliegues.

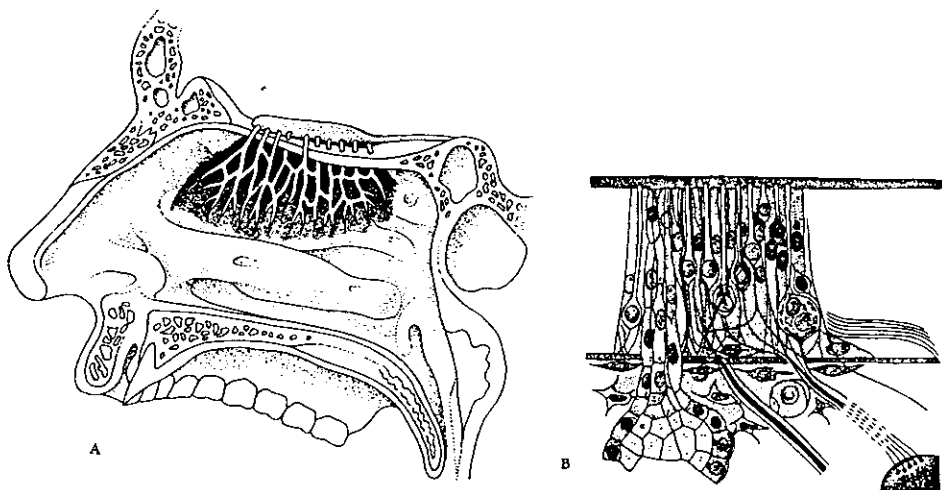


Fig. 2.—Receptores del olfato. A. Parte superior de la cavidad nasal. B. Microscopia de células de la mucosa del olfato.

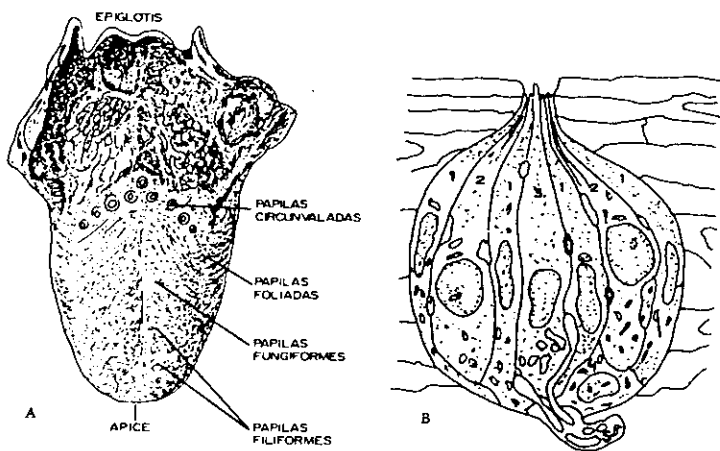


Fig. 3.—Receptores del gusto. A. Papilas de la lengua. B. Poro gustativo.

Las papilas *circunvaladas* forman una V invertida en el fondo de la lengua, asemejan mesetas chatas rodeadas por un surco y los botones gustativos se hallan presentes en los laterales de las papilas y en las paredes del surco limitante [14].

Las papilas del paladar están concentradas en la unión de la bóveda del paladar y el velo del paladar. Desde el punto de vista histológico estas papilas son parecidas a las papilas fungiformes de la lengua [15].

El botón gustativo, unidad de base, tiene una forma sensiblemente esférica, con un diámetro del orden de 100 micrones. Está constituido por un pequeño número de células fusiformes enfundadas en el epitelio superficial.

El polo del ápice está en comunicación directa con la cavidad oral por intermedio de un poro, que tiene un diámetro de un micrón aproximadamente, en la superficie de la lengua, que puede abrirse y cerrarse, y al que llegan las proyecciones ciliadas de las células gustativas [16].

El poro gustativo es un canal por el que pueden penetrar las soluciones líquidas y ponerse en contacto con las mencionadas proyecciones de los receptores (Fig. 3).

Numerosos factores pueden influir en la apertura o el cierre del poro: factores fisiológicos; aflujo de la sangre en los vasos del paladar; contracción de los músculos de la lengua en el curso de la masticación, etc.... factores químicos: los tioles cierran el poro gustativo (disminución de la agudeza gustativa) y trazas de metales divalentes (Cu, Ni, Zn) tienen un efecto contrario (aumento de la agudeza gustativa). El mecanismo que rige la apertura y cierre del poro es debido a una proteína específica que todavía no ha sido identificada. Esta "proteína guardabarrera" (término anglo-sajón) constituye el mecanismo de la regulación.

Según la naturaleza del estímulo químico nos conduce a dos clases de fenómenos:

La cadena proteica se enrolla sobre ella misma, forma un pelotón y provoca así la dilatación del poro del botón gustativo.

La misma cadena se desenrolla al contrario, toma una forma lineal y deja el poro gustativo cerrado.

Abriéndose o cerrándose el poro del botón gustativo, permite un contacto de la sustancia más o menos importante con las células sensoriales, que son células epiteliales diferenciadas, no células nerviosas. Las terminaciones nerviosas englobando estas células sensoriales transforman la despolarización de las mismas en influjos nerviosos.

Los botones del paladar se parecen igualmente a los que se encuentran a nivel de las papilas fungiformes (Fig. 4).

Por otra parte, la hipótesis emitida es que para cada sabor existe una proteína específica: dos de ellas ya han sido aisladas, la del sabor dulce en 1.966 y la del amargo en 1.968. Otro hecho se ha demostrado: los amargos no estimulan la producción de saliva, como lo hacen los condimentos, por ejemplo.

La función de sostén y la función gustativa son desempeñadas por las células sustentaculares y receptoras, respectivamente. Sin embargo, mediante las técnicas de micrografía óptica varios investigadores [17,18,19] demostraron que las células

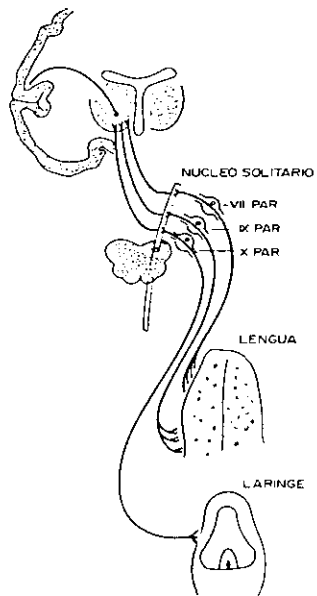
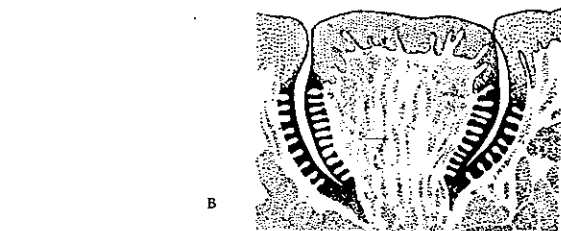
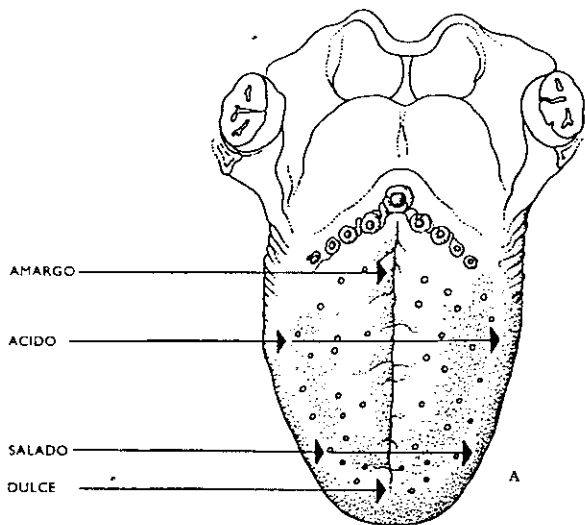


Fig. 5.

Fig. 4.—Receptores del gusto. A. Localización de los sabores. B. Sección de una papila (los poros son las formaciones blancas a lo largo de la fisura que rodea la papila). C. Botón gustativo (izquierda) con su fibra nerviosa (derecha).



sustentaculares y receptoras sólo representan los dos extremos de un mismo continuo y que las variaciones estructurales entre ambas reflejan únicamente diferentes estados de una misma clase de células. Esta metamorfosis celular tiene un sentido práctico porque permite explicar la renovación de los botones gustativos sometidos al desgaste debido a la estimulación gustativa.

Ahora bien, aún con el auxilio de este mecanismo regenerativo, el número de botones gustativos cambia con el transcurso del tiempo, así en los niños los botones gustativos están distribuidos ampliamente, en cambio, en la edad adulta y en la vejez el número se reduce considerablemente [20].

#### 2.2.1.2. b) Vias sensoriales

Las informaciones sensoriales son transmitidas por varios nervios principales (Fig. 5):

- el glosofaríngeo (novenos par craneal)
- la cuerda del tímpano (séptimo par craneal o nervio facial)
- el lingual (rama del trigémino)
- el pneumogástrico o vago (décimo par craneal)

La inervación sensorial de la lengua es debida a tres nervios: la cuerda del tímpano y el lingual (rama del trigémino por el maxilar inferior) en los dos tercios anteriores; el glosofaríngeo por el tercio posterior. El paladar y la mucosa de la mejilla dependen del nervio maxilar superior, rama del trigémino, mientras que la bucofaringe tiene sus sensaciones recogidas por el pneumogástrico.

Las fibras del lingual y de la cuerda del tímpano son entrelazadas hasta el nivel del temporal donde la cuerda del tímpano vuelve a unirse con el tronco del nervio facial.

Las fibras del trigémino presentan una primera sinápsis a nivel del ganglio esfenopalatino (nervio maxilar superior) o a nivel del ganglio ótico (nervio maxilar inferior); desde aquí las fibras son reagrupadas a nivel del ganglio geniculado antes de alcanzar el nudo solitario de donde parten por la cinta de REIL al tálamo y después a la corteza gustativa.

Las fibras del glosofaríngeo pasan por el ganglio de ANDERSCH, después alcanzan la parte media del nudo solitario, desde donde su trayecto es análogo al de las fibras del trigémino.

Las fibras de la cuerda del tímpano se reúnen a nivel del ganglio geniculado, con fibras procedentes del trigémino para alcanzar por el nervio intermediario de WRISBERG, la parte superior del nudo solitario y de la corteza, por un trayecto idéntico al de las fibras linguales y glosofaríngeas.

En fin, la bucofaringe ve recogidas sus sensaciones por fibras del pneumogástrico que pasan por el ganglio plexiforme antes de llegar al nudo del haz solitario.

Esto hace que el nudo solitario sea el punto de reagrupamiento de las fibras sensoriales del pneumogástrico, del glossofaríngeo, del intermediario de WRISBERG y del trigémino.

Para algunos, existiría un nudo somato-sensible llamado nudo gustativo de NAGEOTTE que sería un nudo común al glossofaríngeo y a la cuerda del tímpano, por tanto situado entre el ganglio de ANDERSCH y el ganglio geniculado.

Durante cierto tiempo se ha pensado que el Centro del gusto está situado sobre el arco límbico del cuerpo caloso a nivel del hipocampo; pero, actualmente parece que su localización se sitúa en el pie de la frontal ascendente inmediatamente por encima de la hendidura de SYLVIVS y detrás de la hendidura de ROLANDO, por tanto en la zona del opérculo de SYLVIVS.

### 2.2.1.3. c) Relaciones entre los nervios y los botones gustativos [15]

Los haces de nervios muy finos inervan el botón gustativo y penetran entre las células fusiformes que le constituyen. Se han puesto en evidencia dos tipos de contacto sináptico en el hombre.

Un tipo en el que las vesículas se agrupan a nivel de la membrana de la célula gustativa.

Un tipo en el que las vesículas se aglutinan sobre la membrana de la fibra nerviosa.

En el primer caso, la célula gustativa es un elemento presináptico.

En el segundo caso, la célula es postsináptica.

Se encuentran fibras nerviosas colinérgicas y adrenérgicas. No se ha podido poner en evidencia el tipo de fibras que intervienen en los dos tipos de sinápsis. Sin embargo la microscopia electrónica ha demostrado que los dos tipos de fibras nerviosas inervan al mismo tiempo el botón gustativo.

La microscopia electrónica demuestra que las fibras nerviosas se separan antes de penetrar en el botón gustativo e inervan una a una las células gustativas. Su diámetro es aproximadamente de 0,2 a 0,3 micrones y algunas se extienden hasta el tercio superior del botón gustativo. Las relaciones funcionales entre los nervios gustativos y las células del gusto se han puesto en evidencia por las experiencias de generación del botón gustativo, provocadas por sección de nervios aferentes y por la restauración de las funciones normales de este botón durante la regeneración de estos nervios.

### 2.2.1.4. d) Nacimiento del influjo nervioso [21]

La papila gustativa presenta microvellosidades que aumentan su superficie de contacto con la sustancia sávida. Estas microvellosidades se encuentran normalmente en el interior de la cúpula y constituyen la primera parte del receptor gustativo.

El mecanismo de la degustación puede descomponerse en dos tiempos:

**Fase primaria:** Corresponde al paso de la sustancia a través del poro central. Interviene la disolución de la sustancia en el líquido que se encuentra en el botón gustativo.

**Fase celular:** En el curso de la cual, la sustancia provoca, al contacto de las células sensoriales del botón gustativo, una despolarización que tiene por objeto inducir los influxos informadores en las fibras nerviosas eferentes. El proceso de despolarización no ha sido todavía dilucidado. La despolarización es proporcional a la intensidad del estímulo, es decir a la concentración salivar de la sustancia estimulante.

Los influxos nerviosos gustativos están dirigidos por hormonas producidas por las glándulas suprarrenales: cortisona y dexametasona. Estas hormonas influyen en los influxos nerviosos igual que los metales y los tioles influyen en la fase prenerviosa. Estas hormonas glucocorticoides influyen en el metabolismo del azúcar, jugando normalmente un papel inhibitorio. En las insuficiencias de la corteza suprarrenal el umbral gustativo es 60 a 100 veces más bajo de lo normal.

La acción que ejercen los tioles y algunos metales (Cu, Ni, Zn) durante la fase prenerviosa es una acción competitiva, esquematizada por el siguiente equilibrio:  
 $2 \text{SHR} + \text{Me} \rightarrow (\text{RS})_2 \text{Me} + 2 \text{H}^+$

Si la concentración del tiol aumenta, el equilibrio se desplaza hacia la derecha, la agudeza gustativa disminuye. Esto explica la hipogustia observada en los pacientes tratados por medicamentos que tienen tioles. Si la concentración en metal disminuye, el equilibrio se desplaza igualmente y la agudeza gustativa decrece así mismo. La hipogustia encontrada después de un tratamiento por los medicamentos que eliminan el cobre del organismo, se explica por este fenómeno. Por tanto la interacción tiol-metal juega un importante papel en el proceso quimiosensitivo de la degustación. El balance dinámico entre las trazas de metales y los tioles condiciona los cambios de configuración de la proteína ya citada.

SADINI V [22] estudió el gusto como base del análisis organoléptico de los alimentos diseñando: el órgano del gusto y su funcionamiento; valoración cuantitativa del estímulo del gusto; sabores fundamentales y acciones recíprocas.

## 2.2.2. SABORES

Independientemente de los sabores específicos de cada uno de los alimentos se consideran cuatro sabores fundamentales: dulce, amargo, ácido y salado.

### 2.2.2.1. Sabor dulce

Creemos importante destacar la existencia de una gran variedad de técnicas biofísicas y bioquímicas que permiten estudiar las propiedades de las moléculas

receptoras para el gusto dulce, como así también las características de otras moléculas receptoras.

Por ejemplo se observó que azúcares marcados radioactivamente se unen al tejido que contiene botones gustativos en vez del tejido control que no los tiene [23]. Ulteriores investigaciones [24] han demostrado también que la alanina marcada radioactivamente se une en mayor proporción a los botones gustativos que a tejidos de otras áreas que contienen escasos botones gustativos.

Las primeras hipótesis serias sobre la quimiopercepción de los compuestos dulces se deben a SHALLENBERGER y ACREE (1.967 y 1.971) [25,26,27], los que establecieron la presencia de una estructura llamada AH-B, en la que H es un protón y A ó B átomos o agrupamientos electronegativos, condición necesaria (pero no suficiente) para que aparezca el sabor dulce. A y B pueden ser O, N, C, Cl o un centro de insaturación. HA es un donante de protones y B es un aceptor de protones. La distancia entre AH y B debe estar comprendida entre 2,5 y 4 Å (Fig. 6).

Tanto en el edulcorante como en el receptor se encuentra la unidad AH-B en cada uno; la unión entre el edulcorante y el receptor se hace por un puente de hidrógeno. La fuerza de dicha unión condicionará la intensidad de la excitación.

Para explicar las diferencias de poder edulcorante entre los isómeros de aminoácidos KIER [28] en 1.972, expuso su teoría de una estructura tripolar (AH-B-X) en la que introduce un tercer punto (X), hidrófobo, rico en electrones que acaba de completar el antiguo sistema AH-B para formar el "triángulo de KIER". SHALLENBERGER se sirvió también de este triángulo para explicar la diferencia de poder edulcorante entre la alfa-D y la alfa-L glucosas (Fig.7).

Mientras que KIER sostiene que la interacción sobre el sitio X del compuesto y el sitio X del receptor se debe a una unión de dispersión, SHALLENBERGER se inclina por una interacción hidrofóbica y designa al sitio receptor con el símbolo  $\tau$  [29]. En la fig. 8 se observa la relación geométrica entre HA--B y para la D - glucosa en la conformación más favorable C1 y para la  $\beta$  - D -fructopiranososa.

Una molécula tal se fijaría sobre un "botón terminal" de una papila gustativa provocaría una despolarización de la membrana de esta célula y, por tanto, un estímulo del nervio.

TEMUSSI y sus colaboradores [30] demostraron que las características electrónicas y geométricas del sitio receptor incluyen a la entidad HA -- B y la barrera que mencionamos anteriormente.

La señal sensorial provocada por un edulcorante tiene por consiguiente un espectro propio. MAC LEOD [36] considera que existe probablemente pluralidad de receptores para el sabor "azucarado". Esto explica que en una población determinada pueda haber casos de "daltonismo" para tal o cual edulcorante.

Esto explica también, con bastante probabilidad, la propiedad de ciertos edulcorantes de exaltar el poder edulcorante de un mono o disacárido.

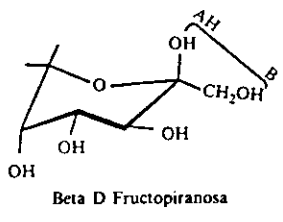
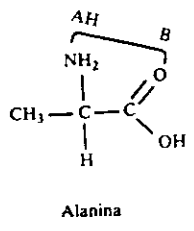
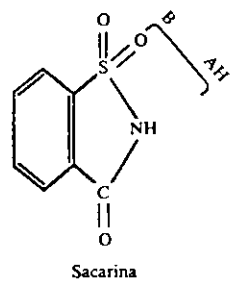
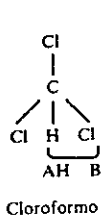
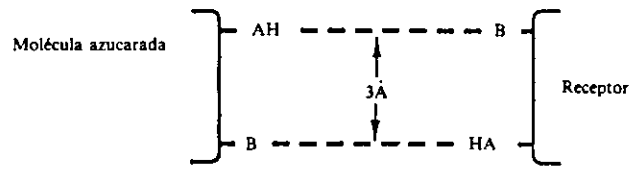


Fig. 6



Fijación de la molécula sobre un receptor

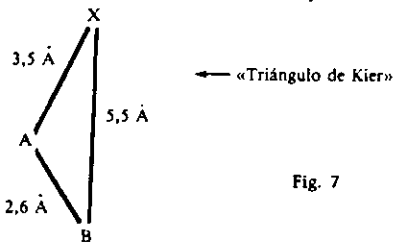


Fig. 7

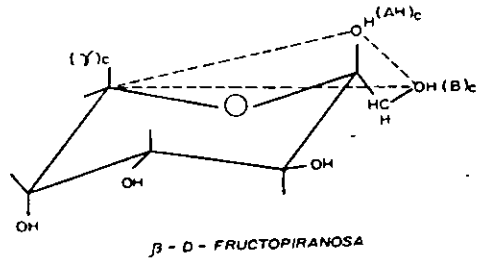
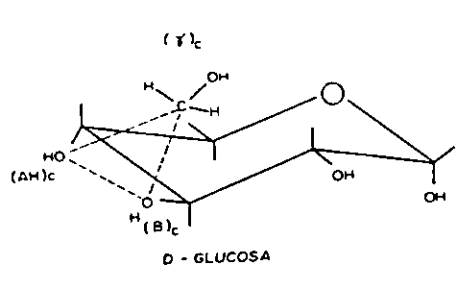


Fig. 8

La información que se transmite al área cortical del gusto (zona del opérculo y zona situada al pie de la parietal ascendente) permite la identificación y medida del sabor dulce.

Estas hipótesis permiten orientar la investigación de nuevos edulcorantes. Sobre la base de estos recientes trabajos no es posible todavía explicar, ni las relaciones tiempo/intensidad del sabor dulce, ni las diferencias de sabor de 1 a 10.000, ni las interacciones sabor dulce/sabor amargo (BUSSIERE, 1.986) [31].

Hoy hay fuertes razones para pensar con FAURION, SALTO y MAC LEOD [32] que hay muchos tipos de receptores membranarios sobre las células sensoriales y que hay, por tanto, llaves estereoquímicas del sabor dulce (HERAUD, 1.986) [33].

Actualmente se siente la necesidad de precisar los múltiples aspectos del fenómeno sabor dulce y los factores que intervienen en los mismos:

- En el plazo de aparición de la señal sensorial del sabor interviene el elemento lipófilo/hidrófobo.
- En la intensidad del sabor dulce interviene la fuerza de la unión AH-B.
- En la duración del fenómeno interviene la adaptación de la estructura glucofora.

Se debe insistir sobre esta cuestión de la duración de la sensación dulce. El reproche que más comúnmente se hace a los edulcorantes no glucídicos de origen vegetal es, en efecto, la persistencia insólita, molesta de la señal dulce. Puede durar diez minutos, veinte minutos, a veces una hora, a pesar del lavado salivar.

Las células sensoriales del gusto azucarado, en número de medio millar se reagrupan a razón de treinta a sesenta en "botones gustativos" que a su vez se agrupan desde algunas unidades hasta muchas centenas, en las papilas de la lengua (BIRCH, G. C., y LEE, C.K., 1.979) [34].

La célula sensorial lingual contenida en los "botones gustativos" dirige hacia la cavidad bucal prolongaciones membranarias que contienen los receptores glucosensibles. Son de naturaleza proteica y tienen forma de bolsa. Los edulcorantes tienen todos en común una estructura glucofora, verdadera llave estereoquímica que permite actuar sobre el receptor.

El esquema de SATO y BELDIER [35], nos muestra como se puede concebir la secuencia de los acontecimientos que conducen a la transmisión de un mensaje sensorial a partir de los "botones gustativos". El receptor glucosensible modifica su conformación y este acontecimiento membranario se propaga de arriba a abajo hasta el polo basal de la célula sensorial. Se modifica la permeabilidad de la membrana en el ambiente iónico y se produce una entrada de iones  $\text{Na}^+$ . A esta señal las vesículas sinápticas emigran hacia las terminaciones nerviosas. (Fig. 9).

Célula sensorial/fibra nerviosa constituyen una unidad funcional, pero las células vecinas parecen poder transmitirse, comunicarse los "fenómenos membranarios" que se producen en cada una. Por otra parte, las terminaciones nerviosas al polo basal de un "botón gustativo" forman un plexo. Esto explica la complejidad del mensaje

sensorial, probablemente un poco diferente según que el estímulo sea de un glúcido natural o de un edulcorante artificial.

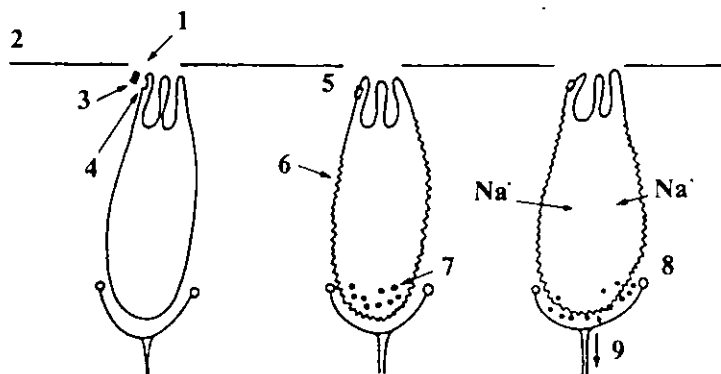


Fig. 9.—Esquema de Sato y Beidler (tomado de Heraud, 1981, *Ann. Fals. Exp. Chim.*, p. 606).

**Leyenda.**—1: Cavidad bucal, poro gustativo. 2: Epitelio lingual. 3: Estructura glucófora. 4: Receptor membranario. 5: Unión AH-B-X. 6: Propagación de una modificación membranaria hacia el polo basal. 7: Vesículas sinápticas. 8: Excitación de las terminaciones nerviosas. 9: Estímulos nerviosos.

Esta función es educable, como se educa, por ejemplo, el oído del músico. Es diferente la sensación hedónica del sabor dulce que es apreciada en una zona muy extensa (circunvalación límbica e hipotalámica). El placer al sabor dulce es innato, existe desde la sexta hora de vida y varía en función de la necesidad/no necesidad (aliestesia-gustativa de CABANAC y DUCLAUX) [36].

#### 2.2.2.2. Sabor amargo

La sensación de sabor amargo no sólo se puede producir mediante la estimulación gustativa normal, sino que también se puede originar amargor por inyección de una droga apropiada (por ejemplo colina) en el flujo sanguíneo [37].

Ciertos individuos presentan gran sensibilidad para detectar pequeñísimas concentraciones de sustancias amargas, lo que ha demostrado que esta capacidad fisiológica se relaciona con la preservación del individuo. Asimismo se probó que la sensibilidad al sabor amargo es proporcional a una sensibilidad sistémica a la droga; así una sensibilidad gustativa aumentada es reflejo de un mayor efecto farmacológico de la droga a nivel sistémico [38].

En la antigua teoría que subdividía la lengua en cuatro zonas gustativas, el tercio posterior de la lengua (zona de papilas calciformes) era sensible al sabor amargo. Sin embargo recientes trabajos han demostrado que se puede establecer el orden de afinidad siguiente: velo del paladar, bucofaringe y en último lugar el tercio posterior de la lengua.

Veamos ahora, en forma similar al sabor dulce se ha postulado la existencia de una proteína sensible al amargo, aislada de la parte posterior de la lengua. Esta fracción proteica no responde a los azúcares pero sí a las sustancias amargas tales como quinina, brucina, naringina o cafeína [39].

Es conveniente aclarar que la especificidad de la interacción estímulo-receptor observada *in vitro* no coincide con la de los receptores *in vivo*. Por este motivo la hipótesis de la proteína sensible al amargo se descartó a favor de otro modelo más convincente, que explica la estimulación de los receptores gustativos amargos.

La teoría del AMP cíclico (3' 5' monofosfato cíclico de adenosina) postula que los compuestos amargos penetran en las células receptoras, de acuerdo con su solubilidad en lípidos, e inician una reacción que produce una disminución de la concentración del AMP cíclico intracelular. Por lo tanto, este nucleótido cíclico es el intermediario en el proceso de transducción gustativa.

Confirman esta hipótesis la presencia de adenilciclase [40] y de 3' 5' nucleótido fosfodiesterasa [41] enzimas que sintetizan y destruyen el AMP cíclico, en el epitelio gustativo. KURIHARA [42] demostró que la fosfodiesterasa del epitelio lingual resultaba inhibida por algunos compuestos amargos (cafeína, teofilina, teobromina y papaverina). Propuso que la inhibición de la enzima ocurre dentro de la célula, entonces, el amargo se relaciona con la facilidad de penetración de los compuestos a la célula.

PRICE [43] empleó un grupo distinto de compuestos amargos (imidazol,  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ , estriocina y nicotina) y observó la activación de la fosfodiesterasa lingual. Este investigador relacionó la potencia activadora de los compuestos con su efectividad como estímulos gustativos. La única excepción fue la cafeína que inhibió la actividad enzimática.

Como hay evidencias [44] de que existen por lo menos dos clases diferentes de receptores para el amargo, tal vez la cafeína sensibiliza los receptores que responden a la familia de las tiocarbamidas, mientras que los otros compuestos no lo hacen.

Podemos decir que el sabor amargo está estrechamente vinculado al sabor dulce. Los compuestos portadores de ambos sabores están relacionados no sólo por su similitud química sino que también son semejantes los sitios receptores.

### 2.2.3. SABORES ACIDO Y SALADO

DE SIMONE y SUS colaboradores [45] estudiaron la función de las capas de fosfolípidos cargados en los sabores salado y ácido.

Los cambios que se producen en la presión superficial de las capas por cambios conformacionales permiten la percepción del gusto salado, ácido y la llamada respuesta al agua. Esta última consiste en el sabor ácido amargo que se percibe cuando la lengua se adapta a soluciones de cloruro de sodio y luego se pone en contacto con soluciones salinas de menor concentración o con agua.



KURIHARA y sus colaboradores [46] demostraron que las papilas gustativas son más ricas en fosfolípidos que el epitelio lingual de los alrededores. BEIDLER [47] también mostró que la respuesta de la lengua de la rata al ácido es semejante a una curva de titulación con un pK de alrededor de 1.8, esto indica un grupo fuertemente ácido; posiblemente un grupo fosfato. Los fosfolípidos cargados son importantes grupos activantes de la superficie sobre el borde apical de las células gustativas. De esta manera queda demostrado que los principios de la química de superficie pueden proveer un mecanismo que explique la respuesta producida por dilución salina, mediada por un estímulo que es salado o ácido.

KAMO y sus colaboradores [48] lograron imitar varias de las características del potencial intracelular de la célula gustativa. Para ello utilizaron un modelo de membrana compuesto de un filtro Millipore impregnado con los lípidos extraídos del epitelio de la lengua bovina; cuando se agregan sales o ácidos o agua destilada, esta membrana artificial sufre cambios de potencial similares a los de las células gustativas in vivo.

Podemos imitar el comportamiento in vivo que se produce al aproximarse una solución salina a la superficie del receptor. Mediante estudios de equilibrio en la interfase lípido - agua (O/W), y estudios de cuasi-equilibrio en la interfase aire - solución, se pueden analizar las velocidades de cambio de la tensión superficial. El análisis teórico incluye la formación de una doble capa difusa que rodea la monocapa fosfolipídica y controla el proceso de difusión.

Al igual que una monocapa de ácido fosfatídico, los receptores gustativos se caracterizan por una densidad de carga superficial, negativa y constante, que tiende a atraer a los cationes y a repeler a los aniones de la superficie. De acuerdo a esto, la carga superficial está dada por:

$$G = e \sum z_i r_i$$

donde  $e$  es la carga protónica y  $z_i$  es la valencia del ión unido a la superficie y cuya concentración de superficie es  $r_i$ .

Como los iones unidos a la superficie están en equilibrio con los iones en solución, cada  $r_i$  depende, en general, de la concentración de iones móviles en la superficie.

La afinidad de los grupos fosfato de superficie es mayor para los iones hidrógeno, pero no obstante, pueden unirse otros iones. La respuesta al agua que se produce luego de la estimulación con una sustancia gustativa en particular depende de dos factores: el pH en la membrana del receptor durante la estimulación con sustancia sávida y la magnitud y signo de la densidad de carga superficial. La adsorción de aniones como el benzoato pueden disminuir la respuesta al agua después de añadir ácidos. En forma semejante, un quimiorreceptor que no muestra la respuesta al agua después de la adaptación con cloruro de sodio, puede ser inducido para producir respuesta al agua cuando la asociación con aniones es alta, por ejemplo después de la estimulación con benzoato de sodio.

Los mecanismos que hemos discutido enfatizan la función de la densidad de carga superficial en la modulación de la composición de la doble capa iónica. A su vez esta densidad es modulada a través de la neutralización de cargas superficiales en respuesta a cambios en la composición iónica específica de la doble capa. En consecuencia, los cambios en la densidad de carga superficial modifican la presión superficial que desencadena la señal eléctrica del nervio gustativo.

### **2.2.3.1. Características de los sitios receptores para el ácido y el salado**

#### **2.2.3.1.1. *Acido***

Como la membrana está compuesta, principalmente, por proteínas y lípidos, los protones podrían unirse al grupo carboxílico de la proteína o al grupo fosfato de los fosfolípidos. La duda quedó resuelta en favor del grupo fosfato al analizar la interacción entre ácidos y monocapas de lípidos extraídos de papilas fungiformes bovinas [49].

Los principales componentes del extracto lipídico de papilas fungiformes bovinas son: colesterol, fosfatidicolina, fosfatidiletanolamina y esfingomiélin. Por lo tanto, el incremento en la presión superficial de las monocapas de lípidos a bajos pHs parece proceder de la unión del ión hidrógeno a los grupos fosfato de los fosfolípidos en las monocapas. Se puede proponer entonces, que el sabor ácido es inducido por la unión del ión hidrógeno a los grupos fosfato de los fosfolípidos en la membrana del receptor gustativo.

#### **2.2.3.1.2. *Salado***

KAMO [50] sugiere que los receptores para el salado son los fosfolípidos. KURIHARA [46] analizó el contenido de lípidos y de proteínas en el epitelio lingual bovino y puntualizó que el nivel de fosfolípidos es significativamente alto en las papilas que contienen botones gustativos. Incluso, la variación en la composición de fosfolípidos puede producir cambios en las respuestas observadas entre células gustativas individuales [51].

## II. AROMATIZANTES, SUSTANCIAS OLOROSAS Y SAPIDAS.

### 3.- CONCEPTOS Y DEFINICIONES.

La aromatización es una ciencia joven que evoluciona. Los conceptos y definiciones han cambiado mucho y conviene que mejoren cada vez más en beneficio de científicos e industriales inmersos en este maravilloso mundo de los aromas.

En 1.971 el "Centre europeen pour la recherche sur l'Aromatisation" comenzó bajo la dirección de los profesores ROUZET (Nantes), TRAISNEL (Lille) y VERAIN (Grenoble) a estudiar un "Vocabulaire en six langues de quelques termes utilisés en l'Aromatisation" [52] (francés, inglés, italiano, alemán, portugués y español). Colaboraron especialistas de diversos países. LE MAGNEN, DEPLEDT, CASTAN y VEDEL de Francia, HOPKIN de Inglaterra, FENAROLI de Italia, JELLINEK de Alemania, CABEZUDO del C.S.I.C. y VILLANUA de la Facultad de Farmacia de Madrid, de España y VIEIRA DE SA y REIS MACHADO de Portugal.

El estudio está integrado por los 69 principales términos utilizados por los expertos en aromatización, algunos de los cuales vamos a contemplar a continuación y diferenciar bien algunos de ellos:

Comencemos con la definición de la palabra objeto de nuestro trabajo:

#### **AROMA:**

En el Diccionario de la Lengua Española [53] solo figuran tres acepciones: flor del aroma (que la describe); goma, bálsamo, leño o hierba de muchas fragancias; perfume, olor muy agradable. Ninguna de estas acepciones nos sirven como definición.

En la legislación alimentaria española, el Código Alimentario Español [54] no define la palabra aroma. Únicamente da la de agentes aromáticos (Ver más adelante) y la Reglamentación Técnico-Sanitaria [55] define como: "Agentes

aromáticos, aromas o esencias" a las preparaciones que contienen en forma concentrada, principios activos aromáticos con incorporación de los productos autorizados, en las listas positivas que figuran como Anexo a la Reglamentación, que no estén destinados a consumo directo, aunque su objetivo es proporcionar olor y sabor a los alimentos y productos alimentarios.

El "Vocabulario" antes citado [52] da una amplia definición de **aroma**: "*Sensaciones percibidas por el órgano olfativo, por vía retronasal, en el momento de la degustación de un alimento o de una bebida.*

El **aroma** se diferencia del **olor**, que es una sensación percibida directamente por vía nasal. El **sabor** es una sensación, únicamente gustativa, percibida después del estímulo de los botones gustativos por ciertas sustancias solubles. La traducción al inglés es *flavor* (U.S.A.), *flavour* (G.B.); en los demás países se dice **aroma**.

Nota: La definición de **aroma** del Vocabulario [52] es empleada a veces impropriamente para designar las sustancias aromatizantes; empleando el término "aroma de ...".

Así la I.O.F.I. de la que hablaremos después dice: "Aroma (*flavouring, essenz*): preparación concentrada, con o sin disolvente, utilizado para conferir un sabor, con exclusión de gustos únicamente salados, dulces o ácidos. No está destinado a consumirse tal cual".

Como se ve, la definición de la I.O.F.I. no coincide con la del "Centre europeen pour la recherche sur l'aromatisation" y además en la I.O.F.I. tampoco coincide la palabra **Arome** (francesa) con la inglesa (*flavouring*) que significa aromatización y la alemana (*essenz*) esencia.

## **AROMATIZANTES:**

"Sustancia que posee propiedades esencialmente olorosas y eventualmente sápidas. Las sustancias amargas, que son esencialmente sápidas se clasifican provisionalmente en la lista de sustancias aromatizantes" [52].

El Código Alimentario Español [54] en su artículo 4.31.16 define: "Agentes aromáticos", para modificar conjuntamente el olor y sabor de los alimentos y bebidas.

FENAROLI [56] simplificando propone la siguiente definición: "Se llama aromatizante aquella sustancia o aquel complejo de sustancias capaces de conferir a un alimento olor y sabor".

## **AROMATIZACION:**

"Operación que consiste en añadir sustancias aromatizantes a los productos alimentarios o farmacéuticos para hacer su aroma más agradable" [52].

## **SUSTANCIA OLOROSA:**

"Se dice de una sustancia susceptible de desarrollar un olor, hedónicamente neutro.

El "poder oloroso" es la intensidad del estímulo olfativo de una sustancia" [52].

El antónimo de oloroso es "inodoro".

## **SUSTANCIA SAPIDA:**

"Califica un producto dotado de sabor hedónicamente neutro. El antónimo es "insípido" [55].

La I.O.F.I. (International Organization of the Flavour Industry. Ginebra) propuso a su vez una terminología internacional para sustancias simples o compuestas, quince términos en inglés, francés y alemán que fueron recogidos en su libro por FENAROLI [56].

La I.O.F.I. define el término de SUSTANCIA AROMATIZANTE: "compuesto químico definido, no destinado a ser consumido tal cual, que posee propiedades aromatizantes (olorosas y/o sápidas)".

## **SUSTANCIA AROMATIZANTE NATURAL:**

Sustancia aromatizante aislada de un producto aromatizado por procedimientos físicos.

## **SUSTANCIA AROMATIZANTE IDENTICA A LAS NATURALES:**

"Sustancia aromatizante obtenida por síntesis o aislada de un producto aromático por procedimientos químicos y cuya constitución es idéntica a la de una sustancia presente en los productos naturales destinados al consumo humano, sea transformados o sea tal cual".

## **SUSTANCIA AROMATIZANTE ARTIFICIAL:**

"Sustancia aromatizante no identificada en un producto natural destinado al consumo humano, sea transformado o sea tal cual.

Además de las definiciones dadas conviene tener en cuenta dos conceptos relacionados con el aroma:

## **CONCENTRACION UMBRAL:**

Que algunos denominan "concentración límite" es la mínima cantidad de un compuesto aromático que puede ser reconocida directamente por su olor o sabor. Este dato permite comparar la intensidad o potencia de las sustancias olorosas.

BELITZ [57] incluye una tabla con el umbral olfatorio de algunas sustancias en agua (a 20°C) en la que desde el umbral de la pirazina de  $3.10^2$  mg/l hasta el 1-p-menten-8-tiol de  $2.10^8$  mg/l se pasa por diversos umbrales olfatorios en los que se considera como umbral 1,0 mg/l a la (-) Nootkatona mientras que el isómero óptico (+) Nootkatona difiere significativamente en su intensidad aromática con un umbral de  $1.10^3$  mg/l lo que influye ocasionalmente en su calidad y carácter.

Las concentraciones umbral dependen de la tensión de vapor de los compuestos, de la temperatura y de la composición del medio. Por ello son muy importantes los métodos de determinación cuantitativa y el dictamen de los equipos de degustación. Hay que tener en cuenta, por ello, que en la literatura científica se encuentran frecuentemente diferencias en las concentraciones umbral para un mismo compuesto.

### COMPUESTO IMPACTO:

Es otro concepto que BELITZ [57] define: De los numerosos compuestos de una materia aromática natural, no todos tienen valor para el aroma. Considerando solo válidos los volátiles cuya concentración sea superior a la umbral. Los compuestos del aroma, por tanto, responsables del olor y sabor característicos son los "compuestos impacto".

## 3.1. ORÍGENES DE LOS AROMAS.

El aroma de un alimento corresponde a un conjunto, complejo y equilibrado, de numerosos componentes más o menos conocidos y característicos del alimento, ya sea natural (frutas, hortalizas,...) o transformado.

Los componentes de cada aroma (olor y sabor) tienen una importancia muy diferente. DRAWERT [58] estimaba que el compuesto oloroso (es decir, volátil) es de un orden de  $10^6$  mientras que el compuesto sávido es de 6.

El aroma puede estar naturalmente presente en las células de la fruta (por ejemplo) correspondiendo al quimismo natural vegetal.

En el curso de su maduración, las frutas y las hortalizas, adquieren aromas particulares, resultado de la transformación de substratos precursores, (azúcares, aminoácidos, péptidos, carotenoides,...); por vías microbiológicas naturales; por vía enzimática; por biosíntesis de compuestos/volátiles o no, de los aromas.

En otros alimentos, tales como productos lácteos, bebidas alcohólicas, productos cárnicos (charcutería), choucroute; tradicionalmente fermentados, la formación provocada de los aromas, in situ, se debe generalmente a la acción de microorganismos y de diversos sistemas enzimáticos.

En el curso de la preparación de los alimentos o de su conservación, se desarrollan procesos químicos (torrefacción, tostado, cocción) que afectan a la mayor parte de los constituyentes alimentarios.

Además, la restauración del aroma, se realiza por adición de un compuesto aromático o enzimas susceptibles de crear "in situ" el aroma (alimentos deshidratados...).

PEYRON [59] esquematizó diciendo que la formación de los componentes del aroma es bioquímica o quimioteología.

### 3.1.1. PRECURSORES DE LOS AROMAS.

Los aromas se originan normalmente, como veremos más adelante, por diversos mecanismos naturales o como consecuencia de las operaciones industriales o culinarias. La formación de los aromas es por tanto consecuencia de la transformación o reacción en los alimentos de componentes naturales de los mismos, denominados "precursores", que vamos a detallar:

Carbohidratos:      Monosacáridos (azúcares).  
                            Polisacáridos.  
                            Pectinas.

Proteínas:            Aminoácidos.  
                            Péptidos.

Lípidos:              Ácidos grasos.

Vitaminas:            Tiamina.  
                            Carotenoides.

Glucósidos:

Los mecanismos de formación de los aromas pueden poner en juego individualmente uno de dichos "precursores", o por el contrario pueden reaccionar entre sí dos de ellos (aminoácidos y azúcares).

La acción de los "precursores" depende del alimento de origen y del mecanismo de formación del aroma, que darán lugar a una serie de compuestos caracterizados por sus grupos funcionales o su estructura molecular.

Los aromas de los alimentos que tienen que someterse a tratamiento térmico, en el que los "compuestos impacto" se generan por la reacción de MAILLARD pueden mejorarse aumentando los niveles de precursores que participan en la reacción. Este es un procedimiento para la aromatización de alimentos.

TABLA 1. PRECURSORES DE LOS AROMAS <sup>1</sup> [57]

ALIMENTO	PRECURSORES	METODO	COMPUESTOS AROMATICOS
<i>Carne</i>	Aminoácidos y azúcares.	Calor	Acidos, aldehidos, cetonas, furanos, pirazinas, fenoles, comp. azufrados.
<i>Pescado</i>	Aminoácidos Acidos grasos.	Enzimas, Calor Enzimas	Aminas, compuestos azufrados. Aldehidos, cetonas.
<i>Prod. lácteos</i>	Aminoácidos Acidos grasos.	Fermentación Enzimas.Calor.	Acidos, Aminas. Aldehidos, cetonas, lactonas.
<i>Pan</i>	Aminoácidos y azúcares.	Calor.	Pirroles, pirazinas, piridinas.
<i>Vegetales</i>	Azúcares.	Biogénesis.	Terpenos, terpenoides, isoprenoides, fenoles.
	Grasas.	Biogénesis.	Aldehidos, lactonas.
	Aminoácidos y azúcares.	Biogénesis.	Pirazinas.
	Aminoácidos y azúcares.	Enzimas.	Aldehidos, compuestos azufrados.
	Aminoácidos.	Calor.	Cianuros, compuestos azufrados.
<i>Frutas</i>	Azúcares.	Biogénesis.	Acidos, terpenos, terpenoides, furanos, piranos, esteres.
	Acidos grasos.	Biogénesis.	Aldehidos, cetonas, esteres, lactonas.
<i>Frutos secos tostados.</i>	Aminoácidos y azúcares.	Calor.	Aldehidos, pirazinas, cetonas, compuestos azufrados.
<i>Café y cacao.</i>	Aminoácidos y azúcares.	Calor.	Aldehidos, cetonas, fenoles, heteróciclos, compuestos azufrados.

<sup>1</sup> SCHUTTE, L. tomado del FENAROLI - Handbook of flavor ingredients, 2<sup>a</sup> ed. Edit. C.R.C. Press (U.S.A.) Vol. I, Pag. 133.



Algunos precursores se añaden directamente, en tanto que otros se generan en el propio alimento, por la liberación previa de los componentes de la reacción, necesarios para producir la reacción de MAILLARD. Esto se consigue añadiendo al alimento hidrolizados de proteínas y polisacáridos.

La industria de fabricación de aromas se sirve de estos precursores para la obtención de aromas de síntesis, mediante diferentes procedimientos patentados, de los que podemos poner como ejemplo algunas patentes para preparados cárnicos (Tabla 2).

**Tabla 2. EJEMPLOS DE PATENTES DE AROMAS PARA PREPARADOS CARNICOS**

INVENTOR	FIRMA	NUMERO	AÑO	REACCION
May y Morton	Unilever	Brit. 858.660	1961	Fuente aminoácido (tiene que contener cisteína) + aldehído + pentosa en agua: calentar a reflujo
Hack y Königsdorf	Corn Products Co.	US 3.480.447	1969	Aminoácidos (sin cisteína) + hidrolizado de proteína vegetal + azúcar reductor + taurina: calentar 15-20 horas a 110°C
Giacino	IFF	US 3.519.437	1970	Taurina + tiamina + hidrolizado de proteína vegetal + agua o grasa + calor o calentamiento instantáneo «flash heating»
O'Hara, Ota, Enei, Eguchi, Okamura	Ajinomoto	US 3.524.747	1970	Aminoácido (no cisteína) + ácido láctico + fosfato + nucleósido-5'-fosfato
Kitada y cols.	Ajinomoto	US 3.620.772	1971	Cisteína + azúcar reductor, 1—10 h a 50—120°C y 70—200 kg/cm <sup>2</sup>
Tonsbeek	Unilever	Can. 862.685	1971	Aminoácido + ácido láctico + 'nucleótido calentado a 110—150°C
van Pottelsberghe, de la Potterie	Nestlé	US 3.716.380	1973	Hidrolizado de proteína + agua + metionina + calor + un sacárido, preferentemente en presencia de un ácido carboxílico
van Pottelsberghe, de la Potterie	Nestlé	US 3.716.379	1973	Hidrolizado de proteína vegetal (exento de cisteína) + tiamina + un mono o polisacárido + agua + calor

BERLITZ [57] Tabla 1.6

## 3.2. MECANISMOS DE FORMACIÓN

La formación de los compuestos responsables del olor y el sabor de los alimentos puede producirse a través de cada uno de los siguientes mecanismos:

- a) Biosintético
- b) Enzimático
- c) No enzimático
- d) Piroclítico

### 3.2.1. MECANISMO BIOSINTETICO.

Este mecanismo de formación de olores y sabores se presenta principalmente solo en frutos climatéricos, que los desarrollan después de la cosecha, durante el periodo de maduración, que coincide con un aumento en su respiración, alcanzando un valor óptimo, que corresponde a la perfecta maduración y después decae.

TRESSL y DRAWERT [61] presentaron los aspectos biogénéticos más importantes en la formación de los aromas.

Los compuestos volátiles más importantes producidos por este mecanismo son terpenos; ésteres, derivados de carbonilos y alcoholes; aldehidos de cadena larga; etc.

FENAROLI (62 y 63) y BERNFELD (64) estudiaron la biogénesis de los productos de naturaleza terpénica.

En el plátano [56], en el primer periodo de la maduración se nota un fuerte y continuo aumento de la producción de anhídrido carbónico, llegando después al "pico climatérico", que decrece hasta una disminución.

Debido a los ácidos presentes en la pulpa, la maduración aumenta la acidez total, en particular el ácido málico y el ácido cítrico, mientras el ácido oxálico disminuye al 60%.

Los aminoácidos valina y leucina parecen ser precursores, al menos en parte, del aroma, porque su disminución coincide con la formación de alcoholes isobutílico e isoamílico y sus acetatos.

También parece que el ácido oleico es un precursor del aroma de plátano, como se deduce de la presencia del 2-hexenal.

Como se ve los datos disponibles, son escasos y fragmentarios, pero FENAROLI [56] observa que la formación del aroma durante la maduración está ligada sobre todo a procesos degradativos (no de síntesis) en los que los enzimas juegan un papel importante.

La biosíntesis de terpenos [57] se realiza únicamente en las plantas y en algunos microorganismos y en ambos casos se inicia con acetyl-CoA:

Tres moléculas de acetil-CoA se condensan para formar 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA, que después de la consiguiente hidrólisis y reducción, se convierte en ácido mevalónico. La fosforilación y eliminación de anhídrido carbónico y agua da isopentenilpirofosfato, el cual puede isomerizarse particularmente a dimetilalilpirofosfato. Después por conjugación y posterior eliminación de un protón, se produce el difosfato de geranilo, que es el compuesto de partida para la biosíntesis de monoterpenos.

Por condensación del difosfato de geranilo con isopentenil difosfato conduce al farnesil difosfato compuesto de partida para la biosíntesis de todos los sesquiterpenos.

Aunque el difosfato de geranilo es la base de monoterpenos acíclicos, es posible la ciclación por isomerización del difosfato de geranilo a partir de las formas trans o cis, es decir, la formación de nerilpirofosfato.

Por análogas reacciones tiene lugar la biosíntesis de los sesquiterpenos, por dos rutas metabólicas, una postulada para la biosíntesis del  $\beta$ -bisaboleno y la segunda para el  $\beta$ -cadineno.

Otro medio indirecto de abordar la biosíntesis de los monoterpenos consiste en examinar la frecuencia de los diversos compuestos (hidrocarburos, alcoholes, lactonas, aldehidos, cetonas, etc.). FUJITA [65] después de estudiar muchos cientos de especies pudo distinguir tres grupos de sustancias:

- I- Muy frecuentes, que se forman fácilmente pero que no son precursores (pineno, limoneno, cineol).
- II- Conteniendo terpenos bastante frecuentes (geraniol, borneol, linalol, citral, alcanfor), que serán los verdaderos precursores.
- III- Grupo de sustancias bastante raras, cuya producción es difícil (terpineno, sabineno, mentol, mentona, fencona).

Esta interesante hipótesis merecería una confirmación experimental.

Un caso de biosíntesis de los aceites esenciales es el de las plantas con anetol. [66]: en este caso los precursores parecen proceder del metabolismo de los glúcidos y por un paso intermediario se llega primero al ácido shikímico, al ácido pirúvico y después a la fenilalanina. Por acción de la fenilalanina amonialiasa se llega al ácido 4-hidroxicinámico, que con un donador de metilo (metionina) se forma el anetol [67].

Por degradación oxidativa de los carotenoides [57] se forman sustancias aromáticas a partir de diferentes precursores:

En el tomate procedentes del licopeno se encuentran la 6-metil-5-hepten-2-ona, la 6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona y la 6,10,14-trimetil-5,9,13-pentadecadien-2-ona y a partir del dehidrolicopeno se encuentra la 6-metil-3,5-heptadien-2-ona.

Otras de las sustancias originadas por degradación oxidativa de los carotenos son las iononas, que se encuentran en tomate, frambuesa, zarzamora, té negro, etc.

Del  $\beta$ -caroteno se forma la  $\beta$ -ionona, del  $\beta$ -caroteno-5,6-epóxido la  $\beta$ -ionona-5,6-epóxido y del  $\alpha$ -caroteno la  $\alpha$ -ionona. La  $\beta$ -ionona que es esencial para el aroma de frambuesa, posee un umbral olfatorio muy bajo (14 ppb en agua)

### 3.2.2. MECANISMO ENZIMATICO

El mecanismo enzimático es el que se produce en los productos naturales al reaccionar los enzimas con los sustratos o "precursores".

Estas reacciones pueden provocar transformaciones que afecten al color (en cuyo caso se denomina "pardeamiento enzimático") o que afecte al aroma (olor y sabor).

En los productos vegetales que son los que sufren las consecuencias del "pardeamiento enzimático" existen diversos precursores principalmente de naturaleza fenólica, que según el origen de los enzimas que catalizan su oxidación dan lugar a la formación de pigmentos de distinto tipo. Estas reacciones pueden rebajar la calidad del alimento o por el contrario ser beneficioso al mejorar el color del producto. Pero de esta transformación del color no vamos a tratar.

Sin embargo, el mecanismo enzimático tiene un significativo papel en la formación de los aromas, como seguidamente veremos:

Las reacciones enzimáticas desencadenadas por la destrucción tisular son especialmente importantes, tal como ocurre durante la desintegración y troceado de frutas y hortalizas.

Los enzimas pueden participar indirectamente en la formación del aroma realizando la fase preliminar del proceso, como por ejemplo, liberando:

- aminoácidos a partir de las Proteínas existentes.
- azúcares de los polisacáridos.
- ortoquinonas a partir de compuestos fenólicos, que son después convertidos en compuestos aromáticos por posteriores reacciones no enzimáticas.

De este modo y por este mecanismo, los enzimas aumentan el aroma del pan, la carne, la cerveza, el té, el cacao, etc. [57].

La formación, el desarrollo y la destrucción de los constituyentes de los aromas, poniendo en marcha sistemas enzimáticos, constituyen un conjunto de fenómenos que cotejamos o utilizamos diariamente, casi sin saberlo, pero también que se precisa e industrializa cada vez más, cuando se trata de componentes olorosos, volátiles o sápidos fijos.

Una gran parte de nuestros alimentos son el resultado de fenómenos enzimáticos en uno u otro estado de su preparación.

Ciertos productos aromáticos datan de tiempos inmemoriales, tales como la formación de bebidas alcohólicas (vino, cerveza, sidra, whisky...) la panadería, la fabricación de vinagre, quesos, yogurts, choucroute, charcutería, derivados de la pesca.

La maduración del té, del tabaco, de la vainilla necesitan enzimas procedentes de levaduras, bacterias, mohos...

El envejecimiento natural del brandy en barriles de roble; el desarrollo de aromas y el buquet del vino de Monbazillac gracias a la acción del *Botrytes cinerea* sobre los racimos muy maduros; y tantos otros, son ejemplos de felices procesos enzimáticos.

Por el contrario, en otros casos los resultados son peores, tales como el enranciamiento de las grasas por la acción de lipasas y lipoxigenasas.

### 3.2.2.1. Productos aromaticos formados.

Pertencen prácticamente a casi todas las series orgánicas. La gran complejidad de la mayor parte de los productos resultantes de los fenómenos enzimáticos va unida a la actividad de numerosos sistemas enzimáticos, más o menos específicos en las condiciones de su trabajo, que se trata del quimismo vegetal normal o de tecnologías humanas.

Querer relacionar los componentes de aromas resultantes de procesos enzimáticos corresponde prácticamente a reunir el conjunto de compuestos aromáticos descritos; es decir unos diez mil, agrupados por sus funciones químicas.

Hidrocarburos (alifáticos, ciclcos, terpénicos, bencenoides...).

Alcoholes y fenoles.

Compuestos carbonílicos.

Eteres y esterés.

Acidos.

Compuestos heterocíclicos (azufrados, nitrogenados y oxigenados).

Estos últimos han adquirido un gran interés entre los aromas.

PEYRON [59] puso algunos ejemplos de los mecanismos de biogénesis de los aromas en la célula vegetal, o de transformación en los medios tecnológicos sometidos a la actividad de los enzimas.

### 3.2.2.2. Reacciones en formación

Gracias a los compuestos con  $C^{14}$  se ha podido explicar como a partir de los ácidos linoleico, linolénico y en presencia de dos enzimas: lipoxigenasa primero y aldehidoliasa después, se produce en los frutos (plátano verde y pepinos) la presencia de hexenal, nonenal y nonadienal.

En los productos lácteos, la biosíntesis del diacetilo puede corresponder a dos mecanismos enzimáticos: uno de ellos con la alfa-acetolactato-sintetasa y la alfa-acetolactato-oxidasa y el otro con la acetil-coenzima A.

En la mostaza la acción de un solo enzima, la tioglucosidasa, transforma dos sustancias diferentes: la sinigrina (olor picante y lacrimógeno) y la sinalbina (olor débil y sabor ardiente), en dos sustancias: alilisotiocianato y benzoilisotiocianato.

Otro enzima, la aliinasa, transforma en el ajo, la (+)S-alilcisteina en alicina (dialiltiosulfinato), sustancia olorosa y de propiedades antibacterianas características.

### 3.2.2.3. Biotecnología

Entre los medios que permiten mejorar el aprovisionamiento alimentario y su calidad, están particularmente de actualidad las biotecnologías, conjunto de técnicas nacidas de la biología en un sentido amplio, poniendo en marcha microorganismos, por ejemplo, o interviniendo directamente a nivel de las moléculas de las células [68].

Como consecuencia, de las biotecnologías han aparecido las bioindustrias, es decir, la aplicación de las primeras al sector industrial.

Citemos diversas biotecnologías:

- La *fermentación*. Técnica muy antigua dirigida a la producción de sustancias muy diversas de la química, de la farmacia y de la alimentación. Se efectúa con la ayuda de microorganismos que se nutren de sustratos a base de nitrógeno, sales minerales, carbono, desembocando en una industria pesada que necesita una gran experiencia.
- Las *bioconversiones*. Reacciones de tipo químico realizadas por un microorganismo con vista a transformar un compuesto con enzimas fabricados por las células, como intermediario. Ello permite efectuar ciertas reacciones químicas muy específicas de una manera mucho más eficaz y frecuentemente más económicas que por síntesis química.
- La *ingeniería enzimática*. Tecnología fundada sobre la utilización de enzimas. Comprende dos tipos:
  - a) La ingeniería enzimática "libre", utilizando enzimas en solución.
  - b) La ingeniería enzimática "fija", nueva tecnología, que pone en marcha "enzimas inmovilizados" sobre soportes, que por bioreacciones desemboca en la producción en masa y con excelentes rendimientos de diversos productos aromáticos. Puede beneficiar recaídas de ingeniería genética (recombinaciones genéticas de nuevos microorganismos con una alta capacidad biocatalítica, producción de enzimas...).

Entre los medios tecnológicos utilizados, es decir, las diversas formas de enzimas, su inmovilización, destinada a acrecentar su estabilidad asegurando su empleo en

continuo o discontinuo, permite su reutilización en largos periodos, contrariamente a los enzimas en solución, que no se recuperan al final de la reacción.

Ello permite además realizar transformaciones secuenciales en reacciones en cadena, evitando la introducción de sustancias extrañas y el rechazo de contaminantes.

Los objetivos de estas tecnologías enzimáticas en el campo de la aromatización son muy variadas:

- a) Un mejor conocimiento de los mecanismos y la utilización de substratos originales con vistas de mejorar la calidad y el rendimiento de las tecnologías enzimáticas clásicas;
- b) La formación de biomásas aromáticas directamente valorizables;
- c) La modificación de los procesos enzimáticos habituales hacia nuevas orientaciones y aromas originales;
- d) La restauración del aroma de alimentos conservados (secos,...);
- e) El empleo de inhibidores para evitar la destrucción enzimática de aromas;
- f) La transformación selectiva de compuestos poco aromáticos en otros de mayor valor organoléptico añadido.

Biotechnologías, bioindustria, ingeniería enzimática son panaceas de futuro en el amplio campo de la aromatización. Podrían ser fuentes de un desarrollo espectacular en la generación de biomásas, de mezclas complejas con características organolépticas, así como productos específicos idénticos a los encontrados en la naturaleza.

Las tecnologías enzimáticas tienen un gran futuro por su selectividad, su flexibilidad, su bajo precio de funcionamiento y su mejora de la calidad.

Sobre el papel de los enzimas en la formación de los principios aromáticos en los alimentos se pueden consultar las obras de BASANT K., DWIVEDI [69] y PEYRON [59].

#### **3.2.2.4. Formación de compuestos aromáticos aislados idénticos a los naturales.**

Además de la síntesis enzimática de aminoácido con propiedades no específicamente organolépticas, recordemos la de dos "exaltadores" del gusto: la Inosina-5'-monofosfato y la Guanosina-5'-monofosfato.

*Mentol.* El mentol racémico de síntesis total, por resolución enzimática con la lipasa My (*Cándida cylindracea*), se utiliza para obtener el mentol levogiro.

Se puede citar la obtención por bioconversión de algunos compuestos con propiedades organolépticas:

- El norpatchoulenol por hidroxilación del patchoulol por medio de diferentes microorganismos del género *Pithomyces*.

- La valencene, sometida a la acción de bacterias, produce una mezcla de ciperona, nootkatona, un epóxido y una cetona.
- La transformación de las alfa y beta iononas en una mezcla compleja de metabolitos, semejante a un aceite esencial con olor a tabaco, por la *Lasiodiplodia theobromae*.

### 3.2.3. MECANISMO NO ENZIMÁTICO.

En el cuadro general de las reacciones que afectan a los componentes de los alimentos en el curso de procesos tecnológicos de cocción, de conservación, de deshidratación, de transformación, es decir, el mecanismo no enzimático o también denominado "pardeamiento no enzimático" debido a su influjo sobre el color, además del que presenta sobre el aroma; se encuentran reacciones muy variadas de condensación entre azúcares y aminoácidos que fueron expuestas por MAILLARD [70] en 1.912 en la Academia de Ciencias de París.

Este mecanismo es un conjunto de fenómenos físico-químicos (modificación del olor, del gusto, de la coloración...) entre azúcares reductores y aminoácidos o proteínas principalmente favorecido por una elevación de temperatura, una alcalinización y una débil hidratación del medio. También está fuertemente influenciado por cambios, a veces mínimos de las condiciones operatorias. Se observa así la formación de compuestos volátiles del aroma de los alimentos cocidos o asados y pigmentos pardos de alto peso molecular: las melanoidinas.

Los actuales métodos analíticos sofisticados, combinados a los medios informáticos, han permitido un mejor conocimiento de dichos compuestos y la previsión u observación de otros. El esquema general de las reacciones se basa en los trabajos de HODGE [71] en 1.953.

Los alimentos más variados, sometidos voluntariamente a tratamientos térmicos en general, están afectados por las reacciones de Maillard que intervienen en todas las industrias, donde los glúcidos y los prótidos son almacenados o calentados, unos en presencia de los otros. Los aromas y las coloraciones que se desarrollan entonces, son buscados intencionadamente. Citemos por ejemplo: el caramelo, el tostado del café, el cacao y de todos los frutos secos (avellanas, cacahuets..); la cocción y el asado de la carne; la cocción del pan, de las patatas, las hortalizas; las "palomitas" del maíz; extracto de carne; cerveza, etc.

O son temidos por sus efectos desagradables, según la tecnología o también según el grado alcanzado por la reacción, como luego veremos.

#### Reacción de MAILLARD

La reacción de MAILLARD forma parte de un conjunto complejo de reacciones paralelas o en cadena, que engloban las que proceden de:



- Calentamiento de un aldehído o de una cetona en presencia de un compuesto aminado, (interacción entre azúcares, reductores y aminoácidos corrientemente).
- Degradación térmica de azúcares;
- Pirolisis de alfa-aminoácidos y dipéptidos;
- Pirolisis de vitaminas y provitaminas;
- Reacción entre compuestos alfa-dicarbonilos y aldehídos en presencia de alfa-aminoácidos o de amonio y/o ácido sulfhídrico;
- Degradación de aminoácidos (STRECKER);
- Oxidación de lípidos;
- Reacciones de aldolización;
- Deshidratación de los intermediarios (AMADORI-, HEGNS);
- Condensación glucosa-aminoácidos (pirrol-lactonas);
- Formación de pirazinas.

En otros casos se trata de transformaciones "parásitas" no deseadas, con efectos negativos o desagradables, tanto organolépticos, como nutricionales, toxicológicos, o simplemente tecnológicos, tales como: la degradación espontánea de las melazas; la disminución del valor nutritivo por bloqueo y destrucción de los aminoácidos; la formación de nitrosaminas; deshidratación de alimentos (leche, huevos, carnes, harina de pescado, frutas y zumos); cocción de algunos animales marinos ricos en ribosa; pasteurización de zumos; etc.

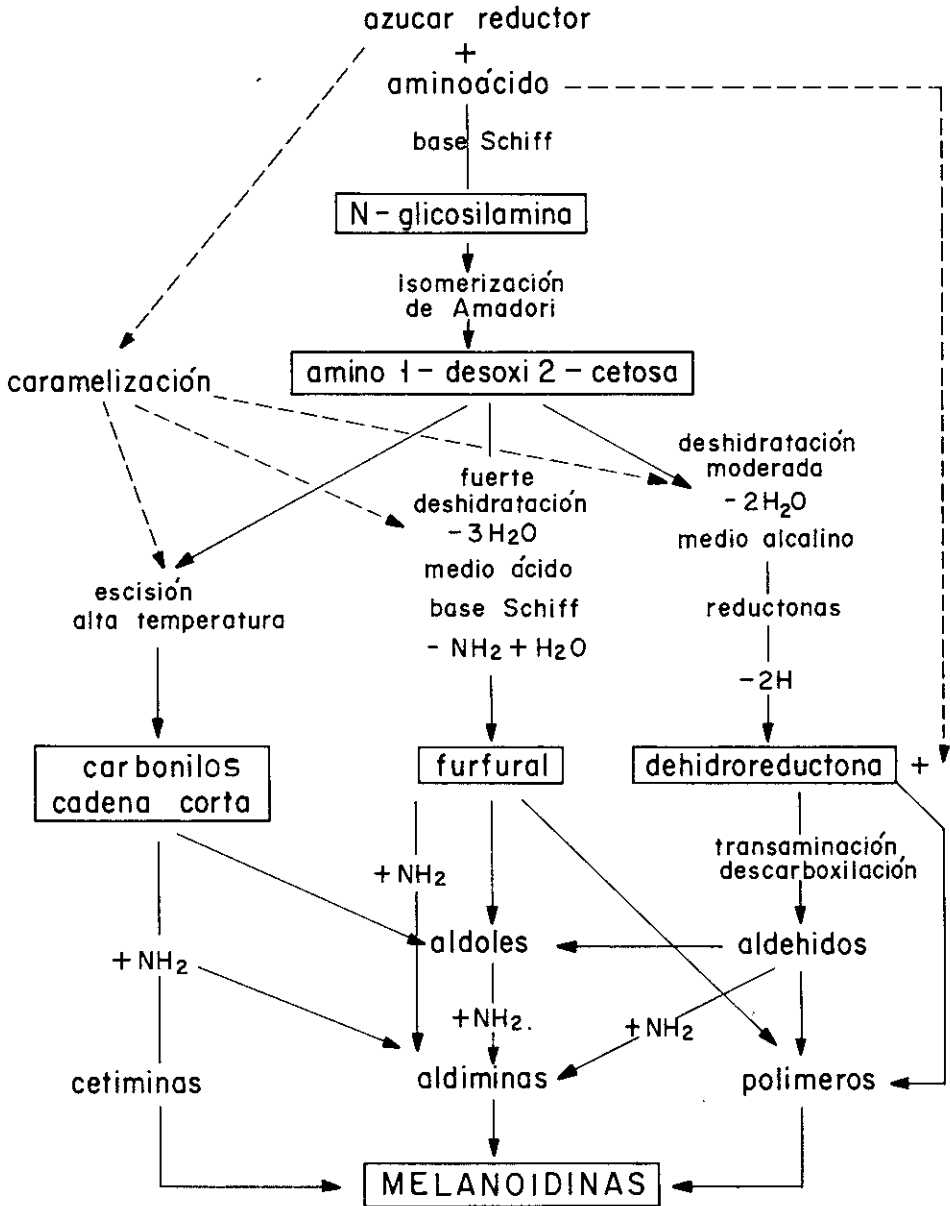
En estos casos hay que poner los medios adecuados para prevenir que no se produzca el efecto desfavorable. Los medios disponibles para ello son cuatro [5]:

- Eliminación de los sustratos o precursores;
- Descenso del pH;
- Vigilancia de la temperatura y humedad;
- Adición de agentes inhibidores.

Son muy variados los precursores de la reacción de MAILLARD, pues dependen naturalmente de la composición química del alimento o del producto de que se trate. Entre los más importantes podemos citar: aminoácidos libres, dipéptidos, azúcares reductores, triglicéridos y derivados, vitaminas, carotinoides, flavonoides y sustancias fenólicas.

Numerosos factores afectan la reacción, tanto en lo que se refiere al pardeamiento, como el bloqueo o destrucción de los aminoácidos o la formación de compuestos relacionados con el aroma.

Los principales factores físicos son el calor, el pH y el grado de hidratación. Los factores químicos juegan un papel importante sobre la velocidad del pardeamiento; tal como reactividad de los azúcares y los aminoácidos: las pérdidas en azúcares son más precoces y más rápidas que las de los aminoácidos, la influencia del azúcar domina a la del aminoácido, sin olvidar que la reactividad de un azúcar está



condicionada por la naturaleza de la proteína presente. También influyen de forma positiva o negativa, según los casos, los metales pesados, el anhídrido sulfuroso, los sulfitos y los fosfatos. Según PEYRON no podemos sentar unos criterios absolutos, pues el problema es específico de cada alimento [72].

Numerosas sustancias descubiertas en la reacción de MAILLARD, se encuentran en las degradaciones térmicas de azúcares o de aminoácidos sin intervención del compañero específico de esta reacción, que no es la generadora exclusiva de numerosos componentes con propiedades organolépticas, tales como los heterocíclicos.

También es difícil relacionar los únicos componentes MAILLARD presentes en un alimento que ha sufrido un tratamiento térmico, entre todos los componentes aromáticos presentes y más o menos característicos del aroma de dicho alimento.

En todos los casos, al lado de las melanoidinas de alto peso molecular, durante los procesos culinarios y a partir de los mismos precursores, se forman diversos compuestos alifáticos de la serie aromática y heterocíclicos.

Los heterocíclicos pueden igualmente formarse por otras reacciones térmicas, tales como degradaciones pirolíticas de constituyentes importantes de los alimentos (azúcares, aminoácidos, dipéptidos, vitaminas), así como por degradación oxidativa de los lípidos o por un mecanismo enzimático.

A través del tiempo se han ido identificando los productos MAILLARD; mientras que en 1.960 los componentes del aroma del café tostado y de la carne eran menos de cien y menos de cincuenta, respectivamente, en 1.980 se conocían de setecientos a ochocientos en cada uno.

Los métodos analíticos actuales permiten esperar un conocimiento más profundo de los productos formados y de los mecanismos de las diversas reacciones que se desarrollan en las condiciones MAILLARD, apartándose del empirismo al que estaba sometido en un principio.

En conclusión, la reacción MAILLARD presenta un innegable interés en el plano psico-sensorial y sobre la calidad comercial de los alimentos tratados térmicamente. Como dice PEYRON [72] su beneficio es particularmente importante entre las carnes, panadería, bollería, frutos secos, tostados etc., pero es deseable que el valor comercial de los productos tratados no se haga a expensas de una gran disminución de su valor nutritivo, o la aparición de sustancias nocivas.

### 3.2.4. MECANISMO PIROLITICO

Otro de los mecanismos de formación de olores y sabores en los alimentos es el pirolítico, propuesto por SANDERSON y GRAHAM [73] se refiere a la acción directa del calor sobre varios constituyentes propios del alimento. Los tratamientos térmicos son:

- Reacciones entre azúcares y aminoácidos.
- Caramelización de azúcares.

Tostado del café, del té, del cacao, de los frutos secos.  
Calentamiento de aminoácidos.  
Ahumado de alimentos.

En dichas reacciones se producen pirazinas, furanos, fenoles, etc., que dan al pan, a la carne, pescados, etc. su aroma y su sabor característicos. Muchas de estas reacciones pirólicas se provocan para producir alimentos de buena calidad, como en los casos indicados; pero también pueden originarse olores y sabores desagradables que puedan además, incluso reducir la calidad y el valor nutritivo de los alimentos.

### 3.3 COMPONENTES DE LOS AROMATIZANTES.

Según el estudio presentado el año 1976, en las "Jornadas de la Aromatización" en Grenoble [59], posiblemente hoy podría ser ampliado, se ponía en evidencia la presencia sistemática, según la función química de algunos ingredientes alifáticos, sobre todo, en las frutas:

En los diversos mecanismos de formación hemos visto que se originan una serie de compuestos químicos definidos, que mezclados algunos de ellos entre sí, en diferentes proporciones, originan las diversas sustancias aromatizantes. El número de dichos compuestos es cada vez mayor, sin embargo las industrias de aromas utilizan un número de ellos, limitado por las normas internacionales, de los cuales unos se encuentran en productos naturales y otros, los denominados artificiales, que aunque no se encuentran en los aromatizantes naturales, se utilizan por sus propiedades aromáticas.

BELTZ [57] recopiló las reacciones más importantes en las que se forman compuestos carbonilo volátiles, que puedan tener alguna incidencia en el estudio de las sustancias aromáticas:

- a) autoxidación lipídica
- b) caramelización
- c) degradación de STRECKER
- d) degradación de carotenoides
- e) reacciones enzimáticas

Los productos primarios procedentes de la *autoxidación* (hidroperóxidos de los ácidos oleico, linoleico y linolénico) son inodoros e insípidos. La calidad de un alimento comienza a alterarse cuando se producen compuestos volátiles secundarios a los que pertenecen sustancias con gran intensidad aromática, que inclusive a las pequeñas concentraciones en que normalmente se encuentran modifican muy fuertemente el olor y el sabor.

Muchos de estos compuestos producen olores y sabores desagradables, que se toman como signos evidentes de la alteración, pero otros compuestos carbonilo intervienen en diversos aromas. Entre ellos encontramos principalmente oxoácidos, aldehidos, alcoholes, vinilcetonas, etc. con diferentes tipos de olores: picante, oleoso, a sebo, a aceite de pescado, aroma de fritura, a pepino, a hojas verdes, a cáscara de naranja, sabor metálico, etc.

En el proceso de *caramelización*, ya sea en medio ácido o básico, puede conducirse o hacia la formación de mayor cantidad de aroma o bien de color. El calentamiento de jarabe de sacarosa en una solución tamponada produce una fuerte fragmentación y por tanto una mayor formación de compuestos aromáticos: dihidrofurano, ciclopentenolona, ciclohexenolona y pirona.

A continuación vamos a ocuparnos de algunos de los compuestos químicos agrupados por los grupos funcionales que les imprimen carácter.

### 3.3.1. COMPUESTOS ALIFATICOS

#### 3.3.1.1. Hidrocarburos

Los productos principales en la fracción de hidrocarburos volátiles originados como productos secundarios en la degradación lipídica por autoxidación, son el penteno y el etano. El penteno se forma probablemente mediante escisión  $\beta$  del 15-hidroperóxido del ácido linoleico. De forma parecida se forma etano a partir del 16-hidroperóxido del ácido linolénico.

### 3.3.2. DERIVADOS HIDROXILADOS

#### 3.3.2.1. Alcoholes

Las alcoholdehidrogenasas pueden reducir los aldehidos derivados del metabolismo de los ácidos grasos y los aminoácidos a los correspondientes *alcoholes*.

La formación de alcohol en las plantas y los microorganismos está fuertemente favorecida por el equilibrio de reacción y fundamentalmente por el predominio de la concentración de NADH sobre la  $\text{NAD}^+$ . No obstante la especialidad es altamente variable. En la mayoría de los casos los aldehidos  $>\text{C}_3$  solo se reducen lentamente; así, con aldehidos formados rápidamente, por ejemplo mediante escisión oxidativa de los ácidos grasos insaturados resulta una mezcla de alcoholes y aldehidos en los que predominan estos últimos.

*Alcoholes saturados:* amílico, hexílico, heptílico, octílico, nonílico, decílico, undecílico, dodecílico.

*Alcoholes insaturados:* 1-penten-3-ol; trans-2-hexenol; cis-3-hexenol; 1-octen-3-ol.

### 3.3.2.2. Fenoles [57 y 75]

Los ácidos fenólicos y la lignina se degradan térmicamente o se descomponen por los microorganismos a fenoles, los cuales pueden detectarse en los alimentos.

El humo producido al quemar la madera (pirólisis de la lignina) se utiliza para el ahumado en frío o en caliente de los productos cárnicos y pescados. Este es un proceso de enriquecimiento en fenol puesto que los vapores de fenol penetran en el tejido muscular de la carne y del pescado.

También contienen pequeñas cantidades de algunos fenoles algunas bebidas alcohólicas como el whisky escocés, y la mantequilla, cuya presencia es necesaria para completar sus aromas típicos.

Estudios con sistemas modelo a base de la pirólisis de ácidos fenólicos sencillos (ácidos ferúlico y sinápico) han puesto de manifiesto la formación de un gran número de fenoles.

Para explicar reacciones tales como las del tostado del café o la desecación en rodillos de la malta.

### 3.3.3. COMPUESTOS CARBONILO

#### 3.3.3.1. Aldehidos

Así como los ácidos grasos y los aminoácidos son precursores de muchos aldehidos, los carbohidratos lo son solo del etanal.

En la *degradación de STRECKER*, a partir de diferentes aminoácidos, se originan diversos aldehidos: metanal, etanal, 2 metilpropanal, 3 metilbutanal, 2 metilbutanal, 2 feniletanal, etc.

Por *degradación oxidativa de los carotenoides* se forman diversos compuestos carbonilos. Entre ellos como más importante se encuentra la  $\beta$ -ionona integrante, ella o sus derivados, de diferentes aromas de frambuesa, tomate, zarzamora, té negro, melocotones, fresas, cerveza, café, etc.

También por *reacciones enzimáticas* se forman compuestos carbonilos, por degradación de los ácidos linoleico y linoléico de las frutas y hortalizas: hexanal, 2-trans-hexenal, 3-cis-hexenal, 2-trans-nonenal, 3-cis-nonenal, 2 trans, 6 cisonenaleal y 3 cis-6 cis nonenal.

Los aldehidos formados por degradación de *STRECKER* también se pueden obtener como subproductos metabólicos de la transaminación enzimática o desaminación oxidativa de aminoácidos.

En un estudio con levadura *Saccharomyces cerevisiae* se vio el origen del 2 metilpropanal y el 2 y el 3 metilbutanal por descomposición, pero principalmente como subproductos durante la biosíntesis de la valina, leucina e isoleucina.

*Aldehidos saturados:* formaldehido; acetaldehido, valeriánico, caprónico, enántico, caprílico, pelargónico, caprínico.

*Aldehidos insaturados:* 2-pental; 2-hexenal; cis-3-hexenal; 2-heptenal; 2-octenal; 2-nonenal.

### 3.3.3.2. Cetonas

Las cetonas más frecuentes son: metil-propil-2 pentanona; dietil-3-pentanona; metil-butil-2-hexanona; metil-amil-2-heptanona; butil-etil-3-heptanoma; dipropil-4-heptanona; metil-hexil-2-octanona.

## 3.3.4. ACIDOS Y DERIVADOS

### 3.3.4.1. Acidos

Independientemente de los esteres, que luego citaremos, en los aromas de frutas se encuentran diferentes ácidos libres, siendo los más frecuentes [59]: el ácido acético y en orden decreciente los ácidos butírico, fórmico, propiónico, caproico, isovalerianico, valeriánico, isobutírico, 2 metilbutírico, 2-hexenoico; cis-3-hexenoico, etc.

### 3.3.4.2. Esteres

Los esteres son constituyentes importantes de muchas frutas. Se sintetizan solamente por las células intactas.

El acetyl-CoA procede de la  $\beta$  oxidación de los ácidos grasos y también ocasionalmente del metabolismo de los aminoácidos [57].

JENNINGS WG Y TRESSL R. [74] estudiaron la biosíntesis de un importante componente del aroma de las peras, el 2-trans-4-cis-decaedionato de etilo a partir del ácido linoleico.

Cuando se homogeneizan las frutas, tal como en la elaboración de zumos, los esteres se hidrolizan rápidamente mediante las hidrolasas presentes y como consecuencia el aroma se debilita.

Según el estudio estadístico presentado en Grenoble en 1.976 [56], ya citado, en las frutas más comunes se habían identificado los siguientes esteres:

192 acetatos esterificados con 42 alcoholes diferentes, 83 butiratos de 23 alcoholes diferentes, 62 caproatos de 18 alcoholes diferentes, 40 caprilatos de 14 alcoholes diferentes, 20 dimetilbutiratos de 9 alcoholes diferentes, y otros en orden decreciente como formiatos, propionatos, isovalerianatos, isobutiratos, decanoatos, valerianatos, pelargonatos y enantoatos.

El alcohol más frecuentemente esterificado es el alcohol etílico (130 con 16 ácidos diferentes) le siguen el metílico, el hexílico y el decílico.

Los ésteres más frecuentes en las frutas son el acetato de etilo, butirato de etilo y capronato de etilo.

### 3.3.4.3. Lactonas [57 y 77]

En diversos alimentos grasos y en frutas se encuentran lactonas de cadena larga (4-nonalóido,  $\tau$  decalactona y  $\delta$ -decalactona) que se obtienen a partir de los correspondientes ácidos hidroxigrasos del tipo del ácido ricinoléico. Por el contrario lactonas como la solerona (5 oxo-4-hexanóido) del vino, 5 hidroxí-4-hexanóido (lactona del Jerez) y 3 metil-4-octanóido (lactona del whisky) no se conoce aún el proceso de su formación.

Las lactonas se encuentran en la grasa de la leche, carne, caldo de carne, pan blanco, pan tostado, maíz tostado, habas de soja, setas desecadas, nueces tostadas, pasas, melocotón, albaricóque, coco, fresas, frambuesas, uvas, etc.

### 3.3.5. TIODERIVADOS [57]

En el calentamiento de los alimentos, los aminoácidos azufrados (cistina, cisteína, metionina) originan numerosos tioderivados, entre los cuales algunos son poderosos compuestos aromáticos que constituyen agradables olores y sabores; por el contrario otros son irritantes o desagradables.

En todos los alimentos proteicos cuando se calientan o se almacenan, durante un largo periodo de tiempo, aparecen tioles, tioéteres, di y trisulfuros integrantes de diversos aromas característicos. Pero estos compuestos pueden encontrarse como componentes, en mayor o menor grado, de aromas completamente distintos.

Dichos aminoácidos azufrados se consideran como precursores en diversas reacciones de pardeamiento no enzimático para la obtención de aromas que imitan la carne cocinada.

Entre los tioderivados, los tioles presentan un gran interés: como constituyentes importantes del aroma, por su intenso olor y además por actuar como productos intermediarios al reaccionar con otros productos volátiles adicionándose a grupos carbonilos o a los dobles enlaces.

Durante la degradación de la cisteína y de la metionina, por la reacción de STRECKER, la primera forma ácido sulfhídrico y 2-mercaptoacetaldehído, mientras que la segunda origina metilmercaptano por  $\beta$  eliminación del metional, producido por fotoxidación de la metionina en presencia de riboflavina. Como ejemplo de tioderivados que pueden ser, según los casos, responsables de sensaciones agradables o desagradables se encuentra el sulfuro de dimetilo. Se obtiene por metilación durante el calentamiento en presencia de pectinas o directamente a partir de metionina. Sus propiedades sensoriales adquieren gran importancia como



constituyente de los aromas del café y del té, incluso a niveles muy bajos, próximos al valor umbral.

En el caldo de carne se encuentran dos tioderivados: el ditiosemiacetal y el 1-metiltioetanotiol, unos de los responsables del aroma característico.

Los tioles [116] se oxidan fácilmente a disulfuros y posteriormente a trisulfuros que intervienen en el aroma de variados alimentos. Pongamos como ejemplo al dimetiltrisulfuro que contiene una excepcional actividad aromática, pues interviene en el aroma de la carne de gallina, en los de la coliflor y de la col cocidas.

La interacción entre el ácido sulfhídrico y el acetaldehído da lugar a la formación de compuestos heterocíclicos entre los que podemos citar el 2,4,6-trimetil-tritiano; 3,5 dimetil-1,2,4-tritiolano; 2,4,6-trimetil-5,6-dihidro-1,3,5-ditiazina y tritioacetona que se originan durante la cocción de la carne y cuya significación en el aroma aún está en estudio.

Los tioderivados son responsables de graves defectos del aroma que en diversos casos los hacen rechazables. Mencionemos el sulfuro de dimetilo que provoca olores desagradables como el de "aceite bruto" en los crustáceos congelados, el de "olor a cebolla" en la cerveza; el de "olor a pienso" en la leche.

El metional, antes citado, es el responsable del aroma "a luz solar" de la leche y del aroma característico de las patatas cocinadas.

Un producto de degradación originado en la fotólisis de la humulona reacciona con ácido sulfhídrico dando 3-metil-2-buten-1-tiol, responsable del aroma "a luz solar" de la cerveza.

El óxido de mesitilo al reaccionar con el ácido sulfhídrico da un tioderivado responsable del sabor a "orina de gato" de la carne de vacuno enlatada.

El aceite de colza y los demás aceites de crucíferas pueden dar lugar a una serie de sustancias volátiles. Las semillas tienen unos glucósidos denominados glucosinolatos que al triturarlas se hidrolizan por la acción de la mirosinasa (una tioglucosidasa) originando una serie de ésteres del ácido isotiocianico derivados de los respectivos glucosinolatos: gluconapina, glucobrasicanapina, progoitrina y gluconasturtina.

Las pequeñas cantidades de tioderivados volátiles formados se eliminan totalmente durante el refinado.

### **3.3.6. COMPUESTOS HETEROCICLICOS**

#### **3.3.6.1. Furanos [57 y 76]**

Entre el gran número de productos obtenidos a partir de la degradación de los carbohidratos, las 3(2H)-furanonas, pertenecen a los más llamativos compuestos aromáticos.

La conversión de fructosa en furanona se consigue por reacciones de calentamiento en medio fuertemente ácido tras un lento proceso de enolizaciones y  $\beta$  deshidrataciones catalizadas por protones con la actuación de algunos

compuestos intermedios muy reactivos. Una reacción alternativa es la participación de una condensación retroaldol, que explica la formación y existencia de la 4-hidroxi-5-metilfuranona.

La L-Ramnosa es el precursor de la 4-hidroxi-2,5 dimetilfuranona que también se puede obtener por la reacción de MAILLARD.

Todavía no está claro si las furanonas detectadas en las frutas son los productos de reacción favorecidos al bajo pH de la fruta y se obtienen exclusivamente por reacciones no enzimáticas.

El 6-metil-2,3-dihidro-tieno (2,3-C-) furano y el 2-mercaptometilfurana son constituyentes significativos del aroma del café. El primero también conocido como kahweofurano contribuye a la nota "a humo quemado" cuando se diluye mucho, en tanto que el segundo semeja al del café.

En la autoxidación de los ácidos linoleico y linolénico se forman algunos derivados del furano a los que se debe, entre otras cosas el defecto del aroma a habas verdes del aceite de soja. En el refinado ordinario se elimina este aroma, pero revierte en casos de almacenamiento inadecuado del aceite (sabor a "reversión").

### 3.3.6.2. Tiofeno

Otros de los tioderivados son los del tiofeno [117]. La degradación de la cisteína por la reacción de STRECKER da lugar a 2-mercaptoetanal, que puede reaccionar con los aldehidos no saturados como la acroleína o el 2-butenal (obtenido a partir del acetaldehido por condensación aldólica), para formar tiofeno, 3-metiltiofeno o 2-metiltiofeno. Estos compuestos se encuentran generalmente en las carnes cocida, asada y enlatada.

Otro aroma a carne se forma al reaccionar en caliente la cisteína con la 3(4 hidroxí-5-metil) furanona produciendo 4 mercapto-5-metil-3-(2H) tiofeno.

El 3-metiltiofeno y el 2-metiltiofeno intervienen así mismo en el aroma del café. El 2-acetil-3-metiltiofeno en valores de 1,1 ppm, da una nota a nuez.

El jarabe de glucosa, por la presencia de 2 ppm de 2-acetil-3-metiltiofeno adquiere un aroma a miel.

### 3.3.6.3. Pirroles [57]

Estos productos que aparecen en la reacción de MAILLARD, o se producen en la reacción entre un aminoácido y un 2-acilfurano, se encuentran en el pan, queso, caviar, cerveza, café, cacao, cacahuete tostado.

Se han identificado unos 40 derivados del pirrol, entre los que cabe destacar el 2-formilpirrol, 2 acetilpirrol, 2 formil-1-metilpirrolidina, 1-furfurilpirrol.

#### 3.3.6.4. Oxazoles [57]

Al calentar los alimentos de naturaleza proteica, principalmente la carne, se originan oxazoles y oxazolininas a partir de serina o treonina mediante un mecanismo alternativo de la degradación de STRECKER, produciéndose 2-aciloxazoleno a partir de la serina. También en el aroma a carne se encuentran diversas oxazolininas como la 2,4,5 trimetil-3-oxazolina (con un umbral olfatorio en agua de 1ppm).

#### 3.3.6.5. Tiazoles

Otros derivados del azufre que se presentan en los alimentos son los tiazoles, de los que se han identificado unos treinta [119]. El 2-acetil-tiazol se encuentra en muchos de los alimentos tratados por el calor, formándose al reaccionar la cisteína con compuestos dicarbonilo. Su precursor la 2-acetil-2-tiazolina tiene un intenso olor semejante al de la corteza de pan fresco, aunque no es un constituyente importante del aroma del pan.

El benzotiazol puede aparecer en la leche cuando se calienta y es el responsable del aroma extraño a "alimento pasado".

El primer estudio sobre ello fue el de STOLL M. Y COL. en 1967 [119] que los investigaron en el cacao y en el café, al mismo tiempo que BUTTERY Y COL. lo hacían en el lúpulo y la cerveza.

El 2-isobutiazol es uno de los principales compuestos del aroma de tomate se adiciona 20 a 50 p.p.b. para reforzar el sabor a tomate, posiblemente se produce en el metabolismo secundario de la leucina y cisteína. También tiene una nota a vino.

El 2,4-dimetil-5-viniltiazol y el 2-acetiltiazol son característicos del aroma a nueces; al primero se encuentra también en la carne frita.

También se encuentran tiazoles en las hortalizas (2-metil-tiazol); cereales y maíz tostado (2-acetiltiazol).

Otro método de obtención de los tiazoles es por degradación térmica de la tiamina dando, por una ruta alternativa, derivados del furano y del tiofeno.

La cisteína también es el precursor del ácido 1,2 ditiolano-4-carboxílico (ácido aspárrico) de los espárragos.

Los compuestos volátiles del azufre originados en el vino y la cerveza lo hacen, partiendo de la metionina, siendo subproductos del metabolismo de los microorganismos, formándose por desaminación, descarboxilación y reducción: el metional, metionol y el acetato del ácido 3(metiltio)propílico.

En 1975 MAGA J.A. publicó un trabajo denominado "Thiazoles in foods" que fue reseñado en la obra de FENAROLI [115].

### 3.3.6.6. Piranonas

Por hidrólisis, en medio ácido, del grupo OH del C-1 de la fructosa se origina a través de estados intermedios el maltol (3-hidroxi-2-metil-pirona) sustancia roja con olor a caramelo, se encuentra en algunos alimentos: chocolate (3,3 ppm); galletas (19,7 ppm); cerveza (0 a 3,4 ppm) y malta tostada (292 ppm) [57].

Se utiliza para dar a los productos de panadería y bollería un olor a "horneado"; para enmascarar el sabor amargo del lúpulo y de la cola; o para endulzar bebidas de zumos de frutas, mermeladas y jaleas [57].

En la actualidad, tanto el maltol como el etilmaltol se utilizan como "reforzadores del sabor dulce" [25] mejorando e incrementando la percepción de este sabor.

Es suficiente la adición de 5 a 75 mg. de maltol para reducir en un 15% la adición de azúcar, sin que se rebaje el sabor dulce. El etilmaltol no se ha encontrado como constituyente natural de los alimentos, pero aumenta el aroma de 4 a 6 veces más que el maltol.

### 3.3.6.7. Pirazinas

Es un conjunto de compuestos heterocíclicos nitrogenados que contribuyen directamente a la formación del "complejo aromático" de diversos alimentos, principalmente tostados o asados. Se han encontrado más de cincuenta en los alimentos.

El estudio de las pirazinas fue objeto de investigaciones realizadas por el Departamento de Bromatología, Toxicología y Análisis Químico aplicado de la Facultad de Farmacia de Madrid [78].

Se forman por varios procedimientos: reacción de MAILLARD; pirólisis de algunos derivados amínicos; reacciones enzimáticas o por biosíntesis.

El problema de la formación de las pirazinas en alimentos ha sido objeto de múltiples investigaciones que intentaremos resumir: ya en 1.896 BRANDES Y STRONR y en 1.913 IRVINE [79] opinan que las pirazinas sustituidas proceden de reacciones entre amoniaco y hexonas, teoría que entre 1.952 y 1.956 compartieron HOUG [80], WIGGINS [81], DAVISON Y WIGGINS [82]. HODGE [71] en 1.953 demostró que, en parte, se produce una fragmentación de los azúcares. DAWES Y EDWARDS [84] llegaron a la conclusión de que pueden ser el resultado de condensaciones entre azúcares y aminoácidos. VAN PRAAG [85] en 1.968 estudia el papel del amoniaco en la síntesis pero KOEHLER [86] un año más tarde, trabajando con radioisótopos afirman que el carbono de las pirazinas procede de un azúcar y el nitrógeno de los aminoácidos. KOEHLER Y ODELL [87] demostraron en 1.970 que la glucosamina, al reaccionar con azúcares y otros compuestos como glicerina, glioxal, 2,3 butanodiona, acetaldehído e hidroxiacetona, dan una variedad de pirazinas específicas.

También se ha estudiado la biosíntesis, [57] a partir de la leucina, por amidación y posterior metilación, obteniéndose la 2-isobutil-3-metoxipirazina que se encuentra

en cantidad apreciable en el pimiento (*capsicum annum*) y en los "chiles" (*capsicum frutescens*). También estudiaron la biosíntesis de las pirazinas BRAMWELL Y BURREL.

Existen unas pirazinas muy olorosas: 2-isopropil-3-metoxipirazina y la 2-sec-butil-3-metoxipirazina que se consideran subproductos metabólicos de algunos hongos y microorganismos. Estas pirazinas son responsables del olor anormal a "tierra mohosa" de los huevos, pescados y productos lácteos.

Se han registrado muchas patentes para la producción de pirazinas y su utilización como sustancias sápidas.

CARBALLIDO, VILLANÚA, VALDEHITA Y ROBISCO [78] determinaron el contenido en pirazinas de diversos alimentos (expresado en 2,6 dimetilpirazina): café en grano (verde, tostado natural y torrefacto); extractos de café solubles (normal y descafeinado); sucedáneos de café (malta, achicoria) y frutas secos, crudos y tostados (almendras, avellanas, cacahuets, piñones).

Desde hace varios años se está investigando sobre el origen del aroma del café y más en particular sobre el producto sometido a tostación.

Los primeros que mencionaron la presencia de pirazinas en un extracto de café fueron REICHSTEIN Y STAUDINGER [88]. El aroma del café estrechamente ligado a las pirazinas, [56] habiéndose dedicado a ello además VIANI Y COL. [89], REYMOND Y COL. [90], GIANTURCO Y COL. [91 a 95], GOLDMAN Y COL. [96], BONDAROVICH Y COL. [97 y 98], FRIEDEL Y COL. [99] y CARBALLIDO Y COL. [78].

Las pirazinas del cacao se estudiaron por DIETRICH Y COL. [100], RIZZI [101], FLAMENT Y COL. [102], VAN PRAAG [85], VAN DER WAL Y COL. [103], RENECCIUS Y COL. [104].

La formación de pirazinas en el cacahuete tostado fue estudiado por KOEHLER Y COL. [86 y 87] en el propio fruto seco y en sistemas modelo por reacción de MAILLARD a 120°C usando diversos precursores. También hay que recordar en este alimento los trabajos de MASON Y COL. [105, 106] y de NEWELL Y COL. [107].

Los estudios de FERRETI Y FLANAGAN [108 a 112] estuvieron dirigidos a la presencia de pirazinas en la leche y productos lácteos.

Respecto a la presencia de pirazinas en el aroma del pan FENAROLI [56] cita los trabajos de SYDOW Y ANJOU y de SIZER Y COL.

En el estudio de las pirazinas en los alimentos, es clásica la revisión hecha por MAGA Y SIZER [113] de los trabajos publicados hasta 1.973, que se ha incluido o extractado en otros trabajos más modernos [56, 57, 78, 115].

### 3.3.7. TERPENOS

Todos los terpenos, cíclicos o lineales, se derivan del isopreno ( $C_5 H_8$ )<sub>n</sub>.

Según el número de moléculas de isopreno, (2-metil-1,3, butadieno;  $CH_2=C(CH_3)-CH=CH_2$ ) se clasifican en monoterpenos (n=2), sesquiterpenos (n=3), diterpenos (n=4), triterpenos (n=6) y tetraterpenos (n=8).

Dentro del gran grupo de los terpenos también se incluyen compuestos oxigenados derivados de estos hidrocarburos (alcoholes, éteres, cetonas, fenoles, óxidos, esterés, etc. así como derivados del azufre o del nitrógeno)

Existen una serie de compuestos terpénicos muy importantes en la Naturaleza (fitol, escualeno, carotenoides, vitaminas A, E, K, coenzima Q).

Los terpenos están distribuidos en la naturaleza en las frutas, hortalizas, hierbas, especias, aceites esenciales, vino, etc. constituyen un amplio espectro de aromas percibidos casi siempre como muy agradables. Los terpenos volátiles de muchos alimentos juegan el papel de "compuestos impactos" y por tanto se utilizan frecuentemente para la aromatización.

Los monoterpenos con grupos hidroxilo, tales como el linalol, geraniol y nerol se presentan en los zumos de fruta, por lo menos en parte, en forma de glucósidos. En las uvas y en el vino se han encontrado el linalol- $\beta$ -rutinosido y el linalol-6-O- $\alpha$ -arabinofuranosil- $\beta$ -D-glucopiranosido.

Los glucósidos de los terpenos se hidrolizan inclusive mediante calentamiento ligero, dependiendo de la acidez del zumo de fruta. En estas condiciones, los terpenos que se liberan con dos o tres grupos hidroxilo sufren nuevas reacciones, formando hotrienol y nerolóxido, a partir del 3,7-dimetilocta-1,3-dien-3,7-diol de los zumos de frutas, y óxidos de cis y trans-linalol a partir del 3,7 dimetilocta-1-en-3,6,7 triol de los mostos de uva y zumo de melocotón.

La mayoría de los terpenos contienen uno o más centros quirálicos. Las formas l, d y racémica de diversos terpenos se encuentran en diferentes plantas.

Los enantiómeros y diastereoisómeros difieren regularmente por sus características olorosas. Por ejemplo el l-mentol, que se encuentra en el aceite esencial de menta, tiene un aroma a menta claramente definido, dulce, frío y refrescante, mientras que el d-mentol tiene notas claramente desagradables (fenólica, medicamentosa, a moho, a alcanfor). La l-carbona huele a menta mientras que la forma d tiene un aroma parecido a la alcaravea.

Algunos terpenos se oxidan fácilmente durante el almacenamiento de los alimentos provocándose defectos del aroma.

## **4.-INFLUENCIA DE LA ESTRUCTURA MOLECULAR Y DE LAS PROPIEDADES FISICO-QUIMICAS**

### **4.1 OLOR Y CONSTITUCIÓN QUÍMICA**

La sensación olfativa en un principio se atribuye a una onda o una variación de presión, pero hay que tener en cuenta que para que se produzca dicha sensación tiene que existir un contacto material entre una partícula de la sustancia olorosa con los órganos sensores de la nariz. Otra de las circunstancias que hay que tener en cuenta es la volatilidad de la sustancia olorosa que pierde poco a poco de su peso, llegando a una cantidad límite, denominada "concentración umbral", que es el mínimo necesario para percibir la sensación olfativa

Los problemas relativos a los estudios de la quimiorrecepción humana, ordinariamente plantean la siguiente interrogante: "¿de que elementos estructurales depende la percepción por los receptores de un compuesto específico de un olor?" [57]. Debemos admitir que todo este campo es muy complejo. Sin embargo, se ha observado cierto número de similitudes entre la estructura de los productos volátiles de un aroma y su relación con el olor.

Se han desarrollado diversas teorías sobre el mecanismo que interviene cuando la partícula actúa sobre los órganos sensores [56]. Estas teorías pueden agruparse en cuatro categorías:

- a) teoría vibracional
- b) estructura molecular y olor
- c) interacciones intermoleculares
- d) estimulación química

#### **4.1.1. TEORIA VIBRACIONAL**

Según la teoría vibracional [120, 121, 122, 123] la responsable de la sensación olfativa será la vibración propia de la molécula de la sustancia olorosa, dato que se incrementa por resonancia propia de los órganos sensores. Se admite que no es una concatenación directa de causa a efecto entre la vibración y la sensación olfativa, sino sólo una correlación general.

Hay que tener en cuenta que las características vibracionales dependen, indirectamente, de la estructura química; el mecanismo olfativo incluye las características vibracionales y otras características químicas de la sustancia olorosa.

Para que las partículas de la sustancia olorosa se pongan en contacto con los órganos sensores y tenga lugar la estimulación química, es necesario, como ya hemos dicho, que la sustancia olorosa sea volátil para poder ser absorbida por los órganos sensores; esta característica depende directamente de la estructura química.

La característica vibracional de la molécula puede ser determinada por el espectro Raman o por el infrarrojo [124, 125, 126], sin embargo la correlación entre olor y espectro Raman e infrarrojo tiene numerosas excepciones; en particular, sustancias con espectros Raman diferentes tienen características olorosas muy parecidas.

#### 4.1.2. ESTRUCTURA MOLECULAR Y OLOR

Las propiedades de un compuesto oloroso dependen de la estructura (o geometría) molecular, o de los grupos funcionales.

##### 4.1.2.1. Geometría molecular

El significado y la esencia de la geometría de un compuesto se demuestra, como dice BELITZ [57], mediante diversos compuestos que tienen un olor muy próximo al del alcanfor.

Los ejemplos sugieren que los grupos funcionales no tienen importancia decisiva para el olor a alcanfor, pero que la forma molecular o geometría de la molécula sí la tiene.

Otro dato de la importancia de la geometría molecular es la posible sustitución de grupos de la molécula por otros que tienen radios de *van der Waals* similares. Esta sustitución no tiene básicamente efecto sobre la cualidad del olor.

Es importante la necesidad de mantener el momento dipolar de la molécula en tales sustituciones, puesto que el momento dipolar es responsable de la necesaria orientación de la molécula en el quimiorreceptor olfatorio.

El hecho de que un tipo de geometría molecular singular soporte un tipo similar de olor se demuestra en el caso del limoneno.

Ambos isómeros del p-menteno-8 difieren claramente, uno tiene un característico olor a naranja como el limoneno, mientras que el otro tiene el olor apagado de un hidrocarburo.

##### 4.1.2.2. Grupos funcionales

BELITZ [57] recopiló una serie de ejemplos de la influencia de los grupos funcionales en el olor. Los grupos funcionales no son en ningún caso esenciales para un compuesto aromático tal como ocurre con los hidrocarburos. Estos



compuestos tienen un olor específico aunque carecen de grupos funcionales, lo cual de nuevo pone de manifiesto la importancia de la geometría molecular. Por otro lado hay compuestos tales como el  $\text{NH}_3$ , el  $\text{SH}_2$  y el  $\text{CH}_3\text{-SH}$ , que consisten solamente en un grupo funcional y tienen un olor (desagradable) extremadamente intenso. En este caso las consideraciones de factores estéricos no tienen sentido; el grupo funcional es obviamente y sólo el determinante del olor.

En los compuestos con varios grupos funcionales, sus posiciones relativas también pueden ser de importancia para la cualidad olorosa.

En conclusión, en relación a los grupos funcionales, puede decirse que en las moléculas pequeñas influyen directamente en la cualidad olorosa, en tanto que en las moléculas grandes influyen la orientación del momento dipolar y de este modo indirectamente la cualidad olorosa. En las grandes moléculas la influencia más importante se deriva de la geometría molecular. Tenemos la sensación de que ambos parámetros, la geometría y los grupos funcionales, no deben separarse nunca en cualquier consideración del problema.

#### 4.1.2.3. La teoría basada en la forma y tamaño de la molécula

No resulta demasiado satisfactoria, en tanto que introduzca otros parámetros: el momento rotacional principal de la molécula, sus características electrófilas o nucleófilas, así como la presencia de determinados grupos funcionales [56].

#### 4.1.3. INTERACCIONES INTERMOLECULARES

La *teoría basada en las interacciones intermoleculares* parece la más completa y satisfactoria. En ella se tienen en cuenta, además, otras numerosas propiedades como la tensión de vapor y la solubilidad.

La sensación olfativa surge de la interacción que se produce en la interfase entre el extracto acuoso (moco) y la membrana olfativa.

#### 4.1.4. ESTIMULACION QUIMICA

La *teoría de la estimulación química* se basa en una verdadera reacción química entre la molécula del aroma y los órganos sensores de la nariz. Esta teoría no ha tenido muchos seguidores, pues se han realizado ensayos "in vitro" y otros en el ambiente biológico sin encontrar una correlación entre ambos.

OHLOFF G, THOMAS A.F. [127] estudió los compuestos responsables del ámbar gris pertenecientes a numerosas series como la del dihidroambrinol o la del isocanfíl-3-ciclohexanol. La estimulación olfativa resulta condicionada a una disposición espacial de los radicales en posición 1-2 y 4, de los que uno debe contener oxígeno.

Las objeciones que se pueden hacer son dos:

Primera: que la teoría indica la presencia en los órganos olfativos de receptores específicos para determinados tipos de moléculas, o determinados olores, llamados primarios; pero las investigaciones fisiológicas han demostrado que la especificidad de los receptores no existe.

Segunda: se basa en los casos de armonía y sobre las experiencias de la fatiga olfativa selectiva.

Existen casos de personas que no perciben el olor de una determinada categoría de almizcle, pero perciben, por el contrario, el olor de otra categoría de almizcle; lo mismo ocurre con la fatiga olfativa. De estos hechos es fácil deducir que la sensación del olor del almizcle, definida como primaria o fundamental, está compuesta de varias sensaciones fundamentales.

SADINI V [128] hizo un estudio sobre el olor y las propiedades moleculares de la sustancia, como base del análisis organoléptico de los alimentos en el que se resumen y comentan algunas de las teorías que hemos comentado.

#### 4.1.5. CONCLUSION

En conclusión [56] ninguna de las teorías descritas es plenamente satisfactoria; en otras palabras, hay que tomar en consideración casi todas las características moleculares indicadas en las diversas teorías para tener una correlación suficientemente general entre el olor y la constitución química.

En una sensación compleja como es el aroma entran en juego, otros factores fisiológicos que hacen prácticamente imposible, al menos por ahora, un tratamiento sistemático y completo del argumento.

## 4.2. SABOR Y CONSTITUCIÓN QUÍMICA

En el examen de las moléculas sápidas es sorprendente comprobar la analogía entre los problemas teóricos que plantean y los que presentan las moléculas farmacológicas; hasta tal punto que las relaciones estructura-actividad de los compuestos sápidos habrían podido constituir un modelo metodológico para el estudio de los derivados farmacológicamente activos, mientras que es todo lo contrario lo que se produce.

Sin duda la edulcoración o la aromatización han pertenecido largo tiempo a un Arte más que a una Ciencia. Pero ocurre igual para la terapéutica y la evolución de las ideas, en las dos disciplinas es notablemente paralela.

Hasta el presente los farmacólogos y los teóricos de la química terapéutica respetuosos de una cierta jerarquía de valores, han considerado las "moléculas del paladar" un tema menor en relación con las "moléculas de la salud". Es más

glorioso trabajar por el bienestar del enfermo, que por el placer del "gourmet" [129].

Bien pocos han comprendido que la interacción de un compuesto sávido y las papilas gustativas constituyen un esquema simplificado de respuesta biológica a un estímulo químico, que se presta a una comprobación experimentalmente cómoda de hipótesis de tipo mecánico. Los modelos artificiales muy sofisticados han sido elaborados mientras que estaba disponible un modelo biológico muy sencillo: la lengua.

En el estudio de la relación entre el sabor y la constitución química hay que destacar que los estudios realizados están principalmente dirigidos a los sabores dulce y amargo (este último en menor grado), mientras que en los sabores salado y ácido hay que reconocer que las relaciones estructura-actividad son aún elementales e ingenuas.

En este estudio debemos destacar dos periodos de tiempo [129]: el primer periodo (o tradicional) y el periodo moderno.

El primer periodo, que se fundamenta en las relaciones estructura-actividad, consta de diferentes conceptos inspirados en la farmacología que le caracterizan:

- a) Investigación de la función activa.
- b) Influencia de la isomería.
- c) Teoría de los grupos funcionales.
- d) Concepto de ciclo potencial
- e) Noción de vinilografía.
- f) Isostería.
- g) Síntesis "acumulativa".

En el periodo moderno, que se fundamenta en las relaciones propiedades-actividad, se contemplan tres conceptos distintos:

- a) propiedades electrónicas
- b) propiedades hidrófobas
- c) factores estéricos

#### **4.2.1. ESTRUCTURA-ACTIVIDAD**

##### **4.2.1.1. Constitución química y sabores dulce y amargo**

Sustancias de constitución química muy próxima tienen a veces sabor muy diferente y es difícil apreciar a veces la ligera diferencia de estructura que corresponda a una gran variación del sabor.

Por otra parte sustancias de constitución química completamente diferente pueden tener sabor dulce.

Del estudio de los complejos dulcígenos y amargógenos se concluye que dos términos de una misma serie son frecuentemente uno amargo y otro dulce y otras sustancias químicamente definidas poseen los dos sabores, sea simultáneamente o uno después de otro.

Se ha estudiado la relación entre constitución química y sabor dulce. STERNBERG denominó "sapiforos" a los grupos OH- y NH<sub>2</sub><sup>+</sup> por considerar que a ellos se debe la sensación sávida. Como los dos actúan de diferente forma es necesario que exista una relación armónica entre ambos para que se desarrolle el sabor dulce.

BERTLY Y MIERS dividieron los grupos funcionales que intervienen en glucóforos y auxóglícos según sus propiedades.

TABLA 3

GLUCOFOROS	AUXOGLICOS
CH <sub>2</sub> OH-CHOH	-H
-CO-CHOH	
-CH-COOH	-CH <sub>3</sub> , -C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> , -R
NH <sub>2</sub>	-CH <sub>2</sub> OH, -CH <sub>2</sub> -O-R
-CH <sub>2</sub> -O-NO <sub>2</sub>	-CHOH-CH <sub>3</sub>
-CH <sub>(α-x)</sub> -Hal <sub>x</sub>	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> OH

La presencia de un grupo glucóforo comunica a la molécula un sabor dulce potencial, siendo para ello necesario la presencia de uno o más grupos auxóglícos. Pero estos autores sólo pensaron en moléculas alifáticas y vieron después que fijando glucóforos a núcleos aromáticos daban lugar a productos amargos.

La relación entre constitución química y actividad edulcorante es un problema extremadamente complejo y complicado no pudiendo afirmar que esté resuelto.

Se han desarrollado diversas investigaciones que han aportado interesantes datos sobre determinados edulcorantes, pero no se han fijado aún de una forma definitiva y segura las condiciones estructurales que deba tener una sustancia con

sabor dulce. Insignificantes variaciones en la molécula de un edulcorante puede convertirlo en una sustancia insípida o incluso amarga.

Entre los trabajos publicados sobre la relación entre constitución química y sabor dulce hay que destacar los dedicados a edulcorantes artificiales realizado por RUNTI Y COL. desde 1.952 y que aparecen en diversas revistas científicas, ver RUNTI, DE NARDO Y SCIORTINO, desde 1.952 a 1.978 [130-141].

Entre los factores que influyen sobre el sabor de las sustancias podemos citar los siguientes:

#### 4.2.1.2 Isomerías

Uno de los ejemplos que podemos poner es la influencia de la *estereoisomería* en el sabor de las aldoxinas en las que los isómeros "anti" son muy dulces, mientras que los "sin" son mucho menos dulces. Este caso se ha estudiado con motivo del poder edulcorante de la Perillartina y de la Oxima V Sri.

Pero quizá lo que más se ha estudiado es la influencia en el sabor de la *isomería de posición*:

- Entre los derivados de la urea, la p-Tolilurea es dulce, mientras que los isómeros meta y orto son amargo e insípido respectivamente.
- En la serie del P-4000, donde únicamente el derivado que tiene el grupo propoxi en posición 6 tiene un poder edulcorante considerable.
- En la serie de los difenoles se aprecia que la resorcina (meta) es dulce, la hidroquinona (para) es dulzaina y la pirocatequina (orto) amarga. Dándose el caso curioso de que la toxicidad de estas sustancias es en sentido inverso: la más tóxica es la pirocatequina y la menos tóxica la resorcina.
- De los nitroderivados de las aminas: la m-nitroanilina es dulce mientras que los isómeros orto y para son insípidos.
- Uno de los ejemplos más claros de la influencia de la isomería de posición es el caso de la sacarina en el que la orto-sulfimido-benzoica es dulce, mientras que la para no lo es [25].

La *isomería de cadena* tiene un ejemplo en el papel que la ramificación de una cadena alifática ejerce en la serie de las nitrofenilureas, en las que dicha ramificación anula el poder edulcorante.

La *isomería óptica* fue subrayada por FISCHER para los alfa-aminoácidos. Los aminoácidos de la serie D tienen un poder edulcorante mayor que los aminoácidos naturales de la serie L.

### *Simetría molecular:*

La simetría molecular puede influir como en el caso de los derivados de la urea: la dimetilurea asimétrica es dulce, mientras que la simétrica es amarga.

#### **4.2.1.3. Teoría de los grupos funcionales.**

La teoría de los grupos funcionales no es en realidad una teoría si no un conjunto de observaciones sobre la influencia de ciertas funciones químicas sobre el sabor de las moléculas.

COHN reunió un cierto número de hechos experimentales que fueron recopilados y ampliados por MONCRIEFF [142] cuya última edición de su obra (1.967) reúne 58 reglas, de las que muchas se destacan por el número de sus excepciones. La mayoría proceden de observaciones en la serie de la sacarina y del P.4000.

### *Compuestos hidroxilados:*

El caso más representativo es el de los azúcares, hidratos de carbono solubles que les comunica un sabor dulce manifiesto; propiedad que reside en la pluralidad de grupos OH de su molécula.

En la serie alifática el sabor dulce se acentúa por la acumulación del grupo OH llegando al máximo con seis de estos grupos, como en el caso citado de los azúcares.

En los compuestos aromáticos ocurre igual, pero llega al máximo con tres grupos fenólicos.

Sin embargo, en la sacarina, la presencia de un OH lo transforma en la pseudosacarina (forma "enólica" de la sacarina), que carece de sabor dulce [25].

### *Grupos carboxílicos:*

Los grupos carboxílicos independientemente de su posición en un ciclo aromático (isomería de posición en las nitroanilinas), puede actuar aumentando en general el sabor dulce o en algunos casos en los que la cadena acética ( $-\text{CH}_2-\text{COOH}$ ) es desfavorable.

### *Compuestos azufrados:*

Como prueba de la influencia de la presencia del grupo  $=\text{SO}_2$  en el sabor dulce también podemos citar la sacarina en la que si dicho grupo se sustituye por un  $=\text{CO}$  obtendremos la ftalimida insípida [25].

### *Compuestos aminados:*

La función amino  $-NH_2$  produce un reforzamiento del sabor dulce, tanto en la serie alifática, como aromática.

### *Compuestos imídicos:*

También influye en el sabor dulce la presencia del grupo imídico  $=NH$  pudiendo citar también el caso de la sacarina que lo contiene y la que si rompemos el grupo imídico se pueden formar dos ácidos, el orto sulfamido benzoico o el orto benzamido sulfónico, que ya no tienen sabor dulce [25].

### *Compuestos metilados y etoxilados:*

Si incorporamos un grupo metilo o un grupo metóxilo o etóxilo a una molécula orgánica, el sabor se altera de diversas maneras:

En la sacarina, si el grupo metilo va unido al núcleo bencénico (p-metilsacarina) el sabor dulce disminuye. Si el metilo se une al grupo imido sustituyendo al hidrógeno, el sabor dulce desaparece [25].

Por el contrario la introducción en la molécula de la fenilcarbamida (amarga) de un grupo etóxilo ( $CH_3-CH_2-O$ ) o de un grupo  $CH_3$ , da lugar a dos compuestos dulces: la para-fenetolcarbamida (dulcina) o la paratolilcarbamida, respectivamente.

En el ácido salicílico, cuyo sabor es dulzón, sin embargo éste sabor desaparece en el derivado metoxilado.

### *Compuestos halogenados:*

Los halógenos influyen de diferentes maneras en el sabor de un producto, dependiendo en algunos casos del peso atómico del halógeno.

En los hidrocarburos alifáticos la presencia de átomos de halógeno incrementa el sabor dulce (cloroformo, por ejemplo).

La presencia de grupos halógenos e hidróxilos en posiciones próximas aumenta el sabor dulce (dibromoetanol, por ejemplo).

En la serie aromática la introducción de un átomo de halógeno en la molécula puede influir de dos maneras: reforzar el poder edulcorante de las nitroanilinas o producir un sabor amargo, como en el caso de la yodo-sacarina.

### *Compuestos nitrados:*

El grupo  $\text{NO}_2$  es amarógeno; sin embargo, la presencia al mismo tiempo en la molécula de otros sustituyentes en determinadas posiciones, puede, por el contrario, producir un sabor dulce, como ocurre en los siguientes casos:

- Grupos  $\text{NO}_2 + \text{OH}$ , como en el caso de los mononitrofenoles dulces.
- Grupos  $\text{NO}_2 + \text{Halógenos}$  (produce sabor dulce).
- Grupos  $\text{NO}_2 + \text{NH}_2$ , caso de la meta-nitroanilina (dulce).
- Grupos  $\text{NO}_2 + =\text{NOH}$ , caso de las orto y para-nitrobenzaldoximas dulces.

### *Oximas:*

La presencia del grupo  $=\text{NOH}$  influye de distinta manera según se trate de la serie alifática o de la aromática. Las aromáticas generalmente son dulces, mientras que las alifáticas rara vez lo son.

Corroborar el carácter dulcígeno del grupo  $=\text{NOH}$  en la serie aromática, el hecho de que las orto y para-nitrobenzaldoximas tengan sabor dulce, aunque el grupo- $\text{NO}_2$  es amarógeno, pero al parecer insuficiente como para anular el efecto dulcígeno del grupo oxima aromático.

### *Aminoácidos:*

Ni el grupo  $\text{NH}_2$ , ni el  $\text{COOH}$  son dulcígenos, aunque a veces lo refuercen, sin embargo, en el caso de los aminoácidos son dulces, debido a la coexistencia de dichos dos grupos funcionales en posiciones cercanas.

#### **4.2.1.4. Concepto de ciclo potencial.**

Este concepto se ha estudiado en diversos casos [129] por apertura o cierre de ciclos potenciales. Esto podría aplicarse a los compuestos aminoácidos del ácido benzoil ciclados en hidroquinoleínas conservando todo el poder edulcorante de la molécula de origen.

#### **4.2.1.5. Noción de vinilografía.**

Después de la noción de ciclo potencial se ha llegado a la de ciclos casi inexistentes con el concepto de vinilografía.

El principio parece derivarse de una observación de CLAISEN [129] la formilacetona del ácido acético. En la forma enólica de la formilacetona todo ocurre como si el grupo vinilo no existiera. Según la fórmula de MENIZER, este conjunto se comporta como un conductor perfecto del efecto de activación ejercido por el carbonilo sobre el hidróxilo. De aquí la idea de que los compuestos no se



diferencian más que por uno o más grupos vinilos debiendo tener las mismas actividades, incluso si estos grupos vinilos se reúnen en un ciclo bencénico.

Este concepto ha sido utilizado por RUNTI en la serie de la Dulcina pero sin éxito, todos los cuerpos obtenidos eran insípidos.

#### 4.2.1.6. La isostería [129]

Deriva de la ley de GRIMM llamada "ley del desplazamiento de hidruros" formulada para explicar la analogía entre el ion  $\text{NH}_4^+$  y los iones alcalinos. GRIMM afirmó que los elementos situados hasta cuatro puestos antes de un gas raro podían formar los pseudoátomos, fijando de 1 a 4 átomos de hidrógeno. Se obtiene así un cuadro cuyas líneas verticales comprenden conjuntos isósteros tales como  $-\text{O}-$ ,  $-\text{NH}-$ ,  $-\text{CH}_2-$ .

En la serie de la Dulcina RUNTI no tuvo éxito con los isósteros que resultaron insípidos o amargos. Por el contrario, la sustitución del oxígeno de ciertas ureas, por azufre parece favorable al reforzamiento del poder edulcorante.

#### 4.2.1.7. La síntesis "acumulativa" [129]

Una de las tentaciones más corrientes del químico terapeuta consiste en reagrupar en la misma estructura las moléculas que separadamente son activas. Tanto en terapéutica, como en la química de la edulcoración no se ha obtenido éxito. Las moléculas resultantes de la unión de la sacarina y de la dulcina son insípidas.

Todos los factores que hemos reseñado que influyen sobre el sabor dulce se refieren a productos químicos artificiales, con la excepción de los compuestos hidroxilados (en lo que se refiere a los azúcares) y los aminoácidos. Pero éstos no son los únicos factores, pues existen casos de nuevos edulcorantes de origen natural de estructura molecular compleja (diferente a la de los azúcares) que aún no están bien estudiados en este aspecto de la relación sabor dulce/constitución química.

### 4.2.2. PROPIEDADES-ACTIVIDAD

Actualizando los estudios mencionados anteriormente (primer periodo) pasamos al periodo moderno en el que se abandona el concepto de las relaciones "estructura-actividad" para interesarse por las relaciones "propiedades-actividad" en un camino de dos etapas.

BOUCHERLE, del Centre Europeen pour la Recherche sur l'Aromatisation, realizó un estudio sobre este tema [143].

En la primera etapa, se prevén las propiedades fisico-químicas de un compuesto a partir de su fórmula de estructura adicionando, por ejemplo, las contribuciones aportadas por cada elemento de la estructura. En la segunda etapa se relacionan

las propiedades /físico-químicas con la actividad biológica, por un análisis de regresión que conduce al establecimiento de una ecuación de correlación.

Esta ecuación tiene la ambición de cubrir el conjunto de los datos accesibles, es decir, prever la actividad de cualquier molécula perteneciente a la misma serie química. "Saber para prever, prever para poder", la fórmula de ROGER BACON, base de todo desarrollo científico.

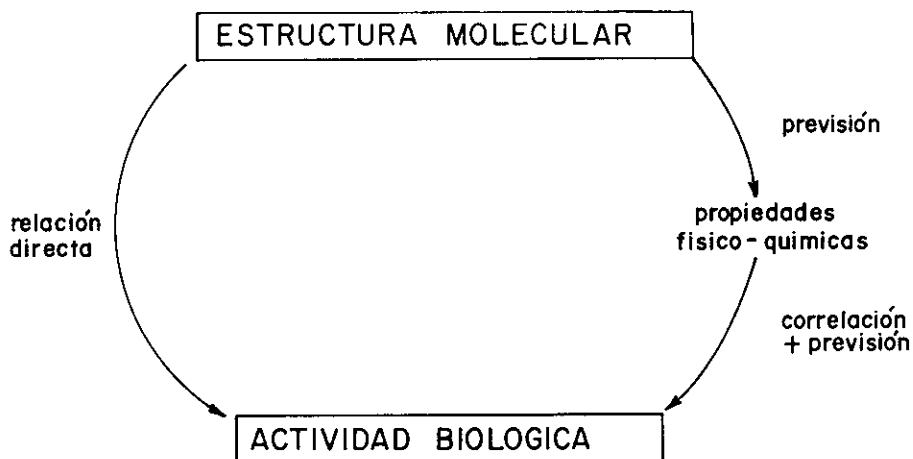


Fig. 10

La acción de un producto sobre el organismo es un fenómeno complejo, en el que hay que considerar al menos: la penetración, el transporte, el metabolismo y la interacción con un receptor. En consecuencia muchas propiedades moleculares pueden influir en la bio-actividad.

En una serie homóloga, tres tipos de propiedades pueden modular la actividad biológica influyendo en uno o más de estos procesos:

- a) propiedades electrónicas
- b) propiedades hidrófobas
- c) factores estéricos

Vamos a tratar de ellas tomando el ejemplo de las sustancias sápidas y más particularmente de los edulcorantes. Como ya se ha dicho el fenómeno del gusto, por la relativa simplicidad de su mecanismo, puede servir de modelo metodológico al estudio de los mecanismos de una respuesta biológica a un estímulo químico.

El análisis cuantitativo de las relaciones entre las propiedades químicas de una molécula y la respuesta biológica (R.B.) que ocasiona puede estar simbolizada en la siguiente ecuación:

$$\log. R.B. = K_1_{\text{electr.}} + K_3_{\text{éster.}}$$

Para cada uno de los cuatro términos de esta relación, conviene precisar su expresión y significado.

#### 4.2.2.1. Respuesta biológica

En el caso de las sustancias sápidas, el estudio cuantitativo del efecto biológico es particularmente difícil. No se trata en efecto de un fenómeno observable de manera objetiva, si no de una respuesta subjetiva que se expresa normalmente en términos hedónicos de grado de satisfacción o de disgusto. Si esta reacción es voluntariamente buscada por la aromatización, no es utilizable en nuestro caso particular.

Algunos autores propusieron realizar las experiencias con animales de laboratorio en vez de con el hombre. Se sabe, por ejemplo, que el comportamiento del animal en ensayos de nutrición puede modificarse bajo la influencia del estímulo gustativo.

Por otra parte, un método más objetivo consiste en analizar las respuestas electrofisiológicas del nervio gustativo provocadas por las sustancias sápidas.

Estos ensayos son excepcionales: la lengua humana es tan común que queda como el órgano elegido para la "gustometría". El método objetivo de la "electrogustometría" pertenece sobre todo al dominio de la clínica donde posee un cierto valor diagnóstico para diversos trastornos neurológicos. El método habitual es el análisis de respuestas subjetivas de catadores voluntarios, de lo que hablaremos en el análisis sensorial.

#### 4.2.2.2. Factores electrónicos

Si se admite como postulado de base que toda acción biológica comienza por una reacción de fijación de una pequeña molécula sobre un bio-polímero, se comprende que todos los factores que modifican la reactividad de la molécula, es decir su capacidad de reacción influirán sobre la respuesta biológica.

Después de lo que se sabe de las reacciones tradicionales de la Química Orgánica, se puede pensar que los factores electrónicos serán determinantes: frecuentemente la reacción se inicia por una densidad electrónica anormalmente elevada o disminuida en un punto de la molécula.

Esta situación adquiere una importancia todavía más grande en la serie aromática.

Estos factores electrónicos son los mejor estudiados gracias a los trabajos de HAMMETT dirigidos a relacionar la reactividad química de una molécula con la presencia de ciertos sustituyentes en esta molécula.

En una serie química homóloga, se puede así definir una ecuación:

$$\log \frac{K X}{K H} = \rho \sigma$$

en la que  $K X$  representa una constante de velocidad o de equilibrio de una reacción química cualquiera para un miembro de la serie portadora del sustituyente  $X$ .

$K H$  es la misma constante para el congénere de referencia, no sustituido.

$\rho$  es una constante característica del tipo de reacción y de sus condiciones operatorias.

$\sigma$  es una constante que mide el efecto de un sustituyente sobre un centro de reacción de la molécula.

El punto importante es que estas constantes de HAMMETT corresponden a valores constitutivos y aditivos de los sustituyentes.

La primera consecuencia es que su medida puede ser hecha una sola vez para todas, sobre una serie química fácilmente accesible y utilizarla a continuación en otras series de estructuras diferentes. La segunda consecuencia atañe a las moléculas polisustituidas para las que la reactividad se preverá por adición de las constantes de cada sustituyente. El problema es relativamente sencillo en tanto que esté conforme con estas constantes de HAMMETT. Se hace complicado singularmente a partir del momento en que, interrogando sobre su real significación, se busca afinar y aumentar la precisión de su medida.

Entonces las expresiones de estos factores electrónicos se multiplican conduciendo al establecimiento de parámetros experimentales o teóricos (Tabla 4).

#### 4.2.2.2.1. *Parámetros experimentales*

Junto a las constantes de HAMMETT determinadas a partir de los esteres benzoicos, CHARTON estableció una lista de parámetros  $\sigma'$  medidas sobre esteres acéticos y utilizables en una serie alifática. SWAIN Y LUPTON preconizaron el empleo de los parámetros  $R$  y  $F$  teniendo como objeto expresar los componentes de resonancia ( $R$ ) y de campo ( $F$ ) de los parámetros de HAMMETT.

Se pueden también citar los parámetros  $\sigma^+$  y  $\sigma^-$  teniendo en cuenta la interacción directa de resonancia entre el centro de reacción de la molécula y el sustituyente.

El parámetro  $\sigma^0$  ha sido preconizado para las reacciones "radicales" en las que se ha apercibido que no son excepcionales para ciertos medicamentos como los derivados del cloranfenicol.

Igualmente se ha utilizado el momento dipolar ( $\mu$ ) y un índice de polarización ( $\alpha$ ) teniendo en cuenta que las reacciones entre los medicamentos y las moléculas biológicas pueden ser de naturaleza dipolar.

TABLA 4

PARAMETROS ELECTRONICOS

EXPERIMENTALES

pK <sup>a</sup>		Momento dipolar
$\mu$	Hammett	Constante de equilibrio (aromático)
$\sigma^*$	Charton	Constante de equilibrio (alifático)
$\sigma^-$	Jaffé	Interacción de resonancia (donantes)
$\sigma^+$	Jaffé	Interacción de resonancia (aceptores)
$\sigma$		Constante de disociación
$\sigma_I$	Taft	Vecino de $\sigma$
$\sigma^{\cdot}$	Hansch	Constante radicalar
R	Swain-Lupton	Componente de resonancia
F	Swain-Lupton	Componente de campo

TEORICOS

H.O.M.O. Aptitud a dar electrones  
 L.E.M.O. Aptitud a recibir electrones

Carga electrónica total  
 Carga neta de electrones  $\pi$   
 etc.

#### 4.2.2.2. *Parámetros teóricos*

Se derivan de los cálculos de la química cuántica, sin entrar en los detalles de estos cálculos, citemos como factores utilizables: la energía de la órbita molecular más alta ocupada H.O.M.O. (High occupied molecular orbital) o de la órbita molecular más baja libre L.E.M.O. (Low empty molecular orbital) expresando respectivamente la aptitud a dar o a aceptar un electrón.

Ante esta plétora de parámetros, es necesario cierto análisis crítico, tanto más, cuando su utilización para el establecimiento de ecuaciones de correlación se someterá al ordenador por razones de comodidad y de precisión.

Desde luego no hay que confundir precisión y exactitud. Hace falta por tanto elegir parámetros más exactos y esta elección, que obliga a renunciar a otros valores, por tanto a privilegiar tales datos en detrimento de los otros, no es siempre fácil. Dependerá, no solamente del tipo de moléculas estudiadas, si no del comportamiento supuesto de esta molécula a nivel de las estructuras biológicas.

Pero esta elección debe ser absoluta porque hace falta, en la ecuación de correlación, eliminar las redundancias y no expresar una misma propiedad por muchos factores equivalentes. Es por tanto suficiente guardar sólo un parámetro que exprese los factores electrónicos de la reacción.

Se ha ensayado introducir directamente estos parámetros electrónicos, cualquiera que sea, en ecuaciones de correlación con ciertas propiedades biológicas. En general deben estar asociados a los parámetros hidrófobos, pues utilizados solos dan resultados mediocres.

#### 4.2.2.3. **Factores hidrófobos**

Estos factores aparecen en definitiva como más importantes. Aunque frecuentemente son insuficientes, por el contrario son siempre necesarios para la obtención de una ecuación de correlación adecuada, lo que explica por la intervención de las propiedades hidrófobas a diversos niveles. Si ellas intervienen para explicar en parte la forma de unión de la molécula sobre el receptor, igualmente juegan un papel sobre la fijación de esta molécula sobre las estructuras biológicas banales: membranas celulares, lugares de almacenamiento, etc. Todos estos fenómenos representan otros tantos repartos entre dos fases no miscibles.

Es por lo que desde hace mucho tiempo se han interesado en el coeficiente de reparto de un medicamento entre el agua y el aceite. Pero los primeros trabajos de MEYER Y OVERTON sobre los hipnóticos iban poco a poco cayendo en el olvido, faltos de generalización, y se les consideraba como resultados afortunados pero no significativos.

CORWIN HANSH dio otra dimensión al problema. Su mérito es doble. Por de pronto reconoce la necesidad de utilizar una ecuación multifactorial para dar cuenta de las propiedades moleculares relacionadas con la actividad biológica. Además

demostró que el coeficiente de reparto era una propiedad constitutiva y aditiva de la molécula, de donde la posibilidad de servirse de los parámetros en todo punto comparables a los de HAMMETT en cuanto a su comodidad de utilización.

Preconizó el empleo del factor  $\pi$  definido como:

$$\pi_x = \log P_x - \log P_H$$

en que  $P_x =$  coeficiente de reparto del derivado sustituido por x.

$P_H =$  coeficiente de reparto del derivado no sustituido.

Por razones de comodidad, no se utiliza el reparto entre el agua y el aceite, pero COLLENDER aconsejó utilizar el octanol normal como fase orgánica no miscible con el agua. La naturaleza del disolvente orgánico tiene finalmente poca importancia porque los coeficientes de reparto obtenidos a partir de disolventes variados pueden estar relacionados y son por tanto equivalentes a un factor casi constante.

Estos trabajos de HANSCH corresponden a lo que se llama el enfoque extratermodinámico. En efecto, el coeficiente de reparto puede considerarse como un factor termodinámico por ser una constante de equilibrio. Está por tanto directamente en relación con los cambios de energía libre del sistema cuando una molécula del producto se transfiere de una fase a otra. Pero este parámetro se mide por un método distinto que el termodinámico, lo que justifica su denominación. Estas consideraciones explican que los factores hidrófobos pueden ser expresados de manera diferente, por ejemplo por constantes cromatográficas, como el  $R_M$  por que se ha demostrado que está en relación con las constantes  $\pi$ .

Estas constantes, asociadas a los factores electrónicos pueden frecuentemente conducir a una expresión conveniente de la actividad biológica de una serie química por medio de una ecuación de correlación del tipo;

$$\log. R.B. = k_1 \sigma + k_2 \pi + k_3$$

El mismo HANSCH ha reconocido que este tipo de ecuación en  $\pi - \sigma$  no era totalmente correcta, ni en el plano experimental, ni en el teórico. Una relación lineal indicaría, en efecto, que la actividad biológica podría aumentar sin límites al mismo tiempo que los parámetros considerados. La experiencia demuestra que este caso es raro, frecuentemente la actividad pasa por un máximo en el interior de una serie homóloga.

La explicación deriva de la utilización de una ecuación parabólica, que implica la introducción de un término en  $\pi^2$

$$\log. R.B. = k_1 \pi^2 + k_2 \pi + k_3 \sigma + k_4$$

Así se puede determinar un coeficiente de reparto ( $P_0$ ) o un factor  $\pi$  ( $\pi_0$ ) correspondientes al máximo posible de actividad biológica.

Pero la introducción de un término en  $\pi^2$  no es siempre necesario y en este caso la ecuación lineal da buenos resultados.

Es lógico pensar que se encuentra entonces en la parte ascendente de la curva y que no se dispone de resultados suficientes para alcanzar el máximo de actividad.

Es, por ejemplo, lo que ocurre en una serie de edulcorantes, los amino-2 nitro-4 bencenos, cuyo producto más conocido es el P 4.000 de VERKADE (etoxi-amino-2 nitro-4 benceno) cuyo poder edulcorante es 4.000 veces el de la sacarosa. DEUTSCH Y HANSCH [144] tomando los resultados de BLANKSMA, han establecido una primera ecuación de correlación

$$\log. R.S. = 1,61 \pi - 1,83 \sigma + 1,73$$

$$r = 0,936, n = 9, r^2 = 0,88$$

Más tarde HANSCH [145] considerando la posibilidad de una interacción de resonancia entre el sustituyente x y el grupo  $NO_2$ , estimó que el parámetro  $\sigma^+$  era más conveniente que  $\sigma$  (Tabla 5).

La correlación se mejora gracias a la ecuación

$$\log. R.S. = 1,43 \pi + 1,03 \sigma^+ + 1,58$$

$$n = 9 \quad r = 0,972 \quad r^2 = 0,94$$

TABLA 5

R	Observado		Calculado	
	log. R.S.	P.E.(*)	log.R.S.	P.E.(*)
0-Pr	3.699	=5.000	3.746	=5.500
0-Bu'	3.000	1.000	4.640	43.700
0-iso Pr'	2.778	600	3,780	=6.000

(\*) Poder edulcorante.



Por otra parte, la intervención del factor  $\pi$  está minimizada, lo que está más conforme a la generalidad, los coeficientes  $\pi$  raramente son superiores a 1,30.

MAC FARLAND [146] propuso el empleo del momento dipolar y de un factor de "polarizabilidad"  $\alpha$ . Para este último término, el autor, pensando que solamente los primeros átomos del sustituyente interactúan con el receptor, no toma en consideración más que el grupo  $-OCH_2$  para los sustituyentes metoxi, propoxi o butoxi. Para expresar este término, utiliza la refracción atómica, en relación directa con la "polarizabilidad"

$$\log. R.S. = 1,31 \pi - 1,08 \sigma + 0,45 \mu^2 + 0,052 \alpha + 1,66$$

$$n = 9 \quad r = 0,985 \quad r^2 = 0,97$$

En este caso, nos podemos preguntar si, en esta expresión tan sofisticada, no se ha dado mucha importancia a los factores electrónicos, introduciendo al menos dos parámetros que no parecen independientes.

Es bastante fácil criticar estas ecuaciones de correlación que representan un enfoque muy imperfecto para una sola serie química.

Señalemos desde luego que se han establecido a partir de 9 valores solamente. No por que falten resultados experimentales, sino porque se han eliminado deliberadamente algunos de ellos.

Así, la aplicación de la ecuación de DEUTSCH Y HANSCH [144] demuestran que en la serie de las nitroanilinas sustituidas, el compuesto que tiene un grupo butoxi debería ser aproximadamente 8 veces más dulce que el derivado propoxi (P 4.000) mientras que en realidad es 5 veces menos activo.

Igualmente el isopropoxi debería ser un poco más activo que el propoxi, mientras que es 10 veces menos dulce. Estas anomalías muestran los límites del método e indican que deben intervenir otros factores para explicar la respuesta biológica.

De todas maneras, estos estudios han demostrado al menos que el sabor dulce depende de tres factores: una solubilidad inicial en el agua, un reparto favorable a nivel de un receptor hidrófobo y una unión electrónica a este nivel. Estas conclusiones deducidas del estudio de una sola serie química de edulcorantes han sido sin embargo suficientes para modificar la teoría molecular de SHALLENBERGER [26,147]. Por otra parte demuestra el interés de este tipo de estudios que persiguen dos objetivos:

El primero, puramente pragmático es el descubrimiento rápido con el mínimo de síntesis químicas de la mejor molécula de una serie homóloga.

El segundo, más abstracto, es aportar alguna nueva información sobre el modo de actuar la molécula para el estudio teórico de su tipo de unión sobre el receptor.

En el caso de los edulcorantes, para juzgar la aportación de estos métodos, conviene abordar los parámetros estéricos.

#### 4.2.2.4. Factores estéricos

Estos factores pueden intervenir de dos maneras diferentes en la actividad biológica de una molécula. Por de pronto pueden modificar la capacidad de reacción y por tanto hacer variar la intensidad de este efecto. Desde este punto deben considerarse de la misma manera que los factores electrónicos e hidrófobos, y entrar en la ecuación de correlación.

A partir de las velocidades de hidrólisis ácida de esteres alifáticos, TAFT definió una serie de índices  $E_s$  modificados después por HANCOCK ( $E_{s,c}$ ) para tener en cuenta la hiperconjugación.

En realidad, estos parámetros son difíciles de utilizar: de una parte, su significado es todavía incierto y por otra parte, el número de valores conocidos es relativamente poco elevado. Por eso HANSCH [145,148] ha propuesto el empleo de los radios de VAN DER WAALS e incluso la masa molecular para explicar la influencia del impedimento estérico sobre la reactividad.

Los factores estéricos pueden igualmente considerarse de manera diferente: la configuración o la conformación de las moléculas puede jugar un papel determinante sobre la aproximación del receptor. En este caso, los factores estéricos, sin influir sobre la naturaleza de unión, tienen sin embargo, una función cualitativa de inhibición.

Este tipo de hipótesis ha jugado un considerable papel en la elaboración de la teoría molecular del sabor dulce según SHALLENBERGER [26 y 147] de la que hemos hablado en el apartado 2.1.2.1. (Sabor dulce). El que sea necesario que la distancia que separa el protón del grupo donador AH del orbital B esté comprendida entre 2,5 y 4 Å con una media de 3 Å, sugiere que en el receptor biológico, imagen en negativo de la unidad edulcorante, los lugares complementarios B'-A'H tienen la misma dimensión espacial. La realidad material de esta hipótesis recibió un principio de confirmación gracias a los bioquímicos americanos que aislaron de la lengua de buey una proteína que sería el "receptor dulce". Se puede pensar que, sobre esta proteína, las unidades edulcorantes se fijarían con una unión peptídica o, más probablemente, sobre la función amida de un resto glutamina o asparagina.

KIER, [28] considerando una serie de aminoácidos (triptófano, fenilalanina, histidina, leucina) demostró que en la conformación molecular privilegiada, determinada por aplicación de la teoría de HUCKEL, los lugares ricos en electrones son superponibles. Estos polos pueden estar implicados en una conjugación por transferencia de carga o en una conjugación hidrófoba. Esto confirma la opinión de HANSCH que demostró que los factores hidrófobos y electrónicos intervienen en la intensidad del poder edulcorante.

En estas condiciones el poder edulcorante se determinaría por la posibilidad de formar conjugaciones dipolares (más bien que uniones hidrógeno) por el motivo AH/B.

Para todas las moléculas de poder edulcorante muy elevado es necesario un tercer lugar de fijación distante de A a 3,6 Å aproximadamente y a 5,5 Å de B.

MARZUR [149] demostró que no era necesaria una unión peptídica. El poder edulcorante de ciertas amidas aspárticas es elevado si se respetan ciertas condiciones estéricas.

Es sorprendente comprobar el entusiasmo con que se acogieron las teorías de SHALLENBERGER, de KIER, de HANSCH, etc. pero pensamos que estamos lejos de haber alcanzado la verdad.

## 5.-ACTIVIDADES METABOLICA Y TOXICOLOGICA

### 5.1. ACTIVIDAD METABOLICA.

Hoy en día, es necesario conocer las interferencias no solo tecnológicas, sino también biológicas, toxicológicas y metabólicas que pueden resultar de la introducción de ciertos aromatizantes en una forma farmacéutica o incluso en los alimentos.

Es muy difícil establecer una correlación entre el papel metabólico y una determinada actividad tóxica, en particular cancerígena.

ROCHAT M.H. VESELY D.L. Y VERAÏN A. [150] del Centre europeen pour la recherche sur l'Aromatisation, estudiaron la actividad metabólica de varios aromatizantes (safrol, estragol, eugenol, vainillina, etilvainillina y glutamato sódico). Para ello se sirvieron de los fenómenos de activación o de inhibición enzimática bajo el efecto de sustancias exógenas a los organismos vivos, que tienen una considerable importancia tanto en el plan fisiológico como terapéutico.

El trabajo experimental versó sobre la medida (in vitro) de las variaciones de la actividad de dos sistemas enzimáticos fundamentales: aril hidrocarburo, hidroxilasa y guanilciclasa, bajo la influencia de los seis aromatizantes indicados.

El estudio estaba enfocado especialmente en el papel que podían jugar sobre los enzimas de biotransformación del organismo vivo, desde dos puntos de vista:

- Los aromatizantes entran en la composición de numerosos medicamentos y pueden, al igual que los excipientes, ser origen de interacciones tecnológicas, biológicas, biofarmacéuticas y metabólicas.
- En el dominio alimentario, todos sabemos que el empleo de los aromatizantes va aumentando, lo que está ligado a la preparación industrial de los alimentos, que también está en pleno desarrollo.

Como resultado del estudio, dichos autores pusieron en evidencia la fuerte reactividad de los cinco primeros aromatizantes sobre los dos enzimas aislados del tejido hepático de la rata, en particular un poder de inhibición muy marcado frente a la mono-oxigenasa con función mixta.

Llegaron a la conclusión de que dichos aromatizantes no tienen la inercia que se pudiera esperar como excipientes farmacéuticos o aditivos alimentarios, lo que puede tener consecuencias a dos niveles:

- Modificación de la eficacia terapéutica de un principio activo, por acción sobre la aril hidrocarburo hidroxilasa que metaboliza un gran número de moléculas medicamentosas.

- Alteración de los mecanismos celulares, tales como el crecimiento de proliferaciones celulares, síntesis del ADN, del ARN, etc. que puede ejercer una influencia sobre el organismo. Es lo que ocurre si hay una modificación de la tasa de G.M.P. cíclico celular como consecuencia de una modificación de la actividad de la guanilciclase.

SCHAUMBURG y COL [151] estudiaron la farmacología del L-glutamato monosódico y el papel que jugaron en el síndrome de los restaurantes chinos.

SOHLEIM y SCHELINE estudiaron el metabolismo de estragol y anetol [152] y eugenol e isoegenol [153].

## 5.2. ACTIVIDAD TOXICOLÓGICA

Es una aspiración natural del hombre el utilizar en su alimentación productos inocuos; es decir, aquellos que no son nocivos para la salud. Esta aspiración le lleva por una parte a preferir los productos naturales a los artificiales, lo que no se puede tomar al pie de la letra, en algunos casos, porque algunos alimentos naturales, en determinadas circunstancias, pueden ser nocivos y, por el contrario, algunos aditivos alimentarios pueden no ser nocivos a la salud en las dosis en que se utilizan.

Se realizan muchas campañas de prensa en uno u otro sentido, que en algún caso son desorbitadas, sin tener en cuenta que se están refiriendo a aquellas circunstancias excepcionales.

En todo momento, en la utilización de ciertos productos artificiales en los alimentos hay que recurrir a aplicar la relación riesgo/beneficio para poder enjuiciar su utilización. Asimismo, hay que tener en cuenta en cada producto el límite de la "ingesta diaria admisible" (I.D.A.) o "dosis diaria admisible" (D.D.A.).

El Código Alimentario Español [54] exige que para admitir un producto como aditivo alimentario (en nuestro caso aromatizantes) es indispensable "haberse comprobado experimentalmente por procedimientos adoptados internacionalmente, que su uso está exento de peligro para el consumidor".

La utilización en los alimentos o en los medicamentos de productos naturales y productos artificiales ha motivado el estudio de los posibles efectos tóxicos provocados bien sea por sus propiedades acumulativas, por suma de efectos o por mecanismos indirectos. Cada vez se intensifica más el estudio de los efectos carcinogénicos, mutagenéticos y teratogénicos en el estudio de la toxicidad.

Pero ya sabemos que existen diversos factores que modifican la toxicidad y acción de los venenos [154]:

- a) procedentes del medio
- b) inherentes al individuo
- c) relacionados con las condiciones de administración
- d) debidos al tóxico (toxicidad y constitución química)

Igual que hemos hablado de la relación entre la estructura molecular o las propiedades de una sustancia y las sensaciones olorosas y sápidas también se ha estudiado la existencia, según EHRlich, de grupos en la molécula denominados "toxóforos" y "aptóforos" y según NERKRASSOW de "toxóforos" y "auxotoxóforos". Asimismo se ha visto la influencia de la disociación electrolítica, estructura

molecular, pesos atómicos o moleculares y la presencia de elementos y grupos funcionales en la molécula. Todas estas teorías, sin embargo, tienen muchas excepciones y por tanto no sirven más que a título informativo; al final hay que recurrir a la experimentación fisiológica.

COQUET B. [155] estudió la seguridad de empleo de los ensayos de inocuidad de las sustancias aromatizantes: Aspecto legislativo (reglamentos y documentos de base); toxicología experimental; estudios de toxicidad (ensayos a efectuar; reflexiones sobre estos estudios).

En el estudio de la nocividad de los aromatizantes hay que distinguir entre productos complejos naturales, productos químicos definidos que se encuentran en los productos naturales, productos químicos definidos que aunque se encuentren en productos naturales no estén relacionados con los alimentos y por último productos químicos definidos artificiales, obtenidos por síntesis que no se han encontrado en los productos naturales.

Independientemente de los estudios toxicológicos formales existen como ya veremos unos prejuicios sobre la relación entre el origen natural o el origen artificial y su constitución química.

### 5.2.1. PREJUICIOS SOBRE LA INOCUIDAD

Muchas de las materias aromáticas de uso alimentario son de origen natural, beneficiándose así de un prejuicio favorable y probablemente por esta razón han sido estudiadas poco o tardíamente. De muchos agentes de aromatización nos faltan todavía informaciones toxicológicas que nos permitan apreciar objetivamente los riesgos ocasionados por su consumo repetido.

De algunas de ellas, disponemos de una larga experimentación humana. Notablemente ciertos vegetales se consumen desde hace mucho tiempo, sea como alimentos (frutos, hortalizas) o como sustancias complementarias, (condimentos, especias, etc.)

A este respecto DEHOVE [156] redactó, como Inspector de la Represión de Fraudes francesa, un informe sobre las materias aromáticas de uso alimentario, en el que hizo diversas indicaciones justificadas. La actitud del toxicólogo podrá ser diferente según la naturaleza de los productos utilizados.

En su informe DEHOVE distinguió dos casos: el de dos productos complejos y el de los compuestos químicos definidos.

Entre los productos complejos distinguió tres grupos:

*Productos procedentes de alimentos utilizados corrientemente* (frutos, hortalizas): a priori no parecen presentar ningún problema toxicológico cualitativo o cuantitativo.

*Extractos vegetales, habitualmente añadidos a los alimentos* (condimentos, especias): a priori no parecen presentar ningún problema toxicológico, siempre que la cantidad añadida al alimento no sea superior a la que sería introducida si utilizáramos el propio vegetal para la aromatización.

*Extractos vegetales que no intervienen habitualmente en la alimentación, ni como alimentos, ni como coadyuvantes:* ningún prejuicio favorable; cada caso debe ser examinado cuidadosamente.

Entre los productos químicos definidos DEHOVE distinguió cuatro grupos:

*Productos absolutamente idénticos a las sustancias que se encuentran en los alimentos* (ésteres presentes en las frutas): a priori puede acordarse un prejuicio favorable a estos productos, a condición de que la cantidad introducida en los alimentos no sea superior a la cantidad que se encuentra normalmente en los alimentos que los contienen naturalmente.

*Productos químicos absolutamente idénticos a las sustancias que se encuentran en los vegetales, que son habitualmente añadidos a los alimentos* (vainillina, anetol): a priori puede acordarse un prejuicio favorable a estos productos a condición de que la cantidad introducida en los alimentos no sea superior a la que sería introducida si utilizáramos el propio vegetal para la aromatización.

*Productos químicos idénticos a las sustancias que se encuentran en los vegetales no consumidos habitualmente por el hombre* (alcanfor, eucaliptol): Esta clase de sustancias químicas aromáticas no pueden beneficiarse de un prejuicio favorable. Cada sustancia debe ser examinada.

*Productos químicos de síntesis que no han sido hasta ahora descubiertos en los vegetales o animales* (etilvainillina). Esta clase de sustancias químicas aromáticas no pueden beneficiarse de un prejuicio favorable. Cada sustancia debe ser examinada.

DEHOVE tuvo razón en ser prudente. Todavía hace falta subrayar que diversos compuestos químicos, consumidos desde hace mucho tiempo, se han revelado como causantes de trastornos que estuvieron inadvertidos durante muchos años. En alimentación, hasta estos últimos años, no se han notado los efectos hipertensivos debidos al consumo exagerado del regaliz en las bebidas.

A este respecto conviene insistir sobre el error que cometen muchas personas que consideran todos los productos naturales como inofensivos. Los venenos más grandes conocidos son de origen natural.

Como ya veremos más adelante, en las materias aromatizantes naturales de origen vegetal admitidas para la aromatización existen catorce compuestos químicos nocivos cuya presencia hay que limitar debido a su nocividad.

Toxicológicamente hablando no debe hacerse diferencias entre un producto de origen natural y otro sintético. Los dos deben sufrir los exámenes toxicológicos más completos que sea posible.

## 5.2.2. EVALUACION TOXICOLOGICA

El Consejo de Europa [1.974 y 1.981] estableció recomendaciones para el examen y la evaluación toxicológica de las sustancias aromatizantes, indicando las condiciones que deben cumplirse para aceptar una sustancia aromatizante, que vamos a resumir: [157,158]

### a) *Propiedades físicas y químicas, control analítico de los residuos.*

Para toda materia aromatizante artificial o natural químicamente definida, deben establecerse claramente "criterios de identidad químicos y criterios de pureza".

Las materias aromatizantes naturales, químicamente no definidas, deben caracterizarse por sus propiedades físicas y las descripciones botánicas, mineralógicas o zoológicas bastante explícitas para asegurar una estricta uniformidad de las materias sometidas al estudio toxicológico y de las empleadas

mineralógicas o zoológicas bastante explícitas para asegurar una estricta uniformidad de las materias sometidas al estudio toxicológico y de las empleadas en la preparación de los alimentos. Si el análisis físico-químico de las materias aromatizantes naturales ha revelado la presencia de compuestos tóxicos, deben fijarse los métodos analíticos, los límites de su presencia, estudiar las posibles transformaciones en el proceso de aromatización y el control analítico de residuos.

#### *b) Estudio toxicológico experimental*

Ninguna materia aromatizante puede considerarse admisible sin haber sufrido una evaluación toxicológica con animales de experimentación:

- 1).- Toxicidad aguda.
- 2).- Toxicidad a corto plazo.
- 3).- Toxicidad a largo plazo.
- 4).- Estudio de las funciones de reproducción.
- 5).- Estudios bioquímicos.
- 6).- Observaciones sobre el hombre.
- 7).- evaluación toxicológica.

La organización Mundial de la Salud (o.m.s.) redactó en 1.967 un Informe sobre "Los métodos de evaluación toxicológica de las sustancias añadidas intencionadamente o no a los alimentos" [159] del que el Consejo de Europa adoptó un extracto de dicho informe, en lo que se refiere a los "Estudios sobre el hombre" que pasamos a contemplar:

· Cuando se estudian sobre el animal los efectos biológicos de los productos químicos susceptibles de ser introducidos en el medio, nos esforzamos en prever los riesgos que pueden comportar para el hombre: este es uno de los principales objetivos de esta experimentación.

Uno de los problemas más delicados que nos encontramos en esta materia es el de la extrapolación de los datos del animal al hombre. El objeto de la utilización del producto no modifica necesariamente la naturaleza de los problemas de investigación a resolver.

La previsión y la prevención de los riesgos de intoxicación que podrían resultar para la colectividad por la introducción de un producto químico en el medio, se fundamentarán sobre un terreno más sólido, si se dispone de informaciones procedentes de estudios bien concebidos efectuados sobre sujetos humanos. Tres aspectos particulares de la Toxicología hay que considerar aquí:

- 1º- Elección de la especie animal que mejor permita prever las reacciones en el hombre.
- 2º- La investigación de los efectos reversibles específicos observados sobre la especie más sensible, con el fin de determinar si el producto en cuestión comporta un riesgo suficientemente grave para el hombre.
- 3º- El estudio de los efectos específicos sobre el hombre.

#### *c) Estudios sobre el metabolismo*

Conviene obtener relativamente pronto datos sobre la absorción, la distribución, el metabolismo y la eliminación del producto en el hombre, porque entonces se pueden comparar con los datos recogidos sobre las diversas especies animales y



elegir la especie que tenga más probabilidades de suministrar indicaciones aplicables al hombre.

Los problemas que presentan estos estudios a emprender sobre el hombre, las primeras investigaciones toxicológicas fueron examinados en el Informe de un Grupo Científico reunido por la o.m.s. Más vale emprender este estudio toxicológico con dosis débiles, pues siempre es necesario poseer datos sobre la toxicidad a corto plazo en diferentes especies animales, antes de administrarlo a sujetos humanos un nuevo producto químico incluso a dosis débiles.

#### *d) Control del margen de seguridad previsto*

Los productos químicos destinados al uso terapéutico deben ser objeto de investigaciones farmacológicas y ensayos clínicos sobre el hombre comprendiendo obligatoriamente la administración de dosis biológicamente eficaces. Cuando se examinan otros productos químicos desde el punto de vista toxicológico, hace falta a veces asegurarse que el margen de seguridad establecido a partir de la experimentación animal es aplicable al hombre. Para ello puede ser útil administrar el producto a "voluntarios", siendo indispensable respetar las siguientes condiciones:

- a) El producto debe haber sido estudiado a fondo sobre muchas especies animales;
- b) Hace falta que sea indiscutiblemente necesario, en interés general, estudiar uno o muchos efectos del producto sobre el hombre.
- c) El efecto o los efectos estudiados deben ser reversibles.
- d) La posología adoptada debe fundarse sobre un conocimiento profundo de las propiedades toxicológicas de la sustancia en los animales.
- e) El estudio debe terminarse desde que el efecto examinado se ha puesto en evidencia de forma indiscutible.
- f) Efectos particulares en el hombre.

El grupo científico citado de la o.m.s. ha examinado la cuestión de los efectos particulares en el hombre; en el caso de las preparaciones farmacéuticas, estos efectos pueden ser puestos en evidencia por los ensayos clínicos o por las reacciones no deseables señaladas después de que el producto ha sido puesto en venta y comercializado.

En lo que concierne a los otros productos químicos, no se sabría estudiar los efectos de esta naturaleza sobre voluntarios. Los estudios toxicológicos pueden hacerse sobre los sujetos profesionalmente expuestos o sobre los enfermos intoxicados accidentalmente. Sería útil proceder a un análisis crítico más riguroso de los datos epidemiológicos y toxicológicos que estos sujetos permitan recoger. Si se observan efectos no atendidos aparentemente particulares al hombre, conviene volver a examinar los resultados de los estudios sobre animales a fin de determinar, si se han descuidado elementos útiles o si otro método no hubiera sido un valor superior por la extrapolación al hombre.

#### *g) Voluntarios.*

El recurso de los voluntarios puede ocasionar problemas de moral y de derecho, la situación varía sensiblemente de un país al otro y son las autoridades nacionales a las que le corresponde tomar cualquier decisión a este respecto.

### **5.2.3. RECOMENDACIONES TOXICOLÓGICAS**

Entre los principios generales establecidos por el Comité de Expertos del Consejo de Europa para el estudio de las sustancias aromatizantes [1.981] se encuentran las recomendaciones toxicológicas:

- Las materias aromatizantes naturales no deben contener constituyentes tóxicos a niveles establecidos.
- Los principios generales de evaluación toxicológica se aplican a todos los aromatizantes químicamente definidos.

Los elementos de inocuidad de las sustancias enumeradas en el libro del Consejo de Europa se han evaluado sobre la base de los resultados de estudios realizados sobre animales así como de observaciones sobre el hombre. También se han adoptado las "dosis diarias admisibles para el consumo humano" establecidas por el Comité mixto de expertos F.A.O./O.M.S. de Aditivos alimentarios o en otros casos por las establecidas por el propio Comité del Consejo de Europa. Cuando no había datos completos para poder establecer la D.D.A. se indican las concentraciones máximas provisionalmente admisibles en los alimentos sin ocasionar riesgos para la salud a corto plazo.

Los parámetros más importantes que el Consejo de Europa ha considerado conjuntamente como base de evaluación de la inocuidad, son los siguientes:

- Informaciones concernientes a la toxicidad para los animales y/o el hombre;
- Datos disponibles concernientes a los niveles de concentración en diversos alimentos.
- Presencia natural en la alimentación normal;
- Consumo preferentemente para ciertos grupos particularmente vulnerables de consumidores;
- Analogía de la estructura química con la de los compuestos cuyas propiedades toxicológicas y bioquímicas son conocidas;
- Efectos acumulativos potenciales de una materia aromatizante absorbida al mismo tiempo que otros aditivos alimentarios.

### **5.2.4. LIMITACIONES**

El Comité de Expertos del Consejo de Europa estableció en 1.981, para las materias aromatizantes naturales, unas limitaciones de algunos de los principios activos, esencialmente fundados en los datos toxicológicos y en las estadísticas de consumo.

En ciertos casos, siempre, los límites deben reflejar los niveles conocidos de principios biológicamente activos normalmente presentes en los diversos alimentos, así como los métodos de análisis corrientes.

En algunos casos puede ser conveniente rebajar los límites desde el punto de vista toxicológico y el Comité de Expertos insiste en el desarrollo de métodos más sensibles que permitan fijar niveles más bajos.

TABLA 5

LIMITES PROVISIONALES PARA LOS PRINCIPIOS ACTIVOS  
(CONSEJO EUROPA 1.981) [158]<sup>1</sup>

Principio activo	Bebidas	Alimentos	Excepciones
Acido agárico	<20mg/Kg <sup>1</sup>	<20mg/Kg <sup>1</sup>	100mg/Kg en bebidas alcohólicas y alimentos conteniendo hongo.
Acido cianhídrico total	1mg/Kg	1mg/Kg	25/Kg en confitería. 50mg/Kg en mazapán. 5mg/Kg en frutos de nuez. 1mg/Kg por 1% en volumen de alcohol en las bebidas alcohólicas.
Aloina	0,1mg/Kg	0,1mg/Kg	50mg/Kg en Bebidas alcohólicas.
β-Asarona	0,1mg/Kg	0,1mg/Kg	1mg/Kg en Bebidas alcohólicas.  1mg/Kg en alimentos conteniendo <i>Acorus calamus</i> o <i>Asarum europaeum</i> .
Berberina	0,1mg/Kg	0,1mg/Kg	10mg/Kg en Bebidas alcohólicas.
Cocaína		Exento de Cocaína	
Cuasina	5mg/Kg	5mg/Kg	10mg/Kg en las pastillas. 50 mg/Kg en Bebidas alcohólicas.
Cumarina	<2mg/Kg <sup>1</sup>	<2mg/Kg <sup>1</sup>	10mg/Kg en caramelos especiales.  10mg/Kg en Bebidas alcohólicas.
Hiperfina	0,1mg/Kg	0,1mg/Kg	1mg/Kg en pastillas. 2mg/Kg en Bebidas alcohólicas.
Pulegona	100mg/Kg	25mg/Kg	250mg/Kg en Bebidas de menta. 350mg/Kg <sup>2</sup> en productos de confitería a base de menta. Los niveles más elevados se encuentran en la menta fuerte especial.
Quinina	85mg/Kg	0,1mg/Kg	300mg/Kg en Bebidas alcohólicas, 40mg/Kg en jaleas de frutas,
Safrol	<1mg/Kg <sup>1</sup>	<1mg/Kg <sup>1</sup>	5mg/Kg en Bebidas alcohólicas conteniendo más de 25% de alcohol en volumen. 15mg/Kg en alimentos conteniendo macis o nuez moscada.
Santonina	0,1mg/Kg	0,1mg/Kg	1 mg/Kg en Bebidas alcohólicas conteniendo más de 25% de alcohol em volumen.
Tuyonas (α y β)	0,5mg/Kg	0,5mg/Kg	10mg/Kg en las Bebidas alcohólicas conteniendo más del 25% de alcohol en volumen.  35mg/Kg en los amargos. 25mg/Kg en los alimentos conteniendo salvia. 250mg/Kg en los rellenos con salvia.

<sup>1</sup>El límite toxicológico debería ser más bajo, pero los métodos generales de análisis utilizados actualmente no permiten un nivel de detección inferior.

2.- Datos toxicológicos solicitados.

Estas limitaciones se aplican a 60 de las 490 materias aromatizantes naturales que componen la lista del Consejo de Europa.

En la edición de 1.981 del Consejo de Europa se suprimieron 13 materias aromatizantes naturales que estaban admitidas en la edición de 1.974 [157].

TABLA 6

**MATERIAS AROMATIZANTES NATURALES RECONOCIDAS COMO TOXICOLÓGICAMENTE INACEPTABLES (CONSEJO DE EUROPA 1.981)**

Nº C.E.

41	<i>Anemone hepática L.</i>	Anémona	Hierba
81	<i>Atropa belladonna L.</i>	Belladona	Planta entera
96	<i>Bryonia alba L.</i>		Raíces
123	<i>Chenopodium ambrosioides L. var. anthelmintheum L.A. Grag</i>	Quenopodio	Hierba
151	<i>Convallaria majalis L.</i>	Muguet	Planta entera
172	<i>Daphne mezereum L.</i>		Planta entera
179	<i>Dryopteris filix mas (L.) Schott</i>	Rizomas	
226	<i>Heliotropium europaeum L.</i>	Heliotropo	Hojas
348	<i>Piscidia erythrina L.</i>		Raíces
358	<i>Polypodium vulgare L.</i>		Raíces
381	<i>Punica granatum L.</i>	Granado	Raíces <sup>2</sup>
466	<i>Uragoga ipecacuana Baill</i>	Ipecacuana	Raíces
467	<i>Urginea scilla Steink</i>	Escila marítima	Bulbo

<sup>2</sup> Los frutos y las flores son aceptables.

En la legislación española, por Resolución de la Dirección General de Sanidad de 16 de Diciembre de 1.975 [160] sobre los aditivos para agentes aromáticos, se incluían dos listas: una "limitativa de materias aromáticas naturales e idénticas a las naturales", inspirada en la del Consejo de Europa de 1,974 [157] aunque incompleta y otra lista prohibitiva de plantas y partes de plantas. Dicha resolución fue ampliada o modificada por otra de 28 de julio de 1.982 [161].

Respecto a la pureza de las sustancias aromatizantes hay que tener en cuenta también la posible presencia de contaminantes (metales y pesticidas, etc.) y establecer las listas de tolerancias para evitar posibles efectos nocivos por consumo prolongado de dichos contaminantes. En relación con los aspectos higiénicos y toxicológicos se pueden consultar los trabajos de MONTES, A.L. [162], PEYRON, L. [163] y COTTALORDA, A.M. y SENAUX, M.S. [164] y los Informes Técnicos del Comité Mixto F.A.O./O.M.S. de Expertos en Aditivos alimentarios [165].

### 5.3. TOXICOCINETICA

Las condiciones de penetración, de distribución, metabolismo, fijación eventual y eliminación de un xenobiótico, presumiblemente tóxico, determina su concentración a nivel de los sitios del organismo donde manifestará su acción y por tanto, en definitiva, su potencial tóxico propiamente dicho. El análisis cualitativo y cuantitativo de estos fenómenos es lo que constituyen los estudios del metabolismo y la toxicocinética. Una vez que el toxicólogo ha adquirido un conocimiento global de las toxicidades aguda y subaguda en animales de experimentación se le plantean las siguientes cuestiones fundamentales en términos de toxicocinética:

#### *Estudios de base*

- 'a)-¿Cual es la suerte de esta sustancia en los organismos estudiados?
  - ¿Se ha biotransformado y cómo?
- b)-Después de la absorción o penetración ¿cuales son la persistencia de esta sustancia en el organismo y su ritmo de eliminación en correlación con los efectos observados?

#### *Estudios específicos*

- c)- Valoración del poder acumulativo eventual de una sustancia.
- d)- Investigación y modificaciones de la evolución de una sustancia en función de la repetición de la administración.
- e)- Modificación de la evolución de una sustancia en función de la administración de sustancias asociadas.
- f)- Modificaciones de la evolución de una sustancia con el estado fisiológico.
- g)- Biodisponibilidad de las sustancias aromatizantes en función del tipo de alimento o de medicamento en el que se han incorporado.

Estos estudios son de una gran complejidad, pero son considerados en lo sucesivo, como indispensables para la aprobación de un aromatizante de síntesis como lo demuestran las posturas tomadas por el Comité de Expertos FAO/OMS en sus diferentes reuniones, especialmente la 23 y la 24 de 1.980.

CLAUDE [166] destacó el interés de las investigaciones toxicocinéticas en las perspectivas para la evaluación de las sustancias aromatizantes destacando las consecuencias éticas, económicas y legales de las investigaciones toxicocinéticas, que deben participar en la elección de los aromatizantes ofrecidos al hombre.

## 6. ANALISIS DE SUSTANCIAS AROMATIZANTES

### 6.1. GENERALIDADES

Como dijo FLAMENT [167] la Química de las sustancias aromatizantes nació con la Química Orgánica, hace exactamente 172 años, en el momento en que ROBINET Y BOUTRON - CHARLARD [168 y 169] primero y WOHLER Y LIEBIG [170] después, identificaron el benzaldehído; una de las primeras moléculas orgánicas que en 1.818 fue extraída de un producto alimentario por VOGEL [171] y MARTRES [172] destilando las almendras amargas. En el mismo siglo XIX se aislaron e identificaron la vainillina [173 a 176], los sulfuros y polisulfuros de ajo y de cebolla [177], y el maltol [178].

En el siglo XX, a través de los años, hasta nuestros días se han ido desarrollando cada vez más las técnicas analíticas y se han ido descubriendo los compuestos químicos definidos, integrantes de los aromatizantes de diversos alimentos: cacao [179], café [180 a 182], melocotón [183], apio [184, 185], cerezas [186], frambuesas [187], plátanos [188], uvas [189], manzanas [190], frambuesas y fresas [191 a 196].

FLAMENT [167] estudió la identificación de las sustancias aromatizantes; las etapas desde el producto natural hasta su reconstitución y los logros y perspectivas.

De los distintos puntos de vista que inciden en el perfecto conocimiento de las sustancias aromatizantes, uno de los más importantes son: la determinación de sus características y propiedades físicas y químicas, la identificación de los diversos compuestos químicos responsables de sus propiedades aromáticas, así como la distinta proporción en que se encuentran ya sea en el producto natural o artificial.

Para este conocimiento e identificación de los diversos componentes podemos esquematizar el trabajo en cuatro fases cada una de las cuales a su vez puede ser dividida [197]:

- a) Preparación de la muestra.
- b) Extracción y concentración.
- c) Separación.
- d) Identificación.

Nos puede interesar investigar las sustancias volátiles o no que influyen sobre el sabor y las responsables del olor y del aroma; por ello analizaremos el extracto

total (volátiles o no volátiles) o los componentes volátiles totales o también los denominados espacios de cabeza, como ya veremos más adelante. En estos trabajos influyen diferentes factores que hay que tener en cuenta: presencia de gran número de componentes de los aromatizantes; baja concentración de algunos de ellos que sin embargo tienen mucha importancia; alto grado de susceptibilidad a modificaciones químicas de alguno de los componentes; etc.

A pesar de todas las dificultades se ha logrado avanzar bastante en la investigación de los agentes aromáticos. ROTHE [198], hizo una clasificación de 2.000 constituyentes del aroma de productos alimenticios agrupándolos por sus pesos moleculares.

ADDA [199], del Laboratoire des Aromes del I.N.R.A. francés hizo un estudio de los métodos físico-químicos, de los métodos sensoriales de los aromas y del tratamiento estadístico.

El Manuel suisse des denrees alimentaires [200] reúne un amplio conjunto de métodos analíticos de los aromatizantes.

## 6.2. PREPARACION DE LA MUESTRA

En el estudio de los agentes aromáticos de los alimentos nos encontramos con diversos tipos de muestras; ya sean productos naturales, alimentos derivados de los mismos o alimentos transformados o preparados. De algunos de ellos pueden ser extraídos los agentes aromáticos directamente, pero en otros es necesario una previa preparación de la muestra.

Hay que tener en cuenta, que en el tratamiento de los productos y en los procesos de extracción, etc. hay que evitar reacciones químicas o enzimáticas que puedan producirse y alteren la composición de los agentes aromáticos, por ello muchas veces se debe trabajar al vacío, a bajas temperaturas o en presencia de gases inertes, como ya veremos.

Otros de los aspectos es el estado físico, propiedades y distribución de los componentes del aroma en los alimentos. Los componentes pueden ir disueltos en la fase acuosa o en la fase grasa de los alimentos. La concentración del aroma en cualquiera de las dos fases influye notablemente en las propiedades aromáticas. Si el componente mayoritario es la grasa hay que ver si la materia grasa se puede separar previamente antes de iniciar la extracción, sin que se produzcan alteraciones o mermas en su composición.

Por ello la preparación de la muestra, con vistas a la extracción, necesita precauciones especiales para evitar reacciones químicas o enzimáticas durante la molidura, picado, prensado o exprimido; debiendo realizarse en condiciones muy bien determinadas.



## 6.3. EXTRACCION Y CONCENTRACION

La extracción es la operación que tiene por objeto aislar en parte o en su totalidad las sustancias aromáticas simples o complejas contenidas en un aroma, un producto aromático o aromatizado.

La extracción comprende el aislamiento de las sustancias aromatizantes a partir del producto y después la concentración de las sustancias diluidas en el disolvente de extracción (agua o disolvente orgánico).

Los métodos de extracción de las sustancias aromatizantes se basan en dos principios: la extracción por disolventes orgánicos y la destilación.

Son variados los diferentes métodos de extracción de los aromatizantes. La elección del más adecuado en cada caso depende de las características físico-químicas del producto del que se va a extraer y de las del propio aromatizante, teniendo en cuenta que la extracción debe ser lo más completa posible y que en el proceso no se alteren o transformen los diversos componentes o que se produzcan interacciones entre ellos.

### 6.3.1. EXTRACCION

En el curso de la extracción y del hecho del aislamiento, las propiedades aromáticas pueden a veces ser modificadas o incluso destruirse; por ello tiene mucha importancia la elección del método, que está condicionada por:

- la naturaleza de la materia prima (cortezas de frutos cítricos, zumos de frutas, bebidas espirituosas),
- el estado físico (sólido, viscoso, líquido),
- la composición química (presencia o ausencia de lípidos, alcohol),
- el objetivo considerado (extracción total o parcial).

El rendimiento de la extracción depende de la composición cualitativa y cuantitativa de las sustancias aromatizantes y de sus eventuales conjugaciones internas con el sustrato.

Del hecho de la complejidad química de las materias primas y de las sustancias aromatizantes y también de las interacciones posibles entre los numerosos constituyentes, los métodos de extracción descritos a continuación no dan necesariamente resultados absolutos.

#### 6.3.1.1. Extracción discontinua de productos líquidos o solubles en agua.

El método consiste en saturar la muestra, eventualmente diluida, con cloruro sódico y extraer con el disolvente orgánico en una ampolla de decantación. La fase orgánica se lava con agua y se seca con sulfato sódico seco [200].

### **6.3.1.2. Extracción continua por disolventes ligeros de productos líquidos o solubles en el agua.**

Para este método se utiliza un extractor de flujo continuo para disolventes ligeros y microtubo para la concentración [201]. Como disolventes se emplean principalmente; n - pentano, iso - octano y éter etílico [200].

### **6.3.1.3. Extracción continua por disolventes pesados de productos líquidos o solubles en el agua.**

El método análogo al anterior se diferencia en el tipo de extractor y los disolventes utilizados [200].

### **6.3.1.4. Extracción de aromatizantes volátiles por disolventes ligeros.**

En esta técnica las sustancias aromatizantes volátiles son arrastradas por destilación y extraídas en un extractor continuo por un disolvente orgánico ligero (n - pentano) [200].

### **6.3.1.5. Extracción por disolventes ligeros de productos sólidos insolubles en el agua y exentos de lípidos.**

En las técnicas de extracción continua se utilizan extractores como el de SOXHLET y sus posteriores modificaciones [197]. Para productos líquidos, semilíquidos o pastosos se usan "percoladores" o "perforadores" de distintos tipos según se utilicen disolventes orgánicos de mayor o menor densidad que el producto que se va a extraer [197] o con las modificaciones de KUTSCHER Y STENDEL [202].

En la elección del disolvente hay que tener en cuenta varios factores: punto de ebullición del mismo, naturaleza del producto que se va a extraer y si el aromatizante se encuentra en la fase acuosa o en la fase grasa.

WEURMAN [202] recopiló los principales disolventes utilizados por diferentes autores.

WONG Y PARKS [203] utilizaron acetonitrilo. JACKSON [204] el metanol. LINDSAY [205] y LIEBICH [206] el iso-pentano. CABEZUDO [207] y BRICONT [208] el pentano. WILLIAMS el triclorofluorometano [209].

### **6.3.1.6. Extracción con acetonitrilo de productos sólidos ricos en grasa.**

En este método se obtienen diversas fracciones que se concentran por destilación fraccionada a presión normal.

La utilización del acetonitrilo ha demostrado que además de no disolver los lípidos, tiene la ventaja de que la primera fracción del extracto está lo suficiente-

mente concentrada como para permitir realizar la cromatografía en fase gaseosa sin evaporación del disolvente [200 y 210].

### 6.3.1.7. Extracción mediante un gas portador [197, 200 y 211].

En estos métodos se sustituye el oxígeno del aire ambiente o el vapor de agua por una corriente gaseosa de un gas portador ya sea a presión normal, a presión reducida o a presión reducida y condensación por frío [212 a 214].

Estos métodos, en combinación con bajas temperaturas pueden realizarse a 0° C., con nieve carbónica + acetona (-80° C.), o con nitrógeno líquido (-196° C.). Para la condensación de los volátiles, además de las bajas temperaturas, pueden también recogerse sobre carbón activo u otros adsorbentes.

#### 1) a presión normal:

Se utiliza un gas inerte, que suele ser argón o nitrógeno o anhídrido carbónico anhidro; la fracción aromática se condensa en un tubo en contacto con nitrógeno líquido, o se condensa directamente en la jeringa de inyección del cromatógrafo.

Diversos autores han empleado técnicas parecidas o modificaciones de las mismas [215 a 218].

#### 2) a presión reducida:

RHOADES [219] realizó una extracción con gas inerte y el producto condensado lo concentró por una microextracción y lo inyectó en el cromatógrafo.

#### 3) a presión reducida y por condensación con frío:

MOINAS empleó argón como gas inerte con un aparato cuyo uso se ha extendido mucho [212] combinándolo con bajas temperaturas -80° C. y trampas de nitrógeno líquido (-196° C.).

AURAND [220] y BERTRAND [221] utilizan nitrógeno, empleando bajas temperaturas. HONKANEN Y KARVONEN [222] usan anhídrido carbónico para el arrastre.

### 6.3.1.8. Extracción por formación de derivados

Un procedimiento seguido para extraer diversos productos definidos, ya sean representativos de un aroma o por el contrario responsables de algún defecto que hay que eliminar. Un ejemplo de estas dos situaciones [199] es el de los compuestos carbonilos representativos de la calidad organoléptica de los quesos "a las finas hierbas" o responsables de defectos: autooxidaciones de lípidos poliinsaturados u oxidaciones enzimáticas, como el gusto "herbaceo" de los vinos. Se puede entonces intentar aislar, específicamente dichos compuestos formando los correspondientes derivados:

- derivados hidrosolubles obtenidos con el reactivo T de GIRARD [223, 224].
- 2,4 dinitrofenilhidrazonas [225, 226].

- compuestos de adición con bisulfito [227].

Todos estos derivados, una vez aislados pueden regenerarse fácilmente, si se desea comprobar la importancia real de su presencia.

### **6.3.2. DESTILACION**

Las técnicas clásicas de destilación que en un principio fueron muy utilizadas para el estudio de los agentes aromáticos están sometidas a duras críticas por someter al agente aromático durante largos periodos de tiempo a temperaturas que pueden ocasionar modificaciones moleculares, deshidrataciones, ciclaciones, polimerizaciones, etc. que modifican los destilados. Por ello las destilaciones van siendo reemplazadas poco a poco por métodos que más adelante citaremos, que evitan tales modificaciones. No obstante estos métodos se siguen recomendando por el Manual suizo de alimentos, con diversas mejoras o modificaciones.

#### **6.3.2.1. Destilación simple a presión normal.**

Para este método se utilizan los aparatos clásicos de destilación [197] o el que aconseja el Manual suizo de alimentos [200] en el que el matraz que contiene el producto a destilar dispone de un agitador y un tubo lateral para introducir el nitrógeno que elimina el aire evitando alteraciones; el matraz receptor está conectado a dos trampas finales, refrigeradas a  $-20^{\circ}$  C. y  $-40^{\circ}$  C.

La destilación a presión normal se ha aplicado para la cerveza [228], zumos de frutas [229, 230] y fermentaciones alcohólicas [231].

#### **6.3.2.2. Destilación simple a presión reducida.**

Igual que en el caso anterior se pueden utilizar los aparatos clásicos, con dispositivo para hacer el vacío [197] o el aparato del Manual suizo de alimentos [200] antes descrito reemplazando el agitador por un capilar para regular la destilación y colocando una tercera trampa refrigerada a  $-80^{\circ}$  C. La operación se realiza a 10-20 torr.

LAFUENTE Y COL. [232] han puesto a punto un método de destilación al vacío aplicado a frutas, especialmente diseñado para disminuir las alteraciones producidas por el tratamiento térmico.

REYMOND Y COL. [233] destilan en un rotavapor unas suspensiones acuosas de café, cacao o té y recogen el destilado en recipientes sometidos a bajas temperaturas. El destilado es extraído por cloruro de metileno.

En muchos de estos métodos se complementa la destilación con una extracción por disolventes orgánicos.

Se usan además de los aparatos clásicos diversas modificaciones como las de RADTKE Y COL. [234] y WEURMAN [235] que utilizan un aparato de destilación al vacío,

concentrando la acetona y acetato de etilo de una solución acuosa. El destilado es condensado a bajas temperaturas (0° C. y -80° C.).

### **6.3.2.3. Destilación con dispositivo de tubo frío (Cold-finger).**

Después de eliminar el gas de la muestra, las sustancias aromatizadas volátiles contenidas en un producto anhidro, líquido (aceite o grasa) o sólido (queso deshidratado), se destilan a presión reducida. Las sustancias aromatizantes más volátiles se condensan, en un principio, en trampas enfriadas con nitrógeno líquido. Las sustancias aromatizantes poco volátiles se destilan a continuación a presión reducida más intensa y se condensan en el tubo frío refrigerado con nitrógeno líquido.

### **6.3.2.4. Destilación por dispositivo de tubo frío (Cold-Finger), de productos grasos (margarinas, quesos) una vez deshidratados. [200, 237].**

La materia prima es deshidratada a presión reducida. Durante esta operación ciertos constituyentes aromáticos volátiles son arrastrados. La muestra deshidratada y después congelada se somete a destilación en el aparato de este método a tubo frío.

### **6.3.2.5. Destilación sobre banda rotatoria o en capa delgada [200].**

El principio del método es el siguiente: el producto a destilar fluye de forma continua sobre banda rotatoria, donde se extiende en forma de una delgada capa. La banda rotatoria se calienta a la temperatura apropiada por circulación interna de un líquido. El dispositivo permite trabajar a presión normal o a presión reducida hasta 10<sup>5</sup> torr. La evaporación de los constituyentes volátiles en las condiciones de la experiencia es prácticamente instantánea. El destilado y el residuo de la destilación se recogen separadamente.

### **6.3.2.6. Destilación por arrastre en corriente de vapor (a presión normal y presión reducida).**

Se trata de la técnica clásica que no permite recuperar más que imperfectamente los compuestos muy volátiles.

El arrastre por corriente de vapor de agua ha sido utilizado por diversos autores para la cerveza, las uvas, los puerros, la remolacha, etc. El producto arrastrado y recogido a baja temperatura, corrientemente se extrae por disolventes orgánicos o como en el caso de la remolacha se separa en fracciones a diferentes pH para su posterior identificación [197, 200, 236].

El arrastre de las sustancias volátiles de los alimentos por una corriente de vapor de agua fue utilizado por HONKANNER Y KARVONEN [222] que recogían el aroma a baja temperatura y posteriormente lo extraían con cloruro de etilo.

La destilación por arrastre en corriente de vapor se utilizó para la cerveza [238] y para las uvas [239].

JACKSON [204] lo aplicó a suspensiones acuosas de queso, y PATTON [240] trabajó con la fase grasa después de la separación.

También se estudiaron los componentes del aroma del puerro (*Allium porrum*, L.) mediante la destilación por arrastre de vapor y la concentración posterior por sucesivas extracciones con éter [241].

AGREE [242] obtuvo un destilado acuoso de la remolacha (*Beta vulgaris*, L.) que posteriormente separó en fracciones ácidas, básicas y neutras para su posterior identificación.

En el *Thymus saturoide* han extraído sus componentes volátiles por destilación con arrastre de vapor con una modificación en el aparato de CLEVINGER [243].

#### **6.3.2.7. Destilación en dos fases a presión normal o a presión reducida.**

Tanto el Manual suizo de alimentos (10.014 - 10.015) [200] como FORSS Y HOLLOWAY [236] describen este método con las dos variantes (presión normal o presión reducida).

El método en líneas generales se funda en una destilación por arrastre en corriente de vapor de agua recogiendo en dos trampas el destilado; transvasar las soluciones acuosas a una ampolla de decantación donde se extraen con éter. Si las soluciones contienen alcohol, entonces se extraen con pentano, éter-pentano (2:1) o mejor diclorometano.

#### **6.3.2.8. Destilación molecular.**

Como modificación y mejora de estos métodos se utilizan aparatos de destilación molecular como el de HERZ Y CHANG [244] que a una presión muy reducida (0,01 mm Hg) y combinada con una condensación a muy bajas temperaturas (-80°, -196° C.) se obtiene un producto condensado que puede extraerse posteriormente por un disolvente orgánico.

FORSS Y HOLLOWAY [236] citaron un dispositivo de destilación molecular con un tubo enfriado por nitrógeno líquido.

#### **6.3.3. "ESPACIOS DE CABEZA"**

El procedimiento más sencillo consiste en no realizar extracciones y contentarse con analizar los vapores en equilibrio por encima del producto. Estas técnicas conocidas con el nombre de "espacios de cabeza" (head space). Su forma más sencilla consiste en succionar, con una jeringuilla de gas, cierto volumen de vapor,

que se encuentra alrededor del alimento y es el responsable de la percepción olfativa directa a través de las fosas nasales [197].

Estas técnicas sencillas teóricamente ideales no han tenido más que un éxito limitado, lo que se explica fácilmente por el hecho de que no permiten alcanzar el estado de identificación, teniendo en cuenta la limitada sensibilidad de los métodos aplicados. En cambio han sido muy utilizados bajo formas más elaboradas, por ejemplo trabajando sobre soluciones concentradas por crioconcentración, con inyección de los vapores sobre una columna cromatográfica en fase gaseosa enfriada con nitrógeno líquido [245].

Otras técnicas se fundan en el arrastre por un gas inerte de los vapores emitidos por el producto, que posteriormente o son condensados por el frío o son retenidos por un adsorbente. En este último caso los compuestos orgánicos pueden ser desadsorbidos por calefacción o por lavado con una pequeña cantidad de disolvente.

Estos métodos han tenido un gran éxito desde la aparición de una serie de polímeros orgánicos de gran superficie de adsorción, que rempazan ventajosamente al carbón activo.

Estos polímeros (Porapark Q, Tenax G.C, Chromosorb 102, 105, etc.) se utilizan corrientemente para el estudio de frutas [246], vegetales [247], bebidas alcohólicas [248], y no alcohólicas [249]. Se puede así obtener un concentrado de aroma de composición diferente al obtenido por los métodos que realizan una extracción más completa de las moléculas olorosas [250], pero cuyo análisis conduce a resultados que concuerdan bastante bien con los del análisis sensorial [251].

Citemos también la posibilidad de condensar los vapores emitidos en atmósfera cerrada y obtener así un extracto acuoso que será recogido ulteriormente por otro método [252].

WEURMAN [253], MAC KAY [254], HARRISON [255], AURAUD [221], REYMOND [233], MAULE [256], NAWAI Y COL. [257] y KROGER [258] utilizaron el análisis de los espacios de cabeza en los alimentos inyectando los vapores en un cromatógrafo de gases.

KEPNER [218] transformó el método en cuantitativo: se prepara una solución del producto a estudiar que se satura de sulfato sódico seco para disminuir la tensión de vapor de agua.

La solución se coloca en un recipiente hermético. Después de algún tiempo se extraen unos mililitros de vapor que se inyectan directamente en el cromatógrafo de gases. Este vapor del espacio de cabeza contiene los compuestos volátiles.

El rendimiento de estos tipos de "extracción" es siempre bastante débil y no es conveniente para aquellos compuestos de punto de ebullición elevado. No es posible identificar los "compuestos menores" salvo si partimos de un gran volumen de muestra [199] y tampoco es posible estudiar los "compuestos no volátiles".

### 6.3.4. CONCENTRACION.[259]

En el análisis estudiamos juntos la extracción y concentración pues muchas veces estos dos procesos se simultanean en las técnicas de extracción de los aromatizantes y por tanto debemos considerarlos como un proceso único.

La concentración puede llevarse a cabo por diversos métodos:

#### 6.3.4.1. Preconcentración

Se utilizan un cierto número de técnicas de preconcentración. Una de las más ingeniosas consiste en una destilación de la solución acuosa ya obtenida, bajo un vacío de 0 a 20 torr, a través de un condensador mantenido a 0° C. Así es posible concentrar la muestra de 3 a 400 veces aproximadamente [260]. Una técnica similar apela a una sublimación a presión reducida impulsada (10<sup>-4</sup> torr) a través de una pieza mantenida a baja temperatura (-55 a -90° C.) lo que permite eliminar el agua o el etanol considerados no deseables, [260, 261] con lo que se consigue lo que en análisis químico denominamos "enriquecimiento de la muestra".

#### 6.3.4.2. Liofilización.

SHAPIRO [262] 52 LV, BIDMEAD [263] 7 LV, KEPNER [264], WEURMAN [265] y HURST [266], describieron otro método fundado en el principio de la crioconcentración: la muestra se refrigera de -10° C. a -50° C. con agitación, el agua es sustraída del medio bajo forma de hielo y los compuestos volátiles se concentran poco a poco en la zona que queda líquida. Se llega así a un factor de concentración de 20 a 30 en la primera "pasada", pudiendo repetir la operación para "enriquecer" más la muestra.

#### 6.3.4.3. Adsorción por polímeros.

Otro procedimiento consiste en hacer pasar la solución acuosa diluída sobre un polímero que retendrá las moléculas orgánicas, las que después son eluidas por medio de un pequeño volumen de disolvente [199].

#### 6.3.4.4. Concentración por cambio de disolventes.

La concentración por medio de disolvente se ha utilizado para diversos productos: huevos [267], quesos [268], berros [269].

En 1.964 LIKENS Y NIKERSON [270] idearon el aparato que lleva su nombre utilizado por MAC LEOD Y COL. [267, 269].



GROUX Y MOINAS [268] emplearon el extractor-concentrador puesto a punto por MAARSE [271, 272] para obtener los constituyentes de la fracción volátil neutra de algunos quesos.

El éter etílico, utilizado como disolvente, se concentra con el aparato descrito por MOINAS [273] en un baño no superior a 40° C. hasta obtener 0,2 ml. aproximadamente.

### **6.3.5. ANALISIS DIRECTO POR INYECCION.**

Esta es una técnica que sólo puede utilizarse en determinados casos en que el alimento pueda introducirse directamente en el cromatógrafo de gases utilizando cuatro columnas distintas. BERZE [259] ha identificado doce componentes volátiles del Whisky.

La primera columna la utilizó para determinar cuantitativamente trazas de los componentes volátiles; la segunda columna fue utilizada para determinar el acetaldehído y metanol; la tercera para ginebras y la cuarta para separar el formiato de etilo de la acetona.

## **6.4. SEPARACION.**

Es absolutamente necesario ser extremadamente riguroso en la elección de los métodos de separación, si se quiere tener ulteriormente el recurso del análisis sensorial o poder identificar por un método físico los numerosos componentes que contribuyen al aroma de un producto [199].

### **6.4.1. DESTILACION FRACCIONADA.**

Las técnicas de separación utilizadas en un principio, que algunas veces podían considerarse también como de concentración, eran las destilaciones fraccionadas a presión normal [200] o a presión reducida [197, 200], que aún se siguen aplicando para algunos casos. Se utilizan los aparatos de destilación corriente a los que se intercalan una columna de fraccionamiento y una pieza para recoger separadamente las distintas fracciones con arreglo a su punto de ebullición.

### **6.4.2. CROMATOGRAFIA**

Como dijo ROUZET [274]: el estudio analítico de los aromatizantes no adquirió un gran desarrollo hasta que no comenzó a utilizarse la cromatografía como método de separación de sus componentes.

Cinco son las técnicas cromatográficas que se utilizan en el estudio de las sustancias aromatizantes.

#### 6.4.2.1. Cromatografía sobre columna [200].

La cromatografía sobre columna permite:

- a) separar las fracciones de los diversos compuestos de cada grupo funcional presentes en las sustancias aromatizantes.
- b) purificar ciertos reactivos.
- c) separar diversos derivados de compuestos de grupos funcionales.

La cromatografía sobre columna se emplea ante todo en el fraccionamiento y la separación de cantidades relativamente importantes de compuestos de una mezcla compleja.

Los hidrocarburos pueden aislarse en una columna de gel de sílice o alumina. En general el peso del absorbente debe ser de 50 a 100 veces el de la mezcla a tratar. En la elución fraccionada se utilizan en un principio los solventes no polares, a los que se añaden progresivamente cantidades crecientes de disolventes polares. Las fracciones son examinadas a continuación por espectrofotometría, por cromatografía gas-líquido, sobre capa fina u otro método.

También se utiliza la cromatografía sobre columna para el análisis de aceites esenciales; separación de vainillina, etilvainillina y cumarina; separación de hidrocarburos terpénicos y compuestos oxigenados de aceites esenciales de frutos cítricos; aislamiento de la beta-asarona; separación de sustancias aromatizantes de los quesos; etc.

#### 6.4.2.2. Cromatografía sobre papel [200].

La cromatografía sobre papel, ya sea ascendente, descendente o circular ha perdido importancia después del auge tomado por la cromatografía en capa fina. Su empleo está limitado por el pequeño número de reveladores coloreados utilizables. Sin embargo se usa en la identificación de ácidos orgánicos, compuestos fenólicos, compuestos carbonilo, alcoholes alifáticos y compuestos de la vainilla.

#### 6.4.2.3. Cromatografía en capa fina [274].

Los métodos cromatográficos en capa fina propuestos por el Laboratorio cantonal de Ginebra [200] por la Estación experimental de aceites esenciales de Regio Calabria [276] y los de numerosos autores, han promocionado el uso de estos métodos para el estudio de los aromatizantes o de los productos que los contienen.

La evaluación cuantitativa de los componentes aislados carece a veces de precisión salvo si son fluorescentes y por tanto dosificables por espectrofotofluorimetría.

La I.O.F.I. publicó [277] un método general de cromatografía cualitativa en capa fina que en ciertas condiciones podría aplicarse a resolver problemas cuantitativos.

#### 6.4.2.4. Cromatografía líquida (H.P.L.C.)

Este método, que cada vez permite la obtención de excelentes resultados para el análisis de productos pesados, ha sido aplicado por diversos autores: POUCHUS [278] puso a punto, en la Facultad de Farmacia de Nantes, un método de determinación del bergapteno destinado a AFNOR Y A ISO. DI GIACOMO [279], también se ocupó del mismo asunto y GLANDIAN [280], en el Centre europeen pour la recherche sur l'aromatisation en Nantes, estudió por esta técnica las cumarinas y furocumarinas de un aceite esencial de limón.

#### 6.4.2.5. Cromatografía en fase gaseosa (gas-líquido).

La cromatografía cuantitativa en fase gaseosa ha sido objeto de numerosos trabajos de diversos autores: VAN DEN DOOL (Holanda), HUMPHREY (Inglaterra), BACHMAN (Suiza), HUËT (I.R.F.A.) y los investigadores de Grasse (Francia). Por otra parte, se han ocupado de la codificación de los métodos operatorios, organismos como el Centre Europeen de Recherches sur l'Aratisation, A.F.N.O.R. e I.S.O.

Pero en cada caso habrá que aplicar la técnica adecuada y tener en cuenta los principales puntos [274]:

- tipo de columna a utilizar.
- control de inercia química de la columna.
- eficacia de la columna.
- elección de patrones internos.
- cálculo del coeficiente de respuesta.
- temperaturas de columna inyector.
- índices de retención.

Los progresos de la cromatografía en fase gaseosa, le hacen el método más adecuado para la separación. Sin embargo, cualquiera que sea el poder de resolución de las columnas utilizadas es siempre necesario realizar un prefraccionamiento del extracto.

Una vez dividido el extracto total en tres fracciones: ácida, neutra y básica respectivamente, se puede con certeza utilizar la cromatografía en fase gaseosa bajo su forma preparativa. Pero el método más corrientemente empleado es el fraccionamiento por cromatografía de adsorción sobre gel de sílice a baja temperatura [281, 282] sobre una mezcla de tierra de infusorios y bentonitas o sobre un polímero orgánico [283]. Las diversas fracciones eluidas por un gradiente

de disolvente podrán ser estudiadas separadamente o reagrupadas según la similitud de su calidad olorosa.

Cada fracción, en general homogénea respecto a la clase química de sus componentes contiene ella misma, en la mayoría de los casos, un elevado número de componentes y se impone el recurso de la cromatografía en fase gaseosa.

La necesidad de no perder absolutamente nada de una muestra tan preciosa; la de disponer de bastante sustancia para poder identificar los componentes de la mezcla presentes al estado de trazas, han conducido a los especialistas en aromas a un tipo de cromatografía muy particular con inyectores del tipo *splittles* que permiten aprovechar el efecto del disolvente [284] y columnas capilares de vidrio de un diámetro interior de 0,70 mm. con una longitud que puede alcanzar los 150 m. Preparados con cuidado y bien utilizados con programación de temperatura, estas columnas permiten obtener TZ comprendidos entre 40 y 50 [285]. Los éxitos de eficacia y la labilidad de los productos inyectados han conducido a preconizar la inyección en la propia columna capilar [286] y a usar un inyector de un tipo especial sin "septum" manteniendo a temperatura ambiente [287].

El detector más corrientemente utilizado es el de ionización de llama, pero se encuentran trabajos en los que para productos azufrados o termoiónicos e incluso derivados nitrogenados, se utilizan detectores específicos del tipo fotometría de llama [288].

Se utiliza frecuentemente un "divisor de efluente" que permite enviar la mayor parte de las sustancias que emergen de la columna hacia una salida calentada, donde se podrá apreciar su intensidad olfativa o recogerlas en "micropiezas" para comprobar, sobre una columna de polaridad diferente, que cada pico no representa más que un solo componente o para identificarlos por un método físico.

## 6.5. IDENTIFICACION.

### 6.5.1. IDENTIFICACION ESPECTROMETRICA.

Para la identificación de los diversos componentes de una sustancia aromatizante se han utilizado siempre métodos espectrométricos (infrarrojo, resonancia magnética nuclear, y espectrometría de masas).

#### 6.5.1.1. Espectroscopia infrarroja.

La Espectroscopia infrarroja permite determinar la absorción de la luz infrarroja en función de la longitud de onda, por una molécula. El espectro caracteriza ciertos grupos funcionales de la molécula, así como el conjunto de la molécula.

Esta técnica, que se utilizó mucho para la identificación, se fue desplazando por las espectroscopias de resonancia magnética nuclear y de masa. Sin embargo

aporta informaciones particularmente complementarias a las facilitadas por la espectrometría de masa.

La Espectroscopia infrarroja permite resolver problemas de isomería (distinción entre anetol cis y trans y estragol). Se aplicó con éxito al estudio de los sesquiterpenos del aceite esencial de Badiana y del zumo de naranja [289].

### 6.5.1.2. Resonancia magnética nuclear.

La resonancia magnética nuclear (RMN) es una espectrometría de absorción no destructiva. En condiciones particulares una muestra puede absorber la radiación electromagnética en el dominio de las radiofrecuencias para las frecuencias ligadas a las características de la muestra y en función de algunos núcleos presentes en las moléculas [290].

Muchos núcleos pueden utilizarse como "sonda" en RMN, como por ejemplo el  $H^1$ , el carbono  $C^{13}$  o el nitrógeno  $N^{15}$ . En la química de los aromas el hidrógeno  $H^1$  está lejos de ser el más importante, pero el carbono  $C^{13}$  por su nivel de abundancia isotópica natural puede ser utilizado en la identificación de aromas.

El simple estudio del espectro RMN de un compuesto aislado, de una fracción o incluso de un aroma completo facilita informaciones más detalladas sobre la naturaleza de la muestra que el IR (de difícil interpretación sobre todo en mezclas); por otra parte la RMN mantiene las ventajas respectivas de las espectrometrías UV (análisis cuantitativo) e IR ("huella digital").

### 6.5.1.3. Espectrometría de masa.

La técnica más corrientemente utilizada es sin duda la espectrometría de masa acoplada directamente a la cromatografía en fase gaseosa.

El principio de esta técnica consiste en introducir una molécula en una cámara de vacío y bombardearla con un haz de electrones. La molécula se transforma así en un ion cargado positivamente, que a su vez se descompone en iones de masa más débil. Estos iones son acelerados, separados al atravesar un campo magnético y después recogidos de tal forma que un registrador suministra una serie de picos cada uno de los cuales corresponde a un ion determinado por la relación masa/carga [289].

Con el tiempo han ido evolucionando los espectrometros de masas poniéndolos a punto para responder a las necesidades de la química de los aromas siendo posible enviar la totalidad del efluente de una columna capilar sin perjudicar a la resolución.

Las formas de estos aparatos funcionaban primeramente según el principio de la fragmentometría pero actualmente están igualmente equipados de una fuente de ionización química obteniendo así informaciones complementarias porque la fragmentometría permite deducir la naturaleza de la molécula a partir de los iones

obtenidos, mientras que la ionización química permite conocer la masa molecular del compuesto.

Aunque la espectrometría de masa representa un aporte decisivo, no permite siempre una identificación de las moléculas separadas, por encontrarnos con la mezcla de dos componentes, en cuyo caso hay que buscar las condiciones cromatográficas que permitan separarlos.

Cuando el espectro obtenido corresponda a una sola sustancia, se compara con los reunidos en un atlas de espectros, por ejemplo. Si los espectros publicados no son idénticos al que se ha obtenido, lo que es más frecuente que lo que se pudiera pensar, incluso comparando con algunos autores [208], que tienen la humildad de añadir a la lista de moléculas identificadas los espectros no dilucidados. Entonces hay que recurrir a los otros métodos de identificación: espectrometría I.R. y de resonancia magnética nuclear.

La sensibilidad de la espectrometría de masa es muy grande y algunos microgramos de producto son suficientes para obtener rápidamente un buen espectro de masa. BRICOUT [289] consiguió obtener varios espectros de masa durante la elución de un pico cromatográfico pudiendo caracterizar por sus espectros el terpineol y el estragol en el aceite esencial de badiana, que no se habían separado por el método cromatográfico.

### 6.5.2. PERFILES CROMATOGRAFICOS.

Basándose en la aplicación de la cromatografía gaseosa al análisis de las sustancias aromatizantes y más concretamente a los aceites esenciales, el Centre Europeen pour la recherche sur l'Aromatisation propuso un nuevo método, el del "Perfil cromatográfico" que fue adoptado por las Comisiones de la Farmacopea francesa, de AFNOR y de la I.S.O. Este método permite solamente con dos inyecciones la obtención de una imagen, de una "foto", de una "huella dactilar" del producto que se quiere normalizar y controlar. Es un método rápido y de coste poco elevado. Con él se puede comparar un producto con un perfil de referencia normalizado.

El "perfil" se basa en la identificación y la determinación (con unidades cromatográficas) de los componentes característicos de una sustancia aromatizante, ya sean mayoritarios o minoritarios, y los límites inferior y superior de la concentración aceptables para que el producto sea conforme [291].

En el examen visual de un cromatograma obtenido con ayuda de una columna capilar, el analista contempla un "bosque de picos" en el que hay que tomar en consideración su posición en el cromatograma y su superficie. Ante tal abundancia de datos, los expertos que crearon la noción de "perfil cromatográfico" pensaron que debería ser posible simplificar la imagen. No todos los componentes del producto tienen la misma importancia, cuando se trata de establecer la conformidad entre dos productos. Hay que seleccionar los componentes más característicos, no teniendo en cuenta más que ciertos picos del cromatograma y por tanto reducir

el volumen a las informaciones necesarias al análisis; es decir un "perfil simplificado".

Para ello hay que tener en cuenta que la selección de los componentes característicos puede realizarse por un "juicio humano" o por el "poder discriminante informático"; siendo el segundo el más riguroso [292].

En 1.981 TOUCHE, DHERBEZY Y LLINAS [293] utilizaron una técnica basada en el análisis estadístico multidimensional para seleccionar los componentes característicos de un aceite esencial de Lavanda. El mismo año POUCHUS [294] puso a punto un método informatizado de selección para el control de los aceites esenciales de frutos cítricos. En 1.982, POUCHUS Y ROUZET [295] publicaron una versión mejorada de dicho método.

En 1.983, CORDOBA [296] utilizando un micro-ordenador y el sistema de POUCHUS seleccionó los componentes cuya presencia (o ausencia en ciertos casos) era característica del aceite esencial (más de 30 muestras) de salvia española. Los componentes deberían estar en más del 95 % de las muestras estudiadas (valor cualitativo) y la superficie del pico debería estar comprendido en intervalos preestablecidos. Con ello estableció el "perfil cromatográfico" de dicho aceite esencial.

Para completar los perfiles cromatográficos se acoplan la cromatografía de gases a la espectrofotometría I.R. o mejor a la espectrometría de masas para la identificación de los picos.

### 6.5.3. EVALUACION SENSORIAL

Sabemos que es posible separar cientos de componentes del aroma por cromatografía, pero su identificación y el caso de su síntesis, representa un trabajo enorme y costoso. Por ello puede ser interesante estimar las propiedades sensoriales de diversas fracciones o compuestos separados por cromatografía para intentar marcar los más importantes de cada aroma [199].

Hay que tener en cuenta varias cuestiones:

- apreciación de componentes o de fracciones separadas.
- medida de los umbrales de percepción.
- unidad de olor o de aroma.
- métodos de descripción del perfil.
- técnicas hedónicas.

La técnica más común para la apreciación de los componentes es la evaluación del olor del efluente de una columna de cromatografía en fase gaseosa [297 a 301]. Los "jueces experimentados" evalúan la calidad olorosa de cada pico que emerge de las columna, utilizando sus propios términos o bien los que figuran sobre una lista. La intensidad de cada olor puede eventualmente estimarse según una escala de intensidad arbitraria. La precisión de las informaciones percibidas aumenta al anotar el tiempo de retención de la sensación percibida; pero hay que tener en

cuenta la fatiga de la mucosa olfativa que sobreviene rápidamente, lo que conduce a tener que utilizar varios "jueces" que se turnarán en el curso de un mismo análisis y tener que repetir el análisis. A medida que la experiencia de los jueces aumenta es posible el identificar rápidamente un cierto número de picos, cosa que no es siempre fácil al principio. FENNEMA [4] se ocupó del análisis sensorial ante las determinaciones por cromatografía gas líquido. Uno de los inconvenientes de este método es que no se tienen en cuenta las interacciones entre componentes y que los olores son evaluados a temperaturas muy superiores a las que rodean normalmente un alimento.

Las fracciones se recogen a la salida de la columna cromatográfica sea directamente en una jeringa [302] o adsorbidas sobre un soporte inerte [303 a 305] lo que permite entonces rediluir las en un medio conveniente hasta que se pueda someterlas a un jurado.

Por este procedimiento LEHTONEN [306] obtuvo buenos resultados en un estudio sobre el aroma del whisky describiendo el olor del efluente y evaluando la intensidad de los olores.

Para medir la intensidad de una respuesta sensorial se utiliza corrientemente la "medida de los umbrales de percepción" con lo que se estima el "potencial aromático relativo" de los diversos componentes de un aroma; constituyendo los "umbrales de percepción" una unidad cómoda para medir el potencial aromático de una molécula determinada. Sin embargo no se puede dar la misma importancia a todos los componentes presentes de un aroma en alimentos y bebidas, puesto que los umbrales de percepción respectivos pueden variar de 1 a  $10^{10}$ .

Se define como umbral de percepción la más débil concentración detectable, sea a un cierto nivel de significación estadística, sea con el 50 % de respuestas exactas o el 50 % de respuestas exactas sin tener en cuenta las respuestas debidas únicamente al azar.

Por ello la medida de un umbral debe ser siempre realizado de manera repetitiva y controlada estadísticamente en razón de las grandes diferencias de sensibilidad entre individuos [307 a 309].

Cuando se ha conseguido identificar los compuestos responsables del aroma y medir su concentración en el alimento, nos servimos de estos resultados para estimar su importancia organoléptica respectiva. Posteriormente se busca combinar umbrales de percepción y concentraciones.

Las "unidades" de olor o de aroma se definen como la relación entre la concentración de un compuesto de un producto y el umbral de percepción y se han utilizado en el estudio de numerosos productos a propósito de los componentes volátiles sobre todo [310 a 313].

Las "unidades de olor" han sido utilizadas para analizar las interacciones existentes entre componentes y revelar cuales de ellos son esenciales para la percepción del aroma global [311, 312, 314, 315].

Para la descripción de los "perfiles", la forma más útil, hasta el momento, es la constitución de un atlas o vocabulario descriptivo del aroma realizado



específicamente para cada producto [297, 316 a 321]. Estos vocabularios están fundados sobre todo en la terminología publicada por HARPER y sus colaboradores [322].

Los métodos de descripción del perfil dotados de datos cuantitativos obtenidos, tanto por el medio de las clases como el de las escalas, son convenientes no solo para describir el aroma de un producto, si no también para seguir las modificaciones producidas en el curso del almacenamiento [323] o transformaciones [324, 325] o incluso para construir modelos que estimulen las preferencias de los consumidores [326].

Las personas aprecian frecuentemente las diferentes propiedades en función de su experiencia personal o de su pasado, mientras que los especialistas tienen más tendencia a juzgar en función de criterios ligados a sus conocimientos y a su aprendizaje [199].

La bibliografía aporta varios estudios en los que los juicios hedónicos se comparan directamente a los datos instrumentales, lo más frecuentemente por medio de una apreciación organoléptica global. Varios problemas que se presentan en la evaluación sensorial, que fueron estudiados por SAUVAGEOT F. [332] son la repetibilidad, reproductibilidad, precisión y fiabilidad.

Entre la abundante bibliografía sobre metrología sensorial podemos citar los trabajos de DEPLEDT F. del Laboratorio francés de Análisis y Metrología sensorial; RIBERAU-GAYON J. de la Universidad de Burdeos II; presentados en el Coloquio de La Baule, de la Société de Clinique Industrielle, Francia (1.973) y el de MONTAGUT M. del Departamento de Química Analítica del Instituto de Química de Sarriá (Barcelona) [333].

FENNEMA O.R. [4] se ocupó del análisis sensorial desde distintos puntos de vista:

#### 1 - Pruebas de laboratorio:

- a) selección y entrenamiento de los catadores
- b) ambiente físico
- c) preparación y presentación de las muestras
- d) ensayos diferenciales
- e) valoración de la calidad-cantidad

#### 2 - Papel del consumidor.

#### 3 - Aplicación en las industrias de aromas.

MARION J.P. [343] publicó la metodología de estudio y experimentación de los aromas: Organización de las degustaciones (entrenamiento de los degustadores; condiciones óptimas de las degustaciones); evaluación de la aromatización (bases de degustación, credibilidad de las evaluaciones; métodos de los perfiles).

SADINI V. efectuó diversos estudios sobre el análisis organoléptico-sensorial de los alimentos y su valor alimentario, calidad y cualificación [344 a 348].

Para más detalles acerca de métodos y técnicas sensoriales consúltense las obras de AMERINE [334] A.S.T.M. [335], BUCHEL [336], LITTLE [337 y 337 bis] y LARMOND [338], y los trabajos publicados con motivo de las "Journées d'études sur les facteurs de l'acceptabilité des aliments" organizadas por la Société Scientifique d'Hygiène Alimentaire (5-6 noviembre 1.982) [199, 339, 332, 340, 341, 342].

#### **6.5.4. METODOS ESTADISTICOS.**

El tratamiento estadístico de los datos, en el ámbito que nos preocupa, se dirige ante todo a establecer correlaciones entre los resultados del análisis físico-químico y los suministrados por el análisis sensorial; pero también se utiliza frecuentemente para controlar los resultados del propio análisis sensorial.

Conviene estimar la confianza de acuerdo con los resultados obtenidos incluso cuando se utilizan valores de umbral o valores relativos como las unidades de olor. El control estadístico es igualmente indispensable en las diferentes técnicas de perfil en las que se trata de saber como utilizan los jueces los métodos o para poner a punto un vocabulario descriptivo para un determinado producto.

Por técnicas de estadística pura se intenta establecer correlaciones entre los resultados del análisis sensorial y los del análisis químico. También se intenta encontrar un lazo de unión entre dos series de datos, que son frecuentemente de naturaleza muy diferente utilizando principalmente métodos multivariantes, como el análisis discriminante o el análisis por regresión múltiple y los análisis canónico o de correspondencias.

Las posibilidades ofrecidas por estos métodos [349] y todavía más su utilización correcta [350] revisten un interés primordial, puesto que parece que la única esperanza de hacer progresar la investigación sobre los aromas reside en la utilización conjunta de los datos sensoriales y químicos.

VESSERAU A. [351] en 1.973, hizo una exposición de la interpretación estadística aplicada a los aromas, en la que después de tratar de los cuatro puntos clave de la interpretación (descripción, modelos, estimación y ensayos de hipótesis) se ocupó de algunos problemas específicos: identificación de un estímulo; clasificación en el caso de muchos niveles de un estímulo; coherencia de los juicios; coeficiente de correlación lineal; informe de correlación; coeficiente de correlación de los intervalos y ensayo de sus clasificaciones.

#### **6.6. CONSTANTES FISICAS Y QUIMICAS.**

Bajo el título de constantes físicas y químicas se reúnen una serie de índices, que son característicos para determinar la calidad de la pureza y el valor comercial

de productos como los aceites esenciales. Estas constantes varían con el método de extracción, la procedencia, la raza química y la edad; por ello los valores varían entre límites suficientemente amplios para una misma especie de aceite esencial.

El "Manuel suisse des denrees alimentaires" [200] describe las constantes más corrientes en aromatizantes:

Físicas:

- a) Densidad (densidad relativa).
- b) Punto de congelación y de solidificación.
- c) Punto de ebullición.
- d) Solubilidad.
- e) Residuo seco a 100° C.
- f) Índice de refracción.
- g) Poder rotatorio específico.

Químicas:

- a) Índice de acidez.
- b) Índices de ester y saponificación.
- c) Índice de peróxidos.

## 7.- SUSTANCIAS AROMATIZANTES

El término sustancia, como indica el Vocabulario [52], se utiliza aquí para designar, sea un producto químico definido, sea una mezcla compleja cuyos constituyentes pueden no ser más que parcialmente conocidos.

Los términos "materias aromáticas", "materias primas aromáticas", o más sencillamente "aromáticos", se utilizan igualmente, pero se les reserva generalmente para las materias naturales de origen vegetal o a veces animal que desarrollan un agradable y penetrante olor. En inglés se utilizan los términos "aromatic" y "aromatic constituents".

### 7.1. CLASIFICACIÓN

#### A-Materias aromatizantes naturales

##### a) Materias de origen vegetal

- 1.- Frutas, frutos secos, hortalizas
- 2.- Plantas aromáticas, especias y condimentos
- 3.- Aceites esenciales
- 4.- Oleorresinas
- 5.- Bálsamos
- 6.- Extractos
- 7.- Destilados
- 8.- Concretos
- 9.- Absolutos

##### b) Materias de origen animal

- 1.- Secreción glandular
- 2.- Producto de desecación de una secreción glandular
- 3.- Producto de desecación de glándulas
- 4.- Concreción (cálculo) del intestino
- 5.- Compuestos aromáticos de la yema de huevo

- 6.- Sustancia azucarada procedente de transformación enzimática del néctar de las flores
- 7.- Ferormonas

#### B- Sustancias aromatizantes artificiales

- 1.- Que pueden añadirse a los alimentos sin riesgo para la salud pública
- 2.- Que pueden añadirse *provisionalmente* a los alimentos sin riesgo para la salud pública

#### C- Sustancias aromatizantes sintéticas de igual composición que las naturales

#### D- Potenciadores de aromas y sabores.

## 7.2. LISTAS DEL CONSEJO DE EUROPA

El Consejo de Europa, en 1981 publicó un libro [158] dedicado a las sustancias aromatizantes en el que incluía tres listas, de las que nos vamos a ocupar a continuación y algunas advertencias y recomendaciones sobre su evaluación toxicológica.

### 7.2.1. LISTA UNICA DE FUENTES NATURALES DE MATERIAS AROMATIZANTES

El examen de un número considerable de fuentes naturales de materias aromatizantes tiene grandes dificultades. En muchos casos se trata manifiestamente de frutas, frutos secos u hortalizas comestibles y por tanto elementos naturales de la alimentación. No figuran por tanto en esta lista si no representan una fuente para la preparación de materias aromatizantes. Se considera que, en principio, no presentan más problemas desde el punto de vista toxicológico que los alimentos de los que se extraen. Estas materias se clasifican en la categoría N1, como "fuentes naturales de materias aromatizantes admisibles" a condición de que la utilización tecnológica de las mismas no ocasione la ingestión de cantidades que sobrepasen las que resulten de un consumo normal de los alimentos en cuestión.

Las materias aromatizantes extraídas de las plantas aromáticas, de especias y de materias que frecuentemente se añaden a los alimentos en pequeñas cantidades para sazonar o aderezar, se han tratado de la misma manera que las anteriores (N1). Las citadas en este párrafo se clasifican en la categoría N2, como "fuentes naturales de materias aromatizantes admisibles" a condición de que el empleo

tecnológico implique cantidades equivalentes a las cantidades presentes en los alimentos después del empleo tradicional de las fuentes.

Un caso particular es el constituido por vegetales que como las especies y condimentos, que desde tiempo inmemorial se vienen añadiendo en pequeñas cantidades a la alimentación normal. Estas materias se clasifican en la categoría N3 como "materias naturales aromatizantes de uso tradicional" a condición de que su empleo se limite estrictamente y no exceda de los niveles de utilización tradicionales, porque la información disponible no permite una evaluación adecuada de su toxicidad química potencial en caso de absorción repetida durante largos periodos de tiempo. El Comité de Expertos del Consejo de Europa opinó que teniendo en cuenta su uso tradicional sin efecto aparente de toxicidad aguda estas materias aromatizantes naturales quedan *temporalmente* admitidas para su uso habitual en las condiciones tradicionalmente aceptadas en ciertas bebidas y otros alimentos constituyendo la categoría N3.

La categoría N4 comprende las fuentes naturales de otras materias aromatizantes que las corrientemente consumidas por el hombre y las que no se pueden clasificar en las categorías indicadas anteriormente de materias naturales admisibles a causa de que sus datos tecnológicos o toxicológicos son inexistentes o insuficientes.

A esta lista acompañan dos anexos: El primero comprende seis materias aromatizantes naturales de origen animal (categorías N1, N2 y N3). El segundo comprende trece materias aromatizantes naturales de origen vegetal reconocidas como toxicológicamente inaceptables, que estaban incluidas en la lista en 1.974 [157] y fueron suprimidas en 1.981 [158].

Ciertas materias clasificadas en las categorías N2, N3 y N4 contienen algún principio activo importante desde el punto de vista toxicológico por lo que son necesarias ciertas limitaciones de las que hablamos en el capítulo 5.

Dicha lista comprende 490 productos de origen vegetal en los que se consigna el número de referencia del Consejo de Europa, el número de referencia del *Codex Vegetabilis* STEINMETZ (ed. 1.957), denominación botánica latina, denominación inglesa, denominación francesa, partes de la planta normalmente utilizadas, categoría, limitaciones del principio activo en el producto terminado. El producto tecnológico debe estar conforme a los criterios habituales de pureza tales como las indicadas en el 10º Informe del Comité Mixto F.A.O./O.M.S. de Expertos sobre aditivos [159].

## 7.2.2. LISTA I

La lista I comprende las "materias aromatizantes que pueden ser añadidas a los alimentos sin riesgo para la salud pública". Contiene 761 compuestos químicos definidos y comprende ocho columnas en las que se especifica: número de referencia del Consejo de Europa, fórmula química desarrollada, nomenclatura sistemática (de Bruselas), sinónimos, D.D.A. (dosis diaria admisible) en mg/kg de

peso corporal, límites específicos en mg/kg en alimentos, en bebidas y excepciones de los límites.

### 7.2.3. LISTA II

Comprende las "Materias aromatizantes que puedan ser añadidas provisionalmente a los alimentos sin riesgo para la salud pública". Contiene 353 compuestos químicos definidos y comprende ocho columnas: número de referencia del Consejo de Europa, fórmula desarrollada, denominación sistemática (de Bruselas), sinónimos, información toxicológica solicitada, límites específicos en mg/kg para bebidas, alimentos y excepciones a los límites.

De la mayor parte de los compuestos se dispone de pocos datos tecnológicos y toxicológicos. Se ha estimado siempre que sería poco realista en el momento actual no permitir, provisionalmente, proseguir el empleo de ciertos de estos compuestos, si se puede razonablemente suponer que no hay peligro, mientras se espera recibir nuevas informaciones.

### 7.3. SUSTANCIAS AROMATIZANTES SINTÉTICAS DE IGUAL COMPOSICIÓN QUE LAS NATURALES.

Dentro del gran número de productos químicos integrantes de las sustancias aromatizantes existen muchos que se encuentran en los alimentos y otros productos naturales, pero también existen otros productos químicos sintéticos integrantes de los aromatizantes artificiales y que no se encuentran en los productos naturales.

En los alimentos y productos naturales se han identificado gran número de compuestos aromáticos, característicos y responsables de cierto aroma, no obstante los factores económicos solo han permitido sintetizar un número limitado de los mismos a escala comercial (vainillina, citral, mentol, etc). La síntesis se realiza a partir de una sustancia natural disponible en abundancia y barata o a partir de compuestos químicos o subproductos de la industria química, de otras fuentes.

Las exigencias de pureza impuestas a estos productos aromáticos naturales sintéticos, son muy altas. Las fases de purificación utilizadas ordinariamente no son solo necesarias para cumplir las exigencias legales estrictas (es decir, sin ninguna duda, sanos e inócuos para la salud humana), sino que también hay que eliminar los compuestos aromáticos contaminantes no deseables, que puedan quedar como impureza de la síntesis. Por ejemplo el mentol puede tener como impureza una nota fenólica no deseable inclusive en presencia solamente de 0,01% de timol. Esto no es sorprendente puesto que el umbral oloroso del timol es inferior al del l(-)-mentol por un factor de 450.

FENAROLI, G [56] dedica en su libro un capítulo a los "sintéticos idénticos a los naturales incluyendo una relación de 190 productos químicos definidos, de cada

uno de los cuales especifica: Nombre químico; sinónimos; estado físico; peso específico; solubilidad; caracteres organolépticos; preparación; presencia en la naturaleza; número de la F.D.A.-F.E.M.A. número del Consejo de Europa; cantidad organolépticamente eficaz en los productos terminados.

Estos productos relacionados por FENAROLI están incluidos en las diferentes listas del Consejo de Europa [157,158] que son más amplias respecto al número de productos, pero en las que no se consignan los datos que aporta FENAROLI.

BELITZ [60] pone unos ejemplos de estos productos químicos definidos, que él denomina "compuestos aromáticos naturales sintéticos":

*Vainillina*, compuesto aromático de la mayor importancia mundial, se obtiene primariamente por hidrólisis alcalina de la lignina (aguas sulfúicas de la industria de la pulpa de madera) de la que se obtiene el alcohol coníferico que se transforma en vainillina por escisión oxidativa

El *Citral*, otro producto que se utiliza en grandes cantidades en el procesado de alimentos, se obtiene del aceite esencial extraído por destilación en corriente de vapor del *Cymbopogon flexuosus* ("Lemon-grass"). El citral está formado por dos isómeros geométricos: geranial y neral; se aíslan a partir del aceite esencial en forma de combinación bisulfúica.

Otro producto, de gran importancia y muy utilizado como aromatizante natural sintético es el *mentol*.

La fabricación del mentol levogiro puede seguir dos vías: la natural y la síntesis total. Las vías natural y sintética pueden utilizarse independientemente la una de la otra, o también conjuntamente, según la materia prima de partida, su disponibilidad y su precio en el mercado.

Las vías naturales, partiendo de las siguientes materias primas:

- a) Aceite esencial de la *mentha arvensis*.
- b) Aceite esencial de la *mentha pulegium*.
- c) Aceite esencial de citronela de Java.
- d) Aceite esencial de *Eucalyptus citriodora*.
- e) Aceite esencial de *Eucalyptus dives* ricos en pipéritona y  $\alpha$  - felandreno.
- f) Esencias de trementina de diferentes especies y variedades de pinos, (*Pinus maritima*, *P. palustris*, *P. heterophylla*, *P. pinea*, etc.), ricos en  $\alpha$  y  $\beta$  pinenos.
- g) Esencias de trementina de *Pinus longifolia* ricas en  $\beta$  careno.

La vía de síntesis total es: la síntesis del mentol racémico a partir del met-cresol, que se alcoila pasando a timol, importante intermediario de esta síntesis, el cual se hidrogena dando mentol racémico. Como el isómero óptico d disminuye sustancialmente la calidad del aroma, hay que separarlo en un proceso en el que se recupera completamente el l(-)mentol.

En la resolución del dl-mentol en sus antípodos ópticos se hacen intervenir combinaciones activas, tales como la cinconina, estricnina, efedrina, ( $\alpha$  - naftil) etilamina, el ácido (-) mentoxiacético o también la hidrólisis asimétrica de un ester



de dl-mentilo utilizando la lipasa *Geotrichum candidum* o *Candida cylindracea*, que ya hemos citado anteriormente (3.2.2.4.)

Interesantes fueron las experiencias industriales de MARTINEZ CRESPO [352] para la obtención del mentol a partir de la pulegona procedente de la menta poleo (*menta pulegium*) cuyo aceite esencial obtenido por destilación en corriente de vapor en plantas españolas alcanza un contenido en pulegona del 80 al 90%

Por una destilación fraccionada al vacío se separan las fracciones con mayor concentración de pulegona, las cuales son sometidas a una hidrogenación catalítica con níquel RANEY a presión y temperatura adecuadas (BEILSTEIN 6, H, 28; 6, III, 133).

El producto hidrogenado se somete a cristalización fraccionada para eliminar las fracciones que contienen diversos isómeros líquidos. En la hidrogenación catalítica pueden formarse varios isómeros y según se conduzca la destilación e hidrogenación así predominarán unos isómeros sobre otros.

Este procedimiento representa un método más fácil de reducir que si se emplea timol y tiene la ventaja sobre el empleo de mentona por la disponibilidad de la materia prima.

La industria de aromas, por una parte ha extraído de los productos naturales de origen vegetal o animal las complejas fracciones responsables del olor y del sabor, pero había algunos casos en los que era imposible el extraer la fracción aromática y entonces había que recurrir a fabricar *aromas artificiales* con productos sintéticos, algunos de los cuales no existen en la naturaleza, pero que "imitaban" apropiadamente el aroma natural.

Con el tiempo ha evolucionado, de una parte el conocimiento de los integrantes de los aromas naturales cualitativa y cuantitativamente, gracias al perfeccionamiento de los métodos analíticos; por otra parte se hace cada vez más patente la idea de abandonar el uso de productos químicos que no se encuentren en la naturaleza. Por ello se estudian los "perfiles aromáticos de las materias aromáticas naturales y se intenta reproducirlos combinando los macro y microcomponentes en las proporciones en que se encuentran en la naturaleza. La idea es aceptable, pero se encuentra con dificultades de ordenes tecnológico y económicos, pero sobre todo que, después de mezclar más de doscientos integrantes del aroma natural en proporción adecuada, nos encontramos con que el análisis sensorial (más sensible que el físico y el químico) lo rechaza. Por otra parte hay que tener en cuenta que los numerosos componentes que tienen las materias aromáticas naturales no todos tienen valor para el aroma. Como sustancias aromatizantes solo se consideran los compuestos volátiles cuya concentración en el producto terminado es superior a su concentración umbral y que sean considerados como "compuestos impacto".

De acuerdo con ello BELTZ [60] agrupa a los alimentos en cuatro grupos:

- 1.- El aroma es debido de modo decisivo a un solo compuesto. La presencia de otras sustancias aromáticas solo sirve para matizar el aroma característico del alimento.

- 2.- El aroma típico del alimento está originado por varios compuestos de los cuales uno juega un papel principal.
- 3.- El aroma solo se puede reproducir con gran fidelidad gracias a un gran número de compuestos. Ordinariamente no hay ningún compuesto impactante.
- 4.- El aroma del alimento no se puede reproducir fielmente, inclusive utilizando gran número de compuestos volátiles.

Ejemplos de los cuatro grupos se encuentran en frutas y hortalizas.

Los aromas de la mantequilla y de los quesos azules se debe fundamentalmente a la 2,3 butanodiona reforzada por acetaldehído y sulfuro de dimetilo o 2-4 heptanona y 2-novanona.

El aroma de los alimentos obtenidos por un proceso térmico, solo o en combinación con fermentación tiene una composición muy compleja perteneciendo al grupo 3 (carne asada, café tostado, té, pan) y grupo 4 (cacao, cerveza).

## 7.4. POTENCIADORES DE AROMAS Y SABORES

En el Vocabulario [52] se incluye el término de "Potenciadores del aroma" (o "exaltadores del aroma") por el que se conocen sustancias, que no poseyendo prácticamente sabor u olor a las dosis en las que se utiliza, es capaz de aumentar considerablemente el aroma de las sustancias aromatizantes utilizadas en pequeñas cantidades.

BADUI [6] dice "que son capaces de acentuar los sabores deseados o eliminar los no deseados siendo su función únicamente la de modificar la intensidad de percepción de algún sabor especial".

La propiedad de no tener sabor u olor propios es muy importante por ser el punto que distingue un potenciador de un condimento o de un aromatizante.

La acción de estos productos es un caso de sinergismo, entendiéndose por tal la acción concomitante de factores diversos capaces de producir un efecto superior a la suma de los efectos de las dos sustancias por separado (el aroma y el potenciador).

FENAROLI [56] opina que la definición es poco genérica porque no contempla la acción modificadora de los potenciadores sobre ciertos aromas, que no es solo y simplemente una exaltación o potenciación.

Conviene recordar en este punto que aunque los potenciadores actúan sobre el aroma, sabor y olor; los estudios realizados se refieren sobre todo al efecto sobre el sabor.

El mecanismo de acción de estos compuestos, que son muy pocos, está aún un poco oscuro. Es lícito pensar en una particular acción biológica sobre los órganos de los sentidos, dada la baja concentración de los potenciadores suficiente para producir notables efectos.

Los potenciadores utilizados dependen del aroma del alimento al que se van a añadir.

Los potenciadores del sabor pueden ordenarse o agruparse por el sabor que potencian (exaltan o refuerzan): dulce, carneo, lácteo, frutado, etc.

El sabor dulce puede potenciarse algunas veces con la adición de una pequeñísima cantidad de sal, que no llega a dar sabor salado y sin embargo exalta el sabor del azúcar que contenga el producto. VRYZY en 1.981 [353] estudió cuatro potenciadores del sabor dulce: maltol, etilmaltol, metilciclopentenolona y etilciclopentenolona.

De ellos, el más difundido es el maltol (3-hidroxi-2-metilpirona), sustancia roja con olor a caramelo, que se adiciona en bebidas de zumos de frutas, mermeladas, jaleas, etc. La adición de 5 a 75 mg. de maltol puede reducir en un 15% la cantidad de azúcar sin rebajar el sabor dulce. También se citan como potenciadores del sabor dulce la cinarina, el ácido gimnémico y el ácido clorogénico [25].

Hablando de la potenciación del sabor dulce, no podemos dejar de hablar de las asociaciones de edulcorantes que PAUL [354] denominó "pares edulcorantes" de los que ya hablaremos en el capítulo 9.2.

Quizá el más difundido de los potenciadores del sabor, por su gran consumo y aplicaciones es el glutamato monosódico descubierto por IKEDA en 1.908. En el intervalo de pH de 5 a 8 en la concentración a la que normalmente se utiliza (0,2 a 0,5%) da un sabor típico ligeramente salado-dulce, muy agradable, así como una propiedad característica a menudo descrita como "satisfacción bucal". El efecto ejercido es una intensificación de la percepción sensorial, en particular de los aromas de tipo cárnico. Se utiliza en productos congelados, desecados y conservas a base de carne y pescado.

Existen algunas personas sensibles al consumo de grandes cantidades de glutamato monosódico a las que se les produce el denominado "síndrome de los restaurantes chinos" caracterizado por una sensación subjetiva de somnolencia, dolor de cabeza, dolor de estómago y de las extremidades, que desaparece rápidamente.

Con la misma acción que el glutamato monosódico, pero con una actividad de 10 a 20 veces mayor se utilizan dos 5' nucleótidos: el 5' inosinmonofosfato disódico y el 5' guanosinmonofosfato disódico. Se utilizan en sopas, salsas, conservas de carne, zumo de tomate, etc. En los alimentos líquidos se produce la sensación de una mayor viscosidad. Otras veces dan una impresión de "frescura" y los nucleótidos "naturalidad". En algunos casos se mezclan con el glutamato monosódico lográndose efectos sinérgicos.

Hay ciertas patentes sobre otros potenciadores del sabor como son: la sal sódica del ester del ácido sulfosuccínico-bis-(2 etilhexílico) que en pequeñas concentraciones da sensación de "fresca" a la leche esterilizada. La N,N' Di-*o*-tolildietilamina, a concentraciones de  $5 \cdot 10^{-7}$  a 10 p.p.b. potencia el aroma de los componentes lácteos de la margarina y de la leche en polvo reconstituida.

## **8. MATERIAS AROMATIZANTES NATURALES.**

### **8.1. MATERIAS AROMATIZANTES NATURALES DE ORIGEN VEGETAL.**

Aunque ya hemos clasificado estas materias en el apartado 7.1. solo vamos a referirnos, como ejemplo a los aceites esenciales.

#### **8.1.1. ACEITES ESENCIALES.**

Los expertos en la materia han intentado durante años definirlos; citemos como ejemplo a NAVES [355] y a DUQUENOIS [356, 357].

La definición puesta a punto en 1.982 por la International Standard Organization (I.S.O.) es la siguiente: "Los aceites esenciales son productos obtenidos a partir de materias primas naturales por arrastre en corriente de vapor, por proceso mecánico (en el caso de los frutos cítricos) por destilación seca o con separación de la fase acuosa por procedimientos físicos".

La Farmacopea europea [358] no define el término general de aceites esenciales, pero incluye algunas monografías sobre los mismos.

La Farmacopea española [359] incluye una monografía general titulada "Esencias (essentiae, aceites volátiles, aceites esenciales, aceites etéreos)" que los define así: "Productos inmediatos orgánicos, volátiles y aromáticos, líquidos o sólidos, cuyo olor, en general es parecido al material farmacéutico de donde se obtienen. Son mezclas naturales, íntimas y complejas, de diversas especies químicas, preexistentes unas en el material de que proceden y formadas otras mediante reacciones espontáneas de ciertos principios contenidos en los vegetales con el agua". Además la Farmacopea española incluye veinte monografías de otros tantos aceites esenciales.

GARCÍA MARTÍN Y GARCÍA VALLEJO [360, 361, y 362] del Departamento de Celulosa e Industrias de Extracción (CRIDA 06 INIA) realizaron interesantes estudios de revisión de las monografías de aceites esenciales de la Farmacopea Española y de la Tabulación de constantes de retención cromatográfica y patrones internos aplicables al análisis de aceites esenciales.

El Código alimentario español [54] aunque cita los aceites esenciales, no los define. Por el contrario la Reglamentación técnico-sanitaria sobre agentes aromáticos, [55] en su artículo 3º (clasificación) indica que "Aceites esenciales: son los productos naturales obtenidos directamente por destilación, exprimido o punción".

Sin embargo, el Ministerio de Economía y Hacienda, en 1.985 promulgó una Orden Ministerial [363] sobre aceites esenciales de frutos cítricos y sin tener en cuenta la Reglamentación antes citada da otras definiciones diferentes.

Independientemente de las Farmacopeas y disposiciones legales se utilizan otras Normas para industrias de alimentos, como el Food Chemicals Codex (USA) [364], o como las redactadas por los Organismos de Normalización ISO, IRANOR, AFNOR, BSI, NNI, etc. muchas de las cuales se recogen posteriormente para incluirlas en las disposiciones alimentarias. A este respecto y más concretamente de la forma de redactar las monografías de los aceites esenciales, se ocupó ROUZET [365] en una conferencia pronunciada en esta Real Academia de Farmacia.

El Centre europeen pour la recherche sur l'Aromatisation ha realizado diversos estudios sobre los aceites esenciales:

- control de calidad,
- estudio de algunos de los componentes: (bergamotina, bergapteno, byakangelicol, citroptenom cumarina, furocumarinas, 8-geranoxi-psoraleno, herniarina, pulegona, tuyona...),
- estudio analítico de algunos aceites esenciales de diferentes orígenes:
- (*Citrus limon* K. var. *Eureka*, *Citrus reticulata*, *Lavandula vera* D.C., *Mentha piperita* L., *Pinus pinaster*, *Salvia lavandulaefolia* Vahl, *Salvia officinalis* L.

Trabajos realizados principalmente por ROUZET Y COL. [291, 292, 294, 295, 365 a 370] del Laboratorio de Farmacia Galénica y Farmacotecnia de la Facultad de Farmacia de Nantes en colaboración en algunos casos con los Departamentos de Bromatología y de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia de Madrid.

Son diversos los Organismos científicos españoles dedicados al estudio de los aceites esenciales. A título de ejemplo citaremos algunos de ellos:

Departamento de Farmacognosia y Farmacodinamia.

Facultad de Farmacia. Universidad Complutense, Madrid [366 a 369].

Departamento de Bromatología, Toxicología y Análisis Químico.

Facultad de Farmacia. Universidad Complutense, Madrid [296, 370].

Departamento de Biología Vegetal I.

Facultad de Biología. Universidad Complutense, Madrid [371 a 383].

Departamento de Celulosa e Industrias de extracción.  
Instituto Nacional de Industrias Agrícolas, Madrid [384 a 389].

Departamento de Farmacognosia y Farmacodinamia.  
Facultad de Farmacia. Universidad de Granada [390].

Departamento de Farmacognosia y Farmacodinamia.  
Universidad de Valencia [391].

En este apartado de los aceites esenciales vamos a tratar de algunos de ellos, que sirven como ejemplo del problema del conocimiento de los mismos. Son aceites esenciales de interés en España que sin embargo presentan algunos problemas sobre su identificación, variedades y origen, etc.

### 8.1.2. ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO

Este producto es de gran importancia en España, por ser uno de los países productores y exportadores más importantes.

En España sólo se destila con este fin el *Thymus Zygis L.*; mientras que en Francia es el *Thymus vulgaris L.* La composición química es un poco diferente pero muy comparable. De las dos especies hay quimo tipos o quimo variedades.

GRANGER [392 a 394] de la Universidad de Montpellier descubrió seis quimo variedades o quimo tipos de *Thymus vulgaris L.*; uno tiene timol, otro cineol, otro borneol, otro linalol, otro carvacrol y otro carvacrol y timol.

Del estudio de los aceites esenciales de tomillos ibéricos se han dedicado GARCÍA MARTÍN D. [384] descubrió muchos quimotipus del *Thymus zygis L.*, VELASCO NEGUERUELA Y PÉREZ ALONSO que estudiaron quimiotipos en el grupo *Thymus Zygis L.* [377] y realizaron un estudio quimiotaxonómico (terpenoides) del género *Thymus L.* [382] y la composición química de los aceites esenciales de : *Thymus orospedamus H. DEL VILLAR* [379], *Thymus lacaitae PAU*, *Thymus villosus subsp. lusitanicus* [378] y *Thymus camphoratus HOFFMANNS & LINK* [381].

El problema está, además, en que hay muchas plantas que reciben también la denominación de "tomillo":

- Tomillo andaluz (Tomillo carrasqueño) *Corydothymus capitatus* Reichb. (Orégano español).
- Tomillo morisco *Fumana thymifolia* L. Spach ex Webb (cistáceas).
- Tomillo real o ajedrea fina *Satureja obovata* Lag. (labiadas).
- Tomillo blanco *Artemisia herba alba* var. *genuina* Batt. Trab. que contiene tuyona.

- Tomillo blanco (otro) o "Almoraduz", procedente de las provincias de Almería, Granada, Huelva y Sevilla. También se conoce con el nombre de "Mejorana silvestre Lázaro" pertenece al *Thymus mastichina* L. Su aceite esencial se comercializa en Francia con el nombre de "Huile essentielle de marjolaine sauvage d'Espagne", que no hay que confundirlo con el "Marjolaine sauvage" (solo, sin d'Espagne) que es el *Origanum vulgare* L. subsp. *viride* (Boiss) Hayek (Orégano griego), ni tampoco con el "Marjolaine a coquilles" que es el *Majorana hortensis* Moench u *Origanum majorana* L. En Gran Bretaña se conoce con la denominación de "Oil of Spanish wild majorain" *Thymus mastichina* L.

El Foods Chemicals Codex [362] describe dos aceites esenciales, a este respecto:

- "Marjoran Oil Spanish Type" del *Thymus mastichina* L.
- "Marjoran Oil Sweet" del *Marjoram hortensis* Moench (*Origanum majorana* L.)

En el caso que nos ocupa, el nombre "tomillo" es un término muy impreciso por lo que no se debe utilizar en el comercio internacional de manera general. En el caso del que se destila en España deberemos incluso diferenciar el quimo tipo: Aceite esencial de *Thymus zygis* L., quimo tipo timol (o quimo tipo: carvacrol).

### 8.1.2. ACEITE ESENCIAL DE OREGANO.

Como hemos dicho antes, algunas veces puede haber confusión entre las plantas de tomillo y de orégano sobre todo en sus denominaciones.

GARCÍA MARTÍN Y GARCÍA VALLEJO M.C. [388, 389] presentaron una revisión bibliográfica o puesta al día del Aceite esencial del orégano español, *Coridothymus capitatus* Reichb. y de otros oréganos comercialmente importantes. Asimismo se expone una adulteración de un aceite esencial comercial de *Coridothymus capitatus* detectada por dichos autores.

El orégano español, tiene otras denominaciones o sinónimos. El más conocido es el de *Tymus capitatus* (L) Hoffman & Link, aunque desde hace tiempo esta especie no se incluye en el género *Thymus*. VICIOSO [395] apoyó la creación del genero añadiendo que es casi segura la inexistencia de híbridos con *Thymus* sp. MORALES propuso denominarlo *Thymbra capitata* Morales basada en opiniones de Dioscorides, Lagasca y Cabanilles.

Otros sinónimos en desuso fueron *Satureja capitata* L. y *Thymus creticus* Brot. Otros oréganos importantes son: Orégano griego; *Origanum vulgare* L. Subsp. *Viride* (Boiss) Hayek también conocido por *Origanum heracleoticum* L. cuyo aceite esencial ha sido estudiado por diversos autores [389, 396 a 403].

Orégano turco; *Origanum onites* L. estudiado su aceite esencial por varios autores [396, 400, 404]

Orégano mejicano; *Lippia graveolens* H.B.K. y algo de *Lippia palmieri* Wats (verbenáceas).

El aceite esencial lo estudiaron STHAL Y COL. [40] RHYU [400] y LAWRENCE [399]. *Majorana syriaca* (L) Rafin, de Israel [401 a 403, 406]. También se ha denominado *Origanum syriacum* L. y *Majorana syriaca* Feinbr. Fue confundida erróneamente, en el pasado con el *Origanum maru* L.

Orégano marroquí; *Origanum virens* Hoffman & Link y *Origanum compactum* Benth [389].

#### 8.1.4. ACEITE ESENCIAL DE SALVIA

La eficaz colaboración del Departamento de Bromatología, Toxicología y Análisis Químico aplicado de la Facultad de Farmacia de Madrid con el Centre europeen de la recherche sur l'Aromatisation en Nantes (Francia) hizo posible el estudio del Aceite esencial de salvia española, que fue realizado por CÓRDOBA Y ROUZET [369, 370] con vistas a determinar las características del Aceite esencial de salvia española (*Salvia lavandulaefolia* Vahl) que son comparadas con las otras dos especies *Salvia officinalis* L. y *Salvia sclarea* L. que son diferentes por su origen botánico y geográfico, por sus propiedades aromáticas, farmacodinámicas y toxicológicas. A pesar de estas diferencias, estos Aceites esenciales muy empleados por las industrias alimentarias, farmacéuticas y de perfumería son frecuentemente comercializadas con la denominación "Aceite esencial de salvia". Esto da lugar a confusiones, si no se completa el nombre con el de la especie.

Este estudio demostró que es posible, gracias al examen del perfil cromatográfico, diferenciar los tres Aceites esenciales de las especies más comercializadas de Salvia. Por otra parte también se pueden diferenciar entre si muestras de Aceites esenciales de *Salvia Lavandulaefolia* Vahl de diferentes zonas de España.

#### 8.1.5. CONTENIDO DE LAS MONOGRAFÍAS DE ACEITES ESENCIALES.

Del estudio de los Aceites esenciales realizados por diversos autores se ve la necesidad de ampliar las monografías de las Farmacopeas o las Normas y Reglamentaciones. Por ello ROUZET en 1.984 [365] propuso que las monografías de Aceites esenciales deben de constar de los siguientes apartados:

- 1º- Título del aceite esencial en el idioma nacional. (Aceite esencial de menta piperita).
- 2º- Origen botánico del aceite esencial en latín (*Menthae piperitae aetheroleum*).
- 3º- Descripción de la naturaleza del producto y sus caracteres organolépticos (color, olor, sabor).
- 4º- Características físicas (densidad, índice de refracción, poder rotatorio).
- 5º- Índices químicos (índices de acidez, de ester, de carbonilo, etc.).
- 6º- Perfil cromatográfico.



Sin ello no podemos definir y diferenciar bien el origen botánico de la planta ni la composición química, ni los principales componentes responsables de su aroma.

#### 8.1.6. QUIMIOTAXONOMIA.

En el caso de los aceites esenciales, como en el de otros constituyentes de los vegetales nos podemos preguntar si existe una relación entre la composición química del aceite esencial de un determinado vegetal y la posición de este en la botánica sistemática. Esto presenta dos tipos de interés: el teórico, para determinar si existe un paralelismo entre la clasificación morfológica y la clasificación química y el interés práctico para investigar en un mismo grupo vegetal, aceites esenciales que constituyan interesantes constituyentes e igualmente para la producción en las mejores condiciones de estos aceites esenciales [407].

En este caso, como en el de otras quimiotaxonomías se presentan ciertas dificultades:

- a) los aceites esenciales no son cuerpos puros sino que son mezclas de terpenoides de bajo peso molecular con diferentes subgrupos o derivados.
- b) son mezclas volátiles extraíbles por vapor de agua, provocándose fenómenos de reparto al contacto con el agua; no corresponden exactamente al producto del aparato secretor "in vivo".
- c) En fin para un mismo vegetal, la composición química del aceite esencial puede variar no sólo con la parte de la planta (raíz, tallo, hoja, flor, fruto) sino también con la época de la vegetación.

Hay que tener en cuenta que en una familia botánica de las que se obtienen aceites esenciales (labiadas, umbelíferas) ciertas especies no los contienen; en cuanto al aceite esencial, frecuentemente es diferente de un género a otro y dentro de un mismo género, de una especie a otra, como hemos visto. Ante esta heterogeneidad es difícil hablar de parentesco químico, excepto en algunos casos (aceites esenciales azufrados de las crucíferas; umbelíferas con anetol). Por el contrario n determinado principio activo puede existir en familias muy diferentes desde el punto de vista botánico (anetol, borneol, carvona, alcanfor, cineol, citral, tuyaona).

Hechas dichas reservas ¿qué podemos obtener de la quimiotaxonomía?

La comparación química no es valedera más que para un órgano dado en condiciones determinadas, por tanto es necesario destacar que las variaciones debidas al medio ambiente (factores externos) son, en el conjunto, mucho menos marcadas que las variaciones genéticas hereditarias (genotipos).

El vegetal deberá identificarse con cuidado desde el punto de vista morfológico; teniendo en cuenta las "razas químicas", es decir vegetales aparentemente idénticos, pero poseyendo caracteres químicos y hereditarios diferentes.

Desde el punto de vista anatómico se comprueba que los constituyentes son suministrados por un aparato secretor de forma variable, externo: células epidérmicas de los pétalos (rosa, lila, jazmín), o pelos de glandulosos (compuestas, labiadas) o un aparato secretor interno: células secretoras de las lauráceas (corteza de canela, madera de alcanfor) magnoliáceas, (badiana) zingiberáceas (cúrcuma) o bien bolsas secretoras de las rutáceas, mirtáceas o umbelíferas y canales secretores de las coníferas.

No parece que exista una relación entre la estructura del aparato secretor y la composición química del aceite esencial.

Los aceites esenciales caracterizan ciertas familias, pero algunas plantas de alguna de estas familias pueden estar desprovistas de aceite esencial y las familias ricas en ellos se eligen desde el punto de vista filogenético.

A nivel de familias hay por tanto ejemplos de divergencia, pero también de convergencia. A este respecto hay que destacar los trabajos de BAKER Y SMITH [408], PENFOLD Y MORRISON [409], REINECKLES Y MABRY [410], REITSEMA [410], FESTER PEYRON [412], GRANGER [414], SABETAY [415], DILLEMANN [416], HEGNAUER [417], PARIS Y DELAVEAU [418], NAVES [419], BERNFELD [420].

Se sabe también que el parasitismo modifica la composición de los aceites esenciales: la menta piperita parasitada por un *Europhytes* es rico en mentofurano.

Vemos que la biosíntesis de los constituyentes de los aceites esenciales es bastante variada y que presenta todavía incertidumbres, ya comienzan a conocerse muchos ejemplos, pero dada la complejidad de la materia viva no se puede generalizar.

Para contribuir a una mejora de las plantas aromáticas, así como un mejor conocimiento de los aceites esenciales y de su producción, hay que recurrir a los resultados adquiridos en el campo de la quimiotaxonomía y en el de la filogenia de los constituyentes [407].

## **8.2. MATERIAS AROMATIZANTES NATURALES DE ORIGEN ANIMAL.**

Después de los productos de origen vegetal, el Consejo de Europa incluye [158] como anexo, seis productos de origen animal en los que se indica el número de referencia del Consejo de Europa, el nombre zoológico latino, del animal de origen, denominaciones inglesa, francesa y latina de las sustancias aromatizantes, así como la categoría de cada producto, que vamos a comentar a continuación.

### **8.2.1. SECRECIÓN GLANDULAR (CIVETO).**

El civeto (*zibethum*) es una materia grasa de fuerte olor, producido en una glándula que posee, cerca y debajo del ano, el civeto (*Viverra Zibetha L.*), un

mamífero carnívoros del Norte de África (Abisinia, Egipto, Nubia). El producto contiene 0,1 % de escatol al que se debe principalmente el olor. El sabor es picante y amargo.

#### **8.2.2. PRODUCTO DE DESECACION DE UNA SECRECION GLANDULAR (ALMIZCLE).**

El almizcle (*moschus*), es una sustancia muy olorosa (penetrante) procedente de la desecación de una secreción contenida en una glándula del almizclero situada bajo el vientre del macho, cerca de los órganos genitales, entre el ombligo y el prepucio, en la que es segregado el almizcle. La secreción sirve probablemente para atraer a la hembra. El almizclero (*Moschus moschiferus L.*), es un mamífero parecido al gamo y que habita en el Norte de China, el Tíbet y Siberia.

El olor tipo *almizcle* es una cualidad olorosa primaria o modalidad típica. Su principal constituyente es una cetona cíclica con un anillo de 15 elementos denominada muscona [57].

#### **8.2.3. PRODUCTO DE DESECACION GLANDULAR (CASTOREO).**

Producto antiespasmódico extraído del castor (*Castor fiber L. var. canadensis* Кунн.) mamífero roedor de Europa y América del Norte. El producto es una secreción contenida en dos bolsas que comunican con los órganos sexuales de los castores machos y hembras.

#### **8.2.4. CONCRECION PEDREGOSA DEL INTESTINO (AMBAR GRIS).**

El ambar gris (*ambra grisea*) es una concreción intestinal de los cachalotes (*Physeter macrocephalus*) es tenaz y flexible, exhala un olor parecido al del almizcle.

La formación del ambar gris no está completamente explicada. Se encuentra en masas de hasta 10 kg. flotando en el agua en los mares tropicales y también en los intestinos de los cachalotes muertos. Se supone que son restos de alimentos endurecidos y no digeridos por completo, procedentes en mayor parte de cefalópodos. Casi insípido y de olor agradable.

#### **8.2.5. COMPUESTOS AROMATICOS DE LA YEMA DE HUEVO.**

El huevo (*ovum*) se utiliza en la alimentación, no solo por sus propiedades nutritivas, si no también por sus características aromáticas procedentes de la composición de la yema.

### 8.2.6. MIEL.

La miel (*mel*) [57] es un producto elaborado por las abejas (*Apis mellifica*) por transformación enzimática del néctar de las flores. Es una solución acuosa de azúcar invertido, con un 17 % aproximadamente de agua, contiene además otros azúcares, diversas enzimas, aminoácidos, materias minerales, pigmentos, ceras, granos de polen, sustancias aromáticas, etc. Su importancia en aromatización es doble: por su olor y sabor característico y su poder edulcorante.

Una vez recolectados el néctar y el polen de las flores se inicia en la vesícula melífica de las abejas colectoras, la elaboración de la miel. Las obreras reciben en el panal la materia prima y la elaboran transformándola en varias etapas: espesamiento del néctar; acidificación de la materia prima y acción de los enzimas de las abejas produciéndose en el estómago melífico de estas, la isomerización de la glucosa en fructosa con lo que aumenta el azúcar invertido; incorporación de proteínas de las plantas y de las abejas, ácidos del cuerpo del insecto, enzimas de las glándulas salivares y de la vesícula melífica de las abejas, minerales, vitaminas y sustancias aromáticas de los vegetales. Cuando la proporción de humedad ha disminuido de un 16 a 19 % se cierran las celdillas del panal con una película de cera. En las celdillas la miel experimenta ulteriores transformaciones, sobre todo la inversión del azúcar.

Según BELTZ [57] en la miel se han aislado más de 120 compuestos aromáticos, de los cuales más de 80 están identificados. Se trata de ésteres de ácidos alifáticos y aromáticos, aldehídos, cetonas y alcoholes. Son evidentemente importantes en particular los ésteres del ácido fenilacético que tienen olor y sabor parecidos a los de la miel. El ácido antranílico es típico de las mieles procedentes del néctar de especies cítricas y del espliego. Como es natural el aroma de la miel depende de las especies vegetales de plantas en las que liban las abejas.

### 8.2.7. FERORMONAS.

Como dijo LOWELL PONTE [421]: "El aire que nos rodea está lleno de señales secretas, olores sutiles, que comunican gran variedad de mensajes. En ellos, los hombres de ciencia están descubriendo un lenguaje silencioso, el más antiguo del mundo".

En todo el tiempo, los entomólogos se han sorprendido por las complejas leyes que rigen la biología de un cierto número de insectos; sea en ciertas etapas de su vida sexual, tal como el vuelo nupcial de ciertas mariposas, o en su organización social: abejas y hormigas.

BETHE [422] descubrió por primera vez en 1.932, que dichos comportamientos son un mecanismo químico que denominó ectohormona. Más tarde en 1.959, KARLSON Y BUTENANDT [423] crearon el término de feromonas, del griego (*pherein* = transportar y *hormein* = excitar, estimular), insistiendo sobre el hecho de que el

producto es transportado a distancia al encuentro con otro individuo sobre el cual actúa para modificar su comportamiento.

En 1.970, PAIN [424] propuso el nombre de ferormonas, en vez del de feromonas utilizado por los anglosajones y en 1.978 MORNEX [425] volvió a utilizar el nombre de ferormona.

Entre estas sustancias y las hormonas existe un parentesco al tratarse de mensajeros químicos producidos por un organismo vivo. La diferencia esencial estriba en que para las hormonas el receptor es el propio organismo y para las ferormonas otro organismo.

Parece necesario delimitar el sujeto: en efecto, todas las sustancias químicas que por olfacción se utilizan entre dos individuos como mensaje no deben denominarse ferormonas, debiendo limitarse esta definición a una molécula "que implica un cambio de información entre animales que pertenecen a la misma especie" (ROPATZ) [426].

La emisión de las ferormonas se efectúa hacia el exterior y la recepción, por vía olfativa o gustativa, se asegura por el animal emisor, pero también por un congénere.

La acción de las ferormonas se expresa de tres maneras diferentes (TABAN [427], WILSON [428]):

- modificando el fenotipo del individuo cuando las ferormonas actúan en un periodo crítico (ferormonas formadoras).
- desencadenando un mecanismo de comportamiento inmediato y reversible (ferormonas desencadenantes).
- induciendo, por un efecto elemental, a una serie de modificaciones que implican al sistema endocrino-hipofisario en general, y nervioso como consecuencia de un estímulo prolongado (ferormonas elementales).

La finalidad de las ferormonas es triple: asegurar la protección, la nutrición y la reproducción de los animales que las producen.

Algunos ejemplos encontrados con esta triple finalidad al estudiar las ferormonas de los insectos:

#### **8.2.7.1. Orientación del fenotipo.**

En una colmena las abejas-obreras se agrupan alrededor de la reina a la que lamen su cuerpo. Su actitud es la misma si la reina es remplazada por un papel secante impregnado de un "triturado" de su cuerpo. A lo largo de su vida los ovarios de las obreras están atrofiados. Si la reina muere, al poco tiempo el 80 % de las obreras desarrollan los ovarios funcionales. Hay, por tanto, una real modificación de la estructura del receptor.

### 8.2.7.2. Marcado del camino.

En unas hormigas americanas (*Solenopsis saevissima*), el reclutamiento para recoger alimentos se hace por medio de una ferormona, sustancia olorosa producida por las glándulas anales de Dufour, emitida por el aguijón y depositada en el suelo a intervalos regulares, pero que desaparece en cinco segundos.

### 8.2.7.3. Atracción sexual.

La reina de las abejas (*Apis mellifica*) durante calurosos y soleados días, aproximadamente a 10 metros del suelo, es fecundada en pleno vuelo, por los machos que salen de su colmena, para precipitarse sobre ella con exclusión de otro insecto.

La mariposa-hembra del gusano de seda (*Bombyx mori*) es capaz de atraer a su congénere-macho que puede recorrer así hasta catorce kilómetros para asegurar su procreación. La atracción es conseguida por una ferormona: el bombykol.

Los "atrayentes" sexuales necesitan, por su parte estructuras geométricas y ópticas muy específicas. Dos especies de mariposas tienen una respuesta muy próxima para isómeros opuestos geoméricamente de n - tetradecenil acetato (ROELOFS) [429].

Hace falta, sin embargo, matizar esta especificidad: por ejemplo la abeja macho da una respuesta eléctrica idéntica a una concentración de  $10^8$  moles/ml. del "atrayente" sexual de la reina y a  $10^{12}$  moles/ml. del ácido caproico (BOECKH) [430]. En ciertas especies se ha demostrado que la misma ferormona de atracción sexual (cis-7-dodecenil acetato) influye sobre dos especies de mariposas; en cuyo caso la discriminación depende de la concentración (KAAE) [431].

Estas acciones no son tan sencillas, porque frecuentemente las producciones químicas no son únicas. Así en el curso de los fenómenos de atracción sexual, además del ácido ceto-9-decen-2-oico las glándulas mandibulares de la reina producen otro ácido graso, el hidroxí-9-decen-2-oico.

Un caso curioso es el ejemplo del *Tenebrio melitor* (gorgojo de la harina): el macho estimulado por la atracción sexual de la hembra, emite una ferormona que inhibe la respuesta sexual de los otros machos; lo que puede transferirse a la hembra para hacerla menos atractiva a los otros machos (HAPP) [432].

El efecto químico, en el fenómeno de atracción sexual, tiene un papel cuantitativo y también cualitativo para la conservación de la especie, porque conduce a un acoplamiento homoespecífico. Se puede así alargar el debate subrayando que las abejas utilizan monoterpenos, alcoholes, aldehídos o ácidos para marcar las fuentes de alimentos. Estos compuestos se encuentran en el aroma de las flores. Este fenómeno rige por tanto las relaciones entre ciertas flores y las abejas. El señuelo que representan estas flores, tanto por su forma, como por sus emanaciones químicas, facilita la polinización por el insecto.

#### 8.2.7.4. Alarma.

Cuando en una colonia de hormigas penetra un insecto extraño, las obreras se precipitan, se agitan y toman una actitud agresiva, en trece segundos la alarma se extiende en una esfera de 6 cm de diámetro; la presencia del intruso incrementa la densidad del mensaje liberado por las obreras presentes; si el intruso se retira, todo vuelve a la normalidad en treinta y cinco segundos.

El aguijón de las abejas (*Apis mellifera*) contiene 5 mcg. de acetato de isoamilo, ferormona de alarma (PAIN) [424]. La abeja deposita en la picadura este producto que puede servir de marcador para el intruso, que conduce a las otras abejas a picar en el mismo sitio.

Existe una diferencia entre las ferormonas de alarma, que no tienen una gran especificidad de estructura y las ferormonas sexuales. Para las primeras hay una correlación entre la configuración molecular y la actividad. Así el n-butilo y la 2 heptanona, que aunque muy diferentes tienen la misma forma y la misma actividad (LAW) [433].

Las ferormonas de alarma pueden servir de "marcador" para el intruso: la abeja deposita trazas de acetato de isoamilo en el lugar de la picadura, que conduce a las otras abejas a picar en el mismo sitio.

Por último hay que tener en cuenta el factor multiplicativo de la producción de ferormonas de alarma; los individuos que acuden a la "zona peligrosa" emiten a su alrededor una cantidad de mensajes que atraen un mayor número de defensores, hasta que el intruso se retira.

BUTENANDT fue el primero que después de veinte años de investigar con millares de hembras del gusano de seda (*Bombyx mori*) estableció la existencia de una base química al aislar el cis-12-trans-10-hexadecadien-1-ol (bombykol), que desencadena el mismo batir de alas, que el debido a la presencia de la hembra.

Actualmente (LAW) se conocen las fórmulas de más de cincuenta productos que se comportan como ferormonas [433]. Un gran número son de naturaleza terpénica, compuestos no polares teniendo poca tendencia a asociarse, que no persiste en las zonas de emisión. Otros son ácidos grasos como el ácido ceto-9-decen-2-oico, ferormona de atracción sexual de las abejas (WILSON).

La difusión de las ferormonas la estudiaron WILSON Y BOSSERT [428] que desarrollaron un modelo matemático particularmente elaborado por estudio de los fenómenos de difusión. El compuesto volátil se dispersa en función de una sencilla ley de difusión sin ser absorbido ni reaccionar con ninguna otra sustancia. La ferormona de alarma del *Acanthomyops claviger* tiene una relación entre las tasas de emisión (Q) y el umbral de concentración (K) de  $10^3$  a  $10^5$  ml/s. El radio de transmisión es de 10 cm; la señal tarda dos minutos para alcanzar esta distancia y ocho minutos para evaporarse.

Además de los estudios de los efectos de las ferormonas sobre insectos (hormigas, abejas, gusanos de seda, etc.) también se han realizado experiencias con mamíferos (roedores, cerdas, cabras, etc.)

### 8.2.7.5. Las ferormonas en la raza humana.

La raza humana está caracterizada por su posición erguida y por la disminución de la función olfativa en comparación con la de otros animales (MORNEX) [425], pues mientras las otras funciones sensoriales han sufrido un desarrollo considerable la olfativa está prácticamente reducida a un estado vestigial. Las otras funciones son tributarias de la corteza cerebral e influenciada por una nota afectiva que puede modificar considerablemente el valor de los mensajes recibidos. Cierta número de elementos abogan, sin embargo, en favor de una información ferormonal inconsciente o subconsciente y su análisis impone clasificarlos bajo tres encabezamientos:

#### 8.2.7.5.1. Producción de moléculas olorosas por el hombre (*Homo sapiens*).

La prueba es aportada por el comportamiento de ciertos animales (toros, cabras y simios) que reaccionan ante el olor femenino. Ciertos perros policías son capaces de detectar objetos llevados por una embarazada debido al olor de la progesterona que impregna su cuerpo.

Algunos individuos atraen la atención de los mosquitos y en la mujer esta particularidad varía con el momento de la regla (WIENER) [434].

La individualización química no está todavía más que bosquejada. En la orina se encuentra el delta-16-androstenol cuyo olor es parecido al del almizcle del que se ha comprobado la importancia en el comportamiento sexual de otros mamíferos. Este esteroide no se excreta en los niños antes de la pubertad y se encuentra en la orina del hombre a una concentración dos veces mayor que en la de la mujer (CLEVELAND) [435].

El sudor de los esquizofrénicos tiene un olor particular debido a la presencia del ácido trans-3-metil-2-hexenoico que contiene (SMITH) [436].

En 1973, WALTAN [437] demostró la presencia en las secreciones vaginales del ácido butírico. En las embarazadas o en actividad genital, la concentración de dicho ácido es 50 veces superior al de las mujeres menopáusicas. La producción de estas sustancias sería tributaria de la flora bacteriana vaginal. MICHAEL registró el 2 de febrero de 1971 en Francia, una patente (3697/1.971) para cubrir eventuales aplicaciones terapéuticas de los ácidos grasos de origen vaginal [438].

Estos tres ejemplos hacen pensar que los mensajes químicos están asociados a la actividad de las glándulas apocrinas, no a las de la zona pubiana (KLIEMAN) pero sí a las de las axilas y las mamas [439]. La zona prepucial es la que sobre todo puede reproducir sustancias olorosas. De hecho en el esmegma se pueden aislar escualenos y esteroides que no han sido totalmente caracterizados.



### *8.2.7.5.2. Capacidad de percepción de ciertos olores.*

A pesar del débil desarrollo de la función olfativa humana es capaz de percibir ciertos olores. Si no fuera así no existiría la industria de perfumería. Además hace falta resaltar la importancia del almizcle, el civeto y otras sustancias, que en los animales tienen un papel ferromonal de importancia sexual, que se usan en los perfumes en los que también se busca el efecto de la atracción inter-sexual.

La lactona del ácido 1-5 hidroxiparadecanoico (exaltólido) tiene un olor almizclado y se utiliza como fijador en los perfumes. LE MAGNEN demostró en 1952 [440], que este olor es percibido fuerte y agradablemente por las mujeres en actividad genital, mientras que, ni los niños ni los hombres adultos lo perciben. VIERLING [441] comprobó que dicha facultad perceptiva es modulada en función del ácido menstrual, alcanzando el máximo, el día anterior a la ovulación y una semana antes de las reglas. Esta ferromonodependencia se presenta también con otros olores: el umbral de percepción del almizcle está influenciado por los estrógenos; y el "cital" cuya percepción disminuye en presencia de andrógenos (SCHNEIDER) [442].

La otra particularidad del olfato femenino es ser capaz, a la inversa del hombre, de percibir el olor del verraco, habiéndose demostrado (VEYLON) [443], que este olor particular es debido a la presencia de delta-16-androstenona, pariente próximo de la sustancia de la que se ha demostrado la presencia en la orina de los hombres en periodo de actividad genital, que también es almizclado.

### *8.2.7.5.3. Fenómenos en el hombre comparables a los de otros mamíferos.*

En 1971 MAC CLINTOCK [444] presentó un trabajo sobre un grupo de estudiantes que vivían juntas, comprobando la aparición de una sincronización de los ritmos menstruales, sobre todo en las jóvenes que vivían muy próximas la una de la otra. Hasta ahora es la única observación precisa, pero a título de hipótesis, otras implicaciones de mecanismos ferromonales han sido o pueden ser sugeridos [445, 446, 443].

Los estudios psicoanalíticos han sugerido que la orientación psico-sexual podría iniciarse en la primera infancia por una percepción olfativa tal, que el olor del pariente del sexo opuesto sería atractivo y del mismo sexo sería repulsivo

En la realización del acto sexual, la atracción podría depender de las producciones olorosas procedentes del aparato genital: vagina y prepucio.

# III AROMATIZACION

## 9.-AROMATIZACION DE ALIMENTOS Y MEDICAMENTOS

### 9.1.- AROMATIZACIÓN DE ALIMENTOS.

Como dijo AUDIBERT "a dosis homeopáticas, los aromas naturales y artificiales se insinúan en la alimentación; su gran auge data de los años 1.965 a 1.970". Su importancia ponderal y financiera es grande, no hay más que recurrir a las estadísticas para situar el consumo mundial de estos aromatizantes y su distribución en los alimentos y medicamentos.

¿Porqué se emplean los aromas y cuales son sus funciones tecnológicas en los alimentos? [447].

La I.O.F.I. supo responder a esta pregunta resaltando el importante papel que juega el aroma de un alimento en el consumo y la aceptación de los alimentos, porque si tienen que ser soportables al paladar para ser aceptados en cantidad conveniente durante un prolongado periodo de tiempo, su aspecto, como su aroma, deben ser variados. Variedad indispensable, pero igualmente ligado al gusto y a los hábitos particulares, geográficos, genéticos y etnológicos de los usuarios.

**En el plan fisiológico**, el papel que juega el aroma de los alimentos es estimular la secreción salivar y ayudar a la digestión. Para asegurar una alimentación aceptable, conveniente y equilibrada es esencial una variedad de aromas.

**Sobre el plan sociológico**, más que dietético, el aumento de la población mundial, los movimientos de poblaciones y los cambios de estilo de la vida familiar, justifican la expansión del empleo de los aromatizantes necesarios para la preparación industrial de los alimentos, ligada a estos cambios sociológicos.

Uno de los aspectos benéficos suplementarios del empleo de aromatizantes, es que los materiales nutritivamente convenientes, pero insípidos, pueden transformarse en alimentos perfectamente aceptables por poblaciones de escasos

recursos y que los alimentos bien aromatizados pueden ponerse a disposición de las distintas clases sociales en lugar de reservarse a una minoría privilegiada.

Sobre el plan tecnológico alimentario se justifica el empleo de los aromatizantes desde tres puntos de vista:

- a) En aquel donde los aromatizantes son ingredientes indispensables (helados, postres lacteos, bebidas analcohólicas edulcoradas, bombones,...).
- b) En aquel en que son característicos de alimentos específicos. Permiten entonces diferenciarlos de otros alimentos de la misma categoría, tales como las bebidas alcohólicas edulcoradas de frutos cítricos, bombones de menta, pan de especias,...).
- c) Para compensar las pérdidas de aroma durante la fabricación de ciertos alimentos, tales como los pasterizados, zumos concentrados de frutos cítricos, jarabes, galletas y todos los productos que sufren la acción del calor.

En contrapartida de dichas ventajas y de estas necesidades de empleo, existe el gran temor, la perplejidad de los consumidores ante las listas de productos. Por tanto, como dijo un productor de aromas: "si se hiciera la lista de los constituyentes de un biftec asado, con todos los que aparecen en la cocción, sería peor".

## 9.2. AROMATIZACIÓN DE LOS MEDICAMENTOS.

Como diría VERAIN [448] venir a hablaros de la corrección del sabor de los medicamentos puede pareceros aberrante. Sobre todo, porque vivimos en una época en la que al visitar los servicios farmacéuticos de los Hospitales contemplamos recipientes de perfusión con los que se administran por vía parental, en diversas tomas, los distintos principios activos necesarios a los tratamientos medicamentosos. En una época en la que frecuentemente utilizamos inyectables, supositorios, cápsulas; es decir formas farmacéuticas en las que los principios activos no se ponen en contacto con las papilas del gusto o del olfato.

En tal época, por tanto, hablar de tecnología de la aromatización hace nacer una sonrisa maliciosa en los labios. Sin embargo, si las inyecciones parentales se utilizan cada vez más, si las cápsulas, son de fácil fabricación y manejo, no hay que olvidar que existen dos categorías de enfermos, cada vez más numerosos, que dependen de la tecnología de la aromatización: son especialmente los niños (pediatría) y las personas de edad avanzada (geriatria). Estos colectivos suelen ingerir medicamentos por vía oral, líquidos o sólidos (jarabes, soluciones, polvos, comprimidos).

Nos encontramos en un mundo que no admite lo desagradable y si una especialidad farmacéutica no debe saber bien, para seguir con el adagio según el cual, "un medicamento para ser activo debe saber mal"; por el contrario en la época actual, debe ser por lo menos "aceptable".

Se señala que la tecnología de la aromatización es nueva. ¿Porqué el farmacéutico no se ha ocupado hasta ahora de este problema? Por cuatro razones:

- 1ª Porque aún resuena el adagio antes citado. Recordemos algunos antiguos medicamentos: la Triaca, históricamente conocida por su amargor; el aceite de ricino; el aceite de hígado de bacalao; la quinina, etc.
- 2ª Antiguamente el género humano soportaba mucho mejor el dolor y si había que tomar algún medicamento de mal sabor, el enfermo lo hacía de buen grado. Recordemos la anécdota del farmacéutico al que un enfermo le preguntó cómo debería tomar una medicina de sabor desagradable y él le contestó: "depende; o mezclado con zumo de limón o con *"resignación"*.
- 3ª Las materias primas activas, en general, eran diferentes. Nuestros predecesores preparaban armoniosas mezclas de productos vegetales añadiendo jarabes de zumos de frutas. Estas composiciones, sin ser "deliciosas", enmascaraban el amargor o el sabor desagradable de los medicamentos. La aromatización de las preparaciones de entonces era muy reducida y los aromas de los jarabes, de tinturas, tales como la corteza de naranja amarga, de aceites esenciales de limón, de menta, etc. eran suficientes para mejorar las mezclas.
- 4ª En el momento en que el público se inclina por las bebidas tónicas o las amargas (bitters), ¿para qué complicarse la vida? Pero por otra parte seguimos preparando diversas especialidades farmacéuticas de sabor desagradable, que se ingieren por vía bucal y se ponen en contacto con los sentidos del olfato y del gusto y por tanto hay que aromatizarlas, sobre todo si van destinadas a niños o a personas de edad.

El galénico deberá fabricar de una manera racional una fórmula correctamente aromatizada, haciéndolo por etapas sucesivas, a veces complicadas: En una primera etapa, la fórmula farmacéutica se estudiará desde dos puntos de vista: el gustativo y el terapéutico. Después de este estudio pueden presentarse dos casos:

- a) Fórmula aceptable: edulcorar, si fuera necesario y después aromatizar.
- b) Fórmula no aceptable: edulcorar, enmascarar y después aromatizar.

Una vez efectuado el estudio gustativo y terapéutico hay que diferenciar en el plan sistemático diversas etapas de esta tecnología, que pueden combinarse o solaparse y que podríamos esquematizar de la siguiente forma:

Corrección del sabor } edulcoración  
                                  } enmascaramiento

Aromatización

En estas operaciones no se trata de suprimir totalmente el sabor de un producto para hacerle insípido y enseguida aromatarlo; lo que se hace es disminuir la sensación desagradable (corrección) y después añadir el aroma que se considere.

### 9.2.1. ESTUDIO DE LA FORMULA FARMACEUTICA

En la aromatización de un medicamento hay que tener en cuenta diversos factores, entre los cuales están los caracteres organolépticos de los principios activos y su aplicación terapéutica. Por ello, antes de añadir un aromatizante de una manera indiscriminada hay que hacer un estudio de la fórmula farmacéutica desde dos puntos de vista.

- aceptabilidad del medicamento desde el punto de vista gustativo.
- estudio terapéutico.

#### *Estudio gustativo.*

En primer lugar la fórmula farmacéutica deberá ser degustada, con cuidado, cronómetro en mano, para trazar su "perfil gustativo".

Para ello se trazará un diagrama colocando en abcisas los tiempos en segundos del instante de aparición de los sabores y duración de su percepción; en ordenadas la intensidad de estos sabores en unidades arbitrarias derivadas del gusto, viendo si esta intensidad es aceptable o no.

Para un aroma intervienen dos fenómenos: intensidad y tiempo de acción. Un aroma de intensidad débil pero persistente puede hacerse intolerable: (por ejemplo el ajo); a la inversa un aroma muy fuerte, que desaparece rápidamente, puede ser "soportado" por el enfermo.

El catador experto que realice este estudio anotará sucesivamente lo que ha sentido y la superficie cubierta reflejará la amplitud de la sensación (sabores: dulce, amargo, astringente, anestésico, picante, estiptico, etc.).

Pongamos algunos ejemplos para establecer los diagramas.

Para mejor comprensión, los primeros ejemplos los tomaremos en el campo alimentario, más familiar a todos.

Un catador degusta una cerveza; durante los tres primeros segundos el sabor alcanza su máximo, después decrece. Por el contrario, el sabor amargo aceptable se desarrolla menos deprisa alcanzando el máximo en cinco segundos, después este decrece. Este desfase en el tiempo de los dos sabores provoca lo que se llama el "regusto" amargo, pero el conjunto determina una sensación agradable.

Si la cerveza es de mala calidad, el sabor amargo interviene después del sabor de cerveza, es mayor, decrece más lentamente y toma diversas características (amargo resinoso, amargo metálico).

Otro ejemplo es un zumo comercial de manzana y cassis. La manzana es un soporte y no debe percibirse, pero aporta una cierta sensación táctil agradable. Por el contrario el cassis y el azúcar son diagnosticados por el catador, que presentará su esquema. El sabor de cassis es aceptable, con su curva próxima a la línea de aceptabilidad; teniendo un intenso sabor, cubre una larga superficie. El catador percibe además un sabor dulce más débil y al final queda en la boca un aroma residual.

Los otros ejemplos serán de formas farmacéuticas.

- Un jarabe antibiótico aromatizado "al plátano". En la cavidad bucal se desarrolla inmediatamente un aroma agradable intenso que enmascara un momento el amargor del antibiótico, que aparece secundariamente, pero que es tolerable. Lo que hace falta en tal preparación es que el poder "enmascarador" del aroma "a plátano" dure el mismo tiempo que el amargor del antibiótico.
- Una fórmula farmacéutica que contiene una molécula a la vez amarga y anestésica. Un amargor detestable se desarrolla durante el primer segundo, anulado rápidamente por el efecto anestésico fuertemente desagradable que invade la boca e incluso paraliza la lengua. Gracias a estos diagramas, nosotros podemos también representar los diversos tipos de amargo:
  - amargo fugaz, que desaparece deprisa y que según su intensidad, puede ser o no tolerable.
  - amargo tenaz, que permanece bastante tiempo en la boca, lo que hace que se acepte más o menos.

Después de haber efectuado varias veces la operación y comprobado que el perfil se reproduce, podremos llegar a una primera conclusión: ésta fórmula es fácil o difícil de corregir. El interés de este perfil es permitir seguir una fórmula a medida de las correcciones aportadas. Además hay que tener en cuenta el envejecimiento de la fórmula.

## *Estudio terapéutico*

Durante este estudio hay que revisar la Memoria de la fórmula farmacéutica para precisar:

1°- La edad de las personas a que se dirige.

2°- A que tipo de enfermo se destina.

La aromatización para un enfermo hepático no será igual que para un paciente debilitado, que tiene necesidad de comer mucho. En el hepático se endulzará mucho menos y se buscará una cierta acidez y efervescencia.

No se aromatizará con extracto de café una fórmula tranquilizante para un enfermo agitado.

Será conveniente aromatizar una fórmula a base de vitamina C, con naranja o limón, porque el enfermo relaciona en su mente los dos productos. Parece haber una sinergización psíquica del principio activo.

3°- A que dosis debe ser absorbido: una cucharada de café o de sopa, dos o tres comprimidos, y si las tomas deben repetirse muchas veces por día.

4°- El momento de la administración también entra en juego: por la mañana en ayunas; antes, durante o después de las comidas.

### **9.2.2. EDULCORACION**

Los niños hereditariamente y por la educación recibida prefieren el azúcar; los ancianos lo buscan particularmente.

El dulce es un sabor, pero en la mente de cada uno, indudablemente unido a la sacarosa o a los azúcares naturales.

Cuando el año 1.955 en Viena [449] comencé mi colaboración con la Commission International des Industries Agricoles en el campo de los Aditivos alimentarios, los edulcorantes se clasificaban en dos grupos: los naturales (alimentos edulcorantes) y los artificiales (aditivos). En la actualidad la clasificación es diferente, pues se basa, en el poder edulcorante, y posteriormente, en su composición química y en su origen. (Tabla 8).

#### **9.2.2.1. Edulcorantes de bajo poder edulcorante (Inferior o próximo al de la sacarosa - Tabla 9)**

Entre los que se encuentran:

Tabla 8

**EDULCORANTES**

- I. EDULCORANTES DE BAJO PODER EDULCORANTE  
(INFERIOR O PROXIMO AL DE LA SACAROSA)
  1. *Azúcares.*
    - 1.1. Polisacáridos.
    - 1.2. Monosacáridos.
  2. *Azúcares-alcoholes.*
    - 2.1. Polisacáridos.
    - 2.2. Monosacáridos.
  
- II. EDULCORANTES DE ALTO PODER EDULCORANTE  
(MUY SUPERIOR AL DE LA SACAROSA).
  3. *Edulcorantes naturales.*
    - 3.1. Heterósidos y otros derivados.
    - 3.2. Compuestos nitrogenados.
  4. *Edulcorantes artificiales (o de síntesis).*
  
- III. AGENTES EXALTADORES DEL SABOR DULCE.

Tabla 9

**EDULCORANTES DE BAJO PODER EDULCORANTE**

- |   |   |
|---|---|
| <ol style="list-style-type: none"> <li>1. AZUCARES.           <ol style="list-style-type: none"> <li>1.1. <i>Polisacáridos</i> <ol style="list-style-type: none"> <li>1.1.1. Sacarosa (azúcar)<br/>(de caña o de remolacha).</li> <li>1.1.2. Azúcar invertido.</li> <li>1.1.3. Palatinosa.</li> <li>1.1.4. Lactosa.</li> </ol> </li> <li>1.2. <i>Monosacáridos.</i> <ol style="list-style-type: none"> <li>1.2.1. Glucosa (Dextrosa).</li> <li>1.2.2. Fructosa (levulosa).</li> <li>1.2.3. Xilosa.</li> <li>1.2.4. Pentosa.</li> <li>1.2.5. Isoglucosa.</li> <li>1.2.6. L-Sorbosa.</li> </ol> </li> </ol> </li> </ol> | <ol style="list-style-type: none"> <li>2. AZUCARES-ALCOHOLES (POLIOLES).           <ol style="list-style-type: none"> <li>2.1. <i>Polisacáridos.</i> <ol style="list-style-type: none"> <li>2.1.1. Maltitol (Malbit<sup>®</sup>).</li> <li>2.1.2. Isomaltitol.</li> <li>2.1.3. Lactitol.</li> <li>2.1.4. Palatinit (Isomalt<sup>®</sup>).</li> <li>2.1.5. Lycasins.</li> </ol> </li> <li>2.2. <i>Monosacáridos.</i> <ol style="list-style-type: none"> <li>2.2.1. Sorbitol (glucitol).</li> <li>2.2.2. Manitol.</li> <li>2.2.3. Xilitol.</li> </ol> </li> </ol> </li> </ol> |
|---|---|



- *Azúcares*: Denominados "alimentos edulcorantes" o "edulcorantes nutritivos", productos con un valor calórico notable entre los que se encuentran: la sacarosa (azúcar de caña o de remolacha) y otra serie de azúcares obtenidos a partir de almidones y que según el agente de hidrólisis utilizado y según el grado de despolimerización o de hidrogenación alcanzado se obtienen diversos productos. Los azúcares están caracterizados por tener una composición derivada de hidratos de carbono solubles que por la pluralidad de grupos OH de su molécula presentan un sabor dulce manifiesto.

Estos azúcares, además de su sabor dulce tienen propiedades tales como el aporte de calorías al organismo y, en solución, el aumento de la viscosidad que, como veremos es uno de los factores de su poder "enmascarador".

En lugar de la sacarosa, se puede emplear la miel que además de su viscosidad y su poder absorbente es un excelente enmascarador. La miel ha sido uno de los productos más utilizados en Farmacia. La hidromiel de los Dioses la consagró; pero con la industrialización, actualmente aparece poco en las especialidades farmacéuticas, porque cada lote difiere en particular en cuanto al color; es una sustancia natural difícil de estandarizar y de controlar.

A la hora actual, el galénico reemplazará frecuentemente la sacarosa, ya que se hidroliza en el curso de la conservación en glucosa y levulosa (fructosa). Además hay que pensar en los diabéticos (cada vez más numerosos); en las mujeres que rechazan los jarabes; en las especialidades adelgazantes; en los dentistas, que están persuadidos que la sacarosa es la única causa práctica de la caries dentaria. Por ello la industria se esfuerza en encontrar nuevos edulcorantes:

La glucosa, obtenida por hidrólisis del almidón, se utiliza más en confitería (jarabe de glucosa) que en Farmacia. Es un excipiente excelente, pero poco dulce (0,65 de poder edulcorante).

Por ello se prefiere la levulosa (fructosa), preparada industrialmente por isomerización de la glucosa. La levulosa, aunque reductora e higroscópica, lo que puede ser molesto, tiene la ventaja de presentar un poder edulcorante de 1,5; además puede ser administrado a los diabéticos porque no es insulino-dependiente.

- *Azúcares-alcoholes*: También llamados "polioles", por su composición, o "edulcorantes hipocariógenos", por sus propiedades, que interesan al consumidor por disminuir el riesgo de caries dental.

El sorbitol, notable en el plan tecnológico: sin poder reductor, poco fermentescible, muy soluble, no cristizable una vez disuelto, termoestable, no cariígeno, conveniente para los diabéticos. Desgraciadamente es muy higroscópico, lo que hace difícil su manipulación a escala industrial. Por esta razón, cuando se trata de formas farmacéuticas sólidas se prefiere usar el manitol que tiene el mismo poder edulcorante (0,5) pero no es higroscópico. Además, el hecho de su acción laxante, hace que no puedan sobrepasarse ciertas dosis.

Entre ellos, además del sorbitol y el xilitol, nos encontramos con nuevos edulcorantes: las malto dextrinas, los "lycaines", que se obtienen por hidrogenación de jarabes de almidón de maíz o patata, produciendo cadenas de glucosa más o menos largas cuya glucosa terminal se transforma en sorbitol. El "palatinit" (no hay que confundirlo con la palatinosa), es una mezcla equimolecular de dos disacáridos-alcoholes: la alfa D glucosa 1-6 sorbitol y la alfa D glucosa 1-6 manitol. El "lactitol" disacárido alcohol obtenido por hidrogenación de la lactosa. El polysorb; el Neosorb NC 80, rico en maltitol; Neosorb NC 70, rico en sorbitol, etc.

### 9.2.2.2. Edulcorantes de alto poder edulcorante (muy superior al de la sacarosa)

También se les denomina "edulcorantes acalóricos", por no tener un valor energético apreciable. Están dirigidos principalmente a los alimentos de régimen (alimentos y bebidas) para dietas de "bajas calorías" que pueden tener implicaciones fisiológicas, especialmente la insulino-secreción y otras consecuencias, lo que mantiene una reserva respecto a su utilización (HERAUD, 1.986) [33].

Se dividen en dos grupos:

- *Edulcorantes naturales (Tabla 10)*: Que a su vez incluye dos subgrupos: los de naturaleza glucosídica (heterósidos) y otros derivados y los de naturaleza proteica. Todos ellos han sido propuestos recientemente como edulcorantes para alimentos con la idea de promocionar el uso de productos naturales.

Entre los del primer subgrupo se encuentran heterósidos como el esteviósido de la Stevia rebandiana (compuestas) y el glicirricinato; varias dihidrochalconas; oligoglucosil fructósidos; derivados halogenados de polisacáridos, etc.

En el segundo subgrupo, los compuestos nitrogenados comprenden proteínas (taumatina, monelina y miraculina), péptidos como el aspartame y además varios aminoácidos.

- *Edulcorantes artificiales (Tabla 11)*: Antes denominados "edulcorantes sintéticos".

Es un grupo en el que se han propuesto mayor número de productos, pero también del que se han prohibido casi todos, ya que sólo quedan en la actualidad dos o tres en uso, con las oportunas reservas hasta que no se terminen con ellos los estudios toxicológicos en curso.

El interés de estos edulcorantes artificiales se basa en la característica fundamental de su elevado poder edulcorante (de 70 a 4.000), así como que no interfieren en el metabolismo glucídico normal o patológico, no tienen poder calórico. Son aconsejados cuando no puedan utilizarse los azúcares u otros edulcorantes naturales; pero, sin embargo, tienen inconvenientes derivados de su estabilidad, sabores posteriores o secundarios, así como su posible toxicidad.

El caso más estudiado del sabor posterior o secundario, es el de la sacarina, de la que se dice que no tiene un sabor dulce puro, ya que a continuación deja un gusto amargo (también descrito como metálico o desagracable). Diversos autores

Tabla 10

**EDULCORANTES DE ALTO PODER EDULCORANTE (NATURALES)**

3. EDULCORANTES NATURALES.

3.1. *Heterósidos y otros derivados.*

- 3.1.1. Glicirricinato amónico.
- 3.1.2. Esteviósido (Susan<sup>R</sup>).
- 3.1.3. Dihidrochalconas:
  - 3.1.3.1. Neohesperidin dihidrochalcona.
  - 3.1.3.2. Naringina dihidrochalcona.
  - 3.1.3.3. Hesperetina dihidrochalcona.
- 3.1.4. Osladina.
- 3.1.5. Filodulcina.
- 3.1.6. Cloro-galacto-sacarosa.
- 3.1.7. Oligo glucosil fructósidos.
  - 3.1.7.1. Glucosilsacarosa (G2F).
  - 3.1.7.2. Maltosilsacarosa (G3F).

3.2. *Compuestos nitrogenados.*

- 3.2.1. Proteínas.
  - 3.2.1.1. Taumatina (Talin<sup>R</sup>).
  - 3.2.1.2. Monelina.
  - 3.2.1.3. Miraculina.
- 3.2.2. Péptidos.
  - 3.2.2.1. Aspartame (aspartilfenilalanina-metil-ester).
- 3.2.3. Aminoácidos.
  - 3.2.3.1. Glicocola.
  - 3.2.3.2. DL-Triptofano.
  - 3.2.3.3. DL-6-Trifluorometil triptofano.
  - 3.2.3.4. DL-Alanina.
  - 3.2.3.5. D-Valina.
  - 3.2.3.6. D-Tirosina.
  - 3.2.3.7. L-Serina.
  - 3.2.3.8. L-Lisina.
  - 3.2.3.9. L-Treonina.

lo han atribuido, no a la propia sacarina, si no a cualquier impureza (Anónimo, [450], 1.954) o a productos resultantes de su degradación hidrolítica. Posteriormente HELGREN Y COL. (1.955) [451], afirmaron que ese "gusto posterior" es debido a la propia estructura molecular del edulcorante.

**9.2.2.3. Asociaciones de edulcorantes**

La asociación de dos o más edulcorantes es muy interesante en la práctica del uso de los mismos, constituyendo lo que PAUL (1.920), denominó "pares edulcorantes". El sinergismo de estas asociaciones tiene dos finalidades RUNTI (1.957):

- a) El potenciar el "poder edulcorante".
- b) Disimular el sabor posterior amargo (o de otro tipo).

Desde que PAUL (1.920) descubrió el sinergismo sacarín+dulcina, han sido varios los autores que se han ocupado de ello (TAUFEL Y WAGNER, 1.925 [452]; MAGIDSON Y

**EDULCORANTES DE ALTO PODER EDULCORANTE (ARTIFICIALES)**

4. EDULCORANTES ARTIFICIALES.

4.1. *Sulfimidas.*

4.1.1. Sacarina (sulfimida benzoica).

4.1.2. Sacarina sódica.

4.1.3. Sacarina cálcica.

4.2. *Derivados de la urea.*

4.2.1. Dulcina.

4.2.2. Sousesan<sup>R</sup> [N-Cp-nitrofenil N(carboxietil)-urea].

4.3. *Acidos sulfámicos.*

4.3.1. Ciclamato sódico (ciclohexil-sulfamato sódico).

4.3.2. Ciclamato cálcico.

4.3.3. Tiazolil-2-sulfamato sódico.

4.3.4. (Metil-3-ciclopentil) sulfamato sódico.

4.4. *Derivados m-amino-nitrobencénicos.*

4.4.1. P.4.000 (n-propoxi-1-amino-2-nitro-4-benceno).

4.4.2. Neo-douxan<sup>R</sup> (n-etoxi-1-amino-2-nitro-4-benceno).

4.5. *Oximas.*

4.5.1. Perillartina (oxima del perillaldehido).

4.5.2. Aldoxima V SRI.

4.5.3. Bencil-5-furfuraldoxima.

4.6. *Amidas.*

4.6.1. N-hexil-2-cloro-2-malondiamida.

4.6.2. N-amil-2-cloro-2-malondiamida.

4.7. *Hidrazidas.*

4.7.1. Dihidrazida del ácido succinico.

4.8. *Iminonitrilos.*

4.8.1. Imino-beta-fenil-beta-propionitrilo.

4.8.2. (p-tolil)beta-imino-beta-propionitrilo.

4.9. *Acidos ceto-carboxílicos (serie aromática).*

4.9.1. Ac, acetofenon-o-carboxílico.

4.9.2. Ac, p-metoxi-benzoil-benzoico (S23/46).

4.10. *Derivados triazínicos.*

4.10.1. Glucina.

4.11. *Derivados del bencimidiazol.*

4.11.1. Acido bencimidazolil-2-propiónico.

4.12. *Oxatiazinondióxidos.*

4.12.1. Acesulfam potásico (acetosulfam).

Desde que PAUL (1.920) descubrió el sinergismo sacarín + dulcina, han sido varios los autores que se han ocupado de ello (TAUFEL Y WAGNER, 1.925 [452]; MAGIDSON Y GORBATSCHOW, 1.923 [453]; ODDO Y COL., 1.931, 1.937 y 1.940 [454 a 456] ; JACOBSEN, 1.942 [457]).

VINCENT Y COL.(1.955) [458], se ocuparon de la asociación sacarín + ciclamato que se ha utilizado bastante tiempo, al prohibir el uso de la dulcina para enmascarar el sabor posterior de la sacarín, debido a su toxicidad.

Las asociaciones casi siempre se hacían con edulcorantes artificiales entresí, ya que el Código Alimentario Español (3-23-23, apartado b) [54] prohíbe la adición de edulcorantes artificiales a los naturales.

Actualmente se comercializan en Cataluña, registrados por la Generalitat, asociaciones de edulcorantes naturales con otros artificiales [25]:

- Dextrosa + ciclamato (26.4102/CAT) 430.
- Fructosa y lactosa 99,3% + sacrin 0,7% (R.S.I. 26.77/CAT).
- Fructosa, manitol + sacarín sódica (R.S.I. 26.755/B/954/CAT).

HERAUD, G. (1.986) [33], cita como ejemplo una patente de una asociación de Sacarín + esteviósido + acesulfam potásico + tricloro-galacto-sacarosa.

Cuando sea necesaria una fuerte cobertura dulce, a veces es bueno poner la cantidad de sacarosa justa suficiente para alcanzar la viscosidad óptima y después reforzar el sabor dulce con una traza de edulcorante artificial (sacarín, ciclamato).

Los edulcorantes artificiales tienen el inconveniente de su alto poder edulcorante y hay que tener cuidado de no preparar una fórmula, cuyo poder edulcorante sea tal que produzca al enfermo repugnancia, no olvidando que este es más sensible a la repugnancia que un individuo sano.

#### 9.2.2.4. Potenciadores del sabor dulce

La denominación de "potenciadores", "reforzadores" o "exaltadores" del sabor no comporta una realidad fisiológica; únicamente reúne una serie de sustancias de naturaleza muy diversa y cuya actuación no es bien conocida.

Como potenciadores del sabor dulce se citan siete, ya mencionados, que se consideran sinérgicos con los alimentos edulcorantes y enmascaran los sabores posteriores de los edulcorantes artificiales. Estos son: maltol, etilmaltol, metilciclopentenolona, etilciclopentenolona, cinarina, ácido gimnémico y ácido clorogénico.

Los siete se emplean a dosis muy bajas modificando la percepción del sabor y del olor, mejorando e incrementando la percepción y contribuyendo a dar al medicamento un conjunto gusto-olor muy característico.

### 9.2.3. EL ENMASCARAMIENTO

Si después de haber edulcorado, nuestra fórmula farmacéutica mejorada, no es aún aceptable, debemos retroceder y precisar ciertos factores como el pH, la viscosidad, el poder adsorbente del medio, la fuerza iónica y utilización de enmascaradores.

El pH debe responder a ciertos imperativos para que la molécula medicamentosa sea activa, pero en la gama así determinada, el sabor regulará el valor que habrá que darle.

De la viscosidad ya hemos hablado al citar la sacarosa como edulcorante, pero para cada determinada preparación existe una viscosidad óptima. Es necesario que el medicamento pase sobre la lengua sin penetrar en los botones gustativos gracias a una suficiente viscosidad, pero hay que evitar que se "pegue" a la lengua por una gran viscosidad.

Hará falta preparar diluciones de viscosidad creciente jugando con el azúcar, los edulcorantes si fuera necesario y con los emulgentes: celulosas (carboxicelulosa, metilcelulosa, etc.); glicerina que aporta un sabor dulce y cálido; las gomas; el agar-agar; alginatos y carragenatos.

Se podrá así descubrir, gracias a los catadores, la o las mezclas mejor adaptadas.

Otro de los factores que intervienen es la posible adsorción del principio activo sobre el excipiente o el cambio de consistencia.

El poder adsorbente del medio puede también actuar solo, independientemente de la viscosidad y constituir un factor sobre el que actúa el aromatizador. Así para enmascarar una acidez muy fuerte, se adsorbe un edulcorante a una goma que fija los hidrogeniones.

Igualmente para corregir un sabor salado muy intenso debido a una disolución iónica, hace falta disminuir esta disociación sea por adición de "protectores" (jarabe de goma, extracto de malva, o de malvavisco), sea por adición de sustancias químicas.

Con este objeto, también son utilizadas las resinas cambiadoras de iones o las proteínas. Recuerdese la utilización habitual de leche para absorber medicamentos desagradables.

El reverso de la medalla es que hace falta asegurarse de la desadsorción de los principios activos sin la que no se produciría ningún efecto terapéutico.

La variación de la fuerza iónica es igualmente susceptible de modificar el sabor.

El cloruro sódico integrado en una preparación farmacéutica juega diversos papeles. Además de su sabor salado característico, es susceptible de modificar la sapidez del medio.

Todos sabemos que los cocineros añaden una pizca de sal para resaltar el sabor dulce de la pastelería sin provocar asco.

Igualmente a una concentración muy definida, enmascara el sabor amargo. Si a una solución amarga, se añaden cantidades crecientes de cloruro sódico, al

principio, el amargor disminuirá, para, por otra parte aumentar por una cantidad bien definida del producto.

Hace falta, por tanto, determinar para cada preparación la concentración óptima de cloruro sódico.

Para último lugar hemos dejado la utilización de enmascaradores. En esta categoría tenemos dos clases de sustancias:

- a) Las de fuerte aroma "cubriente" y que actúan como tales;
- b) Las que intervienen a nivel de las proteínas del gusto.

Ciertos productos, de aroma característico, actúan sobre otras fibras que las fibras gustativas; de hecho poseen un poder cubriente buscado por su amplitud.

Por ejemplo: el glicirricinato amónico: tiene un poder más elevado que el que parece a primera vista, puesto que es de 120. Su sabor dulce agregado de un sabor agradable aparece después de un cierto tiempo de latencia y persiste mucho tiempo en la boca. Es a ello a lo que debe el poder encubridor que buscamos.

El aceite esencial de clavo (trazas) y la corteza de canela de Ceylan (0,4g/100p/p) desarrollan una sensación de calor que encubre numerosas moléculas desagradables. El estragol (0,04/100) tiene un efecto enmascarador valioso; el mentol por el frío que procura se utiliza también (0,02/100) pero no actúa más que durante muy poco tiempo.

Por otra parte utilizan moléculas que bloquean las proteínas específicas. La miraculina extraída del *Synsepalum dulcificum* (Sapotacea), es una glucoproteína (P. mol. 44.000) que contiene de 6 a 7 por ciento de arabinosa y de xilosa. Aislada no tiene ningún sabor dulce, pero confiere tal sabor a los productos ácidos. Se piensa que se produce una saturación de los sitios de la percepción gustativa ácida, gracias a los agrupamientos funcionales particulares. No siendo posible la percepción ácida, la sensación dulce que se manifiesta sería una percepción de compensación; desgraciadamente esta molécula es muy inestable y debe conservarse en frío, lo que la hace poco manejable para un empleo industrial.

El *Eriodyctión*, intervendría bloqueando la proteína del amargo, teniendo además un ligero poder anestésico. El ácido gimnémico extraído de la *Gymnema sylvestris* y muy estudiado en el Japón alcanza a la vez el sitio del amargo y del dulce.

También se han estudiado: ácidos guanílico, inosínico, diversos nucleótidos. Por el ejemplo 5'purin-nucleótido enmascara el amargor, lo que hace que resurja el sabor dulce.

#### 9.2.4. CORRECCION DEL AMARGOR

El amargor es una sensación gustativa desagradable y molesta que pide ser corregida: por ello VERAIN, GATTEFOSSE y BIENVENUE [459], del Centre europeen de la

Recherche sur l'Aromatisation, estudiaron la forma de corregirlo. Para ello se pueden seguir tres vías diferentes, llegando a un resultado parecido:

- 1ª Actuar sobre el enfermo que va a absorber el medicamento amargo.
- 2ª Actuar sobre el medicamento o más bien sobre los principios activos responsables del amargor, realizando modificaciones de sus estructuras químicas.
- 3ª Elegir un factor-tampon que va a intercalarse entre el enfermo y el medicamento y va a jugar un particular papel: acompañar el amargor y hacerlo soportable o enmascararlo totalmente.

#### 9.2.4.1. Acción sobre el paciente

El problema no es sencillo, dada la gran extensión de la sensibilidad gustativa al amargor en un muestreo de población dada.

El problema va a consistir en impedir la propagación del influjo nervioso que transporta las informaciones gustativas hacia los centros superiores, bloqueando las terminaciones nerviosas a nivel de la lengua y del paladar. Para conseguir esto se puede poner en práctica dos técnicas:

##### *Anestesia local de la lengua y del paladar.*

Utilización de anestésicos superficiales, de duración corta: el efecto anestésiante actúa sobre las cuatro sensaciones gustativas. El sabor salado no es afectado más que débilmente.

Empleo del frío, sea directamente, sea gracias a sustancias que producen la sensación de frío (mentol). Las experiencias demuestran que la anestesia de la lengua y sobre todo del paladar aumentan de 5 a 6 veces los umbrales de ácido y de amargo.

Empleo del calor.

##### *Acción selectiva sobre los "mediadores" químicos responsables de informaciones nerviosas*

Varios trabajos [469 a 462] han permitido el aislamiento y la identificación de sustancias naturales con propiedades particulares orientadas a suprimir o transformar una sensación gustativa.

Así, en lo que concierne al gusto amargo se pueden citar dos plantas anteriormente citadas: *Gymnema sylvestris* y *Eriodictyon Glutiniosum* (Borraginaceas). En cuanto a la segunda, sus hojas facilitan una resina bajo forma de extracto fluido potásico, que se asocia enseguida a un aceite esencial natural (cardamomo o clavo) para solubilizarlo en la saliva. En cuanto a su modo de acción, se piensa que el extracto fluido de *Eriodictyon* solubilizado actuaría de manera electiva sobre las



papilas de la lengua, anestesiándolas y enmascarando así el sabor amargo característico de un cuerpo dado [463 a 466].

#### **9.2.4.2. Acción sobre los principios activos amargos**

Esta acción consiste en la modificación de la estructura de un compuesto amargo. Es una forma elegante de corregir el amargor, pero desgraciadamente esta operación está muy limitada. Se han realizado ensayos con algunos medicamentos amargos:

##### **a) Reacciones de esterificación o salificación.**

El cloramfenicol se ha transformado en el estearato o en el palmitato de cloramfenicol que tienen un carácter claramente menos amargo. La quinina cuyo etilcarbonato y el bisalicilato tienen un sabor muy débilmente amargo; en cambio el carbonato o el tanato de quinina son rigurosamente insípidos.

Los ésteres metílicos o etílicos del ácido cólico no son amargos, en cambio el colato sódico tiene un amargor insoportable, pero la sal cálcica es mucho menos amarga.

##### **b) Hidrólisis enzimática.**

Este es otro procedimiento de quitar el amargor; así por ejemplo la naringina del pomelo por hidrólisis enzimática sufre una rotura de la molécula dando un aglucon que no es amargo.

##### **c) Modificación de la estructura.**

Las modificaciones de la estructura propiamente dichas, actuando sobre la molécula base, se desarrollan poco actualmente por temor de una disminución de las propiedades farmacodinámicas fundamentales, o de desarrollo de una toxicidad para el hombre, lo que sería más peligroso.

#### **9.2.4.3. Acción de los factores extrínsecos.**

Existen algunos recursos para resolver la intervención entre el medicamento amargo y el individuo:

##### **a) Sencillos factores físicos:**

aumentar, por ejemplo, la viscosidad del medio, si se trata de una forma farmacéutica líquida.

b) Añadir un corrector de sabor:

estos correctores actúan gracias a sus propiedades gustativas agradables "enmascarando" así el sabor amargo desagradable de la sustancia activa y permitiendo una mejor tolerancia de parte de las papilas gustativas.

c) Añadir un aromatizante:

en el que se asocian un sabor agradable y un olor característico, conduciendo el conjunto a un complejo de sensaciones. Por tanto un aromatizante interviniendo a la vez sobre el gusto y el olfato actúa profundamente sobre el aroma del producto que acompaña.

#### 9.2.4.4. Correctores de sabor.

De una manera general los correctores del sabor deben cumplir un cierto número de condiciones:

- a) No deben ser tóxicos para el hombre.
- b) No deben ser incompatibles con los otros elementos del medio.
- c) Deben ser estables y conservar sus propiedades intrínsecas.
- d) Deben ser miscibles con el vehículo, lo que es primordial en las formas farmacéuticas líquidas.
- e) No deben influir sobre la eficacia terapéutica de los principios activos que componen el medicamento.
- f) Deben ser definidos en su naturaleza, su composición y sus normas cualquiera que sea su complejidad o la multiplicidad de sus componentes [467].

#### 9.2.4.5. Tecnología de la corrección

El Centre Europeen de Recherche sur l'Aromatisation de Grenoble [56] estudió la tecnología de la corrección del amargor. Pusieron a punto el método sobre una molécula sencilla; la elección del principio activo amargo coincidió con el elegido en Estados Unidos y en Francia como estandar del amargor: el clorhidrato de quinina.

Dosis incorporada: 5g/l jarabe 0,5%. la corrección del amargor por tanto se dirigía a un amargor tenaz y de fuerte intensidad cuyos efectos se perciben 30 minutos después de la toma del jarabe. Determinaron, para una solución acuosa de clorhidrato de quinina al 0,5 % / p / v el umbral de percepción que es de  $5 \cdot 10^{-7}$ g/ml y el umbral de reconocimiento del valor amargo:  $5 \cdot 10^{-6}$ g/ml.

Entre las diferentes formas farmacéuticas (sólidas o líquidas) se eligieron las segundas (solución, jarabe y tintura alcohólica), pero los ensayos se realizaron con jarabe por la importancia que representa actualmente en la terapéutica infantil.

EASTLAND y SHORT [465] fijaron las directrices que permitían abordar el problema de la corrección del amargor de una sustancia, que fueron las que el Centre aplicó al comenzar el trabajo:

a) Utilizar una sustancia de gusto agradable que posea un elemento gustativo que se encuentre en el principio activo que se quiere mejorar.[465] En este orden de ideas y operando con el jarabe de clorhidrato de quinina, que el Centro eligió como estándar del amargor, se hicieron ensayos con glicirricina, concentrado de frambuesa, esencia soluble de naranja, aceites esenciales concentrados asociados a tenso-activos y otros preparados aromáticos comerciales.

b) Incorporación de sustancias que producen una ligera anestesia de la lengua y del paladar. Entre las sustancias que se probaron en este grupo, aplicadas también al jarabe de clorhidrato de quinina, hay que destacar tres: el mentol, el estragol y la canela de Ceylan, que tienen unos sabores bastante fuertes, que finalizan por cansar al enfermo por tomas repetidas de su medicamento.

El *mentol*, utilizado en proporción de 0,02g en 100g de jarabe, además de sus cualidades gustativas y olfativas, aporta una sensación táctil de frescor localizada a nivel de la lengua, del paladar y de las fosas nasales, teniendo por efecto suprimir durante un lapso de tiempo muy corto, todas las impresiones gustativas y en particular el sabor amargo provocado por el clorhidrato de quinina.

El carácter fuertemente aromático del *estragol* (sabor tenaz a anís) junto al efecto anestésico sirve como un buen medio "enmascarador" del sabor amargo en proporción de 0,04g en 100g de jarabe de clorhidrato de quinina.

La *canela de Ceylan* asocia un aroma característico a una sensación táctil, el sabor de la canela es "cálido". Esta sensación persiste y "enmascara" todas las otras sensaciones gustativas, en una concentración de 0,4g por 100g de jarabe.

c) Modificar la viscosidad del medio. Científicos búlgaros (TOTEV y COL) [468] han elegido, a este efecto, la goma arábiga (*Acacia Verek*). Se podría también elegir otro polímero (carboximetilcelulosa). Se comprobó que se produce una disminución del amargor. La explicación del fenómeno no se ha dado de una manera segura: podría ser que el polímero forme una película protectora sobre la lengua y el paladar y aisle momentáneamente las papilas gustativas de los principios amargos. Se nota igualmente una disminución sensible del sabor dulce aportado por el jarabe, lo que confirmaría el carácter esencialmente mecánico del fenómeno.

Experimentalmente VERRAIN Y COL. [469, 470] encontraron que la disminución de la intensidad del sabor amargo del clorhidrato de quinina era efectiva con

una concentración de goma arábica igual a 35g por 100g de jarabe de clorhidrato de quinina.

El jarabe tiene una doble ventaja: cierta viscosidad por la concentración de azúcar y además sus propiedades edulcorantes, que constituyen un elemento apreciable en la lucha contra el amargor aunque el efecto "enmascarador" de una sustancia dulce sea sobrepasada por una de sabor amargo.

La viscosidad debida solo al jarabe es insuficiente para contrarrestar el amargor del principio activo. Hace falta incorporar al jarabe una sustancia coloidal, capaz, a débil concentración, de provocar un incremento notable de la viscosidad del medio.

No obstante las cantidades de polímeros que hay que incorporar son bastante importantes como en el caso de la goma arábica.

- d) Adición de sustancias salinas. Numerosos autores han preconizado el uso del cloruro sódico asociado a la sacarosa, para corregir el sabor amargo de una sustancia. El cloruro sódico no tiene un efecto directo sobre el amargor, pero disminuye por intermedio de la sacarosa; por tanto el cloruro sódico se le considera como "potenciador" sobre la sacarosa [465, 466].

En las experiencias efectuadas por el Centro sobre el jarabe de clorhidrato de quinina se puso en práctica dicho efecto incorporando el cloruro sódico a una concentración no mayor de 0,06g por 100g de jarabe y se vio que era capaz de disminuir el sabor amargo. Pero si la proporción es mayor de 0,06%, el efecto es negativo: reaparece el amargor primitivo y además desarrolla en el medio un sabor salado añadido al sabor amargo.

- e) Combinación de técnicas anteriores. Para ampliar las técnicas de corrección del amargor, el Centro utilizó simultáneamente dos y después tres de las técnicas preconizadas por EASTLAND y SHORT [465], es decir:

- 1.- Utilización de concentraciones moderadas de cloruro sódico.
- 2.- Incorporación de un mucílago en vista de acrecentar la viscosidad del medio.
- 3.- Adición de sustancias que posean un elemento sávido común con el clorhidrato de quinina (compuesto amargo aromático).

Se estudió la asociación de cloruro sódico y de goma arábica. La experiencia confirmó la hipótesis de que no se oponen uno al otro, por el contrario son complementarias; su asociación puede pensarse que es una sinergia de acción.

Experimentalmente se encontró que para una tasa de cloruro sódico de 0,06% es posible disminuir la concentración de goma arábica del 35 al 20% con un efecto de corrección del amargor análogo a cuando se utiliza solo la goma arábica al 35%. Además no hay ninguna incompatibilidad entre los componentes ni ninguna alteración del sabor.

Otras experiencias se realizaron así mismo con el jarabe de clorhidrato de quinina para corregir su amargor. Para ello, al jarabe se le añade goma arábiga, cloruro sódico y posteriormente distintos productos aromáticos comprobando que las técnicas preconizadas por EASTLAND y SHORT permiten una disminución notable del amargor del clorhidrato de quinina.

Pero independientemente de las técnicas descritas, que no son más que paliativos también se emplean técnicas físicas, a veces difíciles de realizar, como la micro-encapsulación y se ha podido pensar que la verdadera solución del delicado problema de las sustancias amargas ingeribles pudiera ser la utilización de la "proteína anti-amargor".

### 9.2.5. AROMATIZACION

Después de la corrección de la fórmula, o directamente, si no hubiera sido necesario edulcorarla o enmascararla, habrá que añadir un aroma que complete el proceso. Aroma que aportará el sabor y el olor conveniente, fuertemente condicionado por diversos factores (ambiente, hábitos o costumbres) [448].

El galénico, para aromatizar, tendrá una doble elección:

- Elegir el aroma más adecuado, dentro de la gama de productos que le ofrece la industria.
- Elegir la forma galénica del aroma.

La elección juiciosa de la forma galénica del aroma permitirá una fácil integración de la sustancia aromatizante a la fórmula. Por ejemplo: La industria, facilita el aroma de limón en diversas formas: aceite esencial, aceite esencial destemperado, aceite esencial soluble, concentrado, alcoholaturo, zumo, pasta, atomizado de zumo, atomizado de aceite esencial, microcápsulas de zumo o de aceite esencial y liofilizados.

Según que el galénico maneje una solución acuosa, alcohólica, oleosa o un polvo, etc., se elegirá una presentación diferente del aroma. El desarrollo de la "galénica de los aromas" hace que se amplíe la gama de productos aromáticos con arreglo a su forma galénica.

En la actualidad, es evidente que los gustos de cada país son más o menos respetados, pero estos gustos evolucionan. También hay que tener en cuenta las categorías de enfermos a que van dirigidas las fórmulas galénicas:

- a) Colectivo de niños.
- b) Colectivo de adultos.
- c) Colectivo de personas de edad avanzada.

Porque cada uno de ellos tiene sus preferencias según las circunstancias y aplicaciones terapéuticas (antipiréticos, reconstituyentes, etc.).

La aromatización consiste muy frecuentemente en añadir al medicamento cuidadosamente elaborado un aromatizante de composición y de estabilidad poco conocidos, pero capaz de modificar el conjunto por incompatibilidad o de modificarse él mismo por su fragilidad y su volatilidad a través de las operaciones tecnológicas o en el curso de la vida del medicamento.

Ciertamente es difícil de hablar de estabilidad en materia de aromas, porque las sensaciones percibidas son debidas a una pérdida en principios aromáticos.

No obstante la fijación sobre "soportes" o el grajeado mejoran considerablemente el comportamiento de los aromatizantes frente a los agentes exteriores (oxígeno, temperatura, excipientes, principios activos, etc.).

En la actual tecnología se consideran de gran importancia. BASQUIN y TRAISNEL [471] estudiaron la estabilidad de los aromatizantes de las formas galénicas sólidas en función del soporte.

Podemos contemplar dos tipos de soportes, los naturales y los artificiales.

Los soportes naturales de los aromas, en general son factores de inestabilidad: así los terpenos ¿son responsables de una autooxidación perjudicial?

En la actualidad se sabe que los compuestos aromáticos son muy frecuentemente productos de reacciones bioquímicas cuyas interacciones con uno u otro compuesto crean una sensación; por ejemplo:

Almidón + proteína + ac. ribonucleicos ---> insípido

Glucosa + proteína + A.R.N. ---> dulce

Glucosa + aminoácidos + A.R.N. ---> frutado

Las combinaciones glucosa-aminoácidos dan productos volátiles olorosos por reacciones enzimáticas, son precursores de aromas y retirados de su medio natural se transforman rápidamente en calidad, en intensidad y en cantidad.

Según BASQUIN y TRAISNEL [471] se puede hablar difícilmente de la estabilidad de los aromas de "frutos rojos" (que ellos estudiaron), estando la producción de aromatizantes limitada por la duración de la vida de los "soportes", y variable en cantidad y calidad según las alteraciones de estos soportes y los fenómenos de oxidación, la volatilidad, la terapéutica, etc.

Los aromatizantes líquidos, cada vez más, ceden el sitio a los aromatizantes en polvo; porque las formas galénicas sólidas sustituyen poco a poco a las formas líquidas: el jarabe se transforma en un granulado para jarabe y la preparación terminada se convierte en una mezcla extemporánea.

Los polvos se prestan de manera ideal a la aromatización, ofreciendo numerosas ventajas:

- Mejor manipulación en sus mezclas.
- Repartición más homogénea en el producto terminado.
- Aumento de la estabilidad.
- Hidrodispersables generalmente.

La elaboración de los polvos se efectúa de diferentes maneras:

Primeramente se pensó en eliminar el agua o el vehículo preparando nebulizados y liofilizados. Estos productos bastante higroscópicos no tienen una gran estabilidad al usarlos; no obstante su almacenamiento en buenas condiciones parece bastante satisfactorio.

Posteriormente, los aromatizantes se fijaron o adsorbieron sobre diversos soportes sólidos, o grajeados o encapsulados con soportes apropiados y por último microencapsulados.

Se habla de *adsorción* de un líquido sobre un soporte sólido, cuando este recibe el aromatizante líquido sobre su superficie o en sus poros; esta retención tiene lugar según un proceso estudiado por NILSSON [472] (fig. 11) que puede ser mecánico (I) tal como la goma arábiga, eléctrico (II) y químico (III), tal como el almidón.

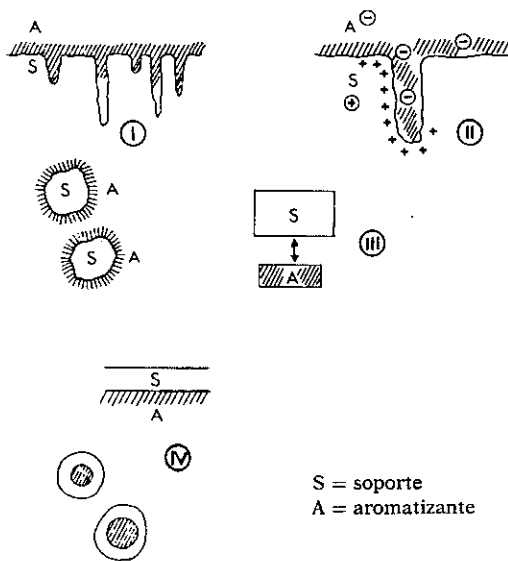


Fig. 11

- I. Mecánico, como la goma arábiga.
- II. Eléctrico.
- III. Químico, como el almidón.
- IV. Encapsulado.

El soporte debe proteger eficazmente al aromatizante durante el almacenamiento, reducir su volatilidad y fijar lo más posible sus cualidades antes de la fabricación y durante la vida del medicamento.

STAMM y MATHIS [473] estudiaron la acción benéfica o desfavorable de ciertos adsorbentes sobre el contenido en principios volátiles de diversos comprimidos y destacaron la primordial influencia de la "superficie específica" (obtenida por permeametría).

El aromatizante líquido puede encapsularse (fig. 10; IV) y estará tanto mejor protegido cuando su aislamiento en el interior de la cápsula sea total sin que haya comunicación con el exterior.

Se elaboran aromas encapsulados por "desechado" de emulsiones del tipo: goma líquida/propilenglicol/azúcar/aromatizante.

El "desechado" puede obtenerse:

- a) Por nebulización, en cuyo caso la cápsula es porosa; la volatilidad disminuirá, pero no se suprime ("Spray Dry").
- b) Por intermedio de almidón (Dry Flo), que absorbe el agua de la emulsión y constituye, con el emulgente macromolecular una capa no porosa, en el seno de la cual se encuentra el aromatizante líquido.

Se denomina "encapsulación" cuando el líquido está encerrado en una cápsula, protegido así de influencias exteriores: oxidación, calor, humedad, reacción con principios activos, excipientes o contenidos.

Se pueden preparar "emulsiones secas" por nebulización de una emulsión: goma líquida/propilenglicol/glucosa/aroma y se obtiene un "aroma en polvo" cuyas partículas son esféricas ( $\Phi$  5-50 micrones). (Permaseal, Givaudan, Esrolko).

La casa Roche prepara, por el mismo procedimiento, una emulsión del mismo tipo, desecando sobre almidón una mezcla de glicéridos de los ácidos grasos/aroma o también propilenglicol/goma/aroma ("Dry Flo").

Las "pulvessences" de la casa Gatefosse son aceites esenciales grajeados en polisacáridos. Los "polvaromas" son aceites esenciales cuyo perfume está fijado por un soporte adsorbente que sirve de medio de dispersión, obteniendo por tanto polvos dispersables en el agua que libera el aceite esencial bajo forma micelar.

Con estos procedimientos se obtiene un "aroma sólido" cuya estabilidad es muy grande pero la liberación del aroma en el momento de su utilización es problemática.

Este panorama de técnicas de adsorción, de grajeado y de encapsulación de los aromatizantes nos conduce a pensar que en todos los casos se habrá aumentado su estabilidad (protección del aroma contra los agentes exteriores, reducción de la volatilidad, incompatibilidades evitadas).

Pero la naturaleza del soporte y el modo de preparación utilizada, condicionan el comportamiento y la resistencia de estos aromatizantes a las operaciones



tecnológicas, así como la dispersión del aroma en el momento de la toma del medicamento.

La aromatización de un sólido dividido o no (polvo o comprimido) supone un estudio previo al de la estabilidad del aromatizante en función del soporte sólido previsto.

## 9.2.6. AROMATIZACION Y BIODISPONIBILIDAD

Si la aromatización de un medicamento aparece como una etapa de la fabricación, la incorporación de un aromatizante en un momento determinado es, en realidad, más complejo de lo que parece [474]. En efecto, la eventual edulcoración, la corrección o el enmascaramiento del sabor desagradable y la aromatización propiamente dicha son etapas que se encuentran confrontadas a exigencias contradictorias [475]:

- Hay que tener en cuenta las incidencias fisicoquímicas, tecnológicas, psíquicas y fisiológicas sobre las interacciones susceptibles de aparecer a nivel de las relaciones entre el principio activo y el aromatizante.
- Hace falta que el aroma se conserve integralmente en calidad y en cantidad y que su liberación sea total e inmediata en el momento de su utilización.
- Es necesario que la aromatización salvaguarde la biodisponibilidad del medicamento.

Se impone una revisión del concepto de calidad para garantizar la eficacia terapéutica; el control de calidad debe completarse con ensayos que garanticen que el principio activo está disponible para la absorción por el organismo, es decir biodisponible.

La biodisponibilidad se funda en la medida de la cantidad de principio activo que aparece en la sangre y los tejidos, así como la velocidad de absorción. Según COHEN [476] es la propiedad de una especie química de encontrarse en un medio biológico después de atravesar muchas barreras biológicas. La biodisponibilidad se caracteriza por el valor máximo de la fracción de la dosis administrada que alcanza la circulación general y por la velocidad a la cual se alcanza este valor máximo.

LEVY y NELSON en 1.961 precisaron que la administración de un producto bajo diferentes formas podría modificar el plazo de aparición, la duración y la intensidad de su acción. La evaluación de la biodisponibilidad forma parte integrante de la investigación de una eficacia terapéutica.

Abordar la biodisponibilidad de un medicamento es por tanto seguir su evolución o seguir las etapas de su recorrido por el organismo. Para cumplir su misión alcanza un sitio receptor; la molécula contenida en una forma farmacéutica deberá liberarse y franquear los obstáculos que el organismo opone a toda sustancia extraña.

El principio activo procedente de la síntesis química o de la extracción de materias primas naturales, llega al laboratorio que deberá fabricar un medicamento, es decir, una forma farmacéutica asegurando su estabilidad y biodisponibilidad.

En el curso de esta etapa en que interviene la aromatización, TRAISNEL [474] estudió las relaciones con la biodisponibilidad.

#### 9.2.6.1. Incidencias tecnológicas.

Entre las diferentes características fisicoquímicas de un medicamento, algunas van a condicionar la absorción por la membrana.

a) La volatilidad.

Pueden provocarse modificaciones de la volatilidad por interacciones entre moléculas, olorosas, dando lugar a un aumento o debilitamiento del poder oloroso o también la creación de nuevas moléculas susceptibles de modificar el olor.

b) La solubilidad.

Para atravesar la membrana de naturaleza lipídica, la molécula de producto debe disolverse y por tanto presentar una cierta lipofilia. El principio activo estará caracterizado por un coeficiente de reparto aceite/agua. La biodisponibilidad del aromatizante será por tanto función de su coeficiente de reparto, pero la adición de un aromatizante a un producto peligra el que se modifique el coeficiente de reparto de este último.

c) La velocidad de disolución.

Obedece a la ecuación de NOYES en la que la cantidad de principio activo disuelto es proporcional a la superficie de las partículas. Además la velocidad de disolución será mayor cuanto las partículas sean más pequeñas. Por tanto la pulverización fina aumenta considerablemente la disponibilidad: el aroma se desarrolla más cuanto mayor es la superficie de la sustancia aromatizante.

d) El estado de ionización y naturaleza de la sal.

Si el principio activo es una molécula de carácter polar débil o nulo, será lipófilo y franqueará fácilmente la membrana lipídica que constituye la barrera celular. Pero si la molécula está fuertemente polarizada, o ionizada, la penetración a través de la membrana celular será influenciada por la carga iónica y la talla de la molécula. El paso por simple difusión se limita a los aniones o cationes de débil dimensión, es decir de talla inferior a 108.

Estas características se aprovechan frecuentemente para modificar el sabor de un medicamento y mejorar su aceptabilidad.

El grado de ionización es generalmente importante cuando únicamente es absorbida la forma no ionizada, más lipófila.

### 9.2.6.3. La formulación.

Por su influencia no despreciable, ciertos excipientes (estearatos, gomas, derivados de la celulosa, etc.) considerados como sustancias inertes no intervienen en la actividad terapéutica, peligran modificar la biodisponibilidad del principio activo.

Cierto número de interacciones entre principios activos y excipientes pueden obstaculizar la absorción. El aromatizante puede ser considerado como principio activo o como excipiente [477].

El soporte debe proteger eficazmente al aromatizante durante la conservación hasta el empleo del medicamento.

En regla general la fijación o la inclusión de un aromatizante en un soporte sólido favorece su estabilidad y los aromatizantes fijados por ligandos covalentes se benefician de una mayor estabilidad en un soporte poroso en relación con la inclusión mecánica.

### 9.2.6.3. Incidencias psico-fisiológicas.

La experiencia demuestra que el agrado llevado a la nutrición es tan importante para el psiquismo, como el aspecto nutricional lo es para el organismo [474].

La influencia de los caracteres organolépticos puede ponerse en evidencia por los ensayos de degustadores como los de la empresa HAARMANN y REIMER haciéndoles identificar un aroma simple combinado con diferentes colores.

Cuando se estudia la influencia de las propiedades físicas del azúcar sobre el poder edulcorante, se comprueba que la sensación azucarada depende de la concentración, pero también de la naturaleza física del azúcar.

Se ha emitido la hipótesis de que la textura influye sobre la cantidad de sustancia sávida que llega a los nervios gustativos en un tiempo determinado. En efecto, el espesamiento de una solución perturba la difusión de las moléculas y puede por tanto modificar las impresiones.

Diversos estudios demuestran la importancia del medio acuoso para el desarrollo del gusto; el paso por el organismo en medio acuoso es una condición para que el producto sea percibido. En solución oleosa, las sustancias aromatizantes penetran menos deprisa y todo ocurre como si debiera disolverse en la saliva.

Estas incidencias nos permiten encontrar los parámetros de la biodisponibilidad: la solubilidad en el agua es de la mayor importancia incluso si la solubilidad en el aceite está en favor de una mejor disponibilidad; el gusto amargo más bien parece transmitido por la solución acuosa, que por una solución oleosa; cuanto más elevado es el contenido en grasa hace falta aumentar más la dosificación del aromatizante para alcanzar la intensidad necesaria a una aromatización óptima.

Para terminar, deseo rogaros que cuanto toméis un medicamento de sabor agradable, parecido al de un refresco; saboreéis un apetitoso alimento, como un queso de olor y sabor característico, o paladeéis una copa de jerez, tengáis un grato recuerdo de este Maravilloso mundo de los aromas.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] TREMOLIERS, J., SERVILLE, Y., JACQUOT, R. Y DUPIN, H. (1980). "Manuel d'alimentation humaine. I. Les bases de l'alimentation". Les editions E.S.F. Paris.
- [2] BROBECK, KENNEDY, ANAND, tomado de la obra de VIVANCO, F., PALACIOS, J.M. Y GARCIA ALMANSA, A. (1982). "Alimentación y Nutrición". Edita Ministerio de Sanidad y Consumo. Dirección General de Salud Publica. (Programa de Educación en Alimentación y Nutrición).
- [3] BRILLAT SAVARIN, A. (1939). "Fisiología del gusto". Ed. Losada. Buenos Aires.
- [4] FENNEMA, O.R. (1982). "Introducción a la ciencia de los alimentos". 2º Vol. Ed. Reverté. S.A. Barcelona.
- [5] CHEFTEL, J.C., CHEFTEL, H. Y BESANCON, P. (1982). "Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos". 2º Vol. Ed. Acribia. Zaragoza.
- [6] BAUDIS, S. (1981). "Química de los alimentos". Ed. Alhambra Mexicana S.A. Mexico.
- [7] FOUGERE, P. (1977). "Olfaction et sentiment". *Riv. Ital. Ess. Prof. Piante*. Enero. 36-38.
- [8] SADINI, V. (1973). Le basi dell'analisi organolettica degli alimenti 2. L'odore. *Industrie alimentari* XII. 12, 66-75.
- [9] VEYLON, R. (1973). "Parfums, perceptions et contexte socio-culturel". *La Nouvelle Presse Medicale*. Dic. 3129-3132.
- [10] HEIMERMANN, M. (1973). *Parfums, cosmetiques et savons de France* 3. 258-270.
- [11] HAAGEN-SMIT, A.J. (1952). "Olfato y gusto". Págs. 11-16.
- [12] GRAZIADI, P.P.C. (1969). "The ultrastructure of vertebrate taste buds". Tomado del C. PFFAFMAN, "Olfaction and Taste". *Proceedings of the third International Symposium*. New York, Rockefeller University. 315-330.
- [13] MURRAY, R.G. (1971). "Ultrastructure of taste receptors". T. Tomado del L.M. BEIDLER, *Handbook of Sensory Physiology*, Vol. IV Chemical Senses, Sección 2: Taste, Springer-Verlag, New York. 31-50.
- [14] MIRTA CALVIÑO, A. (1987). Información facilitada por CARBALLIDO, A.
- [15] VERRAIN, A., GATTEFOSSE, M. Y BIENVENUE, G. (1985). "Contribution a l'etude de l'amertume et de ses correctifs". Tomado de G.FENAROLI "Aromatizzazione". Ed. Pirola. 2ª edición. Milán. Págs. 453-459.
- [16] MONTASTRUC, P. (1980). "La gustation". *Rev. Med. Toulouse* XVI, 185-192.
- [17] BEIDLER, L.M., NEJAD, M.S., SMALLMAN, R.L. Y TATEDA, H. (1960). "Rast taste cell proliferation". *Fed. Proc.* 19, 302.

- [18] DE LORENZO, A.J. (1963). "Studies on the ultrastructure and histophysiology of cell membranes, nerve fibers and synaptic functions in chemoreceptors". Tomado del Y. ZOTTERMAN, "Olfaction and Taste". *Proceedings of the First International Symposium*. Mac Millan, New York. 5-18.
- [19] BEIDLER, L.M. Y SMALLMAN, R.S. (1956). "Renewal of cells within taste buds" *J. Cell. Biol.* 27. 263-272.
- [20] GUIRAO, M. (1980). "Los sentidos. Bases de la percepción". Ed. Alhambra. Madrid. Págs. 280-313.
- [21] HENKIN, ROBERT, I., GRAZIADEL, J.P.G., BRADLEY DAN F., (1969). *Ann. Intern. Med.* 71 (4) 791-821.
- [22] SADINI, V. (1973). Le basi dell'analisi organolettica degli alimenti. 1° il gusto. *Industrie alimentari XII*, 10; Octubre, 107-119.
- [23] CAGAN, R.H. (1971). "Binding studies of taste sensation. I. Binding of [<sup>14</sup>C] labeled sugars to bovine taste papillae". *Biochim. Biophys. Acta.* 252, 199-206.
- [24] KRUEGER, J.M. Y CAGAN, R.H. (1976). "Biochemical studies of taste sensation. Binding of L - [<sup>3</sup>H] alanine to a sedimentable fraction from catfish barbel epithelium" *J. Biol. Chem.* 251, 1. 88-97.
- [25] VILLANÚA, L. (1986). "Edulcorantes". Tomado del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. "Los aditivos en la Industria Agroalimentaria (C.I.I.A.)". Simposio Internacional. Madrid. Págs. 137-158.
- [26] SHALLENBERGER, R.S. Y ACREE, T.E. (1967). "Molecular Theory of Sweet Taste". *Nature*, 216, 480-482.
- [27] SHALLENBERGER, R.S. (1971). "Gustation and olfaction". Ed. Ohloof and Thomas. Academic. Press. New York.
- [28] KIER, L.B. (1972). "A Molecular theory of sweet taste". *J. Pharm. Sci.* 61, 1394-1397.
- [29] SHALLENBERGER, R.S. Y LINDLEY, H.G. (1977). "A lipophilic-hydrophobic attribute and component in the stereochemistry of sweetness". *Fd. Chem.* 2, 145.
- [30] TEMUSSI, P.A., LELY, F. Y TANCREDT, T. (1978). "Three dimensional mapping of the sweet taste receptor site". *J. Med. Chem.*, 21, 1154-1158.
- [31] BUSSIÈRE, G. (1986). Tomado del libro de MULTON, "Aditivos y auxiliares tecnológicos en las industrias agro-alimentarias". Ed. Acribia. Zaragoza.
- [32] FAURION, A., SALTOS Y MACLEOD, P. (1980). *Chemical senses*, 5, 2, 107-121.
- [33] HERAUD, G. (1986). *Cah. Nutr. Diet*, XXI. 65-70.
- [34] BIRCH, G.C. Y LEE, C.K. (1979). Tomado de Hough, C.A.M. "Development in sweeteners". Appl. Science Publishers. Págs. 165-187.
- [35] HERAUD, G. (1981). "Edulcorants non glucidiques d'origine vegetal". *Ann. Fals. Exp. Chim.* 74, 802, 605-612.
- [36] MAC LEOD, P. (1976). "Les bases physiologiques de l'analyse sensorielle". Ed. A.P.R.I.A. París.

- [37] HARTRIDGE, H. (1.945). "The importance of taste and smell in nutrition". *J. Physiology*. París. 103, 34-35.
- [38] FISCHER, R. (1.971). "Gustatory behavioral, and pharmacological manifestations of Chemoreception in man". Tomado del G. OHLOFF y A.F. THOMAS, "Gustation and Olfaction", Academic Press. New York. Págs. 187-237.
- [39] DASTOLI, F.R., LOPIEKES, D.V. Y DOIG, A.R. (1.968). "Bitter-sensitive protein from porcine taste-buds". *Nature*, 218, 884.
- [40] KURIHARA, K. Y KOYAMA, N. (1.972). "High activity of adenylic cyclase in olfactory and gustatory organs". *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, 48, 30.
- [41] PRICE, S. (1.972). "Phosphodiesterase in tongue epithelium: activation by bitter taste stimuli". *Nature*, 241, 54-55.
- [42] KURIHARA, K. (1.972). "Inhibition of cyclic 3'5' nucleotide phosphodiesterase in bovine taste papillae by bitter taste stimuli". *FEBS Letters*, 27, Págs. 274-281.
- [43] PRICE, S. (1.974). "Chemoreceptor proteins in taste cell stimulation". Tomado del T.M. POYNDR "Transduccion mechanisms in chemoreception". Information Retrieval, Ltd. Londres. Pág. 177.
- [44] HALL, M.J., BARTOSHUK, L.M., CAIN, W.S. Y STEVENS, J.C. (1.975). "PTC taste blindness and the taste of Caffeine". *Nature*, 253, 442.
- [45] DE SIMONE, J.A. Y PRICE, S. (1.976). "A model for the stimulation of taste reception cells by salt". *Biophys. J.* 16, 869-880.
- [46] KURIHARA, K., KOYAMA, N. Y KURIHARA, Y. (1.972). "Chemical architecture and model system of gustatory and olfactory receptor membrane". Tomado de D. SCHENEIDER. "Olfaction and Taste". *Proceedings of the Fourth International Symposium*, Verlag, Stuttgart. 234.
- [47] BEIDLER, L.M. (1.954). "A theory of taste stimulation". *J. Gen. Physiol.* 38. 133-139.
- [48] KAMON, N., MIYAKE, M., KURIHARA, K. Y KOBATAKE, Y. (1.974). "Physicochemical studies of taste reception. II. Possible mechanism of generation of taste receptor potential induced by salt stimuli". *Biochim. Biophys. Acta.* 367. 1.
- [49] KOYAMA, N. Y KURIHARA, K. (1.972). "Receptor site for sour stimuli". *Nature*. 239. 459.
- [50] KAMO, N., MIYAKE, M., KURIHARA, K. Y KOBATAKE, Y. (1.974). "Physicochemical studies of taste reception. I Model membrane simulating taste receptor potential in response to stimuli of salts, acid and distilled water. *Biochim. Biophys. Acta.* 367. Pág. 1.
- [51] MIYAKE, M., KAMO, N., KURIHARA, K. Y KOBATAKE, Y. (1.975). "Physicochemical studies of taste reception IV Reponse of individual phospholipid membranes to a variety of chemical stimuli". *J. Memb. Biol.* 22. 197.
- [52] ROUZET, M., TRAISNEL, M. Y VERAINE, A. (1.974): "Vocabulaire en 6 langues de quelques termes utilisés en aromatisation". *Revista Italiana Essenze Profumé, Pianta Officinali. Aromi. Saponi. Cosmetici. Aerosol.* LVI, 168-179.
- [53] REAL ACADEMIA ESPAÑOLA (1.970): Diccionario de la lengua española. Impr. Espasa Calpe. Madrid.
- [54] PRESIDENCIA DEL GOBIERNO: Decreto 2484/1.967 de 21 de Septiembre B.O.E. nº 248 a 253 de 17 a 23 de Octubre. Código Alimentario Español.

- [55] PRESIDENCIA DEL GOBIERNO: Reglamentación Técnico Sanitaria de Agentes aromáticos para alimentos. Decreto 406/1.975 de 7 de marzo B.O.E. 12 de marzo 1.975. Real Decreto 1771/1.976 de 2 de julio B.O.E. 28 de julio 1.976.
- [56] FENAROLI, G. (1.985): "Aromatizzazione". 2ª de. Ed. Pirola. Milán
- [57] BELITZ, H.D. Y GROSCH, W. (1.988): "Química de los alimentos". Ed. Acribia. Zaragoza.
- [58] DRAWERT, F. (1.975): Proc. Int. Symp. Aroma Research Zeist - Pudoc Washington. Pág. 13.
- [59] PEYRON, L. (1.985): Rôle des enzymes dans la formation de l'arôme des produits alimentaires. Tomado del FENAROLI, G. - Aromatizzazione. Ed. Pirola. Milán. Págs. 291-301:
- [60] SCHUTTE, L. (1.975): Handbook of Flavour ingredients 2ª ed. C.R.C. Tomado del G. Fenaroli, "Handbook of flavour ingredients". 2ª ed. Vol I. C.R.C. Press. Inc. U.S.A. Pág. 133.
- [61] TRESSL, R. Y DRANWERT, F. (1.973): "Biogenesis of Banana Volatiles". *J. Agr. Food. Chem.* 21, 560.
- [62] FENAROLI, G. (1.938): "Sostanze Aromatiche Isolate e Sintetiche. Ed. Hoepli.
- [63] FENAROLI, G. (1.963): "Sostanze Aromatiche Naturali. Ed. Hoepli.
- [64] BERNFELD, P. (1.963): "Biogenesis of Natural Compounds". Pergamon Press.
- [65] FUYITA, Y. (1.951): "Fundamental Studies of essential oils". Ogawa Perfume. Tokyo.
- [66] PARIS, R. (1.976): *Parfums, cosmétiques, aromes.* 12, 65-71.
- [67] HANEKOT, T. (1.962): *Chem. Pharm. Bull. Jap.* 10, 1085.
- [68] SHAHANI, K., ARNOLD, R.G., KILARA, A. Y DWIVEDI, BK. (1.976): Biotechnology and Bioengineering vol. XVIII, Págs. 891-907. Ed. J. Willey Sons.
- [69] BASANT, K., DWIVEDI, B.K. : "The role of enzymes in foods". Citado en Fenaroli, "Handbook of flavor ingredients". C.R.C. Press Inc. (U.S.A.).
- [70] MAILLARD, L.C. (1.912): *Comp. Rend. acad. Sci. París.* 154 66.
- [71] HODGE, J.E. (1.953): "Browning Reactions theories Integrated in Review. Dehydrated Foods Chemistry of Browning Reactions in Model Systems". *J. Agr. Food. Chem.* 1, 15, 928-943.
- [72] PEYRON, L. (1.985): Les aromatisants dérivés de la réaction de Maillard. Tomado del FENAROLI, G. Aromatizzazione. Ed. Pirola. Milán. Págs. 251-266.
- [73] SANDERSON, G.W. Y GRAHAM, H.N. (1.973): "On the formation of Black Tea Aroma". *J. Agr. Food. Chem.* 21, 576-585.
- [74] JENNINGS, WG., TRESSL, R. (1.974): Production of volatile compounds in the ripening bartlett pear. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 3, 52.
- [75] MAGA, J.A. (1.978): "Simple phenol and phenolic compounds in food flavor". *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 10, 323.
- [76] MAGA, J.A. (1.979): "Furans in foods". *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 11, 355.
- [77] MAGA, J.A. (1.976): "Lactones in foods". *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 8,1.

- [78] CARBALLIDO, A., VILLANUA, L., VALDEHITA, M.T. Y ROBISCO, M<sup>a</sup> A. (1.974): "Determinación cuantitativa de pirazinas en alimentos". *Anal. Bromatol.* XXVI, 4, 391-420.
- [79] IRVINE, J.C., THOMSON, R.R. Y GARRETT, C.S. (1.913): *J. Chem. Soc.* 23.
- [80] HOUGH, L., JONES, J.K. Y RICHARDS, E. L. (1.952): "The reaction of amino-compounds with sugars. Part I. The action of Ammonia on D-Glucose". *J. Chem. Soc.* 3854-3857.
- [81] WIGGINS, L.F. Y WISE, W.S. (1.955): "Some preliminary observations on the nature of ammoniated molasses". *Chem. Ind.* 4, 656-657.
- [82] DAVIDSON, B.K., WIGGINS, L.F. (1.956): "Pyridine and Pyrazine bases from sugars". *Chem. Ind.* 22, 982-983.
- [83] HODGE, J.E. (1.953): "Browning reaction theories integrated in review. Dehydrated foods chemistry of browning reactions in model systems". *J. Agr. Food. Chem.* 1, (15) 928-943.
- [84] DAWES, I.W. Y EDWARDS, R.A. (1.966): "Methyl-substituted pyrazines as volatile reaction products of heated aqueous aldose-aminoacid mixtures". *Chem. ind.* 22, 982-983.
- [85] VAN PRAAG, M., STEIN, H.S. Y TIBBETTS, M.S. (1.968): "Steat volatile aroma constituents of roasted cocoa beans". *J. Agr. Food. Chem.* 16, 6, 1005-1008.
- [86] KOEHLER, P.E., MASON, M.E. Y NEWELL, J.A. (1.969): "Formation of pyrazine compounds in sugar-aminoacid. Model systems". *J. Agr. Food. Chem.* 17, 2, 393-396.
- [87] KOEHLER, P.E. Y ODELL, G.V. (1.970): "Factors affecting the formation of pyrazine compounds in sugar-amine reactions". *J. Agr. Food. Chem.* 18, 895-898.
- [88] REICHSTEIN, R. Y STUDINGER, H. (1.082): British Patent. Págs. 260-960.
- [89] VIANIR, R., MUGGLER-CHAVAN, F., REYMOND, D. Y EGLI, R.M. (1.965): "Sur la composition de l'arôme de café". *Helv. Chim. Acta.* 48, 7, 1809-1815.
- [90] REYMOND, D., MUGGLER-CHAVANE, F., VIANI, R., UVATZ, L. Y EGLI, R.M. (1.966): *J. Gas. Chromatogr.* 4, 28.
- [91] GIANTURCO, M.A. Y FRIEDEL, P. (1.963): "The synthesis of some cyclic diketones isolated from coffee". *Tetrahedron.* 19, 2039-2059.
- [92] GIANTURCO, M.A., GIAMMARINO, A.S., FRIEDEL, P. Y FLANAGAN, V. (1.964): "The volatile constituents of coffee. III. The structures of two heterocyclic compounds and the synthesis of tetrahydrofuranones". *Tetrahedron.* 20, 1763-1772.
- [93] GIANTURCO, M.A., GIAMMARINO, A.S., FRIEDEL, P. Y FLANAGAN, V. (1.964): "The volatile constituents of coffee: Furanic acid pyrrolic compounds". *Tetrahedron.* 20, 2951.
- [94] GIANTURCO, M.A., GIAMMARINO, A.S. Y FRIEDEL, L.P. (1.966): "Volatile constituents of coffee". *Nature.* 210, 1358.
- [95] GIANTURCO, M.A., FRIEDEL, P., KRAMPL, V., RADFORD, R., RENNER, J.A. Y SHEPHARD, F.W. (1.971): "Constituents of the aroma complex of coffee". *J. Agr. Food. Chem.* 19, 3, 530-532.
- [96] GOLDMAN, I.M., SEIBL, J., FLAMENT, I., GAUTSCHI, F., WINTER, M., WILLHALM, B. Y STOLL, M. (1.967): "Sur l'arôme de café. II. Pyrazines et piridines". *Helv. Chim. Acta.* 50, 2, 694-705.



- [97] BONDAROVICH, H.A., GIAMMARINO, A.S., RENNER, J.A., SHEPHARD, F.W., SHINGLER, A.J. Y GIANTURCO, M.A. (1.967): "Some Aspects of the Chemistry of tea. A contribution to the knowledge of the volatile constituents". *J. Agr. Food. Chem.* **15**, 36-47.
- [98] BONDAROVICH, H.A., FRIEDEL, P., KRAMPL, V., RENNER, J.A., SHEPHARD, F.W. Y GIANTURCO, M.A. (1.967): "Volatile constituents of coffee. Pyrazines and other compounds". *J. Agr. Food. Chem.* **15**, 5, 1093-1099.
- [99] FRIEDEL, P., KRAMPL, V., RADFORT, RENNER, J.A., SHEPHARD, F.W. Y GIANTURCO, M.A. (1.971): "Some constituents of the aroma complex of coffee". *J. Agr. Food. Chem.* **19**, 3, 530-532.
- [100] DIETRICH, P., LEDERER, E., WINTER, Y STOLL, M. (1.964): "Sur l'arôme du cacao. I". *Helv. Chim. Acta.* **47**, 6, 1581-1590.
- [101] RIZZI, G.P. (1.967): "The occurrence of Simple Alkylpyrazines in cocoa butter". *J. Agr. Food. Chem.* **15**, 3, 549-551.
- [102] FLAMENT, I., WILLHALM, B. Y STOLL, M. (1.967): "Sur l'arôme du cacao. III". *Helv. Chim. Acta.* **50**, 8, 2233-2243.
- [103] VAN DER WAL, B., KETTENES, D. K., STOFFELSMA, J., SIPMA, G. Y SEMPER, A., TH.J. (1.971): "New volatile Components of roasted cocoa". *J. Agr. Food. Chem.* **19**, 2, 276-280.
- [104] REINECCIUS, G.A., KENEY, P.G. Y WEISSBERGER, W.I. (1.972): "Factors affecting the concentration of Pyrazines in cocoa-beans". *J. Agr. Food. Chem.* **20**, 2, 202-206.
- [105] MASON, M.E., JOHNSON, B. Y HAMMING, M. (1.966): "Flavour components of roasted peanuts. Some Low Molecular Weight Pyrazines and Pyrrole". *J. Agr. Food. Chem.* **14**, 5, 454-460.
- [106] MASON, M.E., JOHNSON, B. Y HAMMING, M.C. (1.967): "Volatile components of roasted peanuts. The major monocarbonyl and some monocarbonyl components". *J. Agr. Food. Chem.* **15**, 1, 66-73.
- [107] NEWELL, J.A., MASON, M.E. Y MATLOCK, R.S. (1.967): "Precursor of typical and typical roasted peanuts flavour". *J. Agr. Food. Chem.* **15**, 5, 767-772.
- [108] FERRETI, A., FLANAGAN, V.D. Y RUTH, J.M. (1.970): "Nonenzymatic browning in a Lactose-casein model system". *J. Agr. Food. Chem.* **18**, 1, 13-18.
- [109] FERRETI, A. Y FLANAGAN, V.P. (1.971): "Volatile constituents of whey Powder subjected to accelerated Browning". *Dairy Sci.* **54**, 12, 1764-1768.
- [110] FERRETI, A. Y FLANAGAN, V.P. (1.971a): "The lactose-casein (Maillard) browning system: Volatile components". *J. Agr. Food. Chem.* **19**, 2, 245-249.
- [111] FERRETI, A. Y FLANAGAN, V.P. (1.971b): "Nonenzymatic Browning in edible spraydried whey. Identification of some volatile components". *J. Dairy Sci.* **54**, 12, 1769-1771.
- [112] FERRETI, A. Y FLANAGAN, V.D. (1.972): "Steam volatile constituents of stale nonfat dry milk. The role of the Maillard reaction in staling". *J. Agr. Food. Chem.* **20**, 3, 695-698.
- [113] MAGA, I.A. Y SIZER, CH. E. (1.973): "Pyrazines in Food. A. Review". *J. Agr. Food. Chem.* **21**, 1, 22-30.
- [114] MAGA, J.A. (1.982): "Pyrazines in food: an update". *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* **16**, 1.

- [115] FENAROLI, G. (1975): "Handbook of flavor ingredients". 2<sup>a</sup> ed. vol. I C.R.C. Press. Inc. Cleveland, Ohio. U.S.A. Pág. 45.
- [116] MAGA, J.A. (1976): "The role of sulfur compounds in food flavor. III. Thiols". *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 7, 147.
- [117] MAGA, J.A. (1975): "The role of sulfur compounds in food flavor. II. Thiophenes". *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 6, 241.
- [118] MAGA, J.A. (1975): "The role of sulfur compounds in food flavor. I. Thiazoles". *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 6, 153.
- [119] STOLL, M., WINTER, M., GAUTSCHI, F., FLAMENT, I. Y WILLHALM, B. (1967): "Recherches sur les aromes: sur l'arôme de café". *Helv. Chim. Acta.* 50, 2, 628-694.
- [120] WRIGHT, R.H., REID, C. Y EVANS, M.G.V. (1950): "Odor an molecular vibrations. III. A new theory of olfactory stimulation". *Chem. Ind.* 37, 973.
- [121] WRIGHT, R.H. (1954): "Odor and molecular vibrations. I. Quantum and thermodynamic considerations". *J. Appl. Chem.* 4, 611.
- [122] DEMERDACHE, A. Y WRIGHT, R.H. (1967): "Low-frequency molecular vibration in relation to odor". Tomado de T. Hayashi en "Olfaction and Taste" Vol. 2. Ed. Pergamon Press.
- [123] SADINI, V. (1974): Le basi dell'analisi organolettica degli alimenti 3. L'odore e le proprietà molecolari delle sostanze. *Industrie alimentari.* 13, 2, 51-64.
- [124] DYSON, G.M. (1937): "Raman effect and concept of odor". *Perfum. Essent. Oil Rec.* 28, 13.
- [125] WRIGHT, R.H. Y MICHELS, K.M. (1964): "Evaluation of far-infrared relations to odor by a standard similarity method". *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 116, 535.
- [126] WRIGHT, R.H. (1964): "Odor and molecular vibration: the farinfrared spectra of some perfume chemicals". *Ann. N.Y. Acad. Sc.* 116, 552.
- [127] OHLOFF, G. Y THOMAS, A.T. (1971): "Gustation and olfaction". Academic Press. New York.
- [128] SADINI, V. (1974): Le basi dell'analisi organolettica degli alimenti. 3 L'odore e le proprietà. *Industrie alimentari.* 13, (2) febbraio, 51-64 .
- [129] BOUCHERLE, A. (1974): "Relations structure-activité des substances sapides". *Rev. Sci. Techn. pharm.* 3, 3, 167-176.
- [130] RUNTI Y DEGHENGI (1.952-1.953): *Annali Triestini* 22-23. Sez. 2.
- [131] RUNTI Y DOMINITZ (1.955): *Gazz. Chim. It.* 85, 309.
- [132] RUNTI (1.956): *Ann. Chim.* 46, 406; 417; 731 y 1080.
- [133] RUNTI (1.957): *La Chimica e l'Industria.* 29, 354-364.
- [134] RUNTI Y COL. (1.957): *Ann. Chim.* 47, 240, 250 y 356.
- [135] RUNTI Y SINDELLARI (1.959): *Ann. Chim.* 49, 887.
- [136] RUNTI (1.962): *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux.* 197-218.
- [137] RUNTI Y COLLINO (1.964): *Ann. Chim.* 54, 431.

- [138] RUNTI Y ULIAN (1.965): *Ann. Chim.* 55, 845.
- [139] RUNTI Y COLAUTTI (1.965): *Ann. Chim.* 55, 840.
- [140] DE NARDO, RUNTI, ULIAN Y VIO (1.976): *Il Farmaco. Ed. Sci.* 31, 906-916.
- [141] DE NARDO (1.977): *Il Farmaco. Ed. Sci.* 32, 522-530.
- [142] MONCRIEFF, R.W. (1.967) "The chemical senses". Ed. Leonard still. London.
- [143] BOUCHERLE, A. (1.974): Relations Structure-Activité des substances sapides. *Riv. Ital. Essenze, Profumi, Piante officinali, Aromi, Saponi, Cosmetici, Aerosol.* Novembre.
- [144] DEUTSCH, E.W. Y HANSCH, C. (1.966): *Nature.* 211, 75.
- [145] HANSCH, C. (1.970): *J. med. Chem.* 13, 964-969.
- [146] MAC FARLAND, J.W. (1.971): *Drug Research.* 15, 123-146.
- [147] SHALLENBERGER, R.S. Y ACREE, T.E. (1.969): *Nature.* 221, 555-556.
- [148] HANSCH, C. (1.971): "Drug Design". Vol. I. Academic Press. Mew York. Págs. 271-341.
- [149] MARZUR, R.H., REUTER, J.A., SWIATEK, K.A. Y SCHLATTER, J.M. (1.973): *J. med. Chem.* 16, 1284-1287.
- [150] ROCHAT, M.H., VESELY, D.L. Y VERAÍN, A. (1.982): "Activité métabolique des aromatisants". *Labo. Pharma. Probl. Tech.* 30, 321, 455-456.
- [151] SCHAUMBURG, H.H., BYCK, R., GERSTL, R. Y MASHMAN, J.H. (1.969): "Monosodium l-glutamate: its pharmacology and role in the Chinese restaurant syndrome". *Science.* 163, 826-828.
- [152] SOHLEIM, E. Y SCHELINE, R.R. (1.973): "Metabolism of alkenebenzene derivates in the rat. I. Estragole and anethole". *Xenobiotica.* 3, 493-510.
- [153] SOLHEIM, E. Y SCHELINE, R.R. (1.976): "Metabolism of alkenbenzene derivates in the rat. II. Eugenol and isoeugenol methylether". *Xenobiotica.* 6, 137-150.
- [154] VILLANUA, L. (1.982): "Toxicología I. Toxicología General II. Análisis Toxicológico". Ed. Departamento de Bromatología, Toxicología y Análisis Químico Aplicado. Madrid.
- [155] COQUET, B. (1.982): "Securité d'emploi, tests d'innocuité des substances aromatisantes". *Labo-Pharma. Probl. Tech.* 30, 127, 493-447.
- [156] LE MOAN, G. (1.973): "Les aromatisants. Problemes toxicologiques posés par leur emploi". *L'alim et la vie.* 61, 3, 121-155.
- [157] CONSEIL DE L'EUROPE (1.974): "Matières aromatisantes naturelles, leurs sources, et matières aromatisantes artificielles ajoutées". Maisonneuve. Strassbourg.
- [158] CONSEIL DE L'EUROPE (1.981): "Substances aromatisantes et sources naturelles de matières aromatisantes". Maisonneuve. 3<sup>e</sup> edición. Strassbourg.
- [159] O.M.S. (1.967): "Normas de identidad y pureza para los aditivos alimentarios y evaluación de su toxicidad: Emulsificantes, estabilizadores y otras sustancias". (10<sup>o</sup> Informe Comité Mixto F.A.O./O.M.S. de Expertos en Aditivos Alimentarios. *Org. mund. Salud. Serv. Ing. técn.* 373.
- [160] DIRECCION GENERAL DE SANIDAD. Resolución de 16, Diciembre , 1.975. B.O.E. n° 55, 4, Marzo, 1.976. "Aditivos autorizados para uso en la elaboración de agentes aromáticos".

- [161] MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO (1.982): Resolución de la Subsecretaría de Sanidad de 28, Julio, 1.982, por la que se modifica la anterior. Cita bibliográfica 160 (B.O.E. n° 219 de 13, Septiembre , 1.982).
- [162] MONTES, A.L. (1.953): "Los productos aromáticos en su aspecto higiénico. Toxicología, Farmacología y Bacteriología. Su conservación". *Ciencia e Investigación*. 9, 9, 446-452.
- [163] PEYRON, L. (1.978): "Solvants volatils et pesticides residuaires dans les aromatisants". *10 èmes Journées de l'Aromatisation. Grenoble*. 6-7 Octubre. *Labo-Pharma Probl. Tech.* 27, 288, Juin, 527-533.
- [164] COTTALORDA, A.M. Y SENAUX, M.S. (1.978): "Metaux lourds dans les aromatisants". *10 èmes Journées de l'Aromatisation. Grenoble*. 6-7 Octubre. *Labo-Pharma Probl. Tech.* 27, 288, Juin, 534-539.
- [165] F.A.O. (1.968): "Normas para la identidad y pureza para los aditivos alimentarios y evaluación de su toxicidad: Diversas sustancias aromatizantes y varios edulcorantes no nutritivos".
- [166] CLAUDE, J.R. (1.982): Intérêt des investigations toxicocinetiques. *Labo-Pharma Probl. Tech.* 30, 321, Juin 449-453.
- [167] FLAMENT, I. (1.982): "Prospection des substances aromatisantes perspectives et évolution des connaissances sur la composition des produits naturels". *Labo-Pharma. Probl. Tech.* 30, 321, 404-412.
- [168] ROBIQUET Y BOUTRON-CHARLAND (1.830): *Ann. Chim.* 44, 2, 381.
- [169] ROBIQUET Y BOUTRON-CHARLAND (1.925): *Handb. Organ. Chem.* 7, 174.
- [170] WOHLER Y LIEBIG, J. (1.832): *Ann.* 3, 252.
- [171] VOGEL (1.818): *Schweiggers. J. Chem. Phys.* 20, 59.
- [172] MARTRES (1.819): *J. Phann.* 5, 289.
- [173] TIEMANN, F. Y HAARMANN, W. (1.874): *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 7, 608.
- [174] TIEMANN, F. Y HAARMANN, W. (1.875): *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 8, 1120.
- [175] TIEMANN, F. Y HAARMANN, W. (1.876): *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 9, 1288.
- [176] REIMER, C. (1.876): *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 9, 424.
- [177] SEMMLER, F.W.(1.892): *Arch. Phann.* 230, 434 y 443.
- [178] BRAND,J. (1.894): *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 27, 806.
- [179] BAINBRIDGE, J.S. Y DAVIES, S.H. (1.912): *J. Chem. Soc.* 2209.
- [180] REICHSTEIN, T. Y STAUDINGER, H. (1.928): *Chem. Zbl.* II, 2405.
- [181] REICHSTEIN, T. Y STAUDINGER, H. (1.950): *Experientia.* 6, 280.
- [182] REICHSTEIN, T. Y STAUDINGER, H. (1.950): *Angew. Chem.* 62, 292.
- [183] DOWER, F.B. Y CHESNUT, V.K. (1.921): *J. Amer. Chem. Soc.* 43, 1725.
- [184] BERLINGOZZI, S., CIONE, L., LUPO, G. Y MAZZO, F.P. (1.926): *Gazz. Chim. Ital.* 56, 88.

- [185] BERLINGOZZI, S., CIONE, L., LUPO, G. Y MAZZO, F.P. (1927): *Gazz. Chim. Ital.* 57, 243; 248; 255 y 264.
- [186] NELSON, EK Y CURL, A.L. (1939): *J. Amer. Chem. Soc.* 61, 667.
- [187] COPPENS, A. Y HOEJENBOS, L. (1939): *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas.* 58, 675.
- [188] HAAGEN-SMIT, A.J., KIRCHNER, J.G., PRATER, A.N. Y DEASY, C.L. (1945): *J. Amer. Chem. Soc.* 67, 1646.
- [189] HAAGEN-SMIT, A.J., HIROSAWA, F.N. Y WANG, T.H. (1949): *Food. Res.* 14, 472.
- [190] WHITE, J. W. JR. (1950): *Food. Res.* 15, 68.
- [191] SCHINZ, H. Y SEIDEL, C.F. (1957): *Helv. Chim. Acta.* 40, 1839.
- [192] SEIDEL, C.F., SCHINZ, H. Y STOLL, M. (1958): *Helv. Chim. Acta.* 41, 372.
- [193] WINTER, M., PALLUY, E., HINDER, M. Y WILLHALM, B. (1962): *Helv. Chim. Acta.* 45, 2185.
- [194] WINTER, M. Y SUNDT, E. (1962): *Helv. Chim. Acta.* 45, 2195.
- [195] SUNDT, E. Y WINTER, M. (1962): *Helv. Chim. Acta.* 45, 2212.
- [196] WINTER, M. Y WILLHALM, B. (1964): *Helv. Chim. Acta.* 47, 1215.
- [197] VILLANUA, L. Y VILLANUA, M<sup>a</sup> P. (1978): "L'extraction dans l'analyse des composés aromatisants des aliments". *Labo-Pharma. Probl. Tech.* 277, Juin, 519-525.
- [198] ROHTE, M. Y SPECHT, M. (1976): *Die Nahrung.* 20, 3, 281-286.
- [199] ADDA, J. (1982): "L'étude des arômes: méthodes physico-chimiques et méthodes sensorielles". *L'alimentation et la vie.* Dec., 33-48.
- [200] MANUEL SUISSE DES DENRÉES ALIMENTAIRES (1978): "Méthodes d'analyse et d'appréciation des denrées alimentaires et des objets usuels". Tomo III. Cap. 43. "Substances aromatisantes". 5<sup>a</sup> edición. Edición revisada parcialmente en 1984. Office central federal des imprimés et du matériel. Berne.
- [201] HULSTKAMP, J. Y MISEREZ, A. (1966): *Trav. Chim. alim.* 57, 461.
- [202] WEURMAN, C. (1968): *J.Agric. Food. Chem.* 17, 370-384.
- [203] WOLFORD, R.A., ALBERDING, G.E. Y ATAWAY, J.A. (1962): "Analysis of recovered natural orange essence by gas chromatography". *J.Agric. Food. Chem.* 10, 297-301.
- [204] JACKSON, H.W. (1958): *Perfum. Essent. Oil Rec.* 49, 256.
- [205] LINDSAY, R.C., DAY, E.A. Y SANDINE, W.E. (1965): *J. Dairy Sci.* 48, 1566-1574.
- [206] LIEBICH, H.M., DOUGLAS, D.R., BAYER, E. Y ZLATKIS, A. (1970): *J. Chromatogr. Sci.* 8, 351-355.
- [207] CABEZUDO, M.D., GOMEZ CORDOVES, M.C. Y LLAGUNO, C. (1973): "Aportación al estudio del aroma de los vinos blancos de Rioja". *Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment.* 13, 455-462.
- [208] BRICONT, B. (1977): *Ind. Aliment. Agric.* 3, 277-281.
- [209] WILLIAMS, A.A. Y TUCKNOTT, O.G. (1978): *J. Sci. Food. Agric.* 29, 381.

- [210] WONG, NP Y PARKS, O.W. (1968): *J. Dairy Science*. 51, 1768.
- [211] BERTRANDA, A., BOIDRON, IN. Y RIBERAU-GAYON, P. (1967): *Bul. Soc. Chim. de France*. 3149.
- [212] MOINAS, M., GROUX, M. Y HORMAN, I. (1973): "La flaveur des fromages". *Le lait*. 53, 529-530, 601-609.
- [213] NAWAR, W.W., SAWYER, F.M., BELTRAN, E.G. Y FAGERSON, I.S. (1960): *Anal. Chem.* 32, 1534.
- [214] SWOBODA, P.A.T. (1962): IV Symposium on gaz Chromatography. 29.
- [215] MORGAN, M.E. Y DAY, E.A. (1965): *J. Dairy Sci.* 48, 1382-1384.
- [216] MABBIT, L.A. Y KINNON, G. MAC. (1963): *J. Dairy Res.* 30, 359.
- [217] HORNSTEIN, I. Y CROWE, P.F. (1962): "Gas chromatography of food volatiles. An improved collection system". *Anal. Chem.* 34, 1354-1356.
- [218] KEPNER, R.E., STRATING, J. Y WEURMAN, C. (1963): *J. Inst. Brew.* 69, 399.
- [219] RHOADES, J.W. Y MILLAR, J.D. (1965): *J. Agric. Food. Chem.* 13, 5-9.
- [220] AURAND, L.W., SINGLETON, J.A., BELL, T.A. Y ETECHELLE, J.L. (1966): "Volatile components in the vapors of natural and distilled vinegars". *J. Food. Sci.* 31, 2, 172-177 (a).
- [221] BERTRAND, A. (1968): "Connaissance de la vigne et du vin". Tomo 2, n°3.
- [222] HONKANEN, E. Y KARVONEN, P. (1966): *Acta. Chem. Scand.* 20, 2626.
- [223] LEDERER, E. Y NACHMLAS, G. (1949): *Bull. Soc. Chim. France*. 400.
- [224] WILLIAM, P.J. Y STRAUSS, C.R. *J. Sci. Food. Agric.* 29, 557.
- [225] SCHWARTZ, D.P., HALLER, H.S. Y KEENEY, M. (1963): *Anal. Chem.* 35, 2191.
- [226] DARTEY, C.K. Y KINSELL, J.E. (1971): "Rate of formation of methyl ketones during blue cheese ripening". *J. Agric. Food. Chem.* 19, 771-774.
- [227] PARKS, O.W., WONG, N.P., ALLEN, C.A. Y SCHWARTZ, D.P. (1969): *J. Dairy Sci.* 52, 953.
- [228] HASHIMOTO, N. Y KUROIWCO, J. (1966): *J. Inst. Brew.* 72, 151.
- [229] PRIBELA, A. (1965): *Biologia Esckoel.* 3, 173.
- [230] SUNDT, E. Y WINTER, M. (1962): *Helv. Chim. Acta.* 45, 2122.
- [231] AYRAPAA, T. (1967): *J. Inst. Brew.* 73, 17.
- [232] LAFUENTE, B., BENEDITO, J., MANSANET, A. Y NADAL, M.I. (1976): *Rev. Agroquim. Technol. Aliment.* 16, 89-97.
- [233] REYMOND, D., MUEGLER-CHAVA, F., VIANI, R., VUATAZ, L. Y EGLI, H. (1966): *J. Gas. Chrom.* 28.
- [234] RADTKE, R., MOHR, W. Y SPRINGER, R. (1966): "Zur Kenntniss des Kaffee-Aromas und seiner Veränderungen im Laufe der Lagerung von Röstkaffee". III Mitteilung. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 129, 6, 349-359.

- [235] WEURMAN, C. (1.961): "An All-glass laboratory apparatus for concentrating volatile compounds from dilute aqueous solutions". *J. Food. Sci.* **26**, 670-672.
- [236] FORSS, D.A. Y HOLLOWAY, G.L. (1.967): *J. Ann. Oil. Chem. Soc.* **44**, 572.
- [237] DUMONT, J.P. Y ADDA, J. (1.970): *Rev. laitiere franc.* **279**, 579.
- [238] PRILL, E.A. Y HAMMER, B.W. (1.939): *J. Dairy Sci.* **22**, 67.
- [239] WEBB, A.D. Y KEPNER, R.E. (1.957): *Food. Res.* **22**, 384-395.
- [240] PATTON, S. (1.950): *J. Dairy Sci.* **26**, 670-672.
- [241] SCHEYEN, L. DIRINCK, P., WASSENHOVE, VAN F Y SCHAMP, N. (1.976): *J. Agric. Food. Chem.* **24**, 336-341.
- [242] AGREE, T.E., BUTTS, R.M. Y BARNARD, J. M. (1.976): *J. Agric. Food. Chem.* **24**, 430-431.
- [243] MIQUEL, J.D., RICHARD, H.M.J Y SANDRET, F.G. (1.976): *J. Agric. Food. Chem.* **24**, 833-835.
- [244] HERZ, KO Y CHANG, S.S. (1.966): *J. Food. Sci.* **31**, 937-940.
- [245] SYDOW, E. VON, ANDERSON, J., ANJOU, K., KARLSON, K., LAND, D. Y GRIFFITHS, N. (1.970): *Lebensm. Wiss. Technol.* **3**, 11.
- [246] SPENCER, M.D., PANGBORN, R.M. Y JENNINGS, W.G. (1.978): "Gas chromatographic and sensory analysis of volatiles from cling peaches". *J. Agric. Food. Chem.* **26**, 725-732.
- [247] MURRAY, K.E. Y WHITFIELD, F.B. (1.975): "The occurrence of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in can vegetables". *J. Sci. Food. Agric.* **26**, 973-986.
- [248] CHARALAMBOUS, G. (1.978): "Analysis of Food and Beverages, Headspace Techniques". Academic. Press. New York.
- [249] TASSAN, C.G. Y ROUSSEL, G.F. (1.974): "Sensory and gas chromatographic profiles of coffee beverage headspace volatiles entrained on porous polymers". *J. Food. Sci.* **39**, 64-68.
- [250] JENNINGS, N.G. Y FILSOOF, M. (1.977): "Comparison of sample preparation techniques for gas chromatographic analysis". *J. Agric. Food. Chem.* **25**, 440-445.
- [251] WILLIAMS, P.J. Y STRAUSS, C.R. (1.978): *J. Inst. Brew.* **84**, 148.
- [252] SCHREYEN, L., DIRINICK, P., VAN WASSENHOVE, F Y SCHAMP, N. (1.976): Analysis of leek volatiles by headspace. *J. Agric. Food. Chem.* **24**, 1147-1152.
- [253] WEURMAN, C. (1.961): *Food. Technol.* **15**, 331.
- [254] MACKAY, D.A., LANG, D.A. Y BERICK, M. (1.961): "Objective measurement of odor: ionization detection of food volatiles". *Anal. Chem.* **33**, 10, Sept. 1369-1374.
- [255] HARRISON, FAE., BYRNE, W.J. Y COLLINS, E. (1.965): *J. Inst. Brew.* **71**, 366.
- [256] MAULE, D.R. (1.967): *J. Inst. Brew.* **73**, 351-361.
- [257] NAWAR, W.W. Y FAGERSON, I.S. (1.962): *Food. Technol.* **11**, 107-109.
- [258] KROGER, M. Y PATTON, S. (1.964): *J. Dairy Sci.* **47**, 296.
- [259] BECZE, G.I., SMITH, H.F. Y VAUGHNT, T.E. (1.967): *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **50**, 311.

- [260] FORSS, D.A., JACOBSEN, V.M. Y RAMSHAW, E.M (1967): "Concentration of volatile compounds from dilute aqueous solution". *J. Agric. Food. Chem.* 15, 6, 1104-1107.
- [261] WHITFIELD, F.B. Y SHIPTON, J. (1906): *Chem. Ind. (london)*. 1038.
- [262] SHAPIRO, J. (1961): *Science*. 123, 2063.
- [263] BIDMEAD, D.S. (1963): *Rec. Adv. in Food. Sci.* 3, 158-164, ed. Muil. Leitch. J. London. Butterworth.
- [264] KEPNER, R.E., VAN STRATENS, S. Y WEURMAN, C. (1969): "Freeze concentration of volatile components in dilute aqueous solution". *J. Agric. Food. Chem.* 17, 1123-1127.
- [265] WEURMAN, C. (1969): "Isolation and concentration of volatiles in food odor research". *J. Agric. Food. Chem.* 17, 370-384.
- [266] HURST, R.R. (1974): *Analyst. G.B.* 99, 1178, 302-305.
- [267] MAC LEOD, ALJ., CARE, S.J. (1975): "Volatile flavour components of eggs". *J. Sci. Food. Agric.* 26, 351-360.
- [268] GROUX, M. Y MOINAS, M. (1974): *Le Lait. LIV*, 531-532, 44-52.
- [269] MAC LEOD, A.J., ISLAM, R. (1975): "Volatile flavour components of watercress". *J. Sci. Food Agric.* 26, 1545-1550.
- [270] LIKENS, S.T., NICKERSON, G.B. (1964): *Proc. Ann. Soc. Brew. Chem.* 5.
- [271] MAARSE, H. (1971): These. Université de Groninge (Pays Bas).
- [272] MAARSE, M., KEPNER, R.E. (1970): "Changes in composition of volatile terpenes in douglas fir needles during maturation". *J. Agric. Food Chem.* 18, 1095-1101.
- [273] MOINAS, M. (1973): *Mit. Lebensmittelunters u. Hyg.* 64, 1, 60.
- [274] ROUZET, M. Y DROUET, S. (1979): "Chromatographie qualitative et assurance de qualité des matières aromatisantes". *Labo. Pharma. Probl. Tech.* 289, Juillet-Aout, 601-603.
- [275] KUBECZKA, K.H. (1973): *Chromatographia* 6, 106.
- [276] CALABRIO, G. Y CURRO, P. (1976): "Determinazione spettrofluorimetrica delle cumarine dell'essenza di bergamotto". *Essenze Deriv. agrum.* 45, 246-262.
- [277] I.O.F.I. (1975): Analytical procedure for a general method for thin layer chromatography. *Flavours*, 339-346.
- [278] POUCHUS, F. (1979): "Dosage du bergaptène par H.P.L.C." Memoire DEA Pharmacie. Nantes.
- [279] DI GIACOMO, A. Y CALVARANO, M. (1978): "Contents of bergaptene in expressed bergamot oil". *Riv. Ital. E.P.P.O.S.* 60, 2, 69-78.
- [280] GLANDIAN, R. (1979): "Etude des coumarines et des furocoumarines d'une huile essentielle de citron de la Côte d'Ivoire utilisable comme substance aromatisante". Thèse Univ. Pharma. Nantes.
- [281] PALMER, J.K. (1973): "Separation of components of aroma concentrates on the basis of functional group and aroma quality". *J. Agric. Food. Chem.* 21, 923-925.
- [282] STOLL, M., WINTER, M., GAUTSCHI, F., FLAMENT, I. Y WILLHOLM, B. (1967): *Helv. Chim. Acta.* 50, 628.



- [283] SLOOT, D. Y HARKERS, P.D. (1975): "Volatile trace components in Gouda cheese". *J. Agric. Food. Chem.* **23**, 356-357.
- [284] BADINGS, H.T., VAN DERPOL, J.J.G. Y WASSINK, J.G. (1975): *Chromatographia.* **8**, 440.
- [285] GROB, K. Y GROB, K. JR. (1974): *J. Chromatogr.* **94**, 53.
- [286] BADINGS, H.T., VAN DER POOL, J.J.G. Y WASSINK, J.G. (1975): *Chromatographia.* **8**, 442.
- [287] GROB, K. Y GROB, K. JR. (1978): *J. Chromatogr.* **151**, 311.
- [288] KENDALL ALBERT, D. (1978): "Determination of nitrogen compound distribution in petroleum by gas chromatography with a thermionic". *Anal. Chem.* **50**, 13, Nov. 1822-1829.
- [289] BRICOUT, J.: "Identification des constituants (spectrographie de masse et spectroscopie infra-rouge)". I. Institut de Recherche appliquées aux boissons. Montreuil. (France).
- [290] VIANI, R. Identification des saveurs par R.M.N. Produits Nestlé. Lausanne. (Suiza).
- [291] ROUZET, M. (1984): "Los aceites esenciales y las nuevas normas de la Farmacopea Europea y de la International Standard Organization". *Ann. Real Acad. Farm.* **50**, 3, 465-476.
- [292] ROUZET, M. (1984): "La notion nouvelle de profil chromatographique et le niveau de qualité des huiles essentielles". *Labo. Pharma. Probl. Tech.* **32**, 343, 462-466.
- [293] TOUCHE, J., DERBEZY, M. Y LLINAS, S.R. (1981): "Maillettes et lavandes fines françaises". *Riv. Ital. EPPOS.* Oct. 6, 320-323.
- [294] POUCHUS, Y.F. (1981): "Le contrôle de qualité des huiles essentielles d'agrumes". Tesis Doctoral. Universidad de Nantes.
- [295] POUCHUS, Y.F. Y ROUZET, M. (1982): "Methode informatique pour l'établissement de profils chromatographiques des huiles essentielles". *Labo-Pharma, Probl. Tech.* **30**, 319.
- [296] CORDOBA, M.A. (1982): Contribución al estudio del aceite esencial de Salvia española. *Labo-Pharma, Probl. Tech.* **30**, 319, 222-226.
- [297] SYDOW, E. VON., ANDERSSON, J., ANJOU, K., KARLSSON, G., LAND, D. Y GRIFFITHS, N. (1970): *Lebensm. Wiss. Technol.* **3**, 11.
- [298] TASSAN, C.G. Y RUSSEL, G.F. (1974): "Sensory and gas chromatographic profiles of coffee beverage headspace volatiles entrained on porous polymers". *J. Food. Sci.* **39**, 64-68.
- [299] STERN, D.J., GUADAGNI, D. Y STEVENS, K.L. (1975): *Amer. J. Enol. Viticult.* **26**, 208.
- [300] QUIST, I.H., SYDOWE, E. VON, Y AKESSON, C.A. (1976): *Lebensm. Wiss. Technol.* **9**, 311.
- [301] NOBLE, A.C. (1978): Tomado de G. CHARALAMBOUS en "Analysis of Foods and Beverages, Headspace Techniques". Ed. Academic. Press. Mew York. Págs. 203-228.
- [302] TUCKNOTT, O.G. Y WILLIAMS, A.A. (1974): *Chem. Ind. (London)*. 784.
- [303] PARLIMENT, T.H. (1976): *Chem. Ind. (London)*. Pág. 418.
- [304] CLARK, R.G. Y CRONIN, D.A. (1974): "A technique for the trapping of flavour compounds eluted from gas chromatographic columns for organoleptic evaluation (Sensory Analysis)". *J. Sci. Food. Agric.* **25**, 1053.
- [305] CLARK, R.G. Y CRONIN, D.A. (1975): "A new technique for trapping and sensory evaluation of flavour volatiles". *J. Sci. Food. Agric.* **26**, 1009-1019.

- [306] LEHTONEN, M. Communication personnelle.
- [307] SALO, P. (1970): "Determining the odor thresholds for some compounds in alcoholic beverages". *J. Food. Sci.* **35**, 95-99.
- [308] SALO, P. (1970): *J. Sci. Food. Agric.* **21**, 597.
- [309] SALO, P. (1975): Proc. Int. Symp. Aroma Research ZEIST, MAARSE, Groenen P.J. editors. Centre for Agricultural Publishing and Documentation Wagening. Pág. 121.
- [310] HARRISON, G.A.F. (1970): *J. Inst. brew. (London)*. **76**, 486.
- [311] SALO, P., NYKÄNEW, L. Y SUOMALAINEN, H. (1972): "Odor thresholds and relative intensities of volatile aroma components in an artificial beverage imitating whisky". *J. Food. Sci.* **37**, 394-398.
- [312] MEILGAARD, M.C. (1975): *Techn. Quart. Master. Brew. Ass. Amer.* **12**, 107.
- [313] ROTHE, M. (1976): *Nahrung*. **20**, 259.
- [314] GUADAGNI, D.G., MIERS, J.C. Y VENSTRÖM, D.W. (1969): "Concentration effect on odor addition or synergism in mixture of methyl sulfide and tomato juice". *J. Food. Sci.* **34**, 630-632.
- [315] MEIGAARD, M.C., ELIZONDO, A. Y MACKINNEY, A. (1971): *Wallerstein. Lab. Commun.* **34**, 95.
- [316] SYDOW, E. VON. Y KARLSSON, G. (1971): *Lebens. Wiss. Technol.* **4**, 152.
- [317] PEERSON, T., SYDOW, E. VON. Y AKERSSON, C. (1973): "Aroma of canned beef: sensory properties". *J. Food. Sci.* **38**, 386-392.
- [318] CLAPPERTON, J.F., DALGLIESH, C.E. Y MEIGAARD, M.C. (1975): *Tech. Quart. Master. Brew. Ass. Amer.* **12**, 73.
- [319] WILLIAMS, A.A. (1975): "The development of a vocabulary and profile assesment. Method for evaluating the flavour contribution of cider and perry aroma constituents". *J. Sci. Food. Agric.* **26**, 567-582.
- [320] WILLIAMS, A.A. Y CARTER, C.S. (1977): "A language and procedure for the sensory assessment of Cox's Orange Pippin Apples". *J. Sci. Food. Agric.* **28**, 1090-1104.
- [321] PIGGOTT, J.R. Y JARDINE, S.P. *J. Inst. Brew. (London)*.
- [322] HARPER, R., LANG, D.G., GRIFFITHS, N.N. Y BATE-SMITH, E.C. (1968): *Brit. J. Psychol.* **59**, 321.
- [323] WILLIAMS, A.A. Y KNEE, M. (1977): *Ann. Appl. Biol.* **87**, 127.
- [324] PERSSON, T. Y SYDOW, E. VON. (1974): "The aroma of canned beef: processing and formulation aspects". *J. Food. Sci.* **39**, 406-413.
- [325] QUIST, I.H. Y SYDOW, E. VON. (1976): *Lebensm. Wiss. Technol.* **9**, 299.
- [326] MOSKOWITZ, H.R., STANLEY, D.W. Y CHANDLER, J.W. (1977): *Can. Inst. Food. Sci. Technol. J.* **10**, 161.
- [327] WILLIAMS, A.A., LEA, A.G.H. Y TIMBERLAKE, C.I. (1977): Tomado de SCANLAN R.A. "Flavor quality: Objective measurement". Symp. Ser. n°51, American Chemical Society. Washington. Págs. 71-78.
- [328] MALIK, R. (1975): *Vinohard.* **13**, 14.

- [329] BIGGERS, R.E., HILTON, J.J. Y GIANTURCO, M.S. (1969): *J. Chromatogr. Sci.* 7, 473.
- [330] POWERS, J.J. Y QUINLAN, M.C. (1974): *J. Agric. Food. Chem.* 22, 744.
- [331] DUPUY, H.P., RAYNER, E.T., WASWORTH, J.I. Y LEGENDRE, M.G. (1977): *J. Amer. Oil. Chem. Soc.* 54, 445.
- [332] SAUVAGEOT, F. (1982): "Répétabilité, reproductibilité, justesse et fiabilité en evaluation sensorielle". *L'alimentation et la vie.* Dic. 1, 18-32.
- [333] MONTAGUT, M., ASEÑS, J.A. Y NOGUÉ, A. (1972): "El panel humano como método para el control de calidad en la industria química". *Afinidad.* XXIX, 296, 395-398.
- [334] AMERINE, M.A., PANGBORN, R.M. Y ROESSLER, E.B. (1965): "Principles of Sensory Evaluation of Food". Academic Press. New York. Tomado de O.R. FENNEMA "Introducción a la ciencia de los alimentos (1.982). Ed. Reverté. S.A. Barcelona.
- [335] AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIAL. (1968): STP433: "Basic Principles of Sensory Evaluation". STP434: "Manual on Sensory Pesting Methods". STP440: "Correlation of Subjective-Objective Methods in the Study of Odors and Taste". American Society of Testing and Materials. Philadelphia. Tomado de O.R. FENNEMA "Introducción a la ciencia de los Alimentos (1.982). Ed. Reverté. Barcelona.
- [336] BUCHEL, J.A. (1972): "Flavor Thoughts". Naarden Inc. Baltimore. Hd. Tomado de O.R. FENNEMA, "Introduccion a la ciencia de los alimentos". 1.982. Ed. Reverté. Barcelona.
- [337] CAUL, J.F. (1957): The Profile Method of Flavor Analysis. *Advances in Food Research.* Academic Press. New York. Págs. 1-40.
- 337 bis] LITTLE, A.D. (1958): Flavor Research and Food Acceptance. Reinhold. New York.
- [338] LARMOND, E. (1970): "Methods for Sensory Evaluation of Food". Publ. 1284. Canada. Department of Agriculture. Ottawa, 1970. Tomado de O.R. FENNEMA. "Introducción a la ciencia de los alimentos". 1.982. Ed. Reverté. Barcelona. 1.982 Págs.
- [339] CHIVA, M. (1982): Propriétés sensorielles et hedonisme. *L'alimentation et la vie.* Dic.1, 12-17.
- [340] DEPLEDT, F. (1982): "De la connaissance des propriétés organoleptiques d'un aliment a la connaissance des besoins des consommateurs". *L'alimentation et la vie.* Dic. 1, 4-7.
- [341] MAC LEOD, P. (1982): 'De la molécule au comportement'. *L'alimentation et la vie*". Dic. 1, 8-11.
- [342] DAGET, N. (1982): "L'analyse sensorielle dans l'entreprise". *L'alimentation et la vie.* Dic. 1, 49-52.
- [343] MARION, J.P. (1982): "Methodologic d'étude et d'experimentation des arômes". *Labo-Pharma. Probl. Tech.* 30, 321, 461-463.
- [344] SADINI, V. (1973): "L'esame organolettico degli alimenti aifini della loro qualificazione". *Industriae alimentari.* XII, 2, 60-64.
- [345] SADINI, V. (1973): "Valore organolettico sensoriale degli alimenti: ulteriore parametri qualitativi". *Industriae alimentari.* XII, 4, 91-98.
- [346] SADINI, V. (1973): Valore alimentare e qualita dei prodotti alimentari. *Industriae alimentari.* XII, 6, 65-72.
- [347] SADINI, V. (1973): Analisi organolettica e caratteristiche qualitative per la calssificazione degli alimenti. *Industriae alimentari* XII, 3, 128-132.

- [348] SADINI, V. (1973): "La qualita dei prodotti alimentari in relazione al loro valore di origine". *Industrie alimentari*. XII, 7-8, 67-74.
- [349] VUATAZ, L. (1977): Nestlé Research News. 1976/77, 57.
- [350] KRAMER, A. (1976): Correlating sensory objective measurements. New methods for answering old problems. (A.S.T.M.) special technical publication n° 594. (Philadelphia). Págs. 48-55.
- [351] VESSEREAU, A. (1973): "Colloque de La Baule". Societé de Chimie Industrielle. (24-24 Mayo, 1973).
- [352] MARTINEZ CRESPO, C. (1989): Comunicación personal.
- [353] VIZY, G. (1981): Maltol, ethyl-maltol, MCP, ECP. *Labo-Pharma. Probl. Tech.* 29, 310, 483-485.
- [354] PAUL, T. (1920): *Chem. Ztg.* 44, 67.
- [355] NAVES, Y.R. (1964): "Qu'est ce qu'une huile essentielle?". *Industrie chimique belge*. 11, 281.
- [356] DUQUENOIS, P. (1966): "Essai de la délimitation de la notion d'huile essentielle en vue de la normalisation internationale". *La France et ses Parfums*. IX, 262-265.
- [357] DUQUENOIS, P. (1975): "Les huiles essentielles". *Labo-Pharma. Probl. Tech.* 244, 574-577.
- [358] CONSEIL DE L'EUROPE. (1989-1986): "Pharmacopée Européenne". Imp. Maisonneuve, S.A. Sainte-Ruffine. 2ª edición.
- [359] REAL ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA. (1954): Farmacopea Oficial Española. IX edición. Imp. Estades. Madrid.
- [360] GARCIA MARTIN, D. Y GARCIA VALLEJO, M.C. (1979): "Las esencias de la F.E. IX. III Esencia de tomillo, *Thymi aethelorum*". II Jornadas Farmacéuticas. Málaga. Págs. 459-473.
- [361] GARCIA MARTIN, D. Y GARCIA VALLEJO, M.C. (1981): "El control de la calidad de las esencias oficinales. Revisión de la F.E. IX". III Jornadas Farmacéuticas. Murcia. Comunicación 52.
- [362] BLANCO DIEZ, M.M., GARCIA VALLEJO, M.C. Y GARCIA MARTIN, D. (1983): "Análisis químico de aceites esenciales. I La Cromatografía de Gas-Líquido, tabulación de constantes de retención cromatográfica y patrones internos". *Com. I.N.I.A. Sér. Tecnología Agraria*. n° 9.
- [363] MINISTERIO DE ECONOMIA Y HACIENDA. Orden del 3 de Julio de 1985. B.O.E. n° 168, 15 de Julio. Corrección de errores B.O.E. n° 182, 31 de Julio. 1985. Normas sobre comercio exterior para aceites esenciales y esencias de frutos cítricos.
- [364] NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1981): "Food Chemicals Codex". National Academic Press. Washington. D.C. 3ª edición.
- [365] ROUZET, M. (1984): "Los aceites esenciales y las nuevas normas de la Farmacopea Europea y de la International Standard Organization". *An. Real Acad. Farm.* 50, 3, 466-475.
- [366] ORTEGA, T., PARDO, M.P. Y CARRETERO, M.E. "Components of the essential oil of *Elaeoselinum Tenuifolium*. Lag. Lange *Umbelliferae*. *Acta Agronomic*. Tomus 34. Supplementum.
- [367] ORTEGA, T. Y CARRETERO, M.E. "The essential oil from *Elaeoselinum Foetidum*. L. BOISS. *Umbelliferae*. *Acta Agronómica*. Tomus 34. Supplementum.
- [368] ORTEGA, T., CARRTERO, M.E., BERMEJO, P. Y PARDO, M.P. (1986): "Aceites esenciales en umbelíferas. Estudio del aceite esencial de *Elaeoselinum Asclepium*. L. BERTOL. Subsp. *Asclepium*. *Anales Jard. Bot. Madrid*. 43, 1, 121-124.

- [369] CARRETERO, M.E., ORTEGA, T. Y ROUZET, M. (1988): A propos de la composition chimique de l'huile essentielle de *Elaeoselinum asclepium* L. Bertol subsp. *Millefolium* (Boiss). *Plantes Medicinales et Phytoterapie*. 22 (2) 88-91.
- [370] CORDOBA, M<sup>a</sup> A. (1983): "Contribución al estudio del aceite esencial de salvia Española (*Salvia Lavandulaefolia* VAHL)". Tesis Doctoral presentada en la Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. Madrid.
- [371] VELASCO NEGUERUELA, A. (1977): "Composición de la esencia de *Tenerium Gnaphalodes* L'Her. *Anal. Inst. Bot. Cavanilles*. 34, 1, 317-324.
- [372] VELASCO NEGUERUELA, A., PEREZ ALONSO, M.J. Y MATARICO, M. (1982): "Composición química del aceite esencial de una población relicta de *Myrica Gale* L. *Anal. Bromatol.* XXXIV, 2, 231-238.
- [373] VELASCO NEGUERUELA, A. Y PEREZ ALONSO, M<sup>a</sup> J. (1983): "Estudio químico del aceite esencial de diversas *Saturejæ* ibéricas". *Anales Jard. Bot. Madrid*. 40, 1, 107-118.
- [374] VELASCO NEGUERUELA, A. Y MATA RICO, M. (1986): "The volatile oil of *Ziziphora hispanica* L". 1, 111-113.
- [375] VELASCO NEGUERUELA, A., PEREZ ALONSO, M<sup>a</sup> J. Y MATARICO, M. (1987): "Aceites esenciales de lamiaceas ibéricas con pulegona como componente fundamental". *Anal. Bromatol.* XXXIX, 2, 357-372.
- [376] PEREZ ALONSO, M.J. Y VELASCO NEGUERUELA, A. (1988): "The essential oils of four *Santolina* Species". *Flavour and Fragrance Journal*. 3, 37-42.
- [377] PEREZ ALONSO, M.J. Y VELASCO NEGUERUELA, A. (1989): "Variación de la composición química del aceite esencial de especies del género *Santolina* L. I Condiciones de extracción y conservación. *Bot. Complutensis*. 14, 167-179.
- [378] VELASCO NEGUERUELA, A., PEREZ ALONSO, M.J. (1984): "Aceites esenciales de tomillos ibéricos. III Contribución al estudio de Quimiotipos en el grupo *Thymus Zygis* L. *Anal. Bromatol.* XXXVI, 2, 301-308.
- [379] PEREZ ALONSO, M.J. Y VELASCO NEGUERUELA, A. (1984): "Essential oil Analysis of *Thymus Villosus* subsp. *Lusitanicus*". *Phytochemistry*. 23, 3, 581-582.
- [380] VELASCO NEGUERUELA, A., PEREZ ALONSO, M<sup>a</sup> J. (1985): "Aceites esenciales de tomillos ibéricos. I Contribución al conocimiento del aceite esencial de *Thymus Orospedamus* H. del Villar". *Anales Jardín Botánico de Madrid*. 41, 2, 337-340.
- [381] VELASCO NEGUERUELA, A., PEREZ ALONSO, M<sup>a</sup> J. (1985): "Aceites esenciales de tomillos ibéricos. II Contribución al conocimiento del aceite esencial de *Thymus Lacacitæ*. Pau". *Anales Jardín Botánico de Madrid*. 42, 1, 159-163.
- [382] VELASCO NEGUERUELA, A., PEREZ ALONSO, M<sup>a</sup> J. (1986): "Aceites esenciales de tomillos ibéricos. V Contribución al conocimiento del aceite esencial de *Thymus Campheratus*. Hoffmans & Link". *Anales Jardín Botánico de Madrid*. 43, 2, 383-386.
- [383] VELASCO NEGUERUELA, A., PEREZ ALONSO, M<sup>a</sup> J. (1986): "Aceites esenciales de tomillos ibéricos. IV Contribución al estudio quimiotaxonómico (Terpenoides) del género *Thymus* L." *Trab. Dep. Botánica*. 13, Dic. 115-133.
- [384] GARCIA MARTIN, D. Y GARCIA VALLEJO, M.C. (1982): "Chemotypes of *Thymus Zygis* (Lôgl) of Guadarrama Sierra an other places in Castilla (Spain). 9<sup>o</sup> Congreso Internacional de Aceites esenciales. (Singapur).
- [385] GARCIA MARTIN, D. Y GARCIA VALLEJO, M.C. (1982): "Esencias de Eucaliptos Arborescos aclimatados en España. I Esencia de *Eucalyptus Maidenei* F. Muell". *An. I.N.I.A. Ser. Forestal*. 6, 11-191

- [386] GARCIA VALLEJO, M.C., BLANCO DIEZ, M.M. Y GARCIA MARTIN, D. (1982): "Eucaliptos Arbustivos ("Mallees"), para la destilación de esencias. I *Eucalyptus Fructicetorum*. F. Muell. EX. MIQ. en España". *An. INIA. Ser. Forestal.* 6, 139-160.
- [387] GARCIA MARTIN, D. Y GARCIA VALLEJO, M.C. (1982): "Las esencias de la Farmacopea Española. IX Edición. I. Esencia de Eucalipto (*Eucalpti Aetherolum*). La hoja de Eucalipto. *An. INIA. Ser. Forestal.* 6, 131-137.
- [388] GARCIA MARTIN, D. Y GARCIA VALLEJO, M.C. (1986): "El orégano español y otros comercialmente importantes". *Industria Farmacéutica.* Nov./Dic. 67-79.
- [389] GARCIA MARTIN, D. Y GARCIA VALLEJO, M.C. (1986): "El orégano español (*Coridothymus capitatus* Reichb.) y otros oréganos comercialmente importantes. Tomado de C.I.I.A. "Los aditivos en la Industria Agroalimentaria". Págs. 103-128. *Symposio Internacional.* Madrid, 15, 16 y 17, Octubre. Ed. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- [390] MARTIN MESONERO, M., CABO TORRES, J. Y VILLAR DEL FRESNO, A. (1974): "Estudio comparativo de diversos tipos de esencias de espliego españolas". *Boll. Chim. Farm.* 113, 131-136.
- [391] VILLAR, A., ZAFRA-POLO, M.C., BONANAD, A., NAVARRO, A. Y RIOS, J.L. (1985): "Essential Oil of *Sideritis Javalambrensis*". *Pharm. Acta. Helv.* 60, 12, 351-352.
- [392] ADZET, T., GRANGER, R., PASSET, J. Y SAN MARTIN, R. (1976): "Les huiles essentielles de *Thymus vulgaris* spontanées de France et d'Espagne. *Pharmacia Méditerranée.* XI, 1-6.
- [393] GRANGER, R. Y PASSET, J. (1971): *Comptes rendus Academie des Sciences.* (Paris). 273, 2350-2355.
- [394] GRANGER, R. Y PASSET, J. (1973): *Phytochemistry.* 12, 1683-1691.
- [395] VICIOSO, C. (1974): Contribución al estudio de los tomillos españoles. *Anales INIA* (1) 11-63. Trabajo póstumo editado, J. Ruiz Castillo.
- [396] CALZOLARI, C., STANCHER, B. Y MARLETTA, G.P. (1966): "Sulla carterizzazione delle specie Olio Essenziale di origano" (nota I). *Univ. degli Studi di Trieste, Ist. di Merceologia* publ. n° 28, 19 p.
- [397] STAIKOV, V., ZOLOTOVITCH, G. Y KALADIEV, I.V. (1968): "*Origanum heracleoticum* L. Plant and essential oil". *Soap. Perfum. Cosmet.* 41, 327-330.
- [398] SKRUBIS, B.G. (1972): "Seven wild aromatic plants growing in Grece and their essential oils". *The Flavour Ind.* 3, 11, 566-568.
- [399] LAWRENCE, B.M. (1983): "The botanical and chemical aspects of Oregano". *LXth. International Congreso* of Essential Oils, Singapore. Book 2, 39-58.
- [400] RHIU, H.Y. (1979): "Gas chromatographic characterization of Oregano and other selected spices of the Labiate Family". *J. Food Sc.* 44, 1973-1978.
- [401] FLEISHER, A., FLEISHER, Z.H., SNEER, N. Y JOFFE, A. (1980): "Chemical and botanical aspect of the biblical Hyssop". VIIIth. International Congress of Essential Oils. Cannes-Gasse, págs. 666-672.
- [402] FLEISHER, A. Y SNEER, N. (1982): "Oregano spices and *Origanum* chemotypes. *J. Sci. Food Agric.* 33, 441-446.
- [403] FLEISHER, A., BEN-HERUTH, Z., ABU-ELRUB, F. Y DAKA, A. (1983): "Cultivation of *Majorana syriaca*. L. Rafin for essential oil spice production". *IXth. International Congress of Essential Oils, Singapore.* Book 1, 160-164.

- [404] PUTIEVSKY, E., RAVID, U. Y HUSAIN, S.Z. (1983): "Diferences in field-components and essential oils during the life cycle of *Origanum vulgari* L"., *IXth. International Congress of Essential oils, Singapore*. Book 2, 59-65.
- [405] STAHL, W.H., SKARZYNSKI, J.N. Y VOELKER, W.A. (1969): "Spices and other condiments. Diferentiation of geographic origin of spices. II. oregano by T.L.C.". *J. Assoc. of Anal. Chemists*. 52, 6, 1184-1189.
- [406] ZAITSCHIK, D.V. Y LEVONTIN, S. (1971): "Investigation in phenol-containing essential oils of *Labiatae* from Israel". *Harokeach Haivri*. 14, 284-298.
- [407] PARIS, R. (1976): "Chimiotaxinomie et biogénèse des huiles essentielles". *Parfums, cosmétiques, arômes*. 12, 65-71.
- [408] BAKER, R.T. Y SMITH, H.G. (1920): "A Research on the Eucalyptus Gouvern". Printer, Sydney.
- [409] PENFOLD, A.R. Y MORRISSON, F.R. (1950): *Austral Journ. Sc.* 13, 24.
- [410] REINECKLES, V.C. Y MABRY, T.J. (1975): "Terpenoids". Acad. Press. London.
- [411] REITSEMA, R.H. (1968): *J. Amer. Pharm. Asso.* (Sc. Edit.) 47, 258.
- [412] FESTER, G.A. (1962): *Rev. Fac. Ing. Quím. Santa Fe*. 31, 39.
- [413] PEYRON, L. (1972): *Pl. med. et Phyto*. 6, 7.
- [414] GRANGER (1973): *Phytochem.* 12, 1683.
- [415] SABETAY, H. (1938): "Chimie des parfums". Ed. Gauthier. Villars.
- [416] DILLEMANN, G. (1960): *Planta médica*. 8, 168.
- [417] HEGNAUER, R. (1967): "*In progress in the Chemistry of natural products*". 4, 182. Butterworth edit. Londres.
- [418] PARIS, R. Y DELAVEAU, P. (1965): *Bull. Soc. Bot. France*. 143.
- [419] NAVES, Y.R. (1969): *La France et ses parfums*. 12, 39.
- [420] BERNFELD, P. (1963): "Biogenese of natural compounds". Pergamon. Press. Oxford.
- [421] LOWELL PONTE (1982): "Olores, mensajes secretos". *Selecciones del Reader's Digest*. Agosto, 94-98.
- [422] BETHE, A. (1932): *Naturwissenschaften*. 20, 177-181.
- [423] KARLSON, P. Y BUTENANDT, A. (1959): *Ann. Rev. Entomol.* 4, 39-48.
- [424] PAIN, J. (1970): "Pheromones et comportement chez quelques hyménoptères". Tomado de "Les hormones et le comportement". Expansion Scientifique. Paris. Págs. 237-258.
- [425] MORNEX, R. (1978): "Les phérormones". *Labo-Pharma. Probl. Tech.* 26, 277, 479-484.
- [426] ROPARTZ, P. (1970): "Les phérormones dans la régulation du comportement social et la physiologie sexuelle des rongeurs". Tomado de "Les Hormones et le comportement". Expansion Scientifique. Paris. Págs. 319-334.
- [427] TABAN, C. (1972): *Med. Hygiène*. 30, 761-765.

- [428] WILSON, E.O. Y BOSSERT, W.H. (1.963): *Recent. Prog. Horm. Res.* **19**, 673-710.
- [429] ROELOFS, W.L. Y COMEAU, A. (1.969): *Science.* **165**, 398-400.
- [430] BOECK, H.J., SASS, H. Y WHARTON, D.R.A. (1.970): *Science.* **168**, 589.
- [431] KAAE, R.S., SHOREY, H.H. Y GASTON, L.K. (1.973): *Science.* **179**, 487-488.
- [432] HAPP, G.M. (1.969): *Nature.* **222**, 180-181.
- [433] LAW, J.H. Y F.E. REGINER (1.971): *Ann. Rev. Biochem.* **40**, 533-548.
- [434] WIENER, H. (1.966): *New York J. Med.* 3153-3170.
- [435] CLEVELAND, W.W. Y SAVARD, K. (1.964): *J. Clin. Endocrinol.* **24**, 983-987.
- [436] SMITH, K., THOMPSON, G.F., KOSTER, H.D. (1.969): *Science.* **166**, 398-399.
- [437] WALTMAN, R. Y COL. (1.973): *Lancet*, **2**, 496.
- [438] MICHAEL, R.P., ZUMPE, D., KEVERNE, E.B. Y CONSALL, R.W. (1.972): *Recent. Prog. Horm. Res.* **28**, 665-706.
- [349] KLIGMAN, A.M. Y SHEHADEH, N. (1.964): *Arch. Dermatol.* **89**, 461-463.
- [440] LE MAGNEN, J. (1.952): *Arch. Sci. Physiol.* **6**, 125-160.
- [441] VIERLING, J.S. Y ROCK. (1.967): *J. Appl. Phys.* **22**, 311-315.
- [442] SCHNEIDER, R.A., COSTILOE, J.P., HOWARD, R.P. Y WOLF, S. (1.958): *J. Clin. Endocrinol.* **18**, 379-390.
- [443] VEYLON, R. (1.972): *Nouv. Presse. Med.* **1**, 2993-2995.
- [444] MC. CLINTOCK, M.K. (1.971): *Nature.* **229**, 244-245.
- [445] EDITORIAL (1.966): Led by the nose? *Lancet.* **2**, 690-691.
- [446] EDITORIAL (1.971): A human pheromone? *Lancet.* **1**, 279.
- [447] PEYRON, L. (1.982): "Tendances et perspectives dans la recherche la mise au point et l'emploi des substances aromatisantes". *Labo-Pharma. Probl. tech.* **30**, 321-399.
- [448] VERAIN, A. (1.973): "De la correction de la saveur des médicaments". Conférence prononcée à la Société de Pharmacie de Nancy. (17. 05. 1.973).
- [449] VILLANUA, L. (1.955): Comptes rendus du 1<sup>er</sup> Symposium sur les Matieres Etrangères et les Elements Synergiques dans les aliments 6-9 Juillet. Wien I y II. Commission International des Industries Agricoles C.I.I.A. Bureau International de Chimie Analytique B. Tomo II XIV/a (1 a 22+) a XIV/d. **2**, 34.
- [450] ANONIMO (1.954): *Chem. Eng.* **61**, 50.
- [451] HELGREN, F.J., LYNCH, M.J. Y KIRCHMEYER, F.J. (1.955): *J. Amer. Pharm. Assoc. Ed. Sci.* **44**, 353.
- [452] TAUFEL, K. Y WAGNER, C. (1.925): *Ber.* **58**, 909.
- [453] MAGIDSON, O.J. Y GORBATSCHOW, S.W. (1.923): *Ber.* **56**, 1810.