



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Importancia del saborizante de origen natural
4-hidroxi-2,5-dimetilfuran-3(2H)-ona (HDMF)
en la industria de los alimentos**

TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
(TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS)**

PRESENTA

Marcos Ordaz Téllez



MÉXICO, CD. MX.

2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor:** **JOSÉ MANUEL MENDEZ STIVALET**
VOCAL: **Profesora:** **MARÍA DE LOS ÁNGELES VALDIVIA LÓPEZ**
SECRETARIO: **Profesor:** **JOSÉ ALFREDO VÁZQUEZ MARTÍNEZ**
1er. SUPLENTE: **Profesora:** **MARTHA MENES ARZATE**
2° SUPLENTE: **Profesora:** **NORMA CASTILLO RANGEL**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA, LABORATORIO 207, FACULTAD DE QUÍMICA. UNAM

ASESOR DEL TEMA:

DR. JOSÉ ALFREDO VÁZQUEZ MARTÍNEZ

SUSTENTANTE:

MARCOS ORDAZ TÉLLEZ

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México , nuestra “Máxima Casa de Estudios” que me ha dado las herramientas para continuar en mi vida profesional y que con su alma máter he aprendido a dar el esfuerzo para ayudar a quienes me rodean, a varios más y siempre a alguien más.

A la Facultad de Química por su grandeza y sus valiosos profesores que forjan a grandes personas.

Al Dr. Alfredo Vazquez, mi asesor, por ser un magnífico maestro, por su tolerancia y necesidad de titularme. Por su valiosa amistad.

A todas las voces que con sencillez me expresaron su gran amistad: Carlos Amador, Héctor García, Patricia Vargas, Adriana Mejía, Erika Martin, José Manuel Méndez, Victor Ugalde, Gustavo Tavizón, Sara Meza, Jesús Guzmán, Margarita Romero, Blas Flores, Lourdes Flores, Ángeles Valdivia, Amanda Gálvez, Norma Castellanos, Dolores Lastra, Norma Castillo, Oscar Pérez, Marco Almaraz, Martha Menes, Carlos González, Bernardo Campillo, Adriana Martínez, a los chavos del 201 y por supuesto del 207, ambos laboratorios del departamento de Química Orgánica.

A mis padres: a José Marcos muchas gracias por todo, a Aída Téllez por hacer una pausa en tu vida para mantenerme en vida todos estos años. Te amo mamá.

A mis hermanos: Arnulfo, Lupita, Beatríz, Araceli y Felipe. Los amo, los extraño.

A Rocío Romero por permitirme acompañarla y darme la gran aventura de tener a mis hijos que son mi impulso en esta vida. Enrique, Sergio, no dejen de cantar y escribir la vida que componen con la música. Estoy muy orgulloso de ustedes, los amo.

Contenido

| | |
|--|----|
| Abreviaturas | 1 |
| 1. Introducción | 3 |
| 2. Objetivo general | 4 |
| 2.1. Objetivos particulares | 4 |
| 3. Generalidades del HDMF | 4 |
| 3.1. Fórmula y Especificaciones técnicas del HDMF | 5 |
| 3.2. Propiedades organolépticas del HDMF | 5 |
| 3.3. Sinónimos y registros en la industria alimentaria para el HDMF | 6 |
| 3.4. Consumo mundial del HDMF | 7 |
| 3.5. Usos para el HDMF reportados por FEMA | 8 |
| 3.6. Rutas probables de la exposición humana | 8 |
| 3.7. Riesgo para la salud por exposición al HDMF | 9 |
| 3.8. Solubilidad | 9 |
| 3.9. Diferencias en umbrales de olor entre los enantiómeros del HDMF | 10 |
| 3.10. Evaluación del olor de las furanonas enantiopuras | 14 |
| 4. Presencia del HDMF en frutas y legumbres | 17 |
| 4.1. HDMF en fresa | 19 |
| 4.2. Constituyentes de olor activos en piña fresca (<i>Ananas comosus</i> [L.] Merr.) | 22 |
| 4.3. HDMF en diferentes partes de la piña | 23 |
| 4.4. HDMF en tomate fresco | 24 |
| 4.5. Cálculo de los Valores de Actividad Olfativa (OAVs, siglas en inglés) | 26 |
| 4.6. Propiedades sensoriales del HDMF | 28 |
| 5. Cuantificación del HDMF | 30 |
| 5.1. Cuantificación por dilución de isótopos estables | 31 |
| 5.2. Cuantificación del HDMF en tomate utilizando muestras dinámicas de espacio de cabeza con sulfato de sodio | 32 |
| 5.3. Cuantificación de HDMF en pan de trigo y palomita de maíz | 35 |
| 5.4. Determinación cuantitativa de HDMF libre en vino | 36 |
| 6. Formación de HDMF en alimentos procesados térmicamente | 37 |
| 6.1. Precursores de HDMF en la masa del trigo | 40 |
| 6.2. Azúcares libres como precursores de HDMF | 41 |
| 6.3. Precursores del HDMF en el maíz | 43 |
| 6.4. Formación de HDMF a partir de fosfatos de azúcares | 45 |

| | |
|---|----|
| 6.5. HDMF y componentes con actividad aromática en leche seca sin grasa | 49 |
| 7. Contribución del HDMF en el umbral, olor y sabor de los alimentos..... | 50 |
| 7.1. Aromas por el efecto del tratamiento térmico. | 51 |
| 7.2. Reacción de Maillard | 52 |
| 8. Estabilidad del HDMF en los alimentos | 53 |
| 9. Biosíntesis del HDMF..... | 60 |
| 9.1. Formación de HDMF en la fresa..... | 60 |
| 9.2. Biosíntesis de 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona por <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> | 63 |
| 9.3. Condiciones de producción del HDMF | 65 |
| 9.4. Estudio de las condiciones óptimas de la formación de HDMF. Influencia de la concentración de D-fructosa 1,6-difosfato. | 67 |
| 9.5. Influencia de los tiempos de cultivo. | 67 |
| 9.6. Estudio de producción de HDMF con células en reposo <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> | 68 |
| 9.7. Formación de 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona por <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> : Identificación de un Intermediario | 70 |
| 9.7.1. Detección de compuestos de α -dicarbonilo derivados de FBP | 72 |
| 9.7.2. Incubación con extractos de proteínas obtenidos de <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> | 74 |
| 10. Síntesis Química..... | 79 |
| 10.1. Síntesis del HDMF a partir de ácido tartárico | 80 |
| 10.2. Formación de 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona a partir de D-fructosa-1,6-difosfato. | 88 |
| 11. Importancia del HDMF en la industria de los alimentos | 93 |
| 11.1. Hidrofuranos como saborizantes de fresa para productos alimenticios y bebidas..... | 93 |
| 11.2. Composiciones de sabor de carne de furanona | 94 |
| 11.3. Nuevos derivados del HDMF, usos como potenciadores del sabor | 95 |
| 12. Conclusiones | 97 |

Abreviaturas

| | |
|-------------------|---|
| AEDA | Análisis de dilución de extracto de aroma (Aroma extract dilution Analysis) |
| CAS | Una división de la Sociedad Americana de Química (Chemical Abstracts Service). Asigna identificadores a cada compuesto químico que ha sido descrito en la literatura. |
| cm ³ | Centímetros cúbicos |
| CoE | El Consejo de Europa (The Council of Europe) |
| DAD | Detección de matriz de diodos (Diode array detection) |
| FAO | Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (Food and Agriculture Organization of the United Nations) |
| FD | Factor de dilución de sabor (Flavor dilution) |
| FDA | Agencia federal de los Estados Unidos de la Administración de alimentos y medicamentos (U.S. Food and Drug Administration). |
| FEMA | Panel de expertos de la Asociación de fabricantes de sabores y extractos. (Flavor and Extract Manufacturers' Association). |
| g | Gramos |
| HPLC-DAD | Cromatografía de líquidos de alta eficiencia con detección de matriz de diodos |
| HPLC-ESI-UV-MS/MS | Cromatografía de líquidos de alta eficiencia acoplada con detección UV y espectrometría de masas en tándem |
| HSCCC | Cromatografía a contracorriente de alta velocidad (High speed countercurrent chromatography) |
| JECFA | Comité Mixto (OMS/FAO) de Expertos en Aditivos Alimentarios y Contaminantes de los Alimentos (Joint Expert Committee on Food Additives and Contaminants). |
| <i>m/z</i> | Relación masa/carga |
| mg | Miligramos |
| OAVs | Valor de actividad olfativa (Odor activity values) |
| OMS | Organización mundial de la Salud.(World Health Organization) |
| PADI | Posible ingesta diaria promedio. (Possible average daily intake) |

| | |
|------|---|
| pH | Potencial de hidrógeno: $\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$ |
| pKa | Logaritmo negativo de la constante de acidez |
| ppm | Partes por millón |
| SAFE | Evaporación de sabor asistida por disolvente (Solvent-assisted flavor evaporation) |
| SFC | Fluido supercrítico |
| SIDA | Dilución de isótopos estables (Stable isotope dilution assays) |
| SPE | Extracción en fase sólida. |
| Torr | Unidad de presión |
| UV | Ultra violeta |
| VCD | Discrepancia circular vibratorio. Técnica para determinar la estereoquímica absoluta de compuestos orgánicos. |
| °C | Grados celsius |
| µg | Microgramos |

Valor del umbral

La concentración más baja de un compuesto que es suficiente para el reconocimiento de su olor se llama el umbral de olor (umbral de reconocimiento).

Valor del Aroma

Los compuestos con altos "valores de aroma" pueden contribuir al aroma de los alimentos. El "valor del aroma" A_x de un compuesto se calcula según la definición:

$$A_x = \frac{c_x}{a_x}$$

En donde:

c_x es la concentración del compuesto X en el alimento

a_x es el umbral del aroma del compuesto X en el alimento

1. Introducción

El advenimiento de nuevas tecnologías instrumentales y de técnicas analíticas más eficientes para la preparación, manejo y detección de muestras, ha permitido identificar y caracterizar un mayor número de compuestos responsables del aroma y sabor de frutas, verduras y legumbres sin procesar y procesados. La generación y acumulación de conocimiento ha permitido una mejor comprensión de la relación entre la estructura química y la respuesta fisiológica de los compuestos presentes en los alimentos con el objetivo de producir alimentos nutritivos, con atributos sensoriales deseables y con el sabor hecho a la medida del consumidor. La 4-hidroxi-2,5-dimetil-3[2H]-furanona (HDMF) es un compuesto orgánico aromático de gran importancia como aditivo en la industria de saborizantes para bebidas y alimentos procesados. Este compuesto está presente en alimentos naturales como la piña, la fresa, la naranja, el mango, la uva, el kiwi, y el tomate; así como en alimentos procesados como la carne horneada y asada, el pan, el café, el chocolate, papas fritas, palomitas de maíz, pastas para repostería, todos elaborados por los procesos de cocción, horneado, asado, tostado y caramelización.

Por otro lado, también se ha identificado al HDMF, en procesos de fermentación, maduración y almacenamiento de bebidas como los extractos de jugos, así como en la elaboración del vino y de la cerveza. El HDMF, al igual que muchos de los compuestos volátiles responsables del olor, sabor y del aroma, son generados por la acción térmica y/o enzimática sobre los macronutrientes presentes en los alimentos como proteínas, polisacáridos y lípidos, que en conjugación con las variables de temperatura, humedad, pH del alimento y factores como región de procedencia del alimento, madurez y almacenamiento, son responsables de la mezcla compleja de reacciones que aportan el color, aroma y sabor, parámetros que juegan un papel fundamental en la aceptación o rechazo de los alimentos naturales y procesados por parte de los consumidores.

En el presente trabajo monográfico se discute el aislamiento y caracterización del HDMF en matrices alimenticias, su importancia en la industria de alimentos, la cual incluye información sobre su volumen de producción, así como aspectos relacionados con la formación de este compuesto por biosíntesis, durante el procesado de alimentos y mediante síntesis química.

2. Objetivo general

- Analizar la información publicada sobre la 4-hidroxi-2,5-dimetilfuran-3(2H)-ona (HDMF) en el contexto alimentario para evaluar su importancia tecnológica.

2.1. Objetivos particulares

- Recabar la bibliografía sobre registros de la presencia del HDMF tanto en productos naturales como en alimentos procesados.
- Analizar la información sobre la formación y transformaciones del HDMF en matrices alimenticias.
- Investigar la aplicación del HDMF en productos procesados a nivel industrial.
- Identificar los nuevos métodos analíticos y su sensibilidad para la identificación del HDMF en los alimentos a nivel laboratorio e industria.
- Investigar en la literatura los métodos químicos para la obtención de HDMF.

3. Generalidades del HDMF

El sabor y el aroma son los aspectos más importantes para elegir y decidir consumir un alimento. Los compuestos que proporcionan los aromas y sabores que se encuentran atrapados en la compleja matriz de los alimentos, su presencia y concentración dependen de varios factores como son: la reactividad química del compuesto aromatizante, de los diferentes estadios de madurez, lugar de procedencia, tiempo de cosecha, almacenamiento, pH del medio en el alimento, exposición a la luz, atmósfera de oxígeno, presencia de agua, metabolismo (enzimas) y tratamiento térmico si es procesado el alimento.

La comprensión de la estabilidad del compuesto que aporta el sabor y el conocimiento de las técnicas para retrasar su degradación, son factores importantes para maximizar la calidad de los productos alimenticios para su aceptación y consumo.¹

¹ Weerawatanakorn, M.; Wu, J. C.; Pan, M. H.; Ho, C. T. Reactivity and Stability of Selected Flavor Compounds. *J. Food Drug Anal.* **2015**, 23 (2), 176–190.

3.1. Fórmula y Especificaciones técnicas del HDMF

La 4-hidroxi-2,5-dimetilfuran-3(2*H*)-ona (HDMF) es un compuesto orgánico heterocíclico aromático de cinco miembros con un átomo de oxígeno que pertenece a la familia de los furanos. El HDMF contiene, además, un grupo funcional cetona, un hidroxilo, un éter y dos metilos. El HDMF contiene un átomo estereogénico, y por lo tanto puede existir como dos enantiómeros (Figura 1). El enantiómero (*R*)-HDMF es el que se encuentra en la naturaleza, por lo que imparte un olor y aroma más fuerte que el enantiómero (*S*)-HDMF.²



Figura 1. Estructuras de (*R*)- y (*S*)-HDMF

3.2. Propiedades organolépticas del HDMF

Olor: Sabor a fruta muy distintivo a un aroma dulce a fresa, también por un aroma con nota a caramelo, a una tonalidad de piña. Entre los compuestos aromáticos que exhiben olores parecidos al caramelo, la 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2*H*)-furanona (HDMF) es de especial interés, debido a sus umbrales de sabor relativamente bajos de 0.03 mg/kg (sabor) y 0.1 mg por litro de agua (olor). Recientemente el HDMF se identificó como un producto natural del insecto *Eurycotis floridana*. Extractos de glándulas masculinas revelaron un olor característico de caramelo que es atractivo a distancia para las hembras.³

Aspecto físico: Puede existir como un polvo de color beige o cristales incoloros.

² ACS C for the W. Furaneol - American Chemical Society. Molecule of the Week. https://www.acs.org/content/acs/en/molecule-of-the-week/archive/f/furaneol.html?_ga=2.93564829.1821473602.1507133668-875316513.1484953425. Accessed October 4, 2017.

³ Hecquet, L.; Sancelme, M.; Bolte, J.; Demuynck, C. Biosynthesis of 4-Hydroxy-2,5-Dimethyl-3(2*H*)-Furanone by *Zygosaccharomyces Rouxii*. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44* (5), 1357–1360.

Tabla 1. Especificaciones de la 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2*H*)-furanona HDMF.⁴

| | |
|--------------------------------|---|
| Formula empírica: | C ₆ H ₈ O ₃ |
| Peso molecular: | 128.13 |
| pKa: | 9.62 ± 0.40, medio ácido a 25°C. |
| Punto de ebullición: | 110 – 113 °C. |
| Punto de fusión: | 70 °C, experimental. |
| Índice de refracción: | N20/D 1.439 |
| Densidad: | 1.249 ± 0.06 g/cm ³ . 20° C, presión a 760 Torr. |
| Temperatura de almacenamiento: | 2 a 8 °C |
| Apariencia: | Incolora a sólido blanco |
| Punto de fusión: | 78 – 80 °C |
| Para ensayo pureza mínimo: | 98% C ₆ H ₈ O ₃ |
| Solubilidad: | Soluble en etanol, insoluble en agua |

3.3. Sinónimos y registros en la industria alimentaria para el HDMF

| Sinónimos ³ | Registros ⁴ |
|--|------------------------|
| Dimetilhidroxifuranona | CAS No.: 3658-77-3 |
| 2,5-dimetil-4-hidroxi-2,3-dihidrofuran-3-ona | CoE No.: 536 |
| 2,5-dimetil-4-hidroxi-3(2 <i>H</i>)-furanona | FL No.: 13.010 |
| 2,5-dimetil-3-hidroxi-4-oxo-4,5-dihidrofurano | EINECS No.: 222-908-8 |
| 4-hidroxi-2,5-dimetil 3(2 <i>H</i>)-furanona | FEMA No.: 3174 |
| 4-hidroxi-2,5-dimetilfuran-2(3 <i>H</i>)-ona | JECFA No.: 1446 |
| 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2 <i>H</i>)-furanona | NAS No.: 3174 |
| Nombres comunes: | |
| HDMF; Furaneol; Cetona de piña; Furanona de fresa; Alletona; COE 536 | |

⁴ Burdock, G. A. *Fenaroli's HandBook of Flavor Ingredients*, 6th. ed.; Group), C. P. (Taylor & F., Ed.; London New York, 2010.

3.4. Consumo mundial del HDMF

Consumo Anual: 16,216.67 lb

Consumo Individual: 0.01374 mg/kg/día

Estado Regulatorio:

- CoE: Usado provisionalmente para alimentos: 5 ppm
- FDA: sin registro
- JECFA: ADI: Aceptable. No hay preocupación de seguridad en los niveles actuales de ingesta cuando se usa como agente aromatizante (2004).⁵

Lineamientos de asociación de comercio: FEMA PADI: 1.516 mg

- PADI de FEMA (en miligramos/persona/día) es el consumo promedio de alimentos que contienen la cantidad máxima.
- FEMA: Panel de expertos de la Asociación de fabricantes de sabores y extractos. (Flavor and Extract Manufacturers' Association).
- PADI: Posible ingesta diaria promedio. (Possible average daily intake).
- JECFA: Comité Mixto (OMS / FAO) de Expertos en Aditivos Alimentarios y Contaminantes de los Alimentos (Joint Expert Committee on Food Additives and Contaminants).
- CoE: El Consejo de Europa (The Council of Europe)

El CoE (Consejo de Europa), usa una definición bastante amplia de sabor: una sustancia aromatizante es un compuesto químicamente definido que tiene propiedades aromatizantes. Se obtiene por aislamiento de una fuente natural o por síntesis. Las propiedades aromatizantes son aquellas que son predominantemente productoras de olores y que también pueden afectar el sabor.⁶

⁵ Amoah, P.; Beuchat, L. R.; Buchanan, R.; Desmarchelier, P.; Junior, M. F.; Moren, V. M. G.; Hu, D.; Lindblad, M.; Nguyen-The, C.; Pielaat, A. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives Sixty-Third Meeting Geneva, 8-17 June 2004. *Food Agric. Organ. United Nations* **2011**, No. 65, 1–16.

⁶ Burdock, G. A. *Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients*, 6th. ed.; Group, C. P. (Taylor & F., Ed.; London) New York, 2010.

El HDMF se consume como saborizante en bebidas y alimentos procesados, así como aditivo en los cigarrillos. El metoxifuraneol (HDMF con un grupo metilo en lugar del átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo) es también un constituyente importante del aroma de la fresa. Ambas moléculas se utilizan en perfumes con fragancias a fresas y como complemento de aromatizantes (Tabla 2).

3.5. Usos para el HDMF reportados por FEMA

Tabla 2. Usos HDMF reportados por categoría de alimento (FEMA, 1994)⁶

| Categoría de Alimento | ppm | | Categoría de Alimento | ppm | |
|-----------------------------|-------|--------|---------------------------|-------|--------|
| | Usual | Máximo | | Usual | Máximo |
| Bebidas alcohólicas | 0.54 | 0.75 | Mermeladas, jaleas | 0.59 | 0.59 |
| Panadería y Pastelería | 3.50 | 3.50 | Bebidas no alcohólicas | 5.00 | 80.00 |
| Gomas de mascar | 2.60 | 2.60 | Condimentos, saborizantes | 1.20 | 10.00 |
| Grasas, aceites | 0.10 | 0.50 | Goma y caramelo suave | 20.00 | 60.00 |
| Helados, lácteos congelados | 5.41 | 10.49 | Salsas dulces | 5.00 | 40.00 |
| Gelatinas, pudines | 10.00 | 80.00 | | | |

El HDMF o furanona de fresa, es un compuesto ampliamente distribuido en la naturaleza de un gran valor para la industria del sabor en bebidas y alimentos procesados y como aditivo en cigarrillos.⁶

3.6. Rutas probables de la exposición humana

La exposición ocupacional a dimetilhidroxifuranona (HDMF) puede ocurrir por inhalación y contacto dérmico con este compuesto en lugares de trabajo donde se produce o usa HDMF. Los datos de monitoreo indican que la población general puede estar expuesta a la HDMF a través de la inhalación de volátiles y aromas de los alimentos, la ingestión de alimentos y bebidas, y el contacto dérmico con productos de consumo que contienen HDMF.

La exposición también puede ocurrir por fumar cigarrillos. Si la dimetilhidroxifuranona (HDMF) se libera al medio ambiente, se descompondrá en el aire por efecto de la luz solar. Este compuesto se mueve de suelos húmedos y aguas superficiales para integrarse al aire. Se espera su acumulación en peces.⁷

3.7 Riesgo para la salud por exposición al HDMF

La Organización Mundial de la Salud (OMS) determinó que no existe “preocupación de seguridad” para la salud humana en los niveles actuales de HDMF utilizados para los aditivos alimentarios, debido a la falta de efectos tóxicos en los animales de laboratorio después de la exposición oral repetida. Los datos del potencial de toxicidad del HDMF en humanos no están disponibles. Los datos sobre el potencial del HDMF para causar infertilidad, aborto o defectos de nacimiento en animales de laboratorio no están disponibles.⁷

El programa IRIS de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos, la Agencia Internacional para la investigación del Cáncer y en el 13° Informe sobre Carcinógenos del Programa Nacional de Toxicología de EE.UU. no ha evaluado la posibilidad de que el HDMF cause cáncer en humanos.⁷

3.8. Solubilidad

Se determinó la solubilidad del HDMF en agua a 0.315 g/mL a 25 °C; soluble en solventes orgánicos tales como etanol 1g HDMF/mL etanol 95%. Se ha reportado que disolventes orgánicos como el acetato de etilo, el éter etílico y el diclorometano pueden extraerlo de frutas y vegetales para su detección cualitativa y medición cuantitativa.⁷

⁷ New York, 2010. TOXNET <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/f?./temp/~iERYF1:4> (accessed Jan 18, 2018).

El desarrollo de métodos para su análisis cuantitativo ha sido limitado debido a la alta polaridad y la inestabilidad del compuesto en la matriz de los alimentos, en especial de aquellos que son sometidos a descomposición oxidativa o térmica. Su Log *D* en agua y Log *P* en buffer de fosfato 0.1 M fueron de -0.133 y 0.95 (20 °C), respectivamente. Su pKa fue de 8.56 (20 °C).⁸

3.9. Diferencias en umbrales de olor entre los enantiómeros del HDFM.

Varios compuestos de sabor tienen átomos estereogénicos (centros quirales) en sus estructuras, y se ha demostrado que existen diferencias en las características de olor y umbrales de detección entre los correspondientes enantiómeros.

El dicroísmo circular vibratorio (VCD, por sus siglas en inglés)⁹ la cual es una técnica desarrollada recientemente para la determinación de la esteoquímica absoluta de compuestos orgánicos, asistida inicialmente por cálculos de la teórica cuántica, se ha usado para estudiar furanonas aromáticas con olor activo que tienen una estructura tautomérica ceto-enólica única, propensa a la racemización. Ejemplos de 3(2*H*)-furanonas sustituidas en posición 2 y de 2(5*H*)-furanonas sustituidas en posición 5, se muestran en la Figura 2.⁹

Los compuestos de la Figura 2., son saborizantes naturales que tienen olor dulce azucarado y a caramelo quemado y que contribuyen a las propiedades sensoriales de muchos productos naturales y alimentos procesados térmicamente; poseen umbrales de olor extremadamente bajos, tales como 60 ppb para HDMF (**1**), 20 ppb para el homofuraneol (**5**), 1 ppt para la sotolona (**6**), y 0.01 ppt para la furanona de maple (**7**) que muestra uno de los umbrales de olor más bajos reportados para compuestos orgánicos.

⁸ Chen, Y.; Sidisky, L. M. Quantification of 4-Hydroxy-2,5-Dimethyl-3-Furanone in Fruit Samples Using Solid Phase Microextraction Coupled with Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A.* **2011**, 1218 (38), 6817–6822.

⁹ Yaguchi, Y.; Nakahashi, A.; Miura, N.; Taniguchi, T.; Sugimoto, D.; Emura, M.; Zaizen, K.; Kusano, Y.; Monde, K. Vibrational CD (VCD) Spectroscopy as a Powerful Tool for Chiral Analysis of Flavor Compounds. *ACS Symp. Ser.* **2015**, 1212 (Vcd), 35–56

Los compuestos aromáticos naturales se presentan a menudo en concentraciones en exceso de uno de los posibles enantiómeros, los cuales poseen características e intensidades organolépticas diferentes. Sin embargo, las 3(2*H*)-furanonas, sustituidas en posición 2, tales como HDMF **(1)**, mesifurano **(2)**, acetato de furaneol **(4)** y el homofuraneol **(5a, 5b)** se aislaron como compuestos ópticamente inactivos, debido a sus estructuras tautoméricas ceto-enólicas únicas que causan la racemización (Esquema 1).⁹

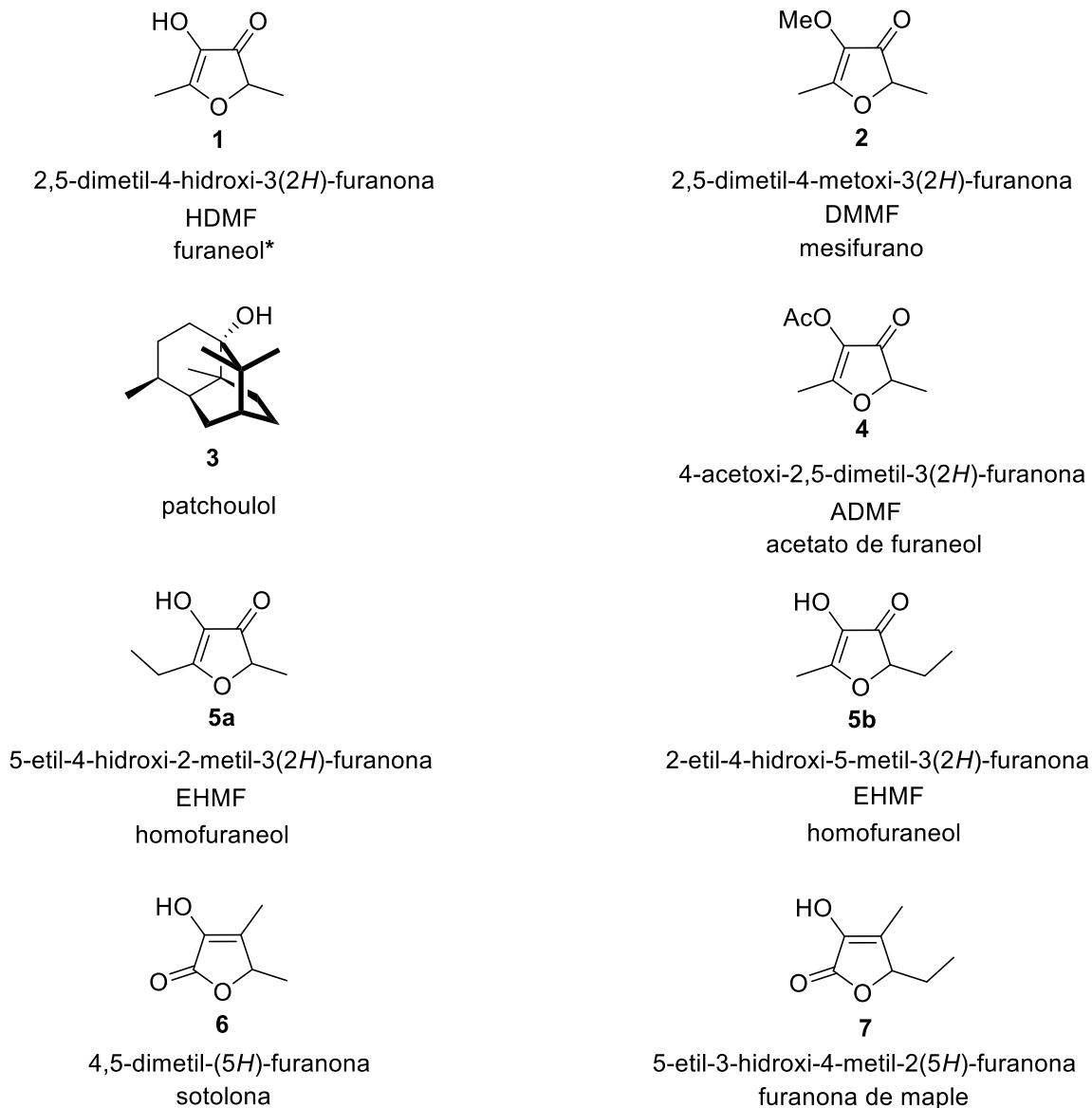
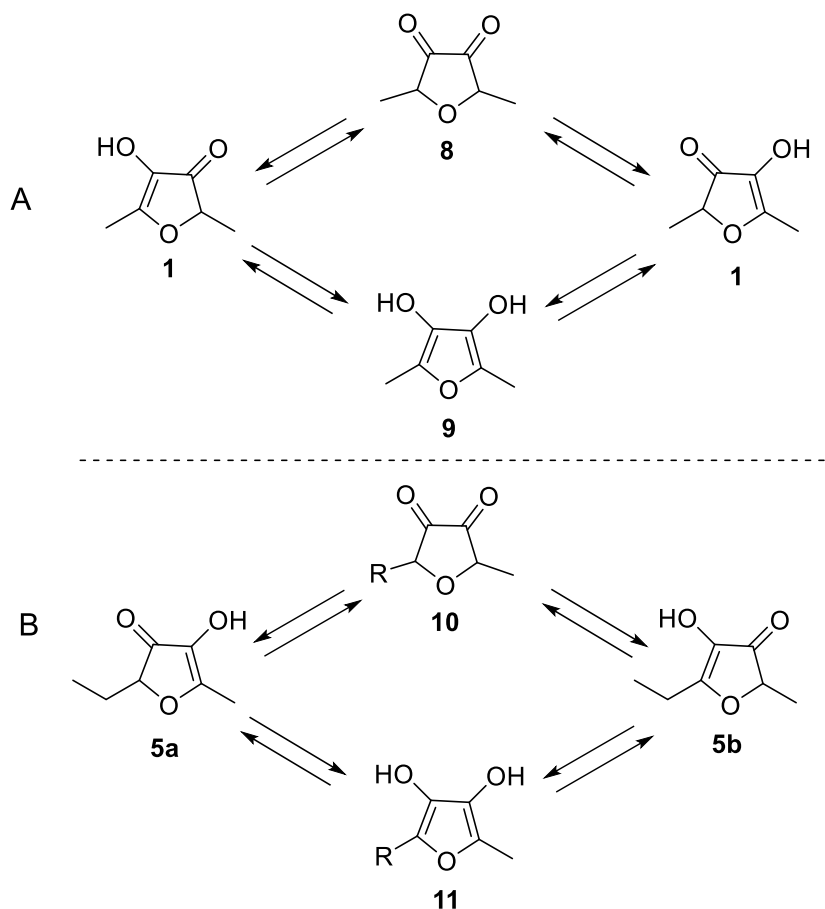


Figura 2. Las 3(2*H*)-furanonas, sustituidas en posición 2 y las 2(5*H*)-furanonas, sustituidas en posición 5. *Furaneol, marca registrada de Firmenich S.A., Switzerland.

También la regioisomerización entre las estructuras del homofuraneol (**5a**) y (**5b**) ocurre durante esta isomerización tautomérica (Esquema 1).



Esquema 1. Tautomerización ceto-enol de 3(2*H*)-furanonas sustituidas en posición 2. [En A el HDMF (**1**), en B el homofuraneol (**5a**, **5b**)].

A pesar de sus propiedades organolépticas y su importancia para las industrias de aromas y fragancias como en materias primas, la relación entre el signo de rotación óptica y la estequiímica absoluta de estas furanonas, a excepción de la sotolona (**6**), no han sido reportadas. Aunque estos compuestos poseen estructuras bastante simples, la determinación de la configuración absoluta por métodos convencionales ha sido extremadamente difícil, debido a sus estructuras tautoméricas ceto-enol únicas.

Esta tautomería obstaculiza los estudios cristalográficos por difracción de rayos X, así como las derivatizaciones requeridas para la aplicación del método estándar de Mosher.¹⁰

¹⁰ Hoye, T. R.; Jeffrey, C. S.; Shao, F. Mosher Ester Analysis for the Determination of Absolute Configuration of Stereogenic (Chiral) Carbinol Carbons. *Nat. Protoc.* **2007**, 2 (10), 2451–2458.

La separación quiral por cromatografía de fluidos supercríticos de CO₂ (SFC, por sus siglas en inglés)⁹ se conoce como un método de resolución óptica a escala preparativa eficaz en el campo farmacéutico para productos químicos que tienen un grupo aromático. Últimamente, la metodología SFC se ha usado para de la resolución óptica para compuestos de sabor. Este método tiene la ventaja de minimizar los procedimientos térmicos, tales como la evaporación del disolvente orgánico, un factor potencial de racemización.

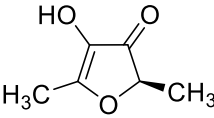
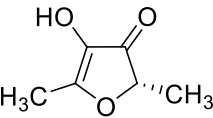
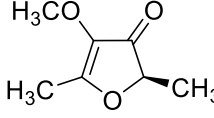
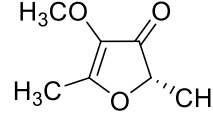
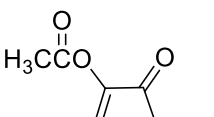
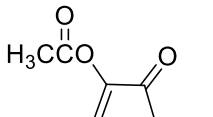
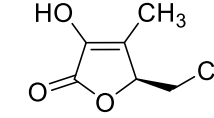
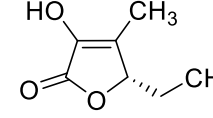
La técnica de dicroísmo circular vibratorio (VCD, por sus siglas en inglés) para determinar la estereoquímica absoluta de compuestos orgánicos, acoplada con la resolución óptica SFC quiral, así como las propiedades organolépticas de los enantiómeros, se han usado para estudiar las configuraciones absolutas de las estructuras 3(2*H*)-furanonas sustituidas en posición 2 y las estructuras 2(5*H*)-furanonas sustituidas en posición 5 utilizando el método VCD.⁹

3.10. Evaluación del olor de las furanonas enantiopuras

Para ambos enantiómeros de los compuestos HDMF, mesifurano, acetato de furaneol y furanona de maple, las evaluaciones de olor se llevaron a cabo,¹¹ y como se esperaba, se percibieron diferencias organolépticas significativas entre estos enantiómeros, como se muestra en la Tabla 3.⁷ Contrariamente a los datos presentados para HDMF, los resultados muestran que el isómero (*R*)-(+) presenta olor intenso, mientras la diferencia considerable de intensidad de olor entre los enantiómeros del mesifurano está de acuerdo con los resultados anteriores. Por otra parte, se encontró que el isómero (*R*)-(+) del acetato de furaneol tenía un olor más fuerte que el isómero (*S*)-(-). Es interesante que los estereoisómeros de configuración (2*R*) del HDMF, del mesifurano y del acetato de furaneol puedan desempeñar un papel importante para la nota dulce intensa que es característica de las 3(2*H*)-furanonas sustituidas en posición 2.

¹¹ Bruche, G.; Dietrich, A.; Mosandl, A. Stereoisomeric Flavor Compounds. Part 71. Determination of the Origin of Aroma-Active Dihydrofuranones. *Zeitschrift fuer Leb. und -forsch.* **1995**, *201* (3), 249–252.

Tabla 3. Configuración absoluta y descripción de las furanonas aisladas ópticamente activas

| Compuesto | Descripción del olor | Compuesto | Descripción del olor |
|---|--|--|---|
|  <p>1a (<i>R</i>)-(+)-HDMF</p> | Evidentemente fuerte, azucarado, afrutado, dulce |  <p>1b (<i>S</i>)-(-)-HDMF</p> | Extremadamente tenue |
|  <p>2a (<i>R</i>)-(+)-mesifurano</p> | Caramelo intenso, quemado |  <p>2b (<i>S</i>)-(-)-mesifurano</p> | Lactona, similar a la cumarina, sin olor a caramelo |
|  <p>4a (<i>R</i>)-(+)-acetato de furaneol</p> | Caramelo intenso, quemado |  <p>4b (<i>S</i>)-(-)-acetato de furaneol</p> | Tenue a caramelo |
|  <p>7a (<i>R</i>)-(+)-furanona de maple</p> | Jarabe de arce |  <p>7b (<i>S</i>)-(-)-furanona de maple</p> | Jarabe de arce menos intenso que (<i>R</i>)-(+)-furanona de maple |

La aplicación de la técnica VCD se extendió a furanonas con olor activo que son propensas a racemizar debido al tautomerismo ceto-enol. Después de las resoluciones ópticas eficientes por SFC, se estableció la estereoquímica absoluta para el HDMF, el mesifurano, el acetato de furaneol y para la furanona de maple. Sorprendentemente, el resultado mostró configuraciones (*R*)-(-) y (*S*)-(+) para el 3-hidroxi-4,5-dimetil-2(5*H*)-furanona (sotolona) y (*R*)-(+) y (*S*)-(-) para el 5-etil-3-hidroxi-4-metil-2(5*H*)-furanona (furanona de maple). Debe enfatizarse que estas furanonas exhiben signos opuestos de rotación óptica a pesar de sus mismas configuraciones absolutas. Se ha reportado el

hallazgo que incluso las moléculas simples y rígidas con la misma configuración absoluta pueden tener rotación óptica opuesta.¹¹

También se han investigado las relaciones estructura-actividad entre configuraciones absolutas y características de olor. Los resultados muestran que los isómeros (*2R*) de 3(*2H*)-furanonas sustituidas en posición 2, son los principales contribuyentes que representan el característico olor a azúcar quemado.⁹ Probablemente, el método de VCD también puede ser útil para la caracterización quiro-óptica de otros compuestos de aroma activos.

4. Presencia del HDMF en frutas y legumbres

El HDMF se identificó como el compuesto volátil que aporta sabor y aroma natural en:

- Piña (Rodin et al., 1965)¹²
- Mango (Pickenhagen et al., 1981)¹⁴
- Toronja (Lee and Nagy, 1987)¹⁶
- Fresa (Sanz et al., 1995)¹⁸
- Muchos frutos, el HDMF-glucósido y el HDMF-malonil-glucósido ^{20,21}.
- Frambuesa (Honkanen et al., 1980)¹³
- Mora ártica (Kallio et al., 1984)¹⁵
- Tomate (Buttery et al., 1994)¹⁷
- Fresas, HDMF-β-D-glucopiranosido¹⁹

Desde entonces, este compuesto se ha detectado en muchas frutas incluyendo frambuesa, en el kiwi y la uva. El HDMF es uno de los compuestos de sabor más importantes de la fresa y en la piña, por lo que también es conocido como furanona de fresa y furanona de piña, respectivamente. Imparte notas de azúcar quemado (caramelo) a altas concentraciones y se vuelve frutal, similar a las fresa a concentraciones más bajas, mientras que el mesifurano (metoxifuranona), tiene un nivel de umbral más alto²² y se describe con un aroma similar a jerez.

¹² Rodin, J. O.; Himel, C. M.; Silverstein, R. M.; Leeper, R. W.; Gortner, W. A. Volatile flavor and aroma components of pineapple. I. Isolation and tentative identification of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone. *J. Food Sci.* **1965**, 30, 280-285.

¹³ Honkanen, E.; Pyysalo, T.; Hirvi, T. The aroma of Finnish wild raspberries, *Rubus idaeirs* L. *2. Lebensm. Unters. Forsch.* **1980**, 171, 180-182.

¹⁴ Pickenhagen, W., Velluz, A., Passerat, J. P., & Ohloff, G. Estimation of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone (furanol) in cultivated and wild strawberries, pineapples and mangoes. *J. S. Food and Agriculture.* **1981**, 32, 1132-1134.

¹⁵ Kallio H., Lapvetelainen A., Hirvi T. and Honkanen E. Volatiles in relation to aroma in the berries of *Rubus arcticus* in Schreier P, *Analysis of Volatiles*, New York, Walter de Gruyter. **1984**, 433-446.

¹⁶ Lee, H. S., & Nagy, S. High performance liquid chromatography of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone in pineapple and grapefruit juices. *Journal of Food Science.* **1987**, 52, 163-165.

¹⁷ Buttery, R. G., Takeoka, G. R., Krammer, G. E., & Ling, L. C. Identification of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone (furanol) and 5-methyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone in fresh and processed tomato. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie.* **1994**, 27, 592-594.

¹⁸ Sanz, C., Richardson, D. G., & Perez, A. G. 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone and derivatives in strawberries during ripening. In R. L. Rouseff (Ed.), *Fruit Flavors.* **1995**, 268-275. Washington, DC: ACS.

¹⁹ Roscher R., Herderich, Steffen JP., Schreier P. and Schwab W. 2,5-dimethyl-4-hydroxy-(2H)-furanone 6'-O-malonyl-β-D-glucopiranoside in strawberry fruits, *Phytochemistry.* **1996**, 43, 155-159.

²⁰ Zabetakis, I., Granshaw, JW. and Robinson, DS. 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone and its derivatives: analysis, synthesis and biosynthesis, a review, *Food Chem.* **1999**, 65, 139-151.

²¹ Bood KG. and Zabetakis I. The biosynthesis of strawberry flavour (II): biosynthetic and molecular biology studies. *J Food Sci.* **2002**, 67, 2-8.

²² Hunter, G. L. K., Busek, W. A., & Radford, T. Volatile components of canned alphonso mango. *Journal of Food Science.* **1974**, 39, 900-903.

El HDMF es el compuesto más importante entre las furanonas debido a su bajo umbral de olor (10 ppb).²³ En frutas como la fresa, se han detectado al menos tres compuestos derivados del HDMF: el HDMF libre, el mesifurano, el HDMF β -D-glucopiranosido y el derivado de malonilo de este HDMF glucósido^{18,19,20} (ver Tabla 4).

Tabla 4. Las cantidades de DMHF, DMHF glucósido y mesifurano en algunas frutas (mg de analito kg⁻¹ de fruta)

| Fruta | DMHF | DMHF glucósido | mesifurano |
|---|--------------|----------------|--------------|
| Fresa (cv. Elsanta) ²⁴ | 20.9 | 4.3 | 79.5 |
| Fresa silvestre ²⁴ | 16.7 | 10.9 | 12.1 |
| Frambuesas silvestres ¹³ | 0.1 | no detectado | trasas |
| Zarza Ártico ²⁵ | no detectado | no detectado | 18 |
| Mango Alfonso ²⁶ | 2 | no detectado | no detectado |
| Piña (de Costa de Marfil) ¹⁴ | 7.4 | no detectado | 0.2 |
| Piña (de Costa Rica) ²⁷ | 0.7 | 0.4 | no detectado |
| Tomate (cv. Ace) ²⁸ | 0.7 | no detectado | no detectado |
| Tomate (var. 6203) ²⁹ | no detectado | trasas | no detectado |
| Vino (varias variedades de uva) ³⁰ | 0.1-3.5 | no detectado | no detectado |

Diferentes estudios indican que el HDMF es derivado del metabolismo de los carbohidratos. En la última década, la mayoría de los estudios sobre la biosíntesis de HDMF se han llevado a cabo en fresa, donde este compuesto puede alcanzar una alta concentración de 37 μ g/g en frutos completamente maduros.

²³ Schwab W. and Roscher R. 4-hydroxy-3(2H)-furanones. Natural and Maillard products, *Recent Res Dev Phytochemistry* 1. **1997**, 643–673.

²⁴ Zabetakis, I., & Holden, M. A. A study of strawberry flavour biosynthesis. In P. Etievant & P. Schreier (Eds.), *Bioflavour*. **1995**, 95, 211-216.

²⁵ Kallio, H. Development of volatile aroma compounds in arctic bramble, *Rubus arcticus* L. *Journal of Food Science*. **1976**, 41, 563-566.

²⁶ Idstein, H., & Schreier, P. Volatile constituents of Alphonso mango (*Magnifera indica*). *Phytochem*. **1985**, 24, 2313-2316.

²⁷ Wu, P., Kuo, M. C., Hartman, T. G., Rosen, R. T., & Ho, C. T. Free and glycosidically bound aroma compounds in pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1991**, 39, 170-172.

²⁸ Krammer, G. E., Takeoka, G. R., & Buttery, R. G. Isolation and identification of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone glucoside from tomatoes. *J. Agricultural and Food Chemistry*. **1994**, 42, 1595-1597.

²⁹ Buttery, R. G., Takeoka, G. R., & Ling, L. C. Furanol: odor threshold and importance to tomato aroma. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. **1995**, 43, 1638-1640.

³⁰ Guedes de Pinho, P., & Bertrand, A. Analytical determination of furaneol (2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone). Application to differentiation of white wines from hybrid and various *Vitis vinifera* cultivars. *Am. J. Enol. Vitic*. **1995**, 46, 181-186.

4.1. HDMF en fresa

Los umbrales de olor de 24 compuestos de aroma en las fresas *Senga Sengana* se determinaron mediante pruebas de dúo-trío. Los valores umbral se compararon con las concentraciones en el fruto, y los compuestos se dividieron en grupos de acuerdo con sus valores de aroma (concentración/umbral). Los compuestos más importantes fueron butanoato de etilo, hexanoato de etilo y 2,5-dimetil-4-hidroxi-3(2*H*)-furanona, pero incluso los compuestos en concentraciones por debajo de los valores umbral tuvieron alguna influencia sobre el olor. Se registró el umbral (mg/kg) del HDMF de 0.001 – 0.01 comparado con la literatura de 0.00004, con un aroma caracterizado como quemado, dulce y caramelo, con una concentración de 11.7 mg/kg y un valor de umbral superior de 1170, ver Tabla 4.³¹

Es notable que el butanoato de etilo tenga un valor de umbral mucho más bajo en comparación de 2,5-dimetil-4-metoxi-3(2*H*)-furanona y de 2,5-dimetil-4-hidroxi-3(2*H*)-furanona, que son mucho más altos. Es importante notar el valor de aroma del butanoato de etilo en la fresa *Senga Sengana* en la cual es absolutamente más alto, lo que sugiere que es el compuesto de aroma más importante. Los compuestos, hexanoato de etilo y 2,5-dimetil-4-hidroxi-3(2*H*)-furanona también parecen ser importantes.

Sundt³² consideró a la 2,5-dimetil-4-hidroxi-3(2*H*)-furanona como el aroma más importante de fresa, compuesto, que mencionó tiene el olor claro de las fresas. Sin embargo, encontró que este compuesto olía dulce y quemado, pero no a fresa, excepto cuando se mezclaba con butanoato de etilo.

Dirinck³³ y Schreier³⁴ encontraron que los compuestos cuantitativamente más importantes eran los ésteres metílicos y etílicos de ácido butanoico y hexanoico, pero no mencionaron qué compuestos eran los más importantes para el aroma.

³¹ Larsen, M.; Poll, L. Odor Thresholds of Some Important Aroma Compounds in Strawberries. *Zeitschrift fuer Leb. und -forsch.* **1992**, *195* (2), 120–123.

³² Sundt E. The development and future of flavor research. Proceedings of the Scandinavian Symposium on Aroma Research. **1970**, *23*: 5-13.

³³ Dirinck P, Schreyen L, Schamp N Aroma Quality Evaluation of Tomatoes, Apples, and Strawberries. *J Agric. Food Chem.* **1977**, *25*:759-763

³⁴ Schreier P. Quantitative Composition of Volatile Constituents in Cultivated Strawberries, *Fragaria ananassa* cv. Senga Sengana, Senga Litessa and Senga Gourmella. *J Sci Food Agric.* **1980**, *31*:487-494.

Pyysalo³⁵ consideró que la 2,5-dimetil-4-metoxi-3(2*H*)-furanona es la más importante en las fresas silvestres y mencionó que hizo una gran contribución al sabor característico de las bayas.

El valor umbral de la 2,5-dimetil-4-metoxi-3(2*H*)-furanona fue relativamente alto y, por lo tanto, es probable que sea menos importante. Además, se descubrió que el olor era parecido a la corteza del pan y a la grasa, y no muy parecido a la fresa.

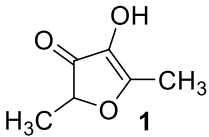
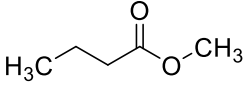
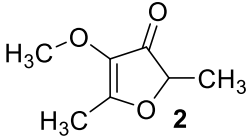
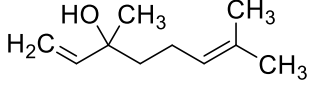
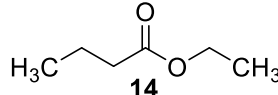
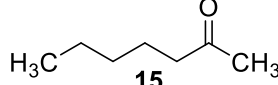
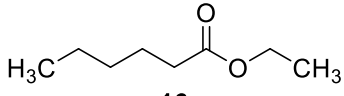
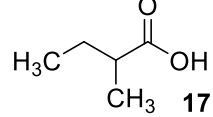
Dirinck³⁶ encontró compuestos que contienen azufre como disulfuro de dimetilo, acetato de metiltiol y butanoato de metiltiol y menciona que estos compuestos dan un olor típico a fresa. Al tratar de analizar un extracto de fresa utilizando un detector fotométrico de llama, equipado con un filtro de azufre, no detectó ninguno de estos compuestos.

Aunque este estudio demuestra que no se puede considerar que ningún compuesto sea totalmente irrelevante, también se muestra que los compuestos que tienen los más altos valores de aroma parecen ser los más importantes. Por lo tanto, aún es posible usar los valores umbral para determinar qué compuestos son más importantes. Y para las fresas *Senga Sengana*, estos compuestos son butanoato de etilo, 2,5-dimetil-4-hidroxi-3 (2*H*) -furanona y hexanoato de etilo. Otros compuestos importantes son butanoato de metilo, linalool, 2-heptanona y, en menor medida, ácido 2-metilbutanoico, ver Tabla 4.

³⁵ Pyysalo T, Honkanen E, Hirvi T. Volatiles of Wild Strawberries, *Fragaria vesca* L., Compared to Those of Cultivated Berries, *Fragaria X ananassa* cv. *Senga Sengana*. *J Agric Food Chem.* **1979**, 27:19-22

³⁶ Dirinck PJ, DePooter HL, Willaert GA, Schamp NM. Flavor Quality of Cultivated Strawberries: The Role of the Sulfur Compounds. *J Agric Food Chem.* **1981**, 29:316-321.

Tabla 4. El HDMF, el butanoato de etilo y el hexanoato de etilo tienen los valores de umbral y de aroma más representativos en la fresa.³⁷

| | |
|---|---|
|  <p style="text-align: center;">1 HDMF</p> <p>2,5-dimetil-4-hidroxi-3(2H)-furanona</p> <p>Intervalo Umbral de olor (mg/kg): 0.001 - 0.01 Concentración (mg/kg): 11.7 Valor de aroma: 1170 Aroma característico: Quemado, dulce, caramelo</p> |  <p style="text-align: center;">12</p> <p>butanoato de metilo</p> <p>Intervalo Umbral de olor (mg/kg): 0.001 - 0.01 Concentración (mg/kg): 6.14 Valor de aroma: 614 Aroma característico: Afrutado, queso</p> |
|  <p style="text-align: center;">2</p> <p>2,5-dimetil-4-metoxi-3(2H)-furanona</p> <p>Intervalo Umbral de olor (mg/kg): 0.1 - 1.0 Concentración (mg/kg): 11.5 Valor de aroma: 11.0 Aroma característico: Corteza de pan, rancio</p> |  <p style="text-align: center;">13</p> <p>linalol</p> <p>Intervalo Umbral de olor (mg/kg) 0.0001 - 0.001 Concentración (mg/kg): 0.41 Valor de aroma: 410 Aroma característico: Cáscara de limón, flores</p> |
|  <p style="text-align: center;">14</p> <p>butanoato de etilo</p> <p>Intervalo Umbral de olor (mg/kg): 0.000001 - 0.00001 Concentración (mg/kg): 4.53 Valor de aroma: 453 000 Aroma característico: Afrutado, dulce, queso</p> |  <p style="text-align: center;">15</p> <p>2-heptanona</p> <p>Intervalo Umbral de olor (mg/kg) 0.001 - 0.01 Concentración (mg/kg): 1.66 Valor de aroma: 166 Aroma característico: Queso azul danés</p> |
|  <p style="text-align: center;">16</p> <p>hexanoato de etilo</p> <p>Intervalo Umbral de olor (mg/kg): 0.00001 - 0.0001 Concentración (mg/kg): 0.47 Valor de aroma: 4700 Aroma característico: Afrutado, chicle</p> |  <p style="text-align: center;">17</p> <p>ácido 2-metil butanoico</p> <p>Intervalo Umbral de olor (mg/kg): 0.01 - 0.1 Concentración (mg/kg): 12.2 Valor de aroma: 122 Aroma característico: Afrutado, agrio</p> |

³⁷ Larsen, M.; Poll, L. Odor Thresholds of Some Important Aroma Compounds in Strawberries. *Zeitschrift fuer Leb. und -forsch.* **1992**, 195 (2), 120–123.

4.2. Constituyentes de olor activos en piña fresca (*Ananas comosus* [L.] Merr.)

Mediante el método de Análisis de Dilución del Extracto de Aroma (AEDA, por sus siglas en inglés) se obtuvo un extracto, del cual se generó un destilado por la técnica de Evaporación de Sabor Asistida por Disolvente (SAFE, por siglas en inglés) en el que se detectaron 29 compuestos activos en un intervalo de 2 a 4.096 en el factor de dilución de sabor (FD, por sus siglas en inglés).

Las mediciones cuantitativas realizadas mediante ensayos de dilución de isótopos estables (SIDA, por sus siglas en inglés) y el cálculo de los Valores de Actividad Olfativa (OAVs, por sus siglas en inglés) de 12 compuestos seleccionados revelaron los siguientes compuestos que imparten olores clave en el sabor piña fresca: 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2*H*)-furanona (HDMF; dulce, similar a la piña, caramelo), 2-metilpropanoato de etilo (afrutado), 2-metilbutanoato de etilo (afrutado) seguido por el 2-metilbutanoato de metilo (afrutado, similar a manzana) y 1-(*E,Z*)-3,5-undecatrieno (fresco, sabor similar a piña).

Una mezcla de estos 12 compuestos en concentraciones iguales a las identificadas en la piña fresca, dio como resultado un perfil de olor similar al del jugo fresco. Además, los resultados de las pruebas de omisión utilizando la mezcla modelo mostraron que el HDMF y el 2-metilbutanoato de etilo son olores de impacto de carácter en la piña fresca.

Usando un ensayo de dilución de isótopos estables (SIDA), la determinación cuantitativa de HDMF y su éter metílico se realizó en piñas frescas y procesadas. La concentración del compuesto anterior en piña fresca fue de 34.9 mg/kg. Takeoka³⁸ identificó muchos ésteres que contienen azufre entre los volátiles de la piña, pero sus concentraciones fueron menores que sus umbrales de olor.

Umano³⁹ informó muchos componentes volátiles de la piña verde y madura, pero sus contribuciones al aroma de la piña no se han descrito.

³⁸ Takeoka, G. R.; Buttery, R. G.; Teranishi, R.; Flath, R. A.; Güntert, M. Identification of Additional Pineapple Volatiles. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, 39 (10), 1848–1851.

³⁹ Umano, K.; Hagi, Y.; Nakahara, K.; Shoji, A.; Shibamoto, T. Volatile Constituents of Green and Ripened Pineapple (*Ananas Comosus*). *J. Agric. Food Chem.* **1992**, 40, 599–603.

En estudios recientes, Teai⁴⁰ mencionó que los ésteres, lactonas, furanoides y compuestos de azufre actúan como componentes muy potentes de olor en la piña Polinesia.

4.3. HDMF en diferentes partes de la piña

Mediante el método de microextracción Espacio Superior-Fase Sólida (HS-SPME) y por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC/MS), se analizaron los compuestos volátiles que aportan el aroma característico de diferentes partes de la piña cayena. Los principales compuestos volátiles fueron ésteres, terpenos, cetonas y aldehídos. El número y contenido de compuestos aromáticos detectados en la pulpa fueron mayores que los encontrados en el corazón. En la pulpa, los compuestos aromáticos característicos fueron 2-metilbutanoato de etilo, hexanoato de etilo, 2,5-dimetil-4-hidroxi-3(2*H*)-furanona (DMHF), decanal, 3-(metiltio) propionato de etilo, butanoato de etilo y (*E*)-3-hexenoato de etilo. En el corazón, los principales fueron 2-metilbutanoato de etilo, hexanoato de etilo y el DMHF. Se muestra que las unidades de olor (valores de olor) más altas correspondían al 2-metilbutanoato de etilo, seguido de hexanoato de etilo y DMHF. Los valores de olor encontrados para la pulpa fueron más altas que las del corazón de la piña. En la Tabla 5 se enumeran los valores umbral de olor orto nasal en el agua y los valores de actividad del olor (OAV) para varios compuestos volátiles que se encuentran en la piña.

Engel⁴¹ informó que varios ésteres metílicos y algunos ésteres característicos que contienen azufre, diversos hidroxieésteres y sus correspondientes derivados acetilados, así como algunas lactonas fueron responsables del perfil típico de sabor a piña.

También se reportó que el acetato de etilo, el butanoato de metilo, butanoato de etilo, 2,5-dimetil-4-metoxi-3(2*H*)-furanona (DMMF), DMHF, el 2-metilbutanoato de etilo, 2-metilbutanoato de metilo, el 3-(metiltio) propionato de metilo, el 3-metiltio propionato de etilo, el hexanoato de metilo y el hexanoato de etilo, eran los compuestos activos y contribuían en conjunto al aroma de la piña.

⁴⁰ Teai, T., Claude-Lafontaine, A., Schippa, C., and Cozzolino, F., Volatile compounds in fresh pulp of pineapple (*Ananas comosus* [L.] Merr.) from French Polynesia. *J. Essent. Oil Res.* **2001**, 13, 314–318

⁴¹ Engel, K.H.; Heidlas, J.; Tressl, R. The flavor of tropical fruits (banana, melon, pineapple). In *Developments in Food Science 3C (Food Flavours)*, 1st ed.; Morton, I.D., MacLeod, A.J., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands. **1990**, 195-219.

Tabla 5. Compuestos aromáticos característicos y valores de olor en la pulpa y corazón de la piña.⁴²

| Compuestos aromáticos | Umbral de olor ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | Valor de actividad de olor (OAV) | |
|-----------------------------------|--|----------------------------------|-----------------------|
| | | pulpa | corazón |
| 3-(metiltio)-propanoato de metilo | 180 | 0.15 | 0.06 |
| 3-(metiltio)-propanoato de etilo | 7 | 13.03 | 6.10 |
| butanoato de etilo | 1 | 6.09 | ---- |
| 2-metilbutanoato de etilo | 0.006 | 1693.33 | ---- |
| hexanoato de metilo | 70 | 0.36 | 0.11 |
| hexanoato de etilo | 0.76 | 139.75 | 63.71 |
| (<i>E</i>)-3-hexenoato de etilo | 2 | 2.91 | ---- |
| DMHF | 0.03 | 106.33 | ---- |
| β -cariofileno | 64 | ---- | 0.04 |
| octanoato de metilo | 200 | 0.04 | 0.02 |
| α -terpineol | 330 | ---- | 0.005 |
| nonanal | 1 | ---- | 3.91 |
| decanal | 0.1 | 29.4 | 32.0 |
| decanoato de etilo | 6300 | 0.0018 | 5.80×10^{-4} |

4.4. HDMF en tomate fresco

De una mezcla de tomates frescos y metanol, se obtuvo por filtración y centrifugación, un líquido naranja–amarillento claro, del cual se aisló⁴³ un extracto glicosídico por cromatografía en columna con la ayuda de resina no iónica. La fracción glicosídica se sometió a fraccionamiento por cromatografía a contracorriente de alta velocidad (HSCCC).⁴⁴

⁴² Wei, C. Bin; Liu, S. H.; Liu, Y. G.; Lv, L. L.; Yang, W. X.; Sun, G. M. Characteristic Aroma Compounds from Different Pineapple Parts. *Molecules*. **2011**, 16 (6), 5104–5112.

⁴³ Krammer, G. E.; Takeoka, G. R.; Buttery, R. G. Isolation and Identification of 2,5-Dimethyl-4-Hydroxy-3(2*H*)-Furanone Glucoside from Tomatoes. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, 42 (8), 1595–1597.

⁴⁴ Conway, W. D. *Countercurrent Chromatography: Apparatus, Theory & Applications*; VCH Publishers: New York, **1990**, 32-35.

Las fracciones resultantes son sometidas a hidrólisis enzimática controlada para producir agliconas, que se verificaron mediante GC-MS. La hidrólisis enzimática de las fracciones H9-11 (tiempo de retención = aproximadamente 1h 50 min) reveló la presencia del HDMF (**1**), ver Figura 3, cuya naturaleza se confirmó mediante la comparación del tiempo de retención y el espectro de masas de un patrón de referencia auténtico. Las fracciones obtenidas de varias corridas se agruparon y purificaron por HPLC en una columna C₁₈ de fase reversa. El seguimiento del cromatograma de HPLC a una longitud de onda de 280 nm, así como una hidrólisis enzimática paralela, demostraron que la fracción R21 (tiempo de retención = 15 min), contiene el compuesto HDMF glucósido (**2**) de la Figura 3.

El contenido del 2,5-dimetil-4-hidroxi-3(2*H*)-furanona β -D-glucopiranosido (**3**) en tomates frescos es menor que en las fresas Mayerl⁴⁵ y piñas Wu.^{46,47} Sin embargo, se requieren más estudios cuantitativos para comprender la influencia del glucósido mencionado anteriormente en el aroma de los tomates.

⁴⁵ Mayerl, F.; Naf, R.; Thomas, A. F. 2,5-Dimethyl-4-Hydroxy-3(2*H*)-Furanone Glucoside: Isolation From Strawberries and Synthesis. *Phytochemistry*. **1989**, 28, 631-633.

⁴⁶ Wu, P.; Kuo, M. C.; Zhang, K. Q.; Hartman, T. G.; Rosen, R.T.; Ho, C.-T. Analysis of Glycosidically Bound 2,5-Dimethyl-**4-hydroxy-3(2H)-furanone** in Pineapple. *Perfum. Flavor*. **1990**, 15 (I), 51-53.

⁴⁷ Wu, P.; Kuo, M.4. Hartmann, T. G.; Rosen, R. T.; Ho, C.-T. Free and Glycosidically Bound Aroma Compounds in Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.). *J. Agric. Food Chem.***1991**, 39, 170-172.

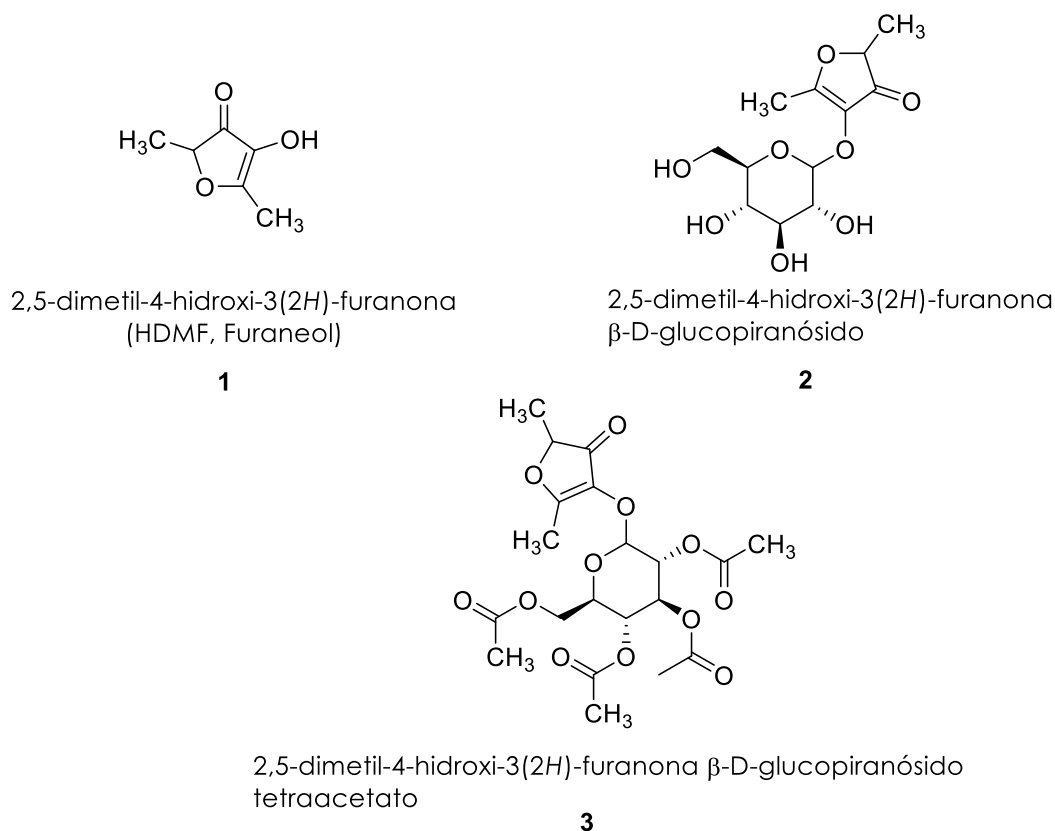


Figura 3. El HDMF (1), es una aroma que se encuentra en muchas frutas, notablemente en la piña, el compuesto 2 en fresas y el compuesto 3 cuando estos frutos tienen largos tiempos de almacenamiento.

4.5. Cálculo de los Valores de Actividad Olfativa (OAVs, siglas en inglés)

Para estimar con precisión la contribución sensorial de los 12 odorantes al sabor de la piña fresca, sus OAV se calcularon sobre la base de los umbrales de olor nasal en el agua y las concentraciones cuantificadas por SIDA (Tabla 6). Este enfoque reveló HDMF que huele a piña y dulce, 2-metilpropanoato de etilo con sabor a fruta y 2-metilbutanoato de etilo como los tres compuestos con mayor olor activo, seguido por 2-metilbutanoato de metilo, 1-(*E,Z*)-3,5-undecatrieno y β -damascenona.

Tabla 6. Umbrales de olor, concentraciones y valores de actividad de olor (OAV) de compuestos en piña fresca.⁴⁸

| COMPUESTO | Aroma | Umbral ($\mu\text{g/L}$ en agua) ⁴⁹ | Concn. $\mu\text{g/kg}$ | OAV ^e |
|---|---------------------------------|--|----------------------------|------------------|
| 2-Metilpropanoato de metilo | Afrutado, dulce | 6.3 | 154 ^c | 24.4 |
| 2-Metilpropanoato de etilo | Afrutado, dulce | 0.02 | 48.0 ^d | 2400 |
| 2-Metilbutanoato de metilo | Afrutado, parecido a la manzana | 2.00 | 1190 ^d | 595 |
| Butanoato de etilo | Afrutado | 1.00 | 75.2 ^d | 75.2 |
| 2-Metilbutanoato de etilo | Afrutado | 0.15 | 157 ^d | 1050 |
| Octanal | Cítricos, grasoso | 8.00 | 19.1 ^d | 2.40 |
| 1-(<i>E,Z</i>)-3,5-Undecatrieno | Fresco, parecido a la piña | 0.02 ^a | 8.89 ^c | 445 |
| β -damascenona | Afrutado, dulce | 0.00075 | 0.083 ^d | 111 |
| δ -octalactona | Parecido al coco | 400 | 78.2 ^d | 0.20 |
| 4-Hidroxi-2,5-dimetil-3(2 <i>H</i>)-furanona | Dulce, parecido a la piña | 10 ^b | 26800 ^c | 2680 |
| δ -Decalactona | Dulce, parecido al coco | 160 | 32.7 ^d | 0.20 |
| Vanilina | Parecido a la vainilla | 25 | 5.99 ^c | 0.24 |

^a Steinhaus, M., y Schieberle,⁵⁰ P., informe no publicado.

^b Referencia Schieberle.⁵¹

^c Los datos son valores medios de duplicados.

^d Los datos son valores medios de triplicados.

^e Los valores de la actividad del olor se calcularon dividiendo las concentraciones de los compuestos por sus umbrales de olor ortonasal.

⁴⁸ Tokitomo Y., Steinhaus M., Büttner A. and Schieberle P. Odor-Active Constituents in Fresh Pineapple (*Ananas comosus* [L.] Merr.) by Quantitative and Sensory Evaluation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. **2005**, 69:7, 1323-1330.

⁴⁹ Rychlik, M., Schieberle, P., and Grosch, W., Compilation of Odor Thresholds, Odor Qualities and Retention Indices of Key Food Odorants. Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Garching, Germany. **1998**.

⁵⁰ Steinhaus, M., and Schieberle, P., Comparison of the most odor-active compounds in fresh and dried hopcones (*Humulus lupulus* L. variety Spalter Select) based on GC-olfactometry and odor dilution techniques. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 1776–1783.

⁵¹ Schieberle, P., and Hofmann, T., Evaluation of the character impact odorants in fresh strawberry juice by quantitative measurements and sensory studies on model mixtures. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, 227–232.

4.6. Propiedades sensoriales del HDMF

Para corroborar los datos analíticos, se realizaron evaluaciones sensoriales. En un primer paso, un panel sensorial capacitado determinó el perfil de olor del jugo de piña fresca. Describieron el olor como dulce, cítrico, fresco, afrutado, verde y herboso, leñoso y similar a la piña (Figura 4).

En una etapa posterior, los 12 odorantes se disolvieron en agua en concentraciones iguales a las determinadas en la piña (Tabla 7). La mezcla modelo mostró el aroma fresco y afrutado típico asociado con el sabor de piña. Luego, el perfil de olor de la mezcla modelo fue evaluado por el panel sensorial en comparación con el jugo de piña fresca. Los resultados de las evaluaciones sensoriales (Figura 4), revelaron una alta similitud de la mezcla modelo con el jugo de piña fresca. No hubo diferencias significativas entre el modelo y el jugo fresco en cuanto a siete cualidades de olor. Las notas de olor fresco, afrutado y similar a la piña obtuvieron casi las mismas intensidades en el modelo que en el jugo. Solo la nota de aroma dulce fue más intensa en el modelo que en el jugo.

En experimentos adicionales, las contribuciones de seis compuestos altamente aromáticos (2-metilpropanoato de etilo, 2-metilbutanoato de metilo, 2-metilbutanoato de etilo, 1-(*E,Z*)-3,5-undecatrieno, β -damascenona y HDMF) fueron evaluados por medio de pruebas de omisión. Cada uno de los seis aromas se omitió individualmente de la mezcla modelo, y esta mezcla de omisión se evaluó ortonasalmente por 15 panelistas sensoriales en comparación con la mezcla de modelo completo por medio de una prueba triangular. Cuando se omitieron HDMF y 2-metilbutanoato de etilo, respectivamente, esas mezclas de modelos incompletos fueron claramente detectables por el panel, ver Tabla 7. El modelo sin HDMF carecía de un aroma dulce similar a la piña, mientras que el modelo sin 2-metilbutanoato de etilo carecía de una nota de olor fresco y afrutado. Por lo tanto, estos resultados muestran que ambos compuestos aromáticos impactan en el característico sabor fresco de piña.

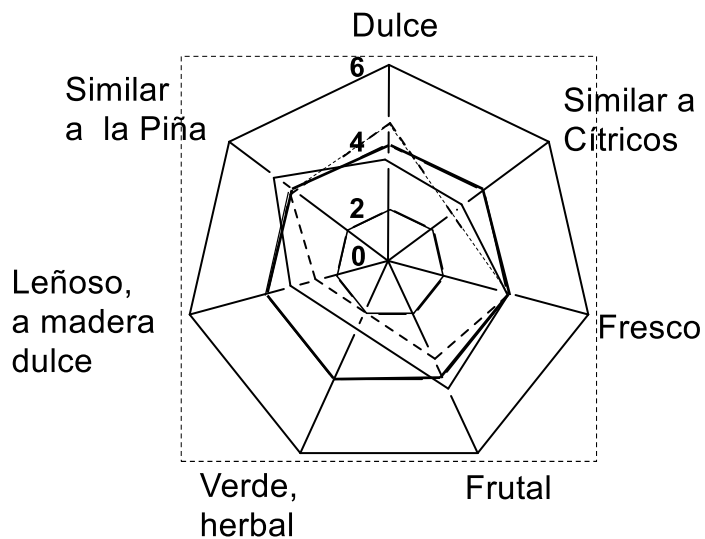


Figura 4. Perfiles de olor del jugo de piña⁵² recién preparado (línea recta) y la mezcla del modelo de aroma de piña (línea punteada).

Tabla 7. Omisión de un compuesto de mezcla modelo⁵²

| Compuesto aromático omitido de la mezcla modelo | Número de panelistas (de 15) que detectan una diferencia de aroma |
|---|---|
| 2-metilpropanoato de etilo | 8 |
| 2-metilbutanoato de metilo | 4 |
| 2-metilbutanoato de etilo | 9* |
| 1-(E,Z)-3,5-Undecatrieno | 7 |
| β -damascenona | 5 |
| 2,5-dimetil-4-hidroxi-3(2H)-furanona | 11** |

*P < 0.05; **P < 0.01

⁵² Tokitomo Y., Steinhaus M., Büttner A. and Schieberle P. Odor-Active Constituents in Fresh Pineapple (*Ananas comosus* [L.] Merr.) by Quantitative and Sensory Evaluation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. **2005**, 69:7, 1323-1330.

5. Cuantificación del HDMF

La cantidad de HDMF en fresas, piñas y mangos se ha determinado por cromatografía de gases cuantitativa después de la extracción de las frutas con éter etílico.⁵³

En dos investigaciones recientes se describe el análisis de los compuestos aromáticos volátiles destilados por vapor de fresas cultivadas y silvestres, y mencionan especialmente la ausencia del HDMF, del cual se ha descrito que se produce en esta fruta como uno de los compuestos que contribuyen al aroma. El metil éter se ha encontrado en ambos análisis. Debido a las notables diferencias en las propiedades organolépticas y los valores umbral entre el HDMF y su metil éter, no parece razonable que el HDMF no se encontrara en cantidades considerables en diferentes variedades de fresas y otras frutas en las que se haya encontrado el éter metílico. Por esta razón, los extractos aromáticos de fresas cultivadas, fresas silvestres, piñas y mangos se examinaron para determinar cuantitativamente su contenido de HDMF y de su éter metílico.

La Tabla 8 muestra la cantidad de HDMF y su metil éter determinado en las diferentes frutas. Los datos confirman la presencia de cantidades considerables de HDMF en fresas y piñas. Otros trabajos han encontrado solo trazas o ninguna presencia del HDMF en fresas debido principalmente a los diferentes métodos de preparación del extracto del aroma. Siendo el HDMF altamente oxigenado, no destila al vapor. Se repitió el método descrito por Schreier⁵⁴ y se obtuvo un aroma de fresa que, sin embargo, carecía de algunas notas afrutadas características. No se detectó HDMF en este extracto, pero el extracto de éter del residuo permitió la identificación de 3 mg/L de HDMF.

Otra razón para pasar por alto pequeñas cantidades de HDMF podría ser su comportamiento bajo ciertas condiciones de cromatografía de gases, ya que cierta cantidad de HDMF adsorbida por la columna capilar de vidrio, preparadas con BaCO₃, generalmente no permiten la detección de pequeñas cantidades del HDMF en diferentes fases estacionarias.

⁵³ Gramshaw, J.W.; Zabetakis, I.; Robinson, D. 2,5-Dimethyl-4-Hydroxy-2H-Furan-3-One and Its Derivatives: Analysis, Synthesis and Biosynthesis—a Review. *Food Chem.* **1999**, 65 (2), 139–151.

⁵⁴ Schreier, P. Quantitative composition of volatile constituents in cultivated strawberries, *Fragaria ananassa* cv. *Senga Sengana*, *Senga Litessa* and *Senga Gournella*. *J. Sci. Food Agric.* **1980**, 31, 487–494.

Tabla 8. Concentración de HDMF y su éter metílico en algunas frutas.

| Fruta | Origen | HDMF (mg/L) | Metil ether (mg/L) |
|--|------------------------------|----------------|-----------------------|
| - Fresas <i>Fragaria ananassa</i> 1 día después de la cosecha | Ardèche (Francia) | 6.3 | 2.7 |
| - Fresas <i>Fragaria ananassa</i> Almacenadas durante 8 días a 3°C | | 3.9 | 10.9 |
| - Fresas silvestres | Vaud (Suiza) | 2.2 | 0.5 |
| - Piñas | Costa de Marfil | 7.4 | 0.2 |
| - Piñas almacenadas durante 10 días a 22 °C | | 3.6 | 0.2 |
| - Mangos | Israel | 0.4 | ----- |
| - Mangos enlatados | Sun Water Brand, (Taiwan) | 0.7 | ----- |

Solamente la sílice fundida o las columnas de vidrio suave lixiviadas con ácido acuoso hicieron posible la detección. En este contexto, los autores actuales quisieran apoyar la advertencia de Bruhn⁵⁵ de que el uso ciego de la cromatografía de gases puede conducir a resultados erróneos y a una mala interpretación del método. Además, cuando se declaran resultados negativos, es necesario tener cuidado al seleccionar el procedimiento experimental, y cuando el compuesto en cuestión está disponible, también se debe ejecutar un experimento de control para validar los resultados.

5.1. Cuantificación por dilución de isótopos estables

Entre los volátiles de piña, se sabe que el HDMF es relativamente lábil, y los ésteres (por ejemplo, 2-metilpropanoato de metilo) son muy volátiles. Para compensar las pérdidas de estos compuestos durante el procedimiento experimental, se utilizó SIDA para la cuantificación.

⁵⁵ Bruhn, W. Pour et contre la chromatographie en phase gazeuse ou arguments contre l'abus de la

Los resultados de los experimentos de cuantificación se resumen en la Tabla 6. HDMF estaba presente en una concentración muy alta, 26.8 mg/kg (ppm), en piña fresca. Usando un estándar interno en el análisis de GC, se determinó que las concentraciones de HDMF en el jugo de piña fresca eran de 7.4 mg/l y 0.7 mg/kg por Pickenhagen⁵⁶ y Wu⁵⁷ respectivamente. Takeoka⁵⁸ informó que el HDMF volátil que aporta el aroma en la piña, no se recuperó ni por destilación al vapor-extracción (Vacuum Steam Distillation-Extraction) ni por muestreo dinámico en el espacio de cabeza (Dynamic Headspace Sampling). En un estudio anterior, Sen⁵⁹ determinó una concentración de HDMF de 34.9 mg/kg usando SIDA. Este valor y su resultado indican que SIDA combinada con extracción con disolvente y el método SAFE son útiles para la cuantificación de compuestos lábiles y altamente polares como HDMF.

5.2. Cuantificación del HDMF en tomate utilizando muestras dinámicas de espacio de cabeza con sulfato de sodio

Se encontró que el muestreo de espacio de cabeza (head space en inglés) dinámico de alto flujo con exceso de sulfato de sodio anhidro era un método efectivo para aislar HDMF de los tomates frescos. El análisis cuantitativo se llevó a cabo mediante cromatografía de gases usando maltol como patrón interno. El HDMF se encontró con las concentraciones más altas (660-1100 ppb) en la cosecha de verano de tomates de hortaliza casera y en algunos de los tomates de invernadero cultivados hidropónicamente, que se maduran en la planta antes de ser transportados a los supermercados. Se encontró HDMF en las concentraciones más bajas (38-180 ppb) en los tomates de supermercado madurados en etileno, cultivados en el campo.

⁵⁶ Pickenhagen, W., Velluz, A., Passerat, J. P., & Ohloff, G. Estimation of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone (furanol) in cultivated and wild strawberries, pineapples and mangoes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **1981**, 32, 1132-1134.

⁵⁷ Wu, P., Kuo, M. C., Hartman, T. G., Rosen, R. T., & Ho, C. T.. Free and glycosidically bound aroma compounds in pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1991**, 39, 170-172.

⁵⁸ Takeoka, G., Buttery, R. G., Flath, R. A., Teranishi, R., Wheeler, E. L., Wieczorek, R. L., and Guentert, M., Volatile constituents of pineapple (*Ananas comosus* [L.] Merr.). *ACS Symp. Ser.* **1989**, 388, 223-237.

⁵⁹ Sen, A., Laskawy, G., Schieberle, P., and Grosch, W., Quantitative determination of β -damascenone in foods using a stable isotope dilution assay. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, 39, 757-759.

La Figura 5 muestra un ejemplo de un cromatograma de los volátiles aislados de una muestra de tomate usando la columna capilar DB-Wax. La Tabla 9 muestra las concentraciones de HDMF encontradas en muestras de diferentes tomates. Las mayores concentraciones de HDMF se encontraron en la cosecha de tomates cultivados a mediados de verano (julio) y en algunos tomates cultivados hidropónicamente, los cuales se maduran en la planta antes de ser transportados al lugar de venta.

La concentración más baja de HDMF en los tomates maduros se encontró en los tomates más comunes del supermercado que tienen los precios más bajos, y que normalmente son cultivados en el campo, cosechados entre verde maduro y madurados con etileno (o compuestos que generan etileno).

Se encontró que el umbral de olor de HDMF en solución acuosa a pH 4.5 (cerca del pH de los tomates) era 31 $\mu\text{g/L}$ (~31 ppb) de agua.⁶⁰ Excepto para los tomates verdes, todas las muestras de la Tabla 10 muestran concentraciones por encima de este valor de umbral.

⁶⁰ Buttery, R. G.; Takeoka, G. R.; Naim, M.; Rabinowitch, H.; Nam, Y. Analysis of Furaneol in Tomato Using Dynamic Headspace Sampling with Sodium Sulfate. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49* (9), 4349–4351.

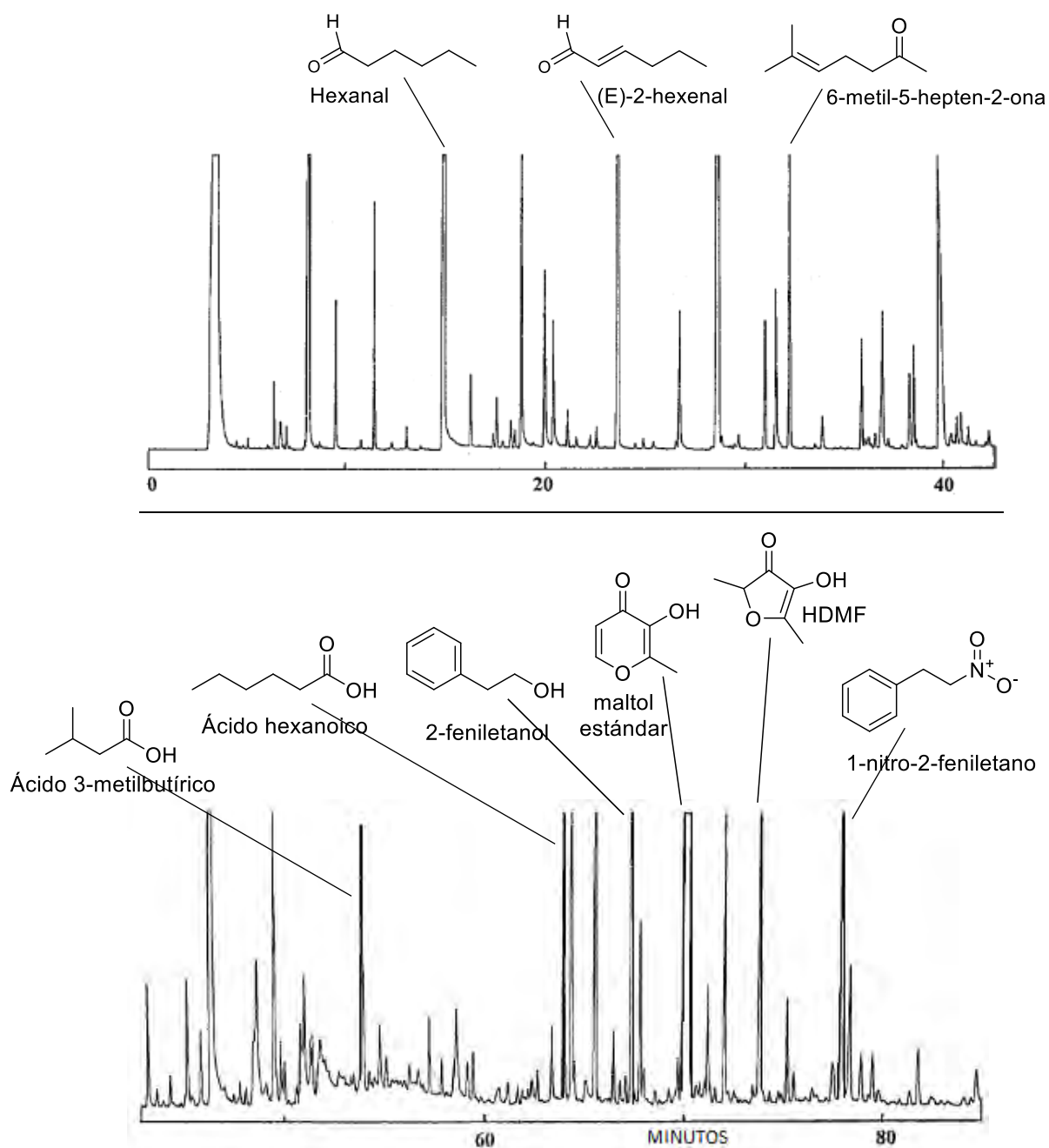


Figura 5. Análisis de GC capilar (DB-Wax) de los volátiles aislados de tomates de hortaliza usando el método dinámico de alto flujo de sulfato de sodio en el espacio de cabeza. Los picos correspondientes al HDMF y maltol se indican junto con los de algunos otros componentes principales.⁶¹

⁶¹ Schieberle, P. Primary Odorants in Popcorn. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, 39, 1141-1144

Naturalmente, se esperaría que la contribución del aroma "dulce" del HMDF fuera mayor cuanto mayor fuera su concentración en el tomate. Los estudios preliminares habían indicado que no todos los tomates de cosecha propia mostraban altas concentraciones de HMDF. Los análisis de las muestras cultivadas en los meses más fríos (septiembre y octubre) mostraron concentraciones considerablemente más bajas de HMDF.

Tabla 9. Concentración de HMDF [2,5-dimetil-4-hidroxi-3(2*H*)-furanona] encontrado en diferentes muestras de tomate fresco.⁶¹

| Tipo de tomate fresco | Conc. en agua µg/kg | Intervalo µg/kg |
|--------------------------------|------------------------|--------------------|
| Cosechada de hortaliza (julio) | 880 | 660-1100 |
| Supermercado "Hot House" | 820 | 480-1100 |
| Supermercado "Cherry on vine" | 640 | 520-770 |
| Supermercado "On vine" | 260 | 220-320 |
| Supermercado "Roma" | 150 | 110-180 |
| Supermercado, tomate ordinario | 110 | 38-180 |
| Tomate verde | < 8 | todos < 8 |

5.3. Cuantificación de HMDF en pan de trigo y palomita de maíz.

Las mediciones cuantitativas son un prerrequisito para estudiar la formación de odorantes en sistemas alimentarios complejos. Debido a su polaridad relativamente alta y a su inestabilidad bajo condiciones normales de cromatografía de gases, la cuantificación de HMDF puede conducir a resultados incorrectos. Para superar estos problemas, recientemente se desarrolló un ensayo de dilución de isótopos estables (stable Isotope dilution assay, SIDA) marcando al HMDF con ¹³C. En un primer experimento, el ensayo se aplicó a extractos de corteza de pan de trigo y palomitas de maíz.⁶² Como se muestra en la Tabla 10, concentraciones relativamente altas de HMDF estaban presentes en ambos alimentos.

⁶² Ferreira, V.; Jarauta, I.; López, R.; Cacho, J. Quantitative Determination of Sotolon, Maltol and Free Furanol in Wine by Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography-Ion-Trap Mass Spectrometry. *J. Chromatogr.* **2003**, 1010 (1), 95–103.

Además, una comparación de las unidades de olor (UO) con las de 2-acetil-1-pirrolina, previamente establecida como uno de los olores más importantes en ambos alimentos. Resalta la importancia sensorial del HDMF en los sabores de la corteza del pan de trigo y de las palomitas.

Tabla 10. Concentraciones y unidades de olor (UO)^a de HDMF y de 2-acetil-1-pirrolina en costra de pan de trigo y palomitas de maíz

| Compuesto | Costra de pan de trigo | | Palomitas de maíz | |
|----------------------|------------------------|------|-------------------|------|
| | μg/kg | UO | μg/kg | UO |
| HDMF | 1960 | 1960 | 1370 | 1370 |
| 2-acetil-1-pirrolina | 96 | 4800 | 32 | 1600 |

^a La UO se calculó dividiendo las concentraciones de los compuestos por sus umbrales de olor (HDMF: 1 ng/L aire; 2-acetil-1-pirrolina: 0.02 ng/L aire). Los umbrales de olor se aproximaron como se describe [62].

5.4. Determinación cuantitativa de HDMF libre en vino

La sotolona, el maltol y el HDMF son compuestos de origen químico diverso pero de estructuras similares⁶². Los tres tienen aromas muy dulces de gran potencia y normalmente se clasifican en el mismo grupo de aromas con notas de azúcar quemada, caramelo y maple por los perfumistas; por lo tanto, no es sorprendente que puedan actuar de manera aditiva o sinérgica.

El papel desempeñado por estos componentes en el aroma de los vinos no es del todo conocido, aunque los datos disponibles en la literatura indican que su contribución podría ser sustancial. A concentraciones relativamente altas, la sotolona parece ser responsable de los aromas característicos de los vinos elaborados con uvas botríticas, de los vinos elaborados mediante el envejecimiento oxidativo, así como de la nota rancia de algunos vinos dulces fortificados.

El HDMF puede encontrarse en cantidades superiores a 1 mg/L en vinos elaborados con uvas híbridas, concentraciones en las que produce un aroma de fresa desagradable. Recientemente, se ha descrito que el HDMF actuando de forma sinérgica con el homofuraneol, en cantidades relativamente pequeñas de este componente, ejercen un gran impacto en las notas afrutadas y caramelizadas de algunos vinos rosados.

Para la determinación analítica de sotolona [4,5-dimetil-3-hidroxi-2(5H)-furanona], maltol [3-hidroxi-2-metil-4H-piran-4-ona] y HDMF libre [2,5-dimetil-4-hidroxi-3(2H)-furanona] en el vino, se usó el método de extracción de fase sólida y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas por trampa de iones. Los límites de detección alcanzados están muy por debajo del umbral olfatorio de los compuestos. También se ha demostrado que el HDMF puede existir en complejos sin olor en los vinos blancos y que la cantidad de HDMF recuperada en el procedimiento propuesto está relacionada con la forma libre. El maltol y la sotolona se determinaron mediante el almacenamiento iónico de iones seleccionados en los intervalos m/z 120-153 y 79-95, utilizando los iones m/z 126 y 83 para la cuantificación, respectivamente.

El HDMF se determinó mediante la fragmentación del ion principal no resonante m/z 128 y el subsecuente análisis del ion m/z 81. Los límites de detección del método están en todos los casos entre 0.5 y 1 μgL^{-1} , muy por debajo de los umbrales olfatorios de los compuestos. La precisión del método está en el rango de 4-5% para los niveles en el vino de alrededor de 20 μgL^{-1} . La linealidad contiene al menos hasta 400 μgL^{-1} , y es satisfactoria en todos los casos. Las recuperaciones de maltol y sotolon son constantes (70 y 64%, respectivamente) y no dependen del tipo de vino. Por el contrario, en el caso del HDMF, los vinos tintos presentan recuperaciones constantes y altas (97%), mientras que las recuperaciones en los vinos blancos varían entre 30 y 80%.

6. Formación de HDMF en alimentos procesados térmicamente

HDMF se ha detectado⁶³ en varios alimentos procesados con calor, por ejemplo el caldo de ternera,⁶⁴ las almendras tostadas⁶⁵ y las palomitas de maíz⁶⁶ y recientemente se identificó como un aroma importante en la corteza de pan de trigo.⁶⁷

⁶³ Hecquet, L.; Sancelme, M.; Bolte, J.; Demuyne, C. Biosynthesis of 4-Hydroxy-2,5-Dimethyl-3(2 H)-Furanone by *Zygosaccharomyces Rouxii*. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44* (5), 1357–1360.

⁶⁴ Tonsbeek, C. H. T.; Planken, A. J.; Weerdhof, T. V. D. Components contributing to beef flavor: isolation of 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone and its 2,5-dimethyl homolog from beef broth. *J. Agric. Food Chem.* **1974**, *22*, 1016-1021.

⁶⁵ Takei, Y.; Yamanishi, T. Flavor components of roasted almond. *Agric. Biol. Chem.* **1974**, *38*, 2329-2336.

⁶⁶ Tressl, R.; Bahri, D.; Köppler, H.; Jensen, A. Primary odorants in popcorn. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1978**, *167*, 111-114.

⁶⁷ Schieberle, P.; Teranishi, R. Formation of Furanol in Heat-Processed Foods. *Flavor Precursors*; ACS, Ed.; ACS: Washington, DC. **1992**, 164-174.

HDMF también se ha aislado de shoyu (shoyu es el nombre japonés para la salsa de soya).⁶⁸ El contenido de HDMF en shoyu es muy bajo (10 ppm). En 1963, se reportó por primera vez al HDMF como un producto de la reacción de Maillard o reacción de oscurecimiento no enzimático.

Estos compuestos son sintetizados durante el proceso metabólico de los frutos con la intervención de enzimas que catalizan toda una serie de reacciones durante el proceso de maduración, como la conversión de HDMF en metoxifuraneol mediada por la enzima O-metiltransferasa.

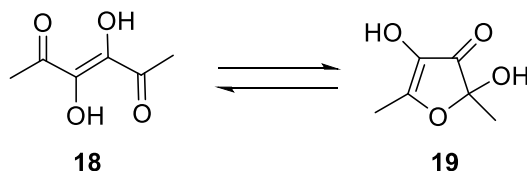
Existen métodos para la preparación de estos compuestos en el laboratorio que han sido publicados y algunos han sido usados para su obtención a nivel industrial. Sin embargo, para el desarrollo de un proceso biotecnológico aún se requiere de conocimiento y de enzimas adecuadas. Afortunadamente, durante los últimos años se han logrado progresos sustanciales en la elucidación de la ruta biosintética que conduce al HDMF y al DMMF, y la información generada deberá servir para el desarrollo de procesos enzimáticos eficientes. Se ha establecido que el HDMF es un componente importante de la corteza de pan de trigo y palomitas de maíz. Para entender su origen en los productos alimenticios mencionados anteriormente, se identificaron los precursores en la masa de trigo y el maíz sobre la base de mediciones cuantitativas.

Los experimentos de horneado revelaron que la levadura era la fuente más importante de HDMF en la corteza de pan de trigo. Además, la ebullición de una solución acuosa de los compuestos de bajo peso molecular a partir de células de levadura inhibidas, proporcionó altas cantidades de HDMF.

El análisis de los azúcares libres presentes en esta fracción y los resultados de los experimentos del modelo, indicaron que el principal precursor del HDMF era la fructosa-1,6-difosfato. En contraste, el calentamiento en seco fue necesario para liberar HDMF de sus precursores en el maíz palomero.

⁶⁸ Osaki, K. Y.; Okamoto, T.; Akao, S.; Nagata, S.; Takamatsu, H. Fermentation of soy sauce with immobilized whole cells. *J. Food Sci.* **1985**, *50*, 1289-1292.

Los experimentos con modelos mostraron que estas condiciones, simulando el proceso de estallido, causaron la formación de HDMF a partir de glucosa y fructosa que predominan en el maíz y son poco activas, cuando se calentaron en solución acuosa. Otros experimentos con modelos mostraron que la acetilformoína (**12**) (Esquema 3) es un intermedio importante en la formación de HDMF (**1**) a partir de hexosas.



Esquema 3. Acetilformoína, un intermediario en la formación del HDMF.

En los perfiles de sabor de los alimentos procesados térmicamente que contienen carbohidratos en conjunto contribuyen a notas de olor a caramelo. Entre los compuestos aromáticos que presentan olores similares al caramelo, el HDMF es de especial interés debido a sus umbrales de sabor relativamente bajos [0.03 mg (sabor) y 0.1 mg por litro de agua (olor)].

El HDMF se ha detectado en otros alimentos procesados térmicamente, como por ejemplo el caldo de carne de vaca, las almendras tostadas o el café tostado.

Para tener una idea del origen del sabor en los alimentos procesados térmicamente, se dilucidaron los precursores del HDMF en pan de trigo y palomitas de maíz. Además, se elucidó la formación de HDMF en experimentos modelo. Los experimentos modelo han revelado que el HDMF proviene de la degradación térmica de 6-desoxi azúcares; por ejemplo ramnosa,^{69,70} así como de fructosa⁷¹ en presencia de aminas o aminoácidos.

⁶⁹ Shaw, P. E.; Berry, R. E. Hexose-Amino Acid Degradation Studies Involving Formation of Pyrroles, Furans, and Other Low Molecular Weight Products. *J. Agric. Food Chem.* **1977**, 25 (3), 641–644.

⁷⁰ Doornbos, T.; Van den Ouweland, G. A. M.; Tjan, S. B. Amadori compounds, derived from 6-deoxy sugars, as flavor precursors. *Progress in Food and Nutrition Science.* **1981**, 5(1-6, Maillard React. Food)

⁷¹ Mills, F. D.; Gene Baker, B.; Hodge, J. E. Amadori Compounds as Nonvolatile Flavor Precursors in Processed Foods. *J. Agric. Food Chem.* **1969**, 17 (4), 723–727.

6.1. Precursores de HDMF en la masa del trigo.

Para tener una idea de la naturaleza de los precursores, se determinó la cantidad de HDMF presente en la corteza de pan preparado a partir de una masa de levadura y una masa modelo en la que la levadura había sido reemplazada por un agente de fermentación. Los resultados mostrados en la Tabla 11, revelaron que la sustitución de la levadura por el agente de fermentación condujo a una disminución significativa de la concentración de HDMF en la corteza. Los datos indicaron que casi el 90% de HDMF presente en la corteza de pan preparada a partir de la masa de levadura provienen de la levadura.

Para probar si el compuesto que aporta el sabor estaba ya presente en la levadura, o fue liberado a partir de precursores durante el proceso de cocción, se realizó el siguiente experimento: Las células de levadura se rompieron mediante molienda con gel de sílice en un mortero. El material resultante se extrajo con éter dietílico y se analizó para identificar HDMF. Se encontró que la levadura ya contenía 871 mg/Kg de este compuesto. En comparación con la levadura no calentada, las cantidades aumentaron en un factor mayor a diez, lo que indica que la mayor parte del HDMF presente en la corteza de pan era suministrado por degradación de precursores en la levadura. Para localizar estos precursores, las células de levadura se rompieron en un molino de celda, se fraccionaron por centrifugación y ultrafiltración, y mediante tratamiento térmico de cada una de las fracciones obtenidas, los precursores de HDMF podrían estar localizados solubles en agua, en la fracción de compuestos de bajo peso molecular (fracción LMW).

Tabla 11. Influencia de la levadura de panadería en las concentraciones de HDMF en la corteza de pan de trigo^a

| Corteza obtenida de: | HDMF ($\mu\text{g}/\text{kg}$ corteza de pan) |
|-------------------------------|--|
| Masa de levadura | 1960 |
| Pasta fermentada químicamente | 218 |

^a La masa se preparó a partir de 500 g de harina de trigo (tipo 550), 15 g de NaCl, 10 g de sacarosa y 270 ml de agua del grifo. Se añadieron 30 g de levadura o un agente de fermentación comercial.

En dos sistemas modelo diferentes se estudió la influencia de las condiciones de calentamiento sobre las cantidades de HDMF liberadas de la fracción de bajo peso molecular (LMW). Como se muestra en la Tabla 12, una temperatura más alta incrementa las cantidades de HDMF. Dado que a temperaturas de ebullición (experimento 1) se formaron cantidades sustanciales del HDMF, los datos indicaron que los precursores son relativamente lábiles.

Tabla 12. Formación del HDMF a partir de la fracción soluble en agua, de los compuestos de bajo peso molecular de levadura.

| Experimento | Condiciones de calentamiento | | HDMF (mg/kg levadura) |
|----------------|------------------------------|------------------|--------------------------|
| | Tiempo (min) | Temperatura (°C) | |
| 1 ^a | 60 | 100 | 7825 |
| 2 ^b | 45 | 150 | 13071 |

^a El materia (de 5 g de levadura), disuelto en buffer de fosfato. (20 mL; 0.1 mol//L; pH 7.0) se calentó a reflujo.

^b Al igual que el material y condiciones de ^a. El calentamiento se realizó en autoclave de laboratorio.

6.2. Azúcares libres como precursores de HDMF

Se ha demostrado que la ramnosa y la fructosa pueden formar HDMF mediante tratamiento térmico. Para investigar su papel como precursores, se calentaron soluciones acuosas de ramnosa, fructosa, glucosa y sacarosa a 100 °C y 150 °C y se determinaron las cantidades de HDMF liberadas, ver Tabla 13. A 100 °C, sólo la ramnosa produjo cantidades sustanciales de HDMF, mientras que la fructosa sólo produjo cantidades muy pequeñas. La glucosa y la sacarosa no formaron HDMF.

A temperaturas elevadas, las cantidades de HDMF producidas a partir de glucosa y fructosa se incrementaron ligeramente, mientras que la cantidad generada a partir de ramnosa aumentó en un factor de catorce. Los iones fosfato favorecieron significativamente la producción de HDMF. Las cantidades de HDMF formadas a partir de ramnosa disminuyeron en un factor de más de cuarenta cuando el fosfato se reemplazó por solución amortiguadora de malonato.

Tabla 13. Formación de HDMF a partir de carbohidratos. Influencia de la temperatura y del tiempo de reacción^a

| Carbohidrato (0.2 mmol) | HDMF (µg) | |
|----------------------------|-----------------|------------------|
| | 60 min (100 °C) | 45 min (15 °C) |
| Sacarosa | < 0.1 | < 0.1 |
| Glucosa | < 0.1 | 0.9 |
| Fructosa | 0.6 | 2.9 |
| Ramnosa | 20.3 | 282.0 |
| Ramnosa | no disponible | 6.6 ^b |

^a Carbohidrato, disuelto en buffer de fosfato (20 mL; 0.1 mol/L; pH 7.0), se calentó bajo reflujo o en un autoclave de laboratorio.

^b El calentamiento se realizó en buffer de malonato (0.1 mol/mL, pH 7.0).

Las adiciones de los aminoácidos prolina o alanina (0.2 mmol) no mejoraron la formación del HDMF a partir de los carbohidratos (datos no mostrados).

Los azúcares libres presentes en la fracción de bajo peso molecular de la levadura se analizaron por electroforesis de capa fina y cuantificados por métodos enzimáticos.⁷² Se detectaron tres fosfatos de azúcar, entre los que predominó la fructosa-1,6-difosfato (FDP), ver Tabla 14. La fructosa estaba presente sólo en cantidades bajas, mientras que la ramnosa no se detectó.

Tabla 14. Concentraciones de azúcares y fosfatos de azúcar en la fracción de bajo peso molecular de la levadura de panadería

| Carbohidrato | Concentración (mg/kg levadura) ^a |
|------------------------|---|
| Sacarosa | 2440 |
| Fructosa | 33 |
| Glucosa | 1265 |
| Glucosa-6-fosfato | 125 |
| Fructosa -6-fosfato | 230 |
| Fructosa-1,6-bifosfato | 5750 |

^a Las concentraciones se determinaron por métodos enzimáticos.

⁷² Analysis of foods containing polysaccharides. IX. Separation of polysaccharide containing thickeners by thin layer electrophoresis Zeitschrift fuer Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung. **1985**, 181(1), 40-4 CODEN: ZLUFAR; ISSN: 0044-3026; German.

Schieberle, Forschungsanstalt y Garching⁷³ determinaron las cantidades de HDMF formadas después del tratamiento térmico de los tres fosfatos de azúcar. Los datos mostraron (Tabla 15) que los fosfatos de azúcar son precursores efectivos de HDMF pero muestran diferentes reactividades. A 100°C, sólo se liberaron cantidades sustanciales de fructosa-6 y fructosa-1,6-difosfato, mientras que a 150°C también se activó glucosa-6-fosfato. Los datos revelaron que el FDP, el azúcar libre predominante en la levadura, es indudablemente el precursor más importante del HDMF. Esto se corrobora por el hecho de que las cantidades de este compuesto liberadas de FDP en levadura o el experimento modelo estaban bien correlacionadas.

Tabla 15. Formación de HDMF a partir de fosfatos de azúcares ^a

| No. | Azúcar fosfato | HDMF (µg) | |
|-----|-------------------------------------|--------------------|--------------------|
| | | 100 °C (60 min) | 150 °C (45 min) |
| 1 | Glucosa-6-fosfato | 0.6 | 29.7 |
| 2 | Fructosa-6-fosfato | 16.4 | 51.4 |
| 3 | Fructosa-1,6-bifosfato | 17.5 | 46.4 |
| 4 | Fructosa-1,6-bifosfato ^b | ----- | 20.7 |

^a El azúcar fosfato se calentó en buffer de fosfato (20 mL; 0.1 mol/L; pH 7.0).

^b El buffer fosfato se reemplazó por buffer de malonato (pH 7.0).

6.3. Precursores del HDMF en el maíz.

Schieberle, Forschungsanstalt y Garching,⁷³ realizaron un extracto acuoso de harina de maíz fraccionado por centrifugación y ultrafiltración. Como en la levadura, los precursores del HDMF podrían ubicarse en la fracción LMW. En un primer experimento, se examinó la influencia de las condiciones de calentamiento en la formación de HDMF a partir de la fracción LMW de maíz. Los datos revelaron (Tabla 16) que en contraste con los experimentos la levadura a 100°C o a 150°C, sólo se formaron cantidades bajas de los

⁷³ Schieberle, P.; Teranishi, R. Formation of Furaneol in Heat-Processed Foods. *Flavor Precursors*; ACS, Ed.; ACS: Washington, DC. **1992**, 164-174.

saborizantes. Dichas cantidades aumentaron en un factor de doce cuando el extracto de harina se calentó en seco. Este proceso proporcionó casi la misma cantidad determinada en palomitas de maíz, ver la similitud en Tabla 10.

Tabla 16. Formación de HDMF de la fracción soluble en agua, de los compuestos de bajo peso molecular de la harina de maíz.

| Experimento | Condiciones de calentamiento | | HDMF ($\mu\text{g}/\text{kg}$ harina de maíz) |
|----------------|------------------------------|------------------------------------|---|
| | tiempo (min) | temperatura ($^{\circ}\text{C}$) | |
| 1 ^a | 60 | 100 | < 10 |
| 2 ^b | 45 | 150 | 93 |
| 3 ^c | 15 | 170 | 1103 |

^a El material (de 30 g harina de maíz), disuelto en buffer de fosfato (20 mL; 0.1 mo/L; pH 7.0) se calentó a reflujo.

^b Al igual que el pie de nota de b. El calentamiento se realizó en autoclave de laboratorio.

^c El material se mezcló homogéneamente con gel de sílice (3 g) y se calentó en seco.

Una cuantificación de los azúcares libres presentes en el extracto de maíz reveló que predominaba la sacarosa y estaban presentes cantidades relativamente altas de glucosa y fructosa (Tabla 17). Los fosfatos de azúcar estaban presentes en cantidades bajas y la ramnosa estaba ausente.

Tabla 17. Concentraciones de carbohidratos en harina de maíz ^a

| Carbohidratos | Conc. (mg/kg maíz) |
|--------------------|--------------------|
| Sacarosa | 2020 |
| Fructosa | 880 |
| Glucosa | 1190 |
| Glucosa-6-fosfato | 77 |
| Fructosa-6-fosfato | 25 |

^a Las cantidades se determinaron por métodos enzimáticos.

Los azúcares identificados en el extracto de maíz se calentaron en condiciones que simularan el proceso de estallido del maíz. Los resultados revelaron (Tabla 18) que se formaron cantidades sustanciales de HDMF a partir de fructosa y glucosa. Las cantidades liberadas de glucosa-6-fosfato fueron bajas y la sacarosa no generó HDMF.

Como la glucosa y la fructosa son los azúcares libres predominantes en el maíz, los datos permiten concluir que estos carbohidratos son los precursores más importantes del HDMF durante el proceso de estallido.

Tabla 18. Formación de HDMF a partir de carbohidratos calentados en seco ^a

| Carbohidrato (0.2 mmol) | HDMF (μg) |
|-------------------------|------------------------|
| Sacarosa | < 0.1 |
| Fructosa | 18.7 |
| Glucosa | 11.9 |
| Glucosa-6-fosfato | 8.4 |

^a El carbohidrato se mezcló homogéneamente con gel de sílice (3 g) y calentado en seco durante 15 minutos a 170 °C.

6.4. Formación de HDMF a partir de fosfatos de azúcares.

Para explicar la formación de HDMF a partir de fosfatos de azúcar por las reacciones conocidas de degradación del azúcar, se debe suponer que se lleva a cabo una reacción de reducción. Esta hipótesis llevó a investigar si en presencia de un compuesto reductor como el ácido ascórbico se favorecería la formación de HDMF a partir de la FDP.

Como se muestra en la Tabla 19, las adiciones de ácido ascórbico aumentaron las cantidades de HDMF liberado a partir de FDP y también de fructosa-6-fosfato por un factor de dos. Las cantidades de HDMF producidas a partir de fructosa también se incrementaron, pero se mantuvieron bajas en comparación con los fosfatos de azúcar.

Recientemente, se identificó HDMF como un producto de la degradación térmica de la 2,5-dimetil-2,4-dihidroxi-3(5*H*)-furanona (acetilformoína). Para dilucidar el papel de este compuesto como precursor de HDMF, la acetilformoína (0.2 mmol) se degradó calentando durante 60 minutos a 100 °C en buffer de fosfato (20 mL, 0,1 mol/L, pH 7,0).

La reacción proporcionó 176 μg de HDMF, que corresponde a un factor de 10, mayor que el obtenido a partir de FDP (comparar la Tabla 15). Este resultado demuestra que la acetilformoína es un intermediario importante en la formación de HDMF.

Tabla 19. Influencia del ácido ascórbico en la formación de HDMF a partir de carbohidratos

| Carbohidrato (0.2 mmo) ^a | HDMF (μg) | |
|-------------------------------------|------------------------|---|
| | sin | con ^b adición de ácido ascórbico |
| Fructosa-6-fosfato | 51.4 | 102.6 |
| Fructosa-1,6-difosfato | 46.4 | 90.7 |
| Fructosa | 2.9 | 3.8 |

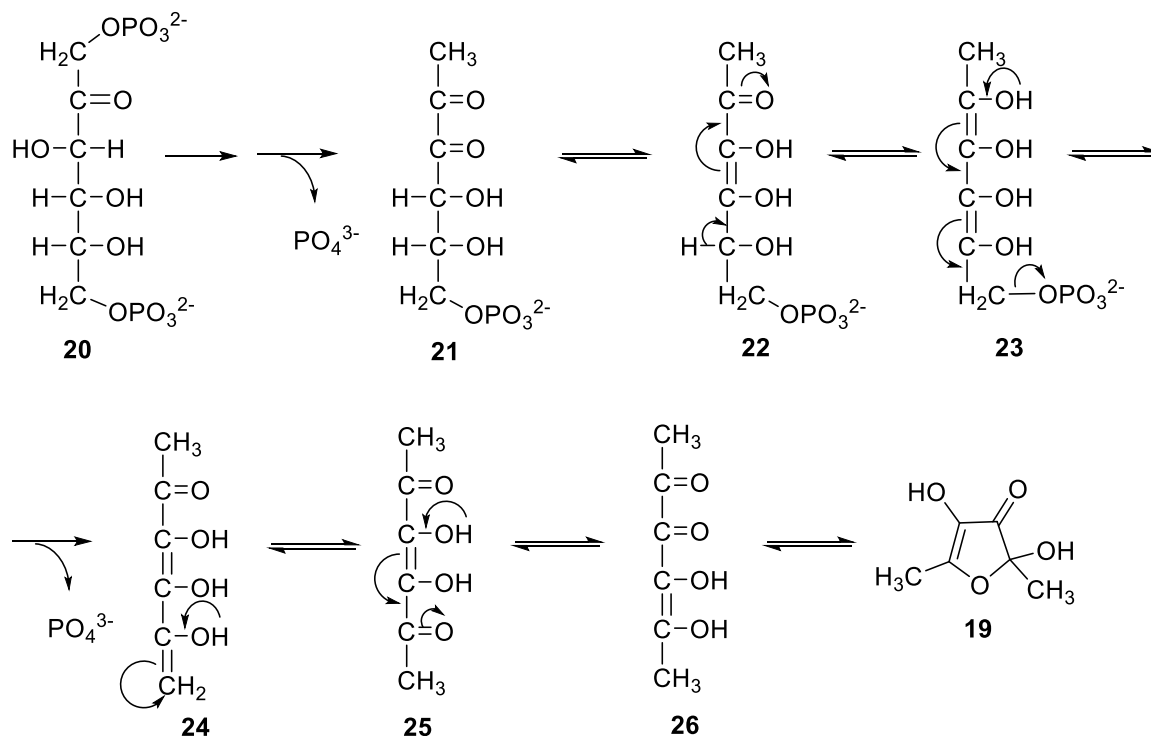
^a Los carbohidratos se disolvieron en buffer de fosfato (20 mL; 0.1 mol/L; pH 7.0) y calentado por 45 min en una autoclave (150 °C).

^b Se agregó ácido ascórbico (0.05 mmol).

En el Esquema 3, se propone una ruta de reacción de FDP a acetilformoína. Después de una enolización 2,3, como primer paso, el grupo 1-fosfato se elimina para formar 1-desoxiosona-6-fosfato. Como el mismo intermedio se formará a partir de fructosa-6-fosfato y como ambos fosfatos de azúcar liberan casi las mismas cantidades de HDMF (comparar con Tabla 15), puede concluirse que la presencia del grupo 1-fosfato no influye en la reactividad del azúcar. La fructosa es poco eficaz como precursor de HDMF en solución acuosa (comparar con Tabla 13).

Por lo tanto, se puede concluir que el grupo fosfato en C-6 juega un papel importante en el proceso. Como el fosfato es un buen grupo de fermentación, su eliminación seguida de reacciones de enolización dará lugar a la acetilformoína. La formación de HDMF a partir de acetilformoína está representada en el Esquema 4. El intermedio reactivo es la forma de cadena abierta de acetilformoína.

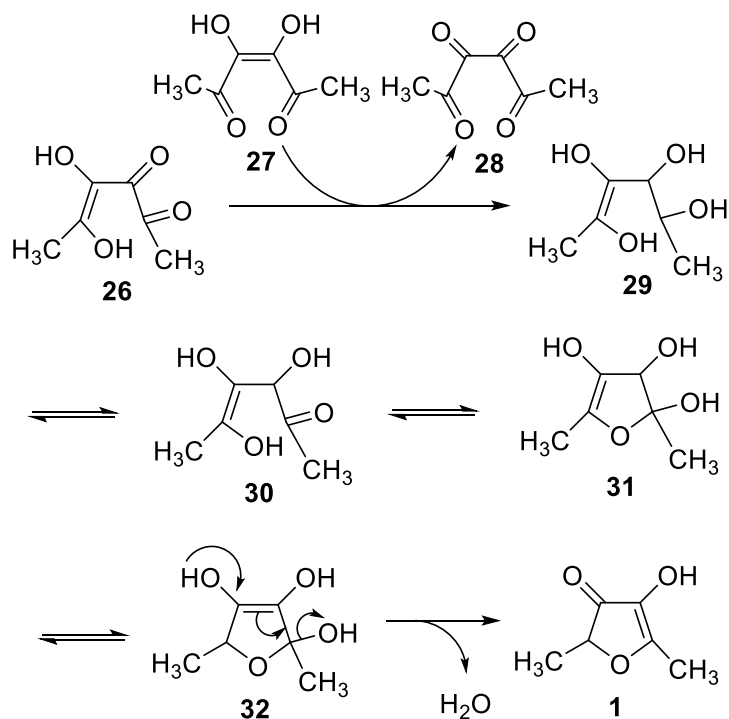
Después de una reducción, que puede ocurrir ya sea por desproporción, o por una reacción mediada por compuestos adicionales como ácido ascórbico. La enolización subsiguiente y la eliminación de agua proporcionarán directamente HDMF a partir de este intermediario.



Esquema 3. Ruta hipotética de la formación de 2,5-dimetil-2,4-dihidroxi-3(2H)-furanona (acetilformoína) a partir de la fructosa-1,6-difosfato.⁷³

⁷³ Schieberle, P.; Teranishi, R. Formation of Furaneol in Heat-Processed Foods. *Flavor Precursors*; ACS, Ed.; ACS: Washington, DC. **1992**, pp 164-174.

En un proceso de calentamiento en seco, como el estallido de maíz, la glucosa y la fructosa también pueden actuar como precursores de HDMF. Bajo estas condiciones, se favorece la eliminación del grupo hidroxilo de C-6, generando de este modo acetilformoína.



Esquema 4. Ruta hipotética para la formación del HDMF a partir de la acetilformoína.⁷³

⁷³ Schieberle, P.; Teranishi, R. Formation of Furaneol in Heat-Processed Foods. *Flavor Precursors*; ACS, Ed.; ACS: Washington, DC. **1992**, pp 164-174.

6.5. HDMF y componentes con actividad aromática en leche seca sin grasa

La aplicación del análisis de dilución del extracto de aroma (AEDA) sobre los componentes volátiles de las leches secas sin grasa (NDM) tratadas con calor bajo, medio y alto, reveló la presencia de compuestos con actividad aromática⁷⁴ con un factor de dilución del sabor \log_3 (\log_3 FD) de 1 a 6.

Los siguientes compuestos aportaron en conjunto los mayores factores \log_3 FD al sabor de la leche seca sin grasa: 2,5-dimetil-4-hidroxi-3 (2*H*)-furanona (HDMF), similar al azúcar quemada; ácido butanoico (rancio); 3-(metiltio)propanal (metional), similar a patata hervida; *o*-aminoacetofenona (similar a la uva); δ -decalactona (dulce); (*E*)-4,5-epoxi-(*E*)-2-decenal (metálico); ácido pentanoico (sudoroso); 4,5-dimetil-3-hidroxi-2(5*H*)-furanona (sotolona), curry; 3-metoxi-4-hidroxibenzaldeido (vainillina), vainilla; 2-acetil-1-pirrolina y 2-acetil-2-tiazolina (tipo palomitas de maíz); ácido hexanoico (similar al vinagre); ácido fenilacético (similar a rosa); ácido octanoico (ceroso); nonanal (graso) y 1-octen-3-ona. Las intensidades de olor de HDMF, ácido butanoico, metional, *o*-aminoacetofenona, sotolona, vainillina, (*E*)-4,5-epoxi-(*E*)-2-decenal y ácido fenilacético fueron más altas en muestras tratadas a mayor temperatura. Sin embargo, las intensidades de olor del 2-acetil-1-pirrolina y del 2-acetil-2-tiazolina no se vieron afectadas por el tratamiento térmico. Los resultados de la evaluación sensorial también revelaron que los aromas generados por calor tienen un impacto importante en el perfil de sabor de las NDM.

El estudio ha demostrado el impacto sobre los olores característicos en las leches secas sin grasa. Las intensidades de olor de algunos compuestos se vieron afectadas por el tratamiento térmico. Del mismo modo, las diferencias en intensidades de sabor debido al tratamiento térmico fueron observadas por panelistas sensores. Los compuestos inducidos térmicamente se percibieron a intensidades más altas en polvos de leche desnatada tratados con calor elevado. HDMF, maltol, sotolona, vainillina y ácido butanoico se percibieron a mayores intensidades en las fracciones ácidas de leche seca sin nata, con tratamiento térmico alto.

⁷⁴ Karagül-Yüceer, Y.; Drake, M.; Cadwallader, K. R. Aroma-Active Components of Nonfat Dry Milk. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49 (6), 2948–2953.

7. Contribución del HDMF en el umbral, olor y sabor de los alimentos

La evaluación sensorial de alimentos y bebidas es tan antigua como la humanidad. En particular, el olor, pero también el sabor, han sido instintivamente utilizados como criterios en la selección de los alimentos. La cocción, el horneado y el tostado se aplican para hacer los alimentos más agradables al paladar.

Los alimentos tanto frescos como procesados son sustratos ideales para ser transformados químicamente por la hidrólisis y la oxidación de lípidos, procesos enzimáticos, reacciones de oscurecimiento no enzimático y reacciones fotoquímicas.

El número de reacciones que se favorecen es muy grande, generando una amplia gama de compuestos como: alcoholes, aldehídos, dicarbonilos, cetonas, ésteres, éteres, azúcares, furanonas, furanos, mercaptanos, terpenos, sales, aminoácidos, lactonas, pirazinas, pirroles, piridinas, pirimidinas, piranonas, sulfuros, oxazoles, oxazolininas, ácidos grasos libres de cadena mediana y corta, metil cetonas, lactonas, compuestos fenólicos y de azufre. Todas estas moléculas responsables de los sabores y aromas de los alimentos se producen esencialmente por dos mecanismos: biosíntesis y por efecto de tratamiento térmico.

Se han detectado⁷⁵ más de 10,000 compuestos volátiles en los alimentos, de los cuales un porcentaje (5-10%) son compuestos aromáticos. Por otra parte, en un meta-análisis⁷⁶ reciente de 5642 publicaciones sobre aromas de alimentos entre los años de 1980 a 2013 y de otros 949 documentos, se identificaron 226 aromas de alimentos clave del análisis de un total de 119 publicaciones de 227 muestras de alimentos. Al clasificar los 226 odorantes clave en orden de su abundancia, encontraron 16 compuestos (denominados "generalistas") que se detectan como olores clave en $\geq 25\%$ de las muestras analizadas.

⁷⁵ Blackwell, W. Characterization of aroma compounds: structure, physico-chemical and sensory properties. In *Flavour: From Food to Perception*; Guichard, E., Salles, C., Morzel, M. and Le Bon, A., Eds.; John Wiley: Oxford UK, **2017**; Vol. First edition, 126-148.

⁷⁶ Dunkel, A., Steinhaus, M., Kotthoff, M., Nowak, B., Krautwurst, D., Schieberle, P., Hofmann, T. Nature's chemical signatures in human olfaction: a foodborne perspective for future biotechnology. *Angewandte Chemie International Edition*. **2014**, 53(28), 7124-7143.

Los más frecuentes son metional (53.7% de las muestras, el olor a papas hervidas), el 2- y el 3-metilbutanal (50.7%, malta), el butano-2,3-diona (41.9%, mantequilla), (*E,E*)-2,4-decadienal (41.4%, frito, graso) y HDMF (40.5%, caramelo), seguido de sotolona (condimento), 1-octen-3-ona (champiñon), ácido acético (vinagre), acetaldehído (afrutado, fresco), 2- y 3-metilbutanoato de etilo (afrutado), (*E*)-2-nonenal (maduro), vainillina (vainilla), 2-acetil-1-pirrolina (asado, palomita de maíz), 2- y ácido 3-metilbutanoico (sudor) y ácido butanoico (sudor).

Otro conjunto de 57 odorantes clave ("intermediarios") contribuyó al aroma del 5-25% de las muestras de alimentos analizadas, mientras que el tercer grupo consistió de 151 compuestos ("individualistas") presentes en menos del 5% de los alimentos.

Los compuestos aromáticos clave tienen umbrales de olor en un espectro muy amplio de valores (desde mg/L hasta pg/L). Cuando se discute el impacto olfativo de los compuestos en los alimentos, se deben tener en cuenta dos características: el umbral de olor y la concentración del compuesto. El impacto olfativo de los compuestos podría ser aproximado por su valor de actividad de olor (OAV), que es una relación de la concentración del compuesto a su umbral de olor.

En un concepto de OAV, la cromatografía de gases-olfatometría (GC-O) permite la determinación de la mayoría de los compuestos activos de olor utilizando el método de análisis de dilución de extracto de aroma (AEDA) en el que se perciben diluciones en serie de extracto de aroma u otros enfoques que proporcionan cuantificación de aroma sensación. Los olores con OAVs bajos (típicamente ≤ 1) generalmente se consideran sin importancia en la percepción sensorial global. Sin embargo, la determinación del perfil del aroma por GC-O no es suficiente para caracterizar el aroma global.

7.1. Aromas por el efecto del tratamiento térmico.

La proporción de sustancias volátiles presentes en los alimentos es extremadamente baja (alrededor de 10 – 15 mg/Kg). Sin embargo, son un gran número los compuestos volátiles los que producen los aromas. Especialmente los alimentos elaborados por procesos térmicos, como el café o en combinación con procesos de fermentación como el pan, la

cerveza, cocoa o té, contienen más de 800 compuestos volátiles. También una gran variedad de compuestos con frecuencia están presentes en frutas y verduras.

Todos los compuestos volátiles conocidos se clasifican de acuerdo con el alimento y las características de compuestos que los integran y se publican en una compilación tabular⁷⁷ Un total de 7100 compuestos en más de 450 alimentos se enumeran en la edición de 1999 (Nijssen, L. M.)^{78,79}, que también está disponible como una base de datos en Internet. De todos los compuestos volátiles, solo un número limitado son importantes para el aroma. El tratamiento térmico en los alimentos inicia una serie de transformaciones como la pirólisis, la caramelización, la degradación de lípidos mediante autooxidación y la reacción de Maillard, relacionada con la degradación de aminoácidos de Strecker. Estas transformaciones generan un gran número de compuestos de bajos pesos moleculares y volátiles aun a temperatura ambiente.

7.2. Reacción de Maillard

Se conoce con el nombre de reacción de Maillard al conjunto de reacciones observadas por primera vez por el químico francés Louis-Camille Maillard en 1912 y que se llevan a cabo entre un grupo aldehído o cetona, proveniente de azúcares reductores, y grupos amino de aminoácidos o proteínas. Ejemplos de los productos de la reacción de Maillard, son los compuestos pigmentados insolubles que se denominan melanoidinas (oscurecimiento del alimento), además de otros compuestos volátiles y solubles.

Las condiciones físicas son determinantes para que se produzca la reacción, la actividad del agua (actividad acuosa, A_w) desempeña un papel importante en estas reacciones, que están propiciadas para bajos contenidos de la misma, mientras que altos contenidos impedirán que se desarrollen.

⁷⁷ Belitz, H. D.; Grosh, W.; Schieberle, P. Aroma Compounds. *Food Chemistry* Springer: Heidelberg, Berlin, **2009**; pp 340-367.

⁷⁸ Nijssen, L.M., Visscher, C. A., Maarse, H., Willemsens, L.C., Boelens, M.H.: Volatile compounds in food. Qualitative and quantitative data. 7th Edition and supplements 1 and 2. TNO Nutrition and Food Research Institute, Zeist, The Netherlands, **1999**.

⁷⁹ Leffingwell; Associates. VCF 2000 - Volatile Compounds in Food DATABASE <http://www.leffingwell.com/bacis1.htm> (accessed Apr 8, 2018).

La reacción de Maillard consiste en una red intrincada de reacciones que forman mezclas químicamente complejas de productos, los cuales ocurren a altas temperaturas (>50 °C) y en condiciones de pH ácido (4-7) y son favorecidas en alimentos con una alta cantidad de proteínas y carbohidratos. La reacción inicia con la interacción entre el grupo carbonilo del azúcar con el grupo amino de los aminoácidos libres o proteínas. El producto de esta interacción experimenta una transformación que se conoce como reordenamiento de Amadori, seguido de una tautomería y posterior deshidratación de la fracción de azúcar, mientras que el aminoácido se libera de forma intacta.⁸⁰

8. Estabilidad del HDMF en los alimentos

El parámetro más importante que enriquece a un alimento es su sabor; por lo que los investigadores y la industria, están prestando cada vez más atención a la estabilidad del HDMF en el alimento natural y en el alimento procesado.

La calidad del aroma de los alimentos está influenciado por tres factores: (1) reactividad química del compuesto de sabor de los alimentos; (2) entorno de los alimentos, como la disponibilidad de luz y oxígeno atmosférico; y (3) sistema de matriz alimenticia y sus constituyentes tales como proteína, grasa, carbohidrato, metales, radical y otros polímeros en alimentos tales como melanoidinas marrones formadas durante el procesamiento térmico de los alimentos. Entre los muchos factores relacionados con la calidad del sabor, la estabilidad del sabor es la más importante. La estructura química individual de los compuestos de sabores y de aromas se asocia con la reacción química que es responsable de su estabilidad. La presencia de grupos funcionales activos, como los grupos funcionales carbonilo, hidroxilo y tiol, afecta la reactividad química de los compuestos de sabor. Los compuestos saborizantes de alta y baja volatilidad, independientemente de si son neutros, ácidos o nitrogenados y compuestos que contienen azufre, pueden ser susceptibles a cambios químicos que ocurren por varios

⁸⁰ Alonso I., Síntesis y reactividad de 5-hidroximentilfurfural (HMF). Formación de pirroles a partir de HMF, Tesis de Licenciatura. UNAM, Facultad de Química. 2014. 24

tipos de interacciones, incluyendo oxidación, hidrólisis, degradación térmica, fotooxidación, polimerización de compuestos insaturados e interacción con proteínas en sistemas alimentarios. Por ejemplo, un aldehído se puede oxidar fácilmente a ácido, la amina puede formar un complejo con iones metálicos, y los terpenos pueden experimentar reordenamiento e isomerización en condiciones ácidas. Estas consecuencias vulnerables tienen un impacto en la calidad general del sabor de los alimentos,⁸¹ el 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona (HDMF) tiene el impacto bastante considerable en el aroma de los alimentos, debido a su umbral de sabor muy bajo en agua, que es de 0.04 µg/kg, en comparación con los de norfuraneol y homofuraneol, que son 23,000 µg/kg y 20 µg/kg, y los tres aportan un sabor dulce parecido al caramelo.⁸²

Además, se ha encontrado⁸³ que los umbrales de HDMF y sus compuestos de olor relacionados varían dependiendo del pH de la solución: cuanto más ácido es el medio de solución, menor es el umbral de olor. Un ejemplo es el homofuraneol identificado por primera vez como un factor de impacto en el sabor de salsa de soya de estilo japonés y desde entonces se ha informado, sobre la base de experimento sensorial, que es de gran importancia para el sabor general de salsa de soya.^{84, 85}

En la naturaleza, el HDMF puede convertirse rápidamente en metoxifuraneol por acción de la enzima O-metiltransferasa durante la maduración de los frutos.⁸⁶ Además, de encontrarse en ciertas frutas, el HDMF es también el principal componente de sabor en alimentos procesados térmicamente, como la corteza de pan de trigo y palomitas de maíz, ya que puede formarse por degradación térmica de fructosa, pirólisis de D-glucosa o 1-desoxi-1-piperidino-D-fructosa, además por calentamiento de aminoácidos con ramnosa.

⁸¹ Fisher C, Scott TR. Introduction problems in flavor research. London, UK: *Royal Society of Chemistry*; **1997**.

⁸² Zabetakis, I., Gramshaw, J.W., Robinson, D.S. 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-2H-furan-3-one and its derivatives: analysis, synthesis and biosynthesis—a review. *Food Chemistry*. **1999**, 65,139-151.

⁸³ Buttery, R. G., Takeoka, G. R., & Ling, L. C. Furaneol: odor threshold and importance to tomato aroma. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. **1995**, 43, 1638-1640.

⁸⁴ Steinhaus P, Schieberle P. Characterization of the key aroma compounds in soy sauce using approaches of molecular sensory science. *J Agric Food Chem*. **2007**, 55:6262-9.

⁸⁵ Aishima T. Classification of soy sauce on principal components in GC profiles. *Agric Biol Chem*. **1979**, 43:1905-10.

⁸⁶ Lavid N, Schwab W, Kafkas E, Koch-Dean M, Bar E, Larkov O, Ravid U, Lewinsohn E. Aroma biosynthesis in strawberry: Sadenosylmethionine: furaneol O-methyltransferase activity in ripening fruits. *J Agric Food Chem*. **2002**, 50:4025-30.

Hasta el momento, los estudios con homofuraneol se han centrado en su generación, y no en su estabilidad comparada con HDMF.⁸⁶

El HDMF es inestable tanto en presencia de aire como en soluciones acuosas.⁸⁷ Por otro lado la tautomería ceto-enol del HDMF depende del pH. El resultado de un estudio de estabilidad del HDMF en una solución tampón acuosa, reveló que la degradación de este compuesto dependía del pH, siendo la estabilidad óptima a pH 4; adicionalmente, se encontró que la velocidad de descomposición sigue una cinética de primer orden.⁸⁸

A partir de un estudio sobre la estabilidad de los derivados de HDMF de origen natural a un intervalo de pH de 2.0–8.0 a 23°C, se encontró que la mayor estabilidad de HDMF en soluciones acuosas era a pH 3.5 y que la adición de sacarosa y alcohol etílico en un intervalo de concentración (0 ± 20%) no tiene ningún efecto sobre la estabilidad del HDMF. El HDMF es lábil al calor, y las altas temperaturas (130 °C y 160 °C) causan la degradación térmica para producir una variedad de compuestos carbonílicos e hidroxilcarbonilos tales como 2-hidroxi-3-butanona y 2-hidroxi-3-pentanona, aldehídos alifáticos o alcoholes.⁸⁹

Los aminoácidos y el sulfuro de hidrógeno también tienen un impacto en la estabilidad del HDMF. Particularmente, se ha estudiado la degradación térmica a temperaturas altas⁸⁹ la degradación térmica del HDMF en un sistema cerrado a 160 °C a varios valores de pH (2.2, 5.1 y 7.1), y se encontró que la mayoría de los productos de degradación eran carbonilos cíclicos, así como furanonas.

La etapa inicial del mecanismo de degradación implica la apertura del anillo de furano. El producto de la apertura sufre una reacción retroaldólica para generar un grupo de productos primarios, incluyendo acetaldehído, hidroxiacetona, 1-hidroxi-2-butanona, 3-hidroxi-2-butanona y 2,3-butanodiona, que reaccionaron de manera intermolecular para

⁸⁷ Koga T, Moro K, Matsudo T. Antioxidative behaviors of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone and 4-hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone against lipid peroxidation. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. **1998**, 46:946-51.

⁸⁸ Hirvi T, Honkanen E, Pyysalo T. Stability of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone and 2,5-dimethyl-4-methoxy-3(2H)-furanone in aqueous buffer solutions. *Lebens Wissensu-Technol*. **1980**, 13: 324-5.

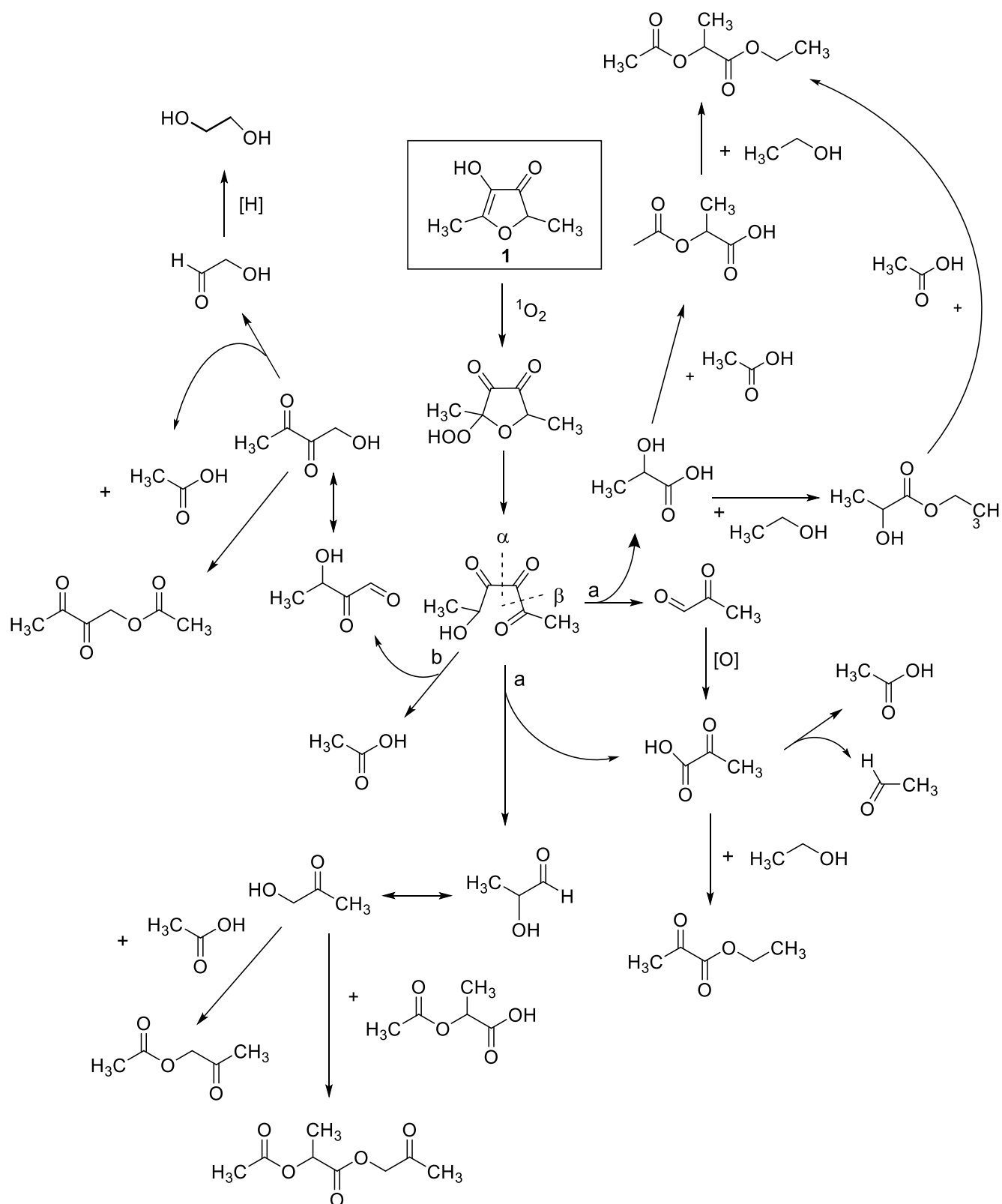
⁸⁹ Shu CK, Mookherjee BD, Ho CT. Volatile components of the thermal degradation of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone. *J Agric Food Chem*. **1985**, 33:446-8.

generar productos secundarios. Los productos secundarios importantes, 3-hidroxi-2-pentanodiona y 2-hidroxi-3-pentanona, se forman por condensación aldólica de los productos primarios acetaldehído e hidroxiacetona.

El estudio de la estabilidad fotooxidativa⁹⁰ mostró que el estado inicial de foto-oxidación del HDMF comienza con la apertura de la estructura del anillo como en el mecanismo de degradación térmica, y se generan los productos primarios de la fotooxidación que luego reaccionan con alcoholes o ácidos, dando lugar a formación de ésteres acíclicos y productos secundarios.⁹⁰

El mecanismo posible para la fotooxidación del DMHF se resume en el Esquema 5 y comienza con la exposición de HDMF a la luz, en presencia de un fotosensibilizador (e.g. clorofila) y se genera el oxígeno singlete (1O_2 , oxígeno molecular energéticamente excitado), que luego ataca el enlace doble en la posición C-5, produciendo un hidroperóxido. Más adelante, este hidroperóxido de anillo abierto forma el intermedio de 5-hidroxi-2,3,4-hexanetriona, que se hidroliza en la posición α o en la posición β para formar los productos primarios o productos intermedios que incluyen ácido láctico, aldehído pirúvico, ácido pirúvico, ácido láctico aldehído, ácido acético y acetoína. Posteriormente, el ácido láctico pasa por una serie de procesos de esterificación con ácido acético o alcohol para formar los productos secundarios que incluyen 2-acetoxipropionato, lactato de etilo y 2-acetoxipropionato de etilo.

⁹⁰ Chen CW, Shu CK, Ho CT. Photosensitized oxidative reaction of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone. *J Agric Food Chem*, **1996**, 44:2361-5.



Esquema 5. Mecanismo postulado para la formación de los productos de oxidación fotoquímica a partir de HDMF en alcohol absoluto que contiene 10 ppm de clorofila a 20 °C.⁹¹

⁹¹ Weerawatanakorn, M.; Ching Wu, J.; Hsiung Pan, M.; Tang Ho, C. Reactivity and stability of selected flavor compounds. *J. Food Drug Anal.* **2015**, *23*, 176-190.

El aldehído piruvato se oxida a ácido pirúvico inestable, que luego se somete fácilmente a una reacción de esterificación con etanol para formar piruvato de etilo y procede a través de una reacción de degradación para generar ácido acético como producto de fotooxidación.

La acetoína se somete a un proceso de tautomerización ceto-enol para formar cetoalcoholes, que son capaces de reaccionar con ácidos para formar ésteres incluyendo el 2-oxopropilo, el 2-acetoxipropionato y la acetoxiacetona. Los intermedios de la parte **b**, tales como el aldehído láctico, pasan por el mismo mecanismo que la acetoína que conduce a la acetoxi-2,3-butanodiona y 1,2-etanodiol. Los resultados de este estudio en términos de intermedio, primario y secundario pueden utilizarse para explicar el efecto prooxidante tanto del homofuraneol como del HDMF.

La reacción de HDMF con sulfuro de hidrógeno o un aminoácido, tal como cisteína, produce un derivado de tiofeno.^{92,93,94} El oxígeno del anillo en el HDMF es fácilmente intercambiable con un átomo de azufre, por lo que es reactivo al sulfuro de sodio, sulfuro de hidrógeno y compuestos que contienen azufre, tales como el aminoácido cisteína y glutatión. Es bien conocido que el sulfuro de hidrógeno (H₂S) es un producto de la degradación térmica de cisteína, cistina y glutatión.^{92,93,94}

La reacción química implica la degradación térmica tanto del furaneol como del aminoácido, y las interacciones entre los productos de degradación incluyen la reacción de Maillard y la degradación de Strecker de aminoácidos. En otros trabajos se obtuvieron⁹⁶ derivados de mercaptotieno por calentamiento de HDMF con sulfuro de hidrógeno en una solución acuosa a 100°C. Por otro lado⁹¹, se estudió la reactividad entre HDMF y cisteína a diversos valores de pH a 160 °C, y se encontró que los productos formados dependían significativamente del pH de la solución.

⁹² Shu CK, Mookherjee BD, Ho CT. Volatile components of the thermal degradation of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone. *J Agric Food Chem.* **1985**, 3:446e8.

⁹³ Van den Ouweland GAM, Peer HG. Components contributing to beef flavor. Volatile compounds produced by the reaction of 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone and its thio analog with hydrogen sulfide. *J Agric Food Chem.* **1975**, 2:501e5.

⁹⁴ Shu CK, Ho CT. Effect of pH on the volatile formation from the reaction between cysteine and 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone. *J Agric Food Chem.* **1988**, 36:801e3.

El estudio mostró que se generaron más derivados del tiofeno a un pH menor (2.2) que a un pH más alto (5.1). Solamente a un pH superior a pl de la cisteína (7.1) se formaron pirazinas. Otros⁹⁵ grupos investigaron el posible mecanismo de reacción a través de la reacción de Maillard y la degradación de Strecker de aminoácidos usando las reacciones de furaneol con cisteína, glutatión, sulfuro sódico y alanina a 130 °C.

Los resultados indicaron que la disponibilidad de sulfuro de hidrógeno podría ser el factor limitante en los tipos y cantidad de compuestos que contienen azufre formados en la reacción.⁹² Kunert-Kirchhoff y Baltes⁹⁶ informaron que, incluso en presencia de aminoácidos que contienen azufre, el HDMF reaccionó con fenilalanina en una autoclave, generando alquilpirazinas y alquildihidrofuropirazinas.

Muchas reacciones químicas y numerosos factores, incluyendo temperatura, pH, período de almacenamiento, enzimas y oxígeno, influyen en la estabilidad de los compuestos de sabor.

Tanto los compuestos aromatizantes de alta y baja volatilidad, independientemente de que sean compuestos neutros, ácidos, compuestos conteniendo nitrógeno o azufre, pueden ser susceptibles a cambios químicos que se producen en diversos tipos de interacciones como la oxidación, la hidrólisis, la degradación térmica, la fotooxidación, la polimerización de compuestos insaturados y la interacción con proteínas presentes en los alimentos.

⁹⁵ Zheng Y, Brown S, Ledig WO, Mussinan C, Ho CT. Formation of sulfur-containing flavor compounds from reactions of furaneol and cysteine, glutathione, hydrogen sulfide, and alanine/hydrogen sulfide. *J Agric Food. Chem.* **1997**, 45:894e7.

⁹⁶ Kunert-Kirchhoff J, Baltes W. Model reactions on roast aroma formation. *Z Lebensm Unters Forch.* **1990**, 190:9e13.

9. Biosíntesis del HDMF

Los compuestos generados por este mecanismo se denominan sabores y aromas naturales. En general, son metabolitos secundarios que se forman durante el ciclo normal de crecimiento y maduración de frutos y vegetales por los procesos bioquímicos conocidos como rutas metabólicas en presencia de sistemas enzimáticos endógenos, propios del alimento y/o por sistemas enzimáticos exógenos, por actividad enzimática de microorganismos. Estos metabolitos secundarios permanecen dentro del producto, generando sabor y el aroma que se perciben directamente durante la degustación de los alimentos. Los productos crudos de origen animal como la leche, carne, huevo, pescado, así como cereales y oleaginosas, son por lo general insípidos y poco atractivos para su consumo; pero cuando son sometidos a tratamientos térmicos con los procesos de cocción, horneado, tostado y de freído, se producen modificaciones en la coloración con pigmentaciones oscuras, cambios en la textura, obtención de una gama de sabores entre amargos y dulces, y la producción de aromas característicos del proceso de cocción, haciéndolos más agradables para su consumo.

9.1. Formación de HDMF en la fresa

En los años de 1995 y 1996^{97,98} se demostró que la formación de HDMF en la fresa está relacionada con el proceso de maduración. Mediante un sistema de crecimiento *in vitro*⁹⁹ se encontró un aumento en el contenido del HDMF con el tiempo a una tasa mayor que las frutas cultivadas en el campo, con la mayor acumulación de furanona (125%) en aquellos frutos cultivados en un medio suplementado con D-fructosa 6-fosfato.¹⁰⁰

⁹⁷ Pérez AG., Sanz C., Olías R., Ríos JJ. and Olías JM. Evolution of strawberry alcohol acyltransferase activity during fruit development and storage, *J Agric Food Chem.* **1996**, 44, 3286–3290.

⁹⁸ Sanz, C., Richardson, D. G., & Perez, A. G. 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone and derivatives in strawberries during ripening. In R. L. Rouseff (Ed.), *Fruit Flavors.* **1995**, 268-275. Washington, DC: ACS

⁹⁹ Perkins-Veazie PM. and Huber DJ. Development and evaluation of an *in vitro* system to study strawberry fruit development, *J Exp Bot.* **1992**, 249, 495–501.

¹⁰⁰ Pérez AG.; Olías R.; Olías JM. Biosynthesis of 4-Hydroxy-2,5-Dimethyl-3(2H)-Furanone and Derivatives in *in Vitro* Grown Strawberries. **1999**, 3 (1992), 655–658.

Experimentos que utilizaron sustratos marcados radiactivamente probaron la transformación de toda la cadena de carbono de la D-fructosa en HDMF.¹⁰¹

Estudios incorporando D-[2-²H]-glucosa demostraron la implicación de la fosfohexosa isomerasa en la conversión de D-glucosa en furanonas, lo que confirma la hipótesis de que la D-fructosa-6-fosfato es un precursor natural de la biosíntesis de HDMF (**1**) y de DMMF (**2**).¹⁰² Recientemente, han aislado¹⁰³ y caracterizado una enzima involucrada en el último paso de la ruta biosintética del HDMF en la fresa. La madurez en el fruto incrementa la actividad de la enzima FaEO y se correlaciona con la acumulación de HDMF (**1**).⁹⁷ Los hallazgos señalan un nuevo precursor natural el 4-hidroxi-5-metil-2-metileno-3(2H)-furanona el HMMF (**34**) y un nuevo esquema de biosíntesis del HDMF (**1**), ver el Esquema 2. En el cual se muestra al HDMF (**1**) como el metabolito clave de la vía.

Los estudios de radiotrazadores han demostrado que los frutos pueden convertir el HDMF (**1**) en mesifurano DMMF (**2**) y en el glucósido del HDMF (**35**).¹⁰⁴ En el año 2002 identificaron¹⁰⁵ la enzima O-metiltransferasa en fresa, capaz de transferir un grupo metilo de S-adenosil-L-metionina (SAM) al HDMF (**1**). La actividad de esta enzima, con una masa molecular nativa de 80 KDa, actividad óptima a pH 8,5 y 37 °C, y una K_m aparente de 5 mM para el HDMF (**1**), también aumenta con la maduración del fruto.¹⁰⁶ Aunque en los frutos de fresa se forma el glucósido de HDMF en la última etapa del desarrollo del fruto¹⁰⁷ y la mayoría de los estudios demostraron que el HDMF (**1**) es el precursor del

¹⁰¹ Schwab W. Application of stable isotope ratio analysis explaining the bioformation of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-(2H)-furanone in plants by a biological Maillard reaction, *J Agric Food Chem.* **1998**, 46, 2266–2269.

¹⁰² Wein M.; Lewinsohn, E.; Schwab, W. L03: 1: 144. Metabolic Fate of Isotopes during the Biological Transformation of Carbohydrates to 2,5-Dimethyl-4-Hydroxy-3(2H)-Furanone in Strawberry Fruits. **2001**, 3 (1), 2006.

¹⁰³ Raab T., López-Raez JA., Klein D., Caballero JL., Moyano E., Schwab W. and Muñoz Blanco J. FaQR required for the biosynthesis of the strawberry flavor compound 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone encodes a enone oxidoreductase, *Plant Cell.* **2006**, 18, 1023–1037.

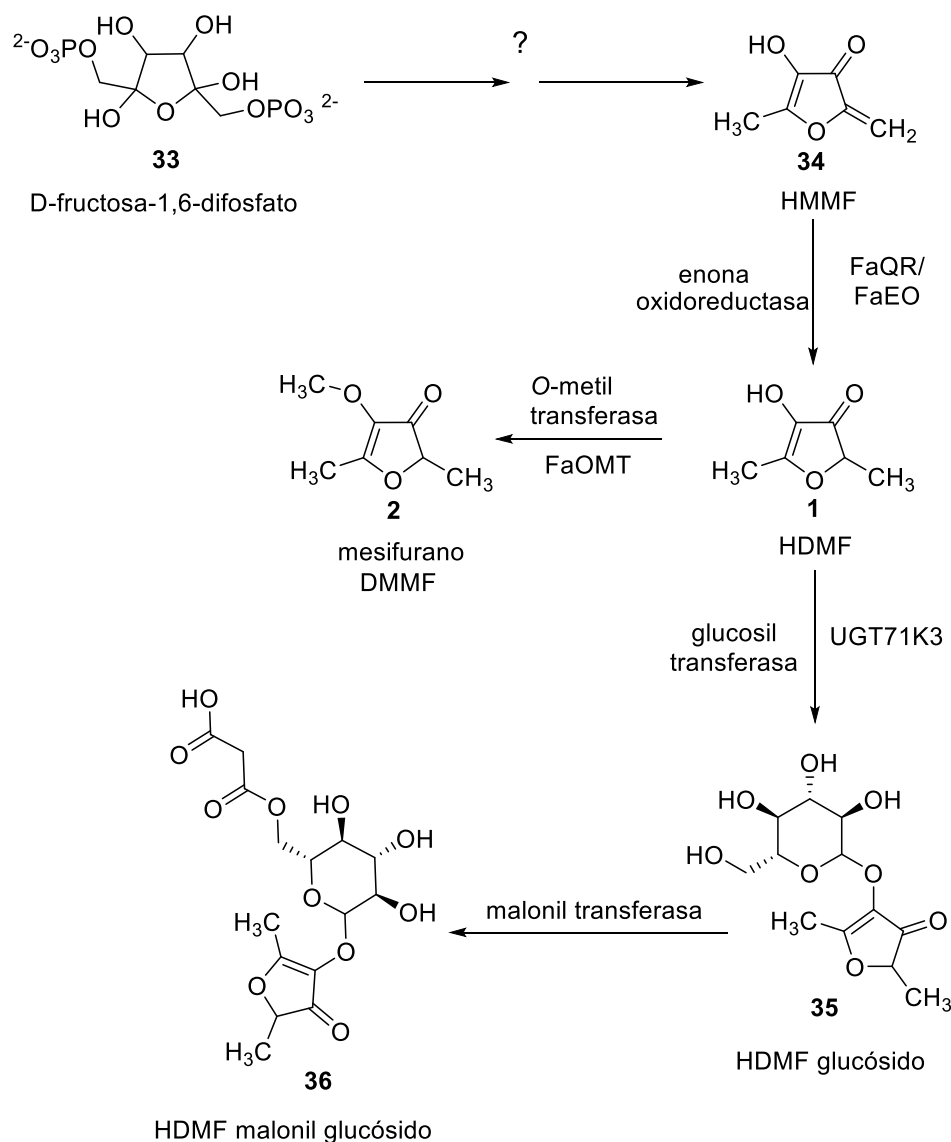
¹⁰⁴ Roscher R., Schreier P., Schwab W. Metabolism of 2,5-Dimethyl-4-Hydroxy-3(2H)-Furanone in Detached Ripening Strawberry Fruits. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45 (8), 3202–3205.

¹⁰⁵ Lavid N, Schwab W, Kafkas E, Koch-Dean M, Bar E, Larkov O, Ravid U, Lewinsohn E. Aroma biosynthesis in strawberry: Sadenosylmethionine: furaneol O-methyltransferase activity in ripening fruits. *J Agric Food Chem.* **2002**, 50: 4025-30.

¹⁰⁶ Lunkenbein, S.; Salentijn, E. M. J.; Coiner, H. A.; Boone, M. J.; Krens, F. A.; Schwab, W. Up- and down-Regulation of *Fragaria x ananassa* O-Methyltransferase: Impacts on Furanone and Phenylpropanoid Metabolism. *J. Exp. Bot.* **2006**, 57 (10), 2445–2453.

¹⁰⁷ Pérez, A. G.; Olías, R.; Sanz, C.; Olías, J. M. Furanones in Strawberries: Evolution during Ripening and Postharvest Shelf Life. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, 44 (11), 3620–3624.

HDMF glucósido (**12**)^{104,108} el mecanismo que regula la interconversión del HDMF (**1**) en el HDMF-glucósido (**12**) no se ha elucidado completamente.



Esquema 2. Propuesta de vía biosintética para el furaneol y sus derivados en la fresa (adaptado de Raab).^{109,110}

¹⁰⁸ Roscher, R.; Bringmann, G.; Schreier, P.; Schwab, W. Radiotracer Studies on the Formation of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone in Detached Ripening Strawberry Fruits. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 3 (97), 1488–1493.

¹⁰⁹ Raab T., López-Raez JA., Klein D., Caballero JL., Moyano E., Schwab W. and Muñoz Blanco J. FaQR required for the biosynthesis of the strawberry flavor compound 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone encodes a enone oxidoreductase, *Plant Cell.* **2006**, 18, 1023–1037.

¹¹⁰ Bernhard Brückner and S. Grant Wyllie. *Fruit and Vegetable Flavour Recent Advances and Future Prospects*, First publ.; Bernhard, B., S. Grant, W., Eds.; Woodhead Publishing Limited and CRC: Boca Raton Boston New York Washington, DC, **2008**.

Los estudios con cultivos de callo han demostrado que después de los experimentos de medios de cultivo con azúcar, el metabolito de almacenamiento preferido es el HDMF glucósido **12**.¹¹¹

Después del fraccionamiento de un extracto glicosídico de fresa se descubrió no solo el mencionado derivado β -D-glucopiranosido **12** sino también un HDMF malonil glucósido **13** formado mediante esterificación.¹¹² Estudios recientes también se han centrado en la biosíntesis de otro derivado del HDMF (**1**), el norfuraneol (4-hidroxi-5-metil-3[2H]-furanona), identificado en frambuesa, guayaba y tomate.¹¹³ La D-ribulosa-5-fosfato parece ser el precursor del HDMF en el tomate a través de una ruta de biosíntesis en la que se considera que 4,5-dihidroxi-2,3-pentanodiona es un intermediario clave.

9.2. Biosíntesis de 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona por *Zygosaccharomyces rouxii*

La producción de HDMF por *Zygosaccharomyces rouxii* se estudió en diferentes condiciones y medios de cultivo. Entre los precursores agregados, el mejor fue el D-fructosa 1,6-difosfato, que en condiciones aeróbicas llevaron a un nivel alto de HDMF con un agregado del 10% de D-fructosa 1,6-disfosfato incrementó la producción de HDMF. La biosíntesis del HDMF luego disminuyó y se inhibió fuertemente con 20% de D-fructosa 1,6-difosfato. El HDMF es producido por la levadura *Zygosaccharomyces rouxii* durante la fase de crecimiento y en la fase estacionaria. Este método microbiológico permite la biosíntesis de HDMF hasta 100 ppm.¹¹⁴

Z. rouxi es la levadura por excelencia para elaboración de la salsa de soya de alta calidad, la cual se produce por la fermentación en varias etapas con diferentes microorganismos

¹¹¹ Zabetakis I. and Holden Ma. The effect of 6-desoxy-6-fructose on flavor bioformation from strawberry (*Fragaria* \times *Ananassa* cv. Elsanta), *Plant Cell Tiss Org Cult.* **1996**, 45, 25–29.

¹¹² Roscher R., Herderich, Steffen JP., Schreier P. and Schwab W. 2,5-dimethyl-4-hydroxy-(2H)-furanone 6'-O-malonyl- β -D-glucopiranoside in strawberry fruits, *Phytochemistry.* **1996**, 43, 155–159.

¹¹³ Hauck, T.; Brühlmann, F.; Schwab, W.; Bru, F. Formation of *Zygosaccharomyces Rouxii*: Identification of an Intermediate Formation of 4-Hydroxy-2,5-Dimethyl-3[2H]-Furanone by *Zygosaccharomyces Rouxii*: Identification of an Intermediate. **2003**, 69 (7), 3911–3918.

¹¹⁴ Hecquet, L.; Sancelme, M.; Bolte, J.; Demuynck, C. Biosynthesis of 4-Hydroxy-2,5-Dimethyl-3(2H)-Furanone by *Zygosaccharomyces Rouxii*. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, 44 (5), 1357–1360.

involucrados, donde *Z. rouxii* aporta el olor a caramelo que es el corazón de cualquier salsa de soya. La salsa de soya se inicia con la producción de soya mohosa.

El hongo *Aspergillus oryzae* (conocido como koji) crece en los frijoles^{115,116} y enzimáticamente descompone los componentes de la soya. Se agrega una solución de salmuera a los granos enmohecidos para crear un puré de moromi y se procede a la fermentación por bacterias de ácido láctico. Una vez que el pH disminuye por las bacterias del ácido láctico, florece *Zygosaccharomyces rouxii*. A medida que se somete a la fermentación alcohólica, esta levadura también produce productos químicos que percibimos como los sabores esenciales de la salsa de soya. Después de varios meses de envejecimiento, se presiona el moromi para obtener la salsa de soya líquida.

En productos crudos naturales, la vía de formación del HDMF es desconocida. En las frutas, se ha identificado un glucósido del saborizante.¹¹⁷ Parece probable que una vía biogénica esté involucrada en su formación. Hasta el momento, no se ha demostrado que el HDMF pueda ser biosintetizado por microorganismos. Este problema es de obvia importancia; ya que el HDMF sintético se utiliza en gran medida como aditivo en las industrias alimentarias, y su producción por fermentación proporcionaría un compuesto natural que sería de gran interés económico.

A inicios de los años 90, Sasaki¹¹⁸ y otros estudiaron la formación de un homólogo de HDMF, el 4-hidroxi-2-etil-3(2*H*)-furanona (HEMF) y concluyeron que la D-sedoheptulosa 7-fosfato es el precursor de la HEMF. Se considera que el HDMF podría ser producido por el mismo microorganismo a partir de unidades de azúcares de seis carbonos.

En sus resultados, en primer lugar probaron la influencia de algunos posibles precursores en formación de HDMF y de HEMF en medio de cultivo caldo *Z. rouxii* y en segundo lugar

¹¹⁵ Guía microbio: *Zygosaccharomyces rouxii* - MicrobialFoods.org <http://microbialfoods.org/microbe-guide-zygosaccharomyces-rouxii/> (accessed Apr 12, 2018).

¹¹⁶ Microbewiki:<https://microbewiki.kenyon.edu/index>. (accessed Apr 12, 2018).

¹¹⁷ Mayerl, F.; Na[^]f, R.; Thomas, A. F. 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2*H*)-furanone glucoside isolation from strawberries and synthesis. *Phytochemistry*. **1989**, *28*, 631-633.

¹¹⁸ Sasaki, M.; Numonura, N.; Matsuda, T. Biosynthesis of 4-hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2*H*)-furanone by yeasts. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39*, 934-938.

optimizaron las condiciones de producción de HDMF usando dos medios de fermentación:

- 1) Un cultivo empleando la salsa de soya para *Zygosaccharomyces rouxii* en medio base de Koji (Koji-Based Medium)
- 2) Un cultivo comúnmente empleado para levaduras, levadura/peptona/dextrosa (Yeast/Peptone/Dextrose, YPD).

AL agregar glucosa al 5% en peso volumen y NaCl al 17% en peso volumen, en todas las preparaciones, se detecto presencia de HDMF y HEMF por HPLC.

9.3. Condiciones de producción del HDMF

Los resultados en la Tabla 20 muestran el aumento de HDMF y HEMF con diferentes azúcares como precursores. No se presentó HDMF en el medio de koji (control 1), y una cantidad de 2 ppm se formó en el proceso de esterilización (control 2), esto es debido a la reacción de Maillard. Esta cantidad no incrementa durante el cultivo con *Z. rouxii* si no se agrega el precursor (control 3). También verificaron que no se formó HDMF en presencia de azúcares precursores sin levadura, en las condiciones de cultivo: con medio de base de koji o con medio YPD, con glucosa al 5%, a pH 4.8 en incubación por 22 días con medio base de koji o por 16 días con medio YPD sin levadura (control 4).

El HDMF no se formó a partir de D-glucosa (control 3) o D-fructosa. Cuando se introdujo la 6-desoxi-L-manosa (6-desoxialdosa), la producción de HDMF aumentó a 5 ppm. El aumento fue más significativo con 6-desoxihexulosa (18 ppm), que era una mezcla de 6-desoxi-L-sorbosa y 6-desoxi-D-fructosa obtenida quimioenzimáticamente.¹¹⁹

¹¹⁹ Hecquet, L.; Bolte, J.; Demuynck, C. Chemoenzymatic synthesis of 6-deoxy-D-fructose and 6-deoxy-L-sorbose using transketolase. *Tetrahedron*. **1994**, *50*, 8677-8684.

Tabla 20. Cantidad de HDMF y HEMF con diferentes azúcares como precursores ^{a,120}

| Azúcar precursor | HDMF (ppm) | | HEMF (ppm) |
|---|-----------------------|-------------------------|-----------------------|
| | Condiciones aeróbicas | Condiciones anaeróbicas | Condiciones aeróbicas |
| control 1: koji por 3 días a 30° C | 0 | --- | --- |
| control 2: koji después de esterilizar | 1.8 | --- | --- |
| control 3 : <i>Z. rouxii</i> sin azúcares precursores | 1.6-1.8 | 1.6 | --- |
| control 4: Azúcares precursores sin <i>Z. rouxii</i> | 1.8 | 1.6 | 1.5 |
| D-fructosa | 5% | 1.8 | --- |
| 6-desoxi-L-manosa | 5% | 5.0 | --- |
| 6-desoxihexulosa | 5% | 18.0 | --- |
| D-ribosa 5-fosfato, sal de sodio y D-xilulosa 5-fosfato, sal de bario | 5% | 2.0 | --- |
| D-glucosa 6-fosfato, sal de sodio | 5% | 1.8 | --- |
| D-fructosa 6-fosfato, sal de sodio | 5% | 3.8 | 1.8 |
| D-fructosa 1-fosfato, sal de sodio | 5% | 1.9 | 1.6 |
| D-fructosa 1,6-bisfosfato , sal de sodio | 5% | 52.4 | 18.3 |
| | | | 6 |

^a Medio base de Koji; cultivo inicial 10 días; cultivo por 12 días. Se añadieron a todos los cultivos glucosa (5%) y NaCl (17%).

Los azúcares monofosfatados (D-glucosa 6-fosfato, D-fructosa 1-fosfato y D-fructosa 6-fosfato) formaron pequeñas cantidades de HDMF y HEMF (2-4.2 ppm), mientras que el azúcar bifosfato analizado, D-fructosa 1, 6-bisfosfato, producido 52 ppm. También incubaron cultivos en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, y los resultados mostraron que con D-fructosa 1,6-difosfato, la producción de HDMF fue 3 veces mayor en condiciones aeróbicas.

¹²⁰ Hecquet, L.; Sancelme, M.; Bolte, J.; Demuynck, C. Biosynthesis of 4-Hydroxy-2,5-Dimethyl-3(2H)-Furanone by *Zygosaccharomyces Rouxii*. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, 44 (5), 1357–1360.

9.4 Estudio de las condiciones óptimas de la formación de HDMF. Influencia de la concentración de D-fructosa 1,6-difosfato.

Se encontró que la producción de HDMF aumenta en proporción a la concentración del D-fructosa 1,6-difosfato agregado hasta 10% (p/v). Más allá de este nivel, la producción de HDMF disminuyó y fue fuertemente inhibida por un 20% de D-fructosa 1,6-difosfato (Figura 6).

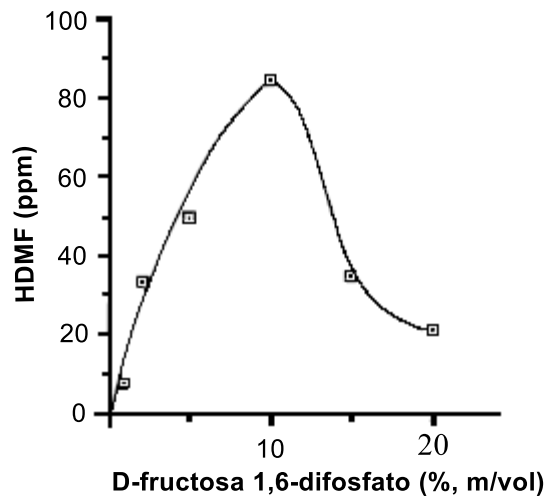


Figura 6. Influencia de la concentración de D-fructosa 1,6-difosfato en la producción de HDMF. Levadura *Z. rouxii* cultivada en base Koji; cultivo inicial de 10 días; cultivo a 12 días; condiciones aeróbicas.

9.5 Influencia de los tiempos de cultivo.

Este estudio se llevó a cabo con dos medios de cultivo: medio a base de koji y medio de levadura/peptona/dextrosa (YPD). La biomasa (2×10^8 células por mililitro de medio de cultivo) fue la misma para los dos medios. Con medio basado de koji [Figura 7 (A)], la producción de HDMF aumentó entre los días 1 y 11 (110 ppm) durante la fase de crecimiento. A continuación, se observó una disminución lenta. Con el medio YPD [Figura 7 (B)], los resultados fueron prácticamente los mismos. La cantidad de HDMF también fue óptima después de 11 días (96 ppm), pero con este medio, HDMF se produjo durante la fase de crecimiento y el comienzo de la fase estacionaria.

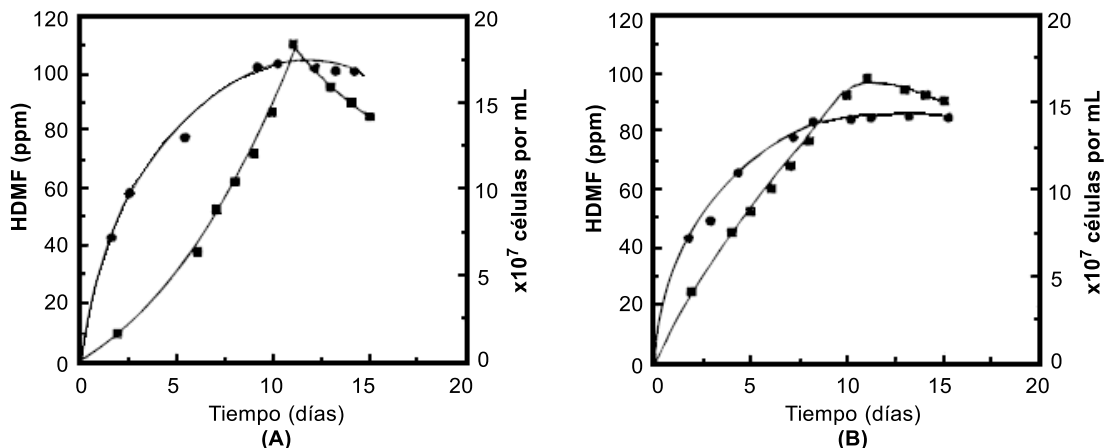


Figura 7. (A) Influencia del tiempo de cultivo en la producción de HDMF: (●) crecimiento de *Z. rouxii* y (■) Producción de HDMF. Cultivo de *Z. rouxii* con medio base de Koji; cultivo de 10 días; 12 días de cultivo; condiciones aeróbicas. (B) Influencia del tiempo de cultivo en la producción de HDMF: (●) Crecimiento de *Z. rouxii* y (■) Producción de HDMF. Cultivo de *Z. rouxii* con medio YPD; cultivo inicial de 10 días; condiciones aeróbicas.

9.6 Estudio de producción de HDMF con células en reposo *Zygosaccharomyces rouxii*.

Las células en reposo (cultivos hechos con medio YPD) se incubaron con D-fructosa 1,6-difosfato (10%). La Figura 8 muestra que la producción de HDMF aumentó hasta el día 6, disminuyó hasta el día 11 y luego se niveló. No se detectó en los controles donde se omitió D-fructosa 1,6-bisfosfato. En estas condiciones, el valor de HDMF fue menor que el valor obtenido con las células en crecimiento. En las células en reposo, los cofactores necesarios para la actividad enzimática no se regeneraron y se detuvo la biosíntesis.

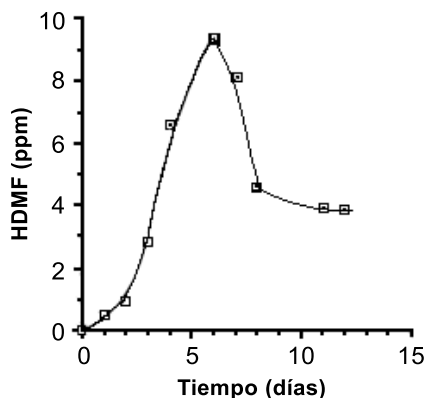


Figura 8. Producción de HDMF por células en reposo.

Este estudio demuestra que el HDMF es un metabolito secundario de *Zygosaccharomyces rouxii* que se produce cuando el medio se complementa con cetonas de seis carbonos. Las condiciones aeróbicas son más favorables para su producción que las condiciones anaeróbicas. Dos de los compuestos probados, 6-desoxicetosa y fructosa 1,6-difosfato, pueden actuar como precursores o inductores de la biosíntesis (este último, un intermedio en la glucólisis, está presente en las células en fermentación, pero a concentraciones muy bajas). La inhibición del 20% de fructosa 1,6-disfosfato podría deberse a la muy alta fuerza iónica del medio en estas condiciones. No se necesita ningún otro compuesto para la producción de HDMF. El medio de cultivo base llamado Koji, más utilizado en este y otros estudios, y dio casi los mismos resultados que el medio de Levadura Peptona Dextrosa (Yeast/Peptone/Dextrose, YPD).¹²⁰

La concentración de HDMF en caldo puede alcanzar 110 ppm. Esto es apreciable, aunque probablemente sea insuficiente para aplicaciones industriales. A esta concentración, la pérdida de HDMF, que es un compuesto volátil e inestable, puede volverse importante.

Los resultados se pueden comparar con el estudio de Sasaki,¹²¹ que demuestra que la sedoheptulosa 1-fosfato o los precursores de esta cetosa por el ciclo de la pentosa fosfato son los precursores del 4-hidroxi-2-etil-5-metil-3(2*H*)-furanona (HEMF). El HDMF puede producirse por la misma vía biosintética a partir de la fructosa 1,6-difosfato. En este caso, 6-desoxifruktosa o 6-desoxisorbosa podrían ser intermedios. Esta posibilidad requiere un estudio más detallado con los precursores marcados.

Estos hallazgos demuestran que HDMF es producido por *Z. rouxii* cultivado aeróbicamente con D-fructosa 1,6-bisfosfato (10%) como precursor. También se demostró que el medio basado en koji utilizado en un estudio de biosíntesis HEMF por Sasaki puede ser reemplazado por el medio de Levadura Peptona Dextrosa (Yeast/Peptone/Dextrose, YPD) con los mismos resultados. La ventaja es que este medio es más fácil de preparar y de escalar más tarde.

¹²¹ Sasaki, M.; Numonura, N.; Matsuda, T. Biosynthesis of 4-hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2*H*)-furanone by yeasts. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, 39, 934-938.

Bajo estas condiciones se obtuvo la mayor cantidad de HDMF (100 ppm; 100 mg/L). La producción de HDMF por este método microbiológico fue baja, con un nivel bastante alto de D-fructosa 1,6-difosfato, pero la cantidad de HDMF fue 50 veces mayor que la obtenida sin azúcar precursora y 10 veces mayor que la detectada en shoyu.¹²² La reproducibilidad de estos experimentos ha demostrado que D-fructosa 1,6-difosfato fue un efectivo precursor para HDMF.

9.7 Formación de 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona por *Zygosaccharomyces rouxii*: Identificación de un Intermediario

Se ha estudiado la formación de HDMF a partir de D-fructosa-1,6-difosfato por la levadura *Zygosaccharomyces rouxii*, realizando la identificación de productos intermediarios presentes en el medio de cultivo.¹²³

De esta manera, la adición de *o*-fenilendiamina, un reactivo de atrapamiento para α -dicarbonilos, al medio de cultivo y el posterior análisis por cromatografía líquida de alta presión (HPLC), con detección de matriz de diodos reveló la formación de tres derivados de quinoxalina derivados de D-fructosa-1,6-disfosfato bajo las condiciones de crecimiento aplicadas (30°C, pH 4 a 5). El aislamiento y la caracterización de estos compuestos mediante espectrometría de masas en tándem y espectroscopía de resonancia magnética nuclear condujeron a la identificación del ácido monofosfórico-(2,3,4-trihidroxi-4-quinoxalin-2-il-butyl) éster (**37**), ácido monofosfórico-[2,3-dihidroxi-3-(3-metilquinoxalin-2-il)-propil] éster (**38**), y ácido fosfórico mono-[2-hidroxi-3-(3-metil-quinoxalin-2-il)-propil] éster (**39**), ver Figura 9. **37** y **38** se formaron independientemente de células *Z. rouxii*, mientras que Q3 se detectó solo en sistemas de incubación que contenían la levadura.

¹²² Osaki, K. Y.; Okamoto, T.; Akao, S.; Nagata, S.; Takamatsu, H. Fermentation of soy sauce with immobilized whole cells. *J. Food Sci.* **1985**, 50, 1289-1292.

¹²³ Hauck, T.; Brühlmann, F.; Schwab, W.; Bru, F. Formation of *Zygosaccharomyces Rouxii*: Identification of an Intermediate Formation of 4-Hydroxy-2,5-Dimethyl-3[2H]-Furanone by *Zygosaccharomyces Rouxii*: Identification of an Intermediate. **2003**, 69 (7), 3911–3918.

La identificación de **38** demostró por primera vez la formación química de 1-desoxi-2,3-hexodiulosa-6-fosfato en el medio de cultivo, un intermedio generalmente esperado pero nunca identificado en la ruta de formación de HDMF. Dado que HDMF se detectó solo en presencia de células *Z. rouxii*, se supusieron pasos enzimáticos adicionales. La incubación de extractos proteicos periplásmicos y citosólicos obtenidos de células de levadura con D-fructosa-1,6-difosfato condujo a la formación de HDMF, lo que implica la presencia de las enzimas requeridas en ambos extractos.

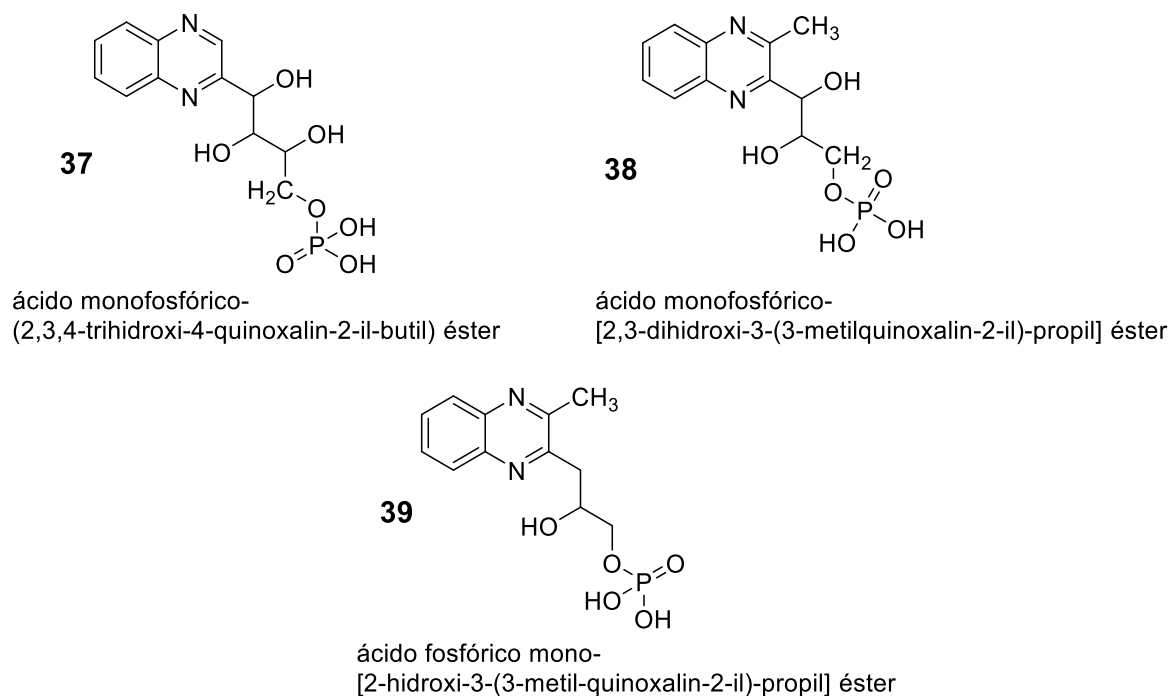


Figura 9. Derivados de Quinoxalina derivados de D-fructosa-1,6-difosfato.

Bioformación de furanonas catalizadas durante la fermentación con la levadura *Z. rouxii*. D-xilulosa-5-fosfato, D-ribulosa-5-fosfato, y D-sedoheptulosa-7-fosfato se determinaron como posibles precursores de homofuraneol y norfuraneol. Se ha demostrado¹²⁴ que HDMF es producido por *Z. rouxii* a partir de D-fructosa-1,6-difosfato (FBP), y se confirmó¹²⁵ a la FBP como el precursor más efectivo en las frutas de fresas maduras.

¹²⁴ Hecquet, L., M. Sancelme, J. Bolte, and C. Demuyne. Biosynthesis of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3[2H]-furanone by *Zygosaccharomyces rouxii*. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, 44:1357–1360.

¹²⁵ Roscher, R., G. Bringmann, P. Schreier, and W. Schwab. Radiotracer studies on the formation of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3[2H]-furanone in detached ripening strawberry fruits. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46:1488–1493.

Z. rouxii produjo aproximadamente 80 ppm de HDMF después de 11 días de incubación en soluciones de nutrientes que contenían 10% de FBP y 5% de D-glucosa como fuente de carbono. La adición de $[1-^{13}\text{C}]$ FBP al medio nutriente reveló que solo FBP suministrado exógenamente se transformó en HDMF. Se supuso que al menos una etapa metabólica tiene lugar en la pared celular o membrana de la levadura. Sin embargo, la biosíntesis en plantas y microorganismos aún no está clara, ya que hasta ahora no se ha identificado ninguna enzima o intermediario involucrado en la formación de HDMF.

Recientemente, se informó sobre la formación química de HDMF a partir de FBP en presencia de NAD(P)H. Los autores proponen el compuesto dicarbonilo 1-desoxi-2,3-hexodiulosa-6-fosfato como posible intermedio que posteriormente se reduce por el NAD(P)H al producto final, HDMF. Se anticipa una ruta biosintética similar en plantas y microorganismos. El objetivo del estudio fue obtener información detallada sobre la formación de HDMF a partir de FBP por la levadura *Z. rouxii*. y se identificaron posibles intermediarios, como α -dicarbonilos en el medio de cultivo. El empleo del reactivo atrapante α -dicarbonilo el *o*-fenilendiamina reveló tres estructuras α -dicarbonilo altamente reactivas derivadas de FBP en el medio nutriente. La elucidación de la estructura de los correspondientes derivados de quinoxalina demostró la formación química del intermedio 1-deoxi-2,3-hexodiulosa-6-fosfato, frecuentemente postulado pero nunca identificado, y la incubación de extractos proteicos periplásmicos y citosólicos obtenidos de *Z. rouxii* confirmó la existencia de oxidorreductasas implicadas en la bioformación de HDMF.

9.7.1 Detección de compuestos de α -dicarbonilo derivados de FBP

Se prepararon tres soluciones nutritivas de acuerdo con el método de Hecquet,¹²⁴ a dos medios se les añadió FBP, y uno de los medios que contenían fosfohexosa se inoculó con células de *Z. rouxii*. Después de 7 días de incubación, cada una de las tres soluciones se complementó con *o*-fenilendiamina, un reactivo de captura, ampliamente utilizado para compuestos α -dicarbonilos altamente reactivos.

Después de incubar durante toda la noche, las células de levadura se eliminaron por centrifugación, y el sobrenadante así como las soluciones incubadas sin células de levadura, se analizaron mediante HPLC con detección de matriz de diodos (diode array detection - DAD). En la muestra que contiene células de levadura y FBP se detectaron tres compuestos **37**, **38** y **39** (Figura 9), donde se muestra el espectro UV de quinoxalina característico con dos máximos de absorción a 238 y 318 nm, además de HDMF. **37** y **38**, también estuvieron presentes en la muestra suplementada con FBP pero desprovista de células de levadura. Dado que ninguno de estos compuestos se detectó en la solución nutritiva sin FBP y células de levadura (Figura 10), se dedujo que **37** y **38** se forman mediante la reacción de *o*-fenilendiamina con compuestos formados no enzimáticamente a partir de FBP en condiciones moderadas. Sin embargo, la formación de **39** y HDMF se observó solo en presencia de FBP y células de levadura, lo que implica una participación decisiva de las células de levadura. Como los otros compuestos mostrados en la Figura 10, no mostraban los espectros UV característicos de quinoxalina o furanona, no se examinaron más a fondo. La extracción en fase sólida en XAD-2 según el método de Beuerle¹²⁶ y el posterior análisis de los extractos de éter dietílico, así como de los extractos de metanol por HPLC de fase inversa con detección UV a 318 nm, reveló que **37**, **38** y **39** se eluyen exclusivamente con metanol, mientras que HDMF se detectó solo en el extracto de éter dietílico. Después de la purificación adicional en material RP18, los iones pseudomoleculares a m/z 331 $[M + H]^+$ para **37**, m/z 315 $[M + H]^+$ para **38**, y m/z 299 $[M + H]^+$ para **39** son determinados por análisis de HPLC-ESI-MS. Los espectros de iones producto de todos los compuestos en estudio, tal como se obtuvieron mediante disociación inducida por colisión de baja energía, estaban dominados por la pérdida de 98 UMA, presumiblemente debido a la extracción de ácido fosfórico. Por lo tanto, los datos combinados de UV, MS y MS/MS indicaron la formación de quinoxalinas fosforiladas mediante la reacción de *o*-fenilendiamina y compuestos de α -dicarbonilo fosforilados derivados de FBP, bajo las condiciones aplicadas. Debido a sus diferentes masas moleculares, parecía que los tres compuestos diferían solo en su estado de hidroxilación.

¹²⁶ Beuerle, T., P. Schreier, and W. Schwab. (*R*)-3-Hydroxy-5(*Z*)-octenyl- β -D-glucopyranoside from *Malus sylvestris* fruits. *Nat. Prod. Lett.* **1997**, 10:119–124.

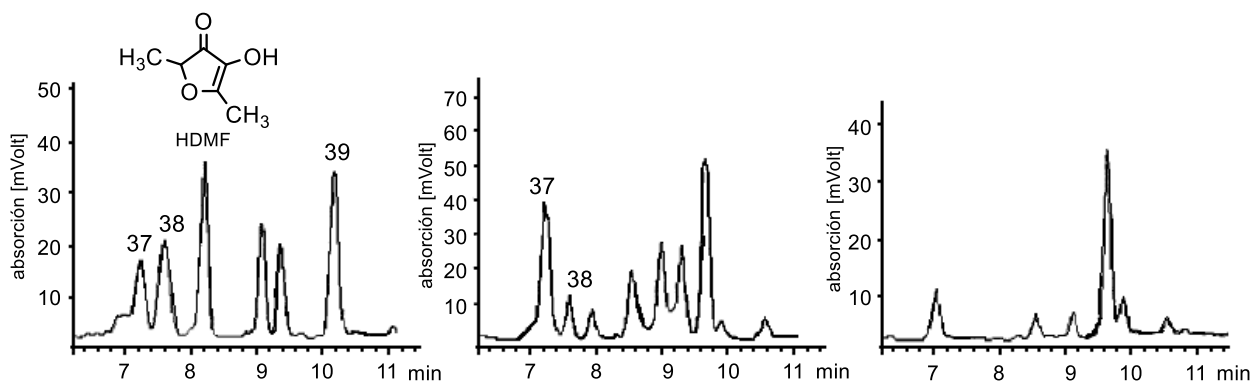


Figura 10. Análisis HPLC-DAD de un extracto obtenido por incubación de medio YPD suplementado con FBP, células de *Z. rouxii* y con o-fenilendiamina durante la noche (izquierda), de medio YPD suplementado con FBP con o-fenilendiamina durante la noche (medio), y de medio YPD con o-fenilendiamina durante la noche (derecha). El efluente de la columna se controló a 318 nm. Los picos no etiquetados no mostraron máximos de absorción a 238 y 318 nm.

9.7.2 Incubación con extractos de proteínas obtenidos de *Zygosaccharomyces rouxii*.

HDMF se formó solo en medios que contenían FBP y células de levadura, pero el precursor 1-desoxi-2,3-hexodulosa-6-fosfato (**41**) (Figura 12), se formó independientemente de las células de levadura. Como se requiere una reducción para transformar el intermedio en HDMF, se concluyó que hubo una reducción enzimática adicional catalizada por una cetoreductasa de levadura inespecífica. Para localizar esta actividad de reductasa, se prepararon extractos de proteína periplásmica mediante digestión con zimoliasa (enzima lítica de levadura, liticasa) de la pared celular de acuerdo con el método de Yoda,¹²⁷ y los extractos de proteína citosólica se prepararon agitando en vórtex células *Z. rouxii* con perlas de vidrio seguido de centrifugación a alta velocidad. Ambos extractos se dializaron para eliminar los componentes de baja masa molecular (<12 kDa), y posteriormente se incubaron a 30 °C durante 24 h con un exceso de FBP para asegurar la formación in situ del precursor requerido. Después de la extracción en fase sólida en cartuchos RP18, las muestras se analizaron por HPLC con detección UV a 285 nm.

¹²⁷ Yoda, K., J.-H. Ko, T. Nagamatsu, Y. Lin, C. Kaibara, T. Kawada, N. Tomishige, H. Hashimoto, Y. Noda, and M. Yamasaki. Molecular characterization of a novel yeast cell-wall acid phosphatase cloned from *Kluyveromyces marxianus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2000**, 64:142–148.

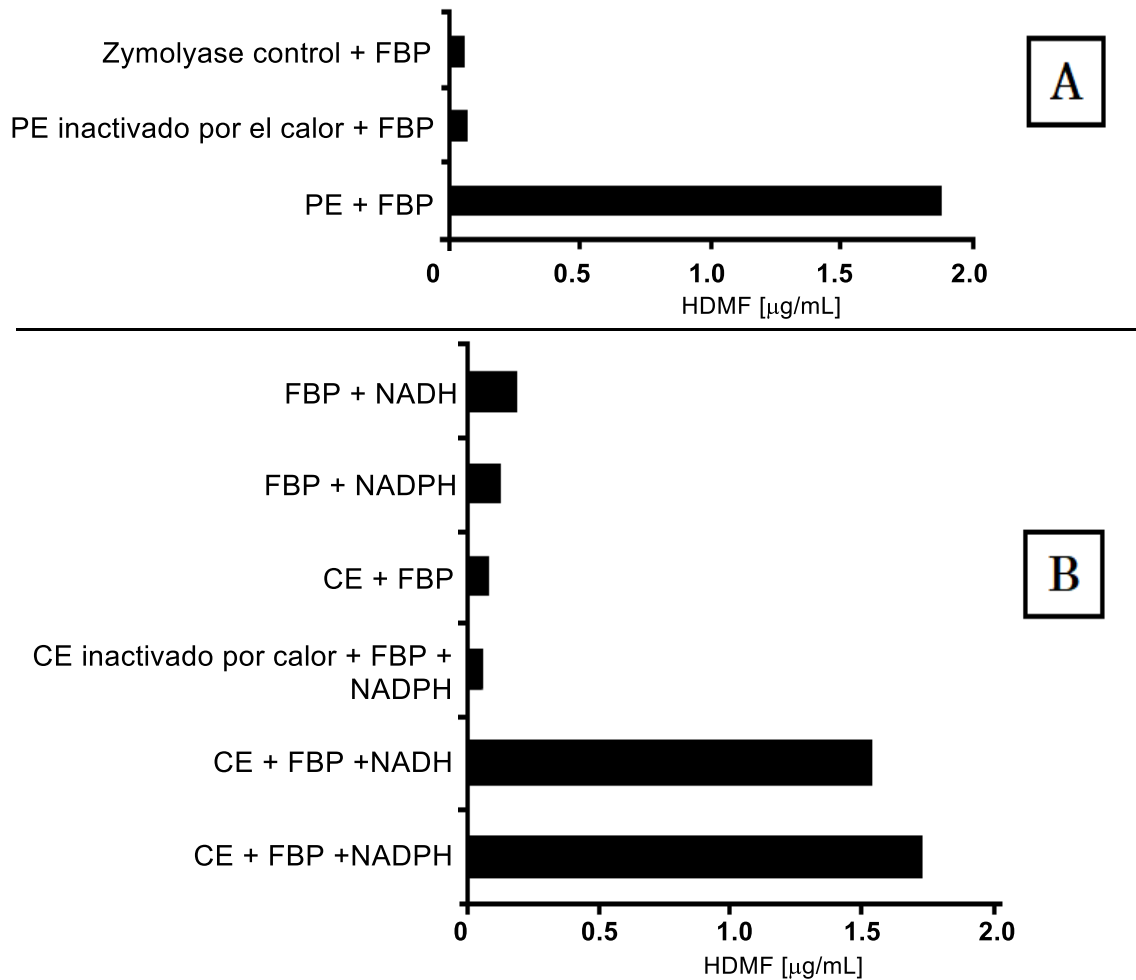


Figura 11. Formación de HDMF por extractos periplásmicos (A) y extractos citosólicos (B) obtenidos de *Z. rouxii*. (PE, extracto periplásmico, CE, extracto citosólico). La formación de HDMF en extractos periplásmicos es independiente de la adición de NAD(P)H. Alícuotas de dos mililitros de los extractos de proteína se suplementaron con 50 mg de sustrato (FBP) y 1 mg de NAD(P)H. Las soluciones se mantuvieron con agitación suave a 30°C durante 24 h. En el caso de los extractos periplásmicos, se omitió NAD(P)H.

En la Figura 11 (A) se muestran las cantidades de HDMF obtenidas de las incubaciones de un extracto periplásmico activo y un extracto periplásmico inactivado por calor y de una incubación de control que incluye la solución de zimoliasa. El HDMF se formó exclusivamente en la muestra activa sin requerir la adición de agentes reductores tales como NADH o NADPH. Sin embargo, no aumentó el rendimiento de HDMF.

Para una caracterización adicional de la formación de HDMF en el extracto periplásmico, se realizó un experimento de curso temporal que revela la liberación de la actividad enzimática formadora de HDMF durante la digestión de la pared celular. Se retiraron alícuotas periódicamente de una digestión con zimoliasa y se trataron como se describió anteriormente. La actividad enzimática formadora de HDMF se liberó gradualmente de las células y alcanzó un nivel máximo. En paralelo, la eficacia de la digestión de la pared celular se controló midiendo la absorbancia a 800 nm. En el caso de los extractos citosólicos, se detectaron cantidades significativas de HDMF solo después de la adición de NADPH o NADH y FBP [Figura 11 (B)]. Cuando el extracto de enzima se inactivó mediante tratamiento térmico antes de la incubación o cuando se omitió el cofactor, no se observó formación de HDMF. Debido a la formación química recientemente registrada de HDMF a partir de FBP en presencia de NAD,¹²⁸ las mezclas experimentales de control que incluían el tampón apropiado en lugar del extracto se trataron de manera similar. La formación de HDMF en las incubaciones de control estaba muy por debajo de la formación en los extractos activos [(Figura 11 (B))].

De acuerdo a los autores^{129,130,131,132} se demostró por primera vez la formación de compuestos α -dicarbonilos altamente reactivos a partir de FBP. Esta transformación se produjo en condiciones de crecimiento moderadas en el medio de cultivo *Z. rouxii* (30°C, pH 4 a 5). Las estructuras de 2-hexosulosa-6-fosfato (**40**), 1-desoxi-2,3-hexodiulosa-6-fosfato (**41**), y 1,4-didexoxi-2,3-hexodiulosa-6-fosfato (**42**) se dedujeron de las quinoxalinas **37**, **38** y **39**. La formación de α -dicarbonilos a partir de carbohidratos se ha estudiado intensamente mediante el uso de reactivos de captura, especialmente derivados de o-fenilendiamina y aminoguanidinas, pero los fosfatos de hidratos de carbono rara vez se han utilizado como precursores, ver Figura 12.

¹²⁸ Hauck, T., C. Landmann, T. Raab, F. Bruhlmann, and W. Schwab. Chemical formation of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3[2H]-furanone from D-fructose 1,6-diphosphate. *Carbohydr. Res.* **2002**, 337:1185–1191.

¹²⁹ Hirsch, J., V. V. Mossine, and M. S. Feather. The detection of some dicarbonyl intermediates arising from the degradation of Amadori compounds (the Maillard reaction). *Carbohydr. Res.* **1995**, 273:171–177.

¹³⁰ Glomb, M. A., and R. Tschirnich. Detection of α -dicarbonyl compounds in Maillard reaction systems and *in vivo*. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49:5543–5550.

¹³¹ Hofmann, T. Characterization of precursors and elucidation of the reaction pathway leading to a novel colored 2H,7H,8aH-pyrano[2,3-b]pyran-3-one from pentoses by quantitative studies and application of ¹³C-labeling experiments. *Carbohydr. Res.* **1998**, 313:215–224.

¹³² Nevidek, W., F. Ledl, and W. Fischer. Detection of 5-hydroxymethyl-2-methyl-3(2H)-furanone and α -dicarbonyl compounds in reaction mixtures of hexoses and pentoses with different amines. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1992**, 194:222–228.

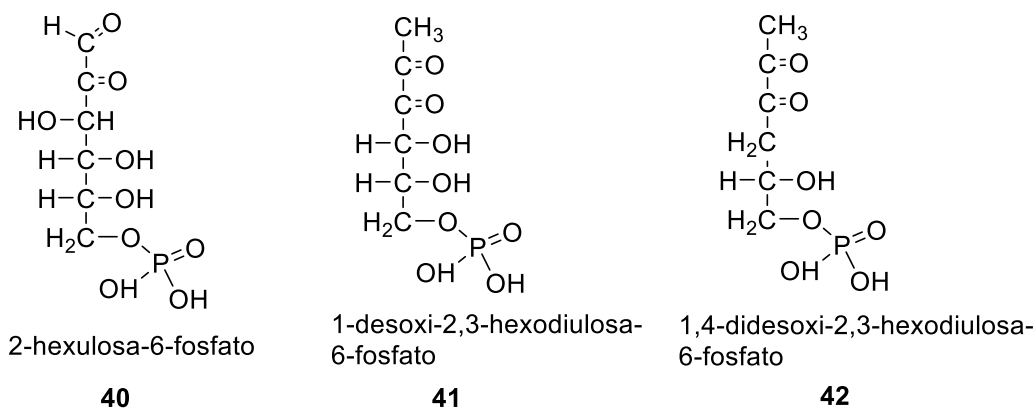


Figura 12. Estructuras α -dicarbonilos **40**, **41** y **42** presentes en las soluciones de nutrientes derivados de sus quinoxalinas **37**, **38** y **39**, respectivamente, ver Figura 9.

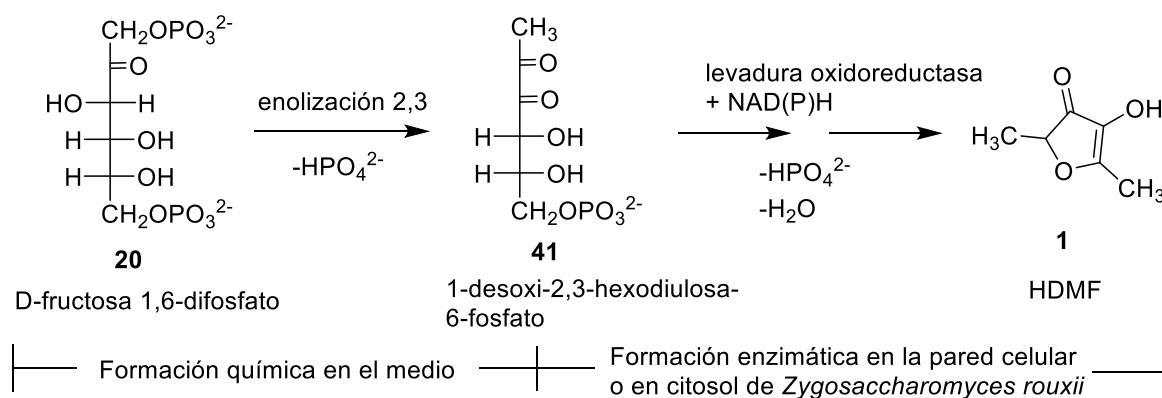
Los compuestos α -dicarbonilo formados químicamente o mediante biocatálisis de levadura representan posibles precursores de HDMF. Recientemente, se demostró la formación química de HDMF en soluciones compuestas de FBP y agentes reductores, y **41** se postuló como un precursor de HDMF formado a partir de FBP. Dado que se requiere una gran cantidad de FBP en el medio nutriente de *Z. rouxii* (hasta 8%) para obtener una concentración razonable de HDMF, se esperaba una transformación química en lugar de una biotransformación como el paso inicial de la formación de HDMF. En general, se supuso una eliminación de fosfato mediante enolización 2,3, pero este mecanismo de formación de **41** nunca se confirmó. Sin embargo, en una secuencia de reacción similar, el fosfato de dihidroxiacetona se transforma en metilglioxal y la D-ribulosa-1,5-difosfato forma la correspondiente 1-desoxipentosa fosforilada.

41 fue atrapado y caracterizado por primera vez como un derivado de quinoxalina. Los resultados indican que el primer paso de la formación de HDMF por la levadura *Z. rouxii* es la formación química de **41** en el medio de cultivo, ya que solo FBP suministrado exógenamente se transforma en HDMF, como se mostró por Dahlen,¹³³ y **41** se forma en el medio de cultivo independientemente de las levaduras.

¹³³ Dahlen, T., T. Hauck, M. Wein, and W. Schwab. 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone as a secondary metabolite from D-fructose 1,6-diphosphate metabolism by *Zygosaccharomyces rouxii*. *J. Biosci. Bioeng.* **2001**, 91: 352–358.

La formación de **41** podría ser el paso limitante en la bioformación de HDMF porque son necesarias cantidades muy grandes del fosfato de azúcar (hasta 8% en el medio de cultivo) para producir cantidades razonables de la molécula objetivo.

Se concluye que una combinación de reacciones químicas que conducen a la eliminación de al menos un grupo fosfato y una reducción enzimática, mediada por una oxidoreductasa de las células de levadura, es responsable de la formación de HDMF en los medios de cultivo (Esquema 6).



Esquema 6. Propuesta de bioformación de HDMF por *Z. rouxii*.

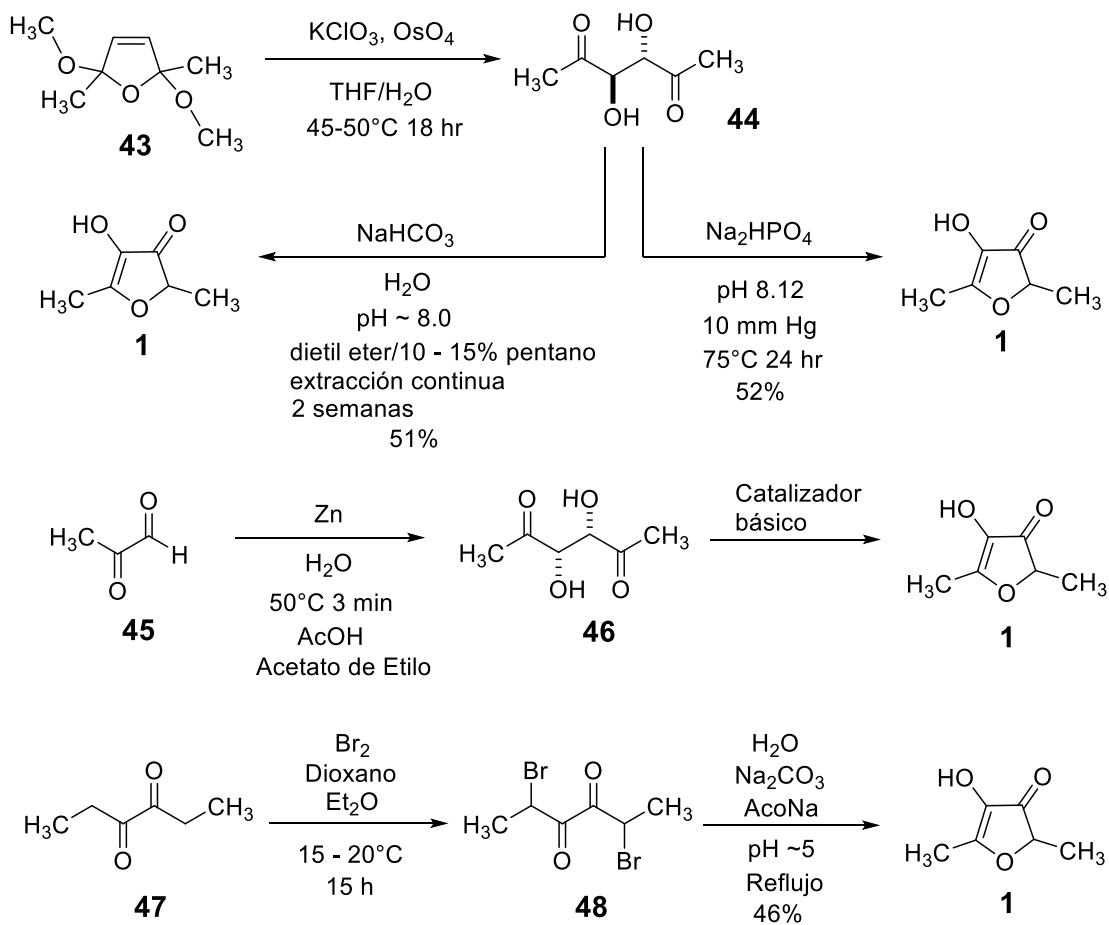
De hecho, se ha detectado la generación de HDMF en extractos de proteínas citosólicas y periplásmicas celulares. Por lo tanto, se asume la existencia de cetoreductasas no específicas en las células de levadura que participan en la formación de HDMF. Las reducciones mediadas por levaduras se han investigado intensamente. Tadashi¹³⁴ *et al.*, purificaron una carbonil reductasa de la levadura de panadería, exhibiendo alta enantioselectividad y amplia especificidad de sustrato. Por su parte Costello¹³⁵ caracterizó una cetoreductasa a partir de extractos de proteínas citosólicas obtenidas de *Z. rouxii*, capaces de reducir meticetonas, α -cetolactonas y dicetonas de manera efectiva y enantioselectiva.

¹³⁴ Tadashi, E., M. Hiroyuki, K. Toru, I. Tomomasa, M. Kentaro, U. Masanori, and S. Takashi.. High enantioselectivity and broad substrate specificity of a carbonyl reductase: toward a versatile biocatalyst. *J. Org. Chem.* **2001**. 66: 8682–8684.

¹³⁵ Costello, C. A., R. A. Payson, M. A. Menke, J. L. Larson, K. A. Brown, J. E. Tanner, R. E. Kaiser, C. L. Hershberger, and M. J. Zmijewski. Purification, characterization, cDNA cloning and expression of a novel ketoreductase from *Zygosaccharomyces rouxii*. *Eur. J. Biochem.* **2000**. 267:5493–5501.

10. Síntesis Química

El HDMF fue preparado accidentalmente por primera vez a mediados de los años 60s, sin especificar el rendimiento a partir de ramnosa y acetato de piperidina en solución de etanol caliente. A continuación, en el Esquema 7, se describe la síntesis del HDMF a partir de tres materias primas relativamente fáciles de obtener.¹³⁶



Esquema 7. Síntesis del HDMF a partir de tres reactivos relativamente fáciles de obtener: Las formas enólicas eritro y treo dihidroxi dicetonas **44** y **46** respectivamente y la conversión del hexano-3,4-diona **47**.

La oxidación (Esquema 7) de la materia prima el 2,5-dimetil-2,5-dimetoxi-2,5-dihidrofurano (**43**) con clorato de potasio en presencia de cantidades catalíticas de

¹³⁶ Buchi, G.; Demole, E.; Thomas, A. F. Syntheses of 2,5-Dimethyl-4-Hydroxy-2,3-Dihydrofuran-3-One (Furaneol), a Flavor Principle of Pineapple and Strawberry. *J. Org. Chem.* **1973**, 38 (1), 123–125.

tetraóxido de osmio en solución acuosa produce el 3,4-dihidroxihexano-2,5-diona (**44**) de configuración *eritro*, un intermediario principal que tratado en condiciones básicas con carbonato o fosfato de sodio se logra la ciclación para la obtención del HDMF (**1**) con rendimientos del 50%, mientras que cuando se trata la dihidroxi dicetona **44** en presencia de un catalizador ácido o por termólisis, no se logra la formación del HDMF (**1**).

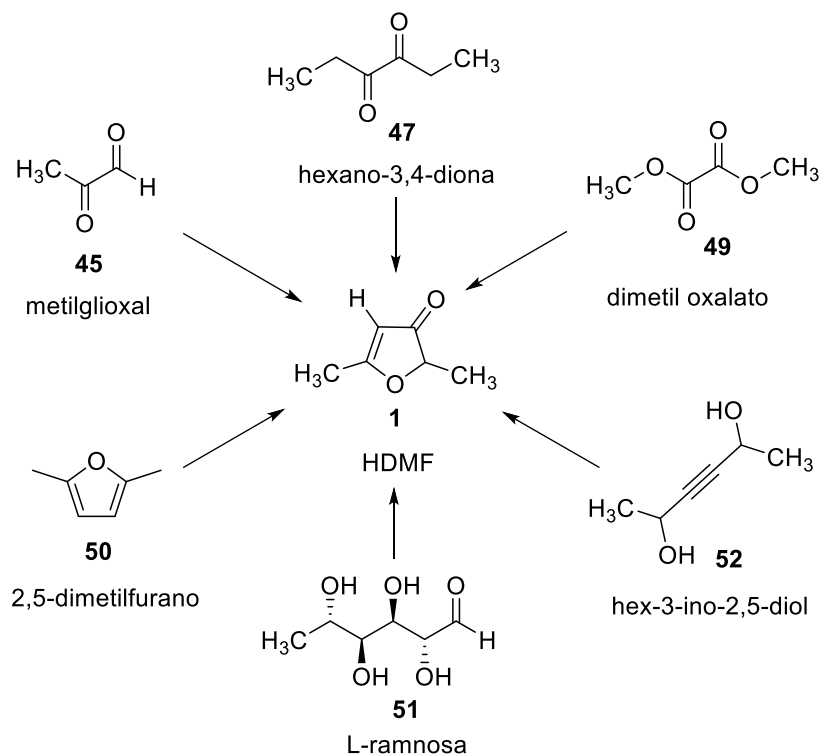
Como se muestra en el Esquema 7, la hidrodimerización del metilglioxal (**45**) en presencia de zinc en ácido acético acuoso a temperatura de 50°C, proporcionó el 3,4-dihidroxihexano-2,5-diona (**46**) en conformación *treo* que con un tratamiento en medio ligeramente básico, se obtiene el HDMF (**1**).

En una tercera síntesis, la bromación del hexano-3,4-diona (**47**) en el dibromuro simétrico **48** para su posterior ciclación al HDMF (**1**) bajo la acción del buffer: Na₂CO₃/AcoNa.

Los intentos de efectuar la ciclación con reactivos ácidos no conducen al HDMF (**1**), las condiciones básicas son más alentadores, lo que concluye que el carbonato ácido de sodio; así como el hidrogenofosfato disódico, son catalizadores útiles produciendo HDMF (**1**) con rendimientos del 50%.

10.1. Síntesis del HDMF a partir de ácido tartárico

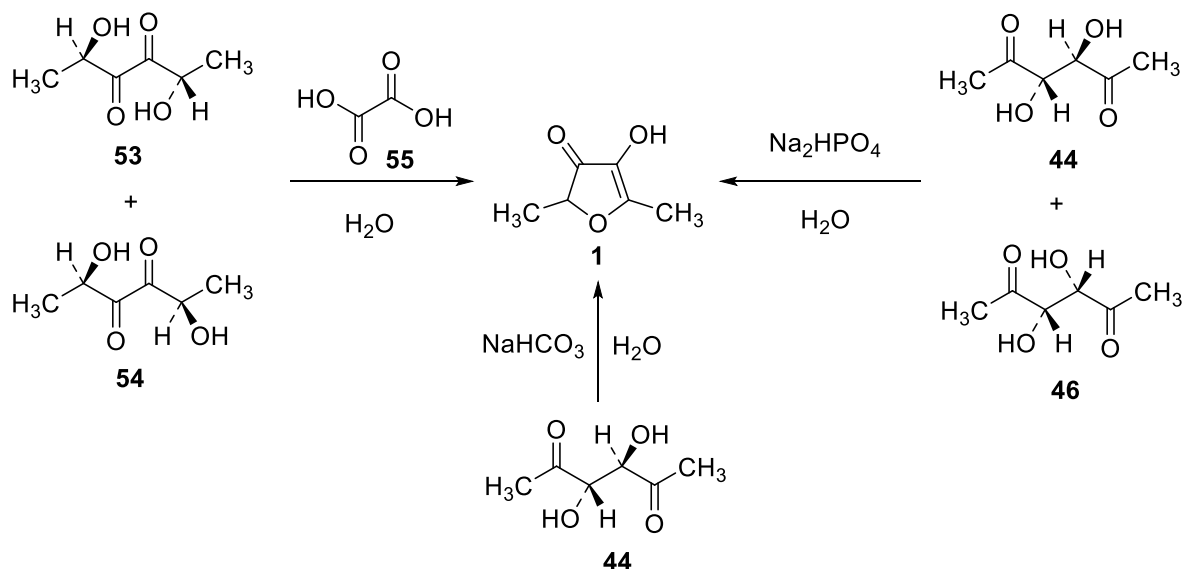
La síntesis del HDMF ha sido reportado¹³⁷ a partir de una amplia gama de materiales de partida, incluyendo: L-ramnosa, diglicolato de dimetilo, metilglioxal, 2,5-dimetilfurano, hexano-3,4-diona y hex-3-il-diol, trabajos de investigación que han derivado en el registro de varias patentes para la elaboración del HDMF a partir de diversas materias primas de fácil disponibilidad en el mercado (Esquema 8).



Esquema 8. Diferentes materias primas para la síntesis del HDMF que han derivado en el registro de varias patentes.

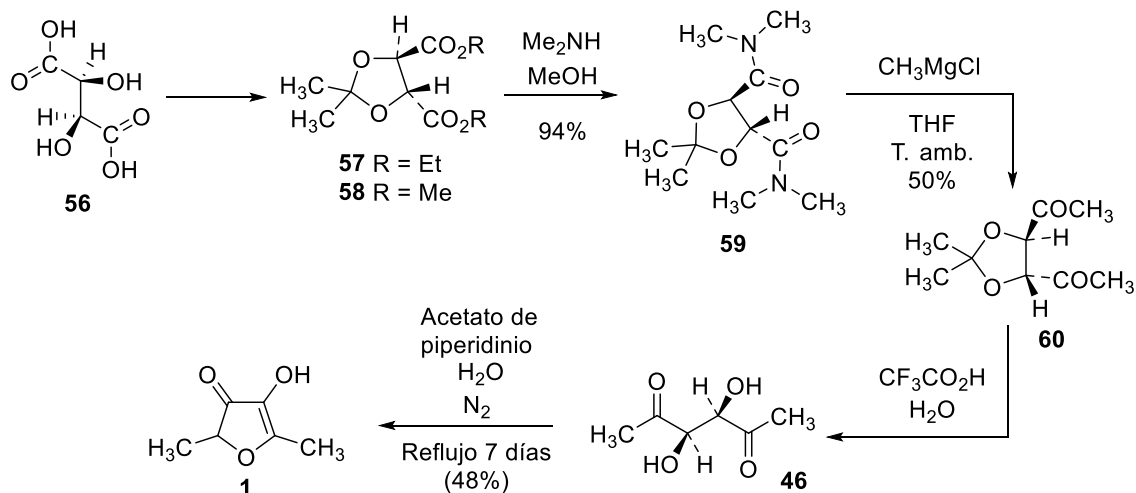
De los precursores sintéticos para la obtención del HDMF, generalmente es utilizada la ciclación de compuestos 2,5-dicarbonílicos de seis carbonos (Esquema 9). El tratamiento de una mezcla de *eritro*- y *treo*-2,5-dihidroxi-hexano-3,4-diona (**53**) y (**54**), respectivamente, con ácido oxálico en agua o el tratamiento de una mezcla de *eritro*- y *treo*-3,4-dihidroxi-hexano-2,5-diona (**44**) y (**46**), con fosfato disódico (Na_2HPO_4) en disolución acuosa, proporcionaron el HDMF (**1**) en rendimientos razonables. Así mismo; la ciclación de únicamente **44** para producir **1**, se logró bajo condiciones alcalinas suaves con bicarbonato de sodio (NaHCO_3) con agua como disolvente.¹³⁷

¹³⁷ Briggs, M. A.; Haines, A. H.; Jones, H. F. Synthesis of 4-Hydroxy-2,5-dimethylfuran-3(2H)-one (Furaneol) from (2*R*,3*R*)- Tartaric Acid. *J. Chem. Soc.* **1985**, *1*, 795-798.



Esquema 9. Síntesis reportada para la obtención de HDMF (**1**) por la ciclación de precursores de 6 carbonos oxigenados en posiciones 2,5.

De otra forma, se explica en el Esquema 10¹³⁷ la conversión del ácido (2*R*,3*R*) tartárico (**56**) a través de una secuencia de cinco pasos en HDMF (**1**) con un 18% de rendimiento global. El paso clave de la secuencia de reacciones implica la formación del (4*R*,5*R*)-4,5-diacetil-2,2-dimetil-1,3-dioxolano (**60**), el cual se obtuvo mediante la reacción del cloruro de metilmagnesio sobre la correspondiente diamida **59**. La obtención de la 3,4-dihidroxi-3,5-diona (**46**) (Esquema 10) se lleva a cabo mediante la acción del ácido trifluoroacético. La obtención del HDMF (**1**) es mediante la reacción de la 3,4-dihidroxi-3,5-diona (**46**) en presencia de acetato de piperidina en reflujo por 7 días. Aunque este enfoque sintético podría ser actualmente considerado poco práctico, ya que implica la destrucción de la quiralidad, el costo del ácido (2*R*,3*R*)-tartárico **56**, en relación con otros materiales de partida previamente usados por otros grupos de investigación, hace que este proceso sea atractivo.



Esquema 10. Síntesis reportada para la obtención de HDMF (**1**) por la vía de conversión del ácido (2*R*,3*R*)-tartárico (**56**) al (3*R*,4*R*)-3,4-dihidroxihexano-2,5-diona (**46**).

El tratamiento de **56** con un exceso de metil-litio pudiera lograr su conversión directa¹³⁸ en **46**. La reacción del 4,5-dicarboxilato de (4*R*,5*R*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolano dipotásico (preparado por saponificación del correspondiente éster dietílico¹³⁹ **57** con hidróxido potásico acuoso) con metil litio dio una mezcla compleja de productos en los que no se pudo detectar el derivado hexano-2,5-diona **46**. En el transcurso de este tipo de reacción existe la gran dificultad de controlar la interacción entre un éster con un reactivo organometálico para proporcionar una cetona con un rendimiento razonable¹⁴⁰ frente al uso directo de un éster adecuadamente protegido tal como el 2,2-dimetil-1,3-dioxolano de (4*R*,5*R*)-dimetilo-4,5-dicarboxilato (**58**)^{141,142} (Esquema 10).

¹³⁸ M. J. Jorgenson, Preparation of Ketones from the Reaction of Organolithium Reagents with carboxylic acids. *Org. React.*, Berkeley, California. **1970**, 18, 1.

¹³⁹ P. W. Feit. 1,4-Bismethanesulfonates of the Stereoisomeric Butanetetranols and Related Compounds. *J. Med. Chem.*, **1964**, 7, 14; J. A. Musich and H. Rapoport, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 100, 4865.

¹⁴⁰ Kharasch M. S and Reinmuth, O. 'Grignard Reactions of Non-metallic Substances' Prentice-Hall, Inc., N.Y., **1954**, 549-708, 846-908.

¹⁴¹ M. Carmack and C. J. Kelly, *J. Org. Chem.* **1968**, 33, 2171.

¹⁴² D. Seebach, H.-O. Kalinowski, B. Bastani, G. Crass, H. Daum, H. Dorr, N. P. DuPreez, V. Ehrig, W. Langer, C. Nussler, H.-A. Oei, and M. Schmidt, *Helv. Chim. Acta.* **1977**, 60, 301.

La necesidad de minimizar los costos y mantener la simplicidad de una ruta potencialmente útil para obtener el HDMF (**1**) restringe el uso de varios métodos establecidos, y algunos más actuales, pero aparentemente útiles para la conversión de derivados ácidos en cetonas. Ejemplos de tales métodos son la reacción de compuestos organometálicos con haluros de acilo, con imidazoles, con ésteres piridina-2-tiol, con anhídridos mixtos, con *N*-metil-*N*-metoxiamidas, con *N*-metil-*N*-(2-piridil)-amidas y con *N*-acilaziridinas. Sin embargo, la bis-amida **59** fácilmente preparada a partir del ácido correspondiente parecía justificar la investigación como posible precursor de la diona **60** (Esquema 10).

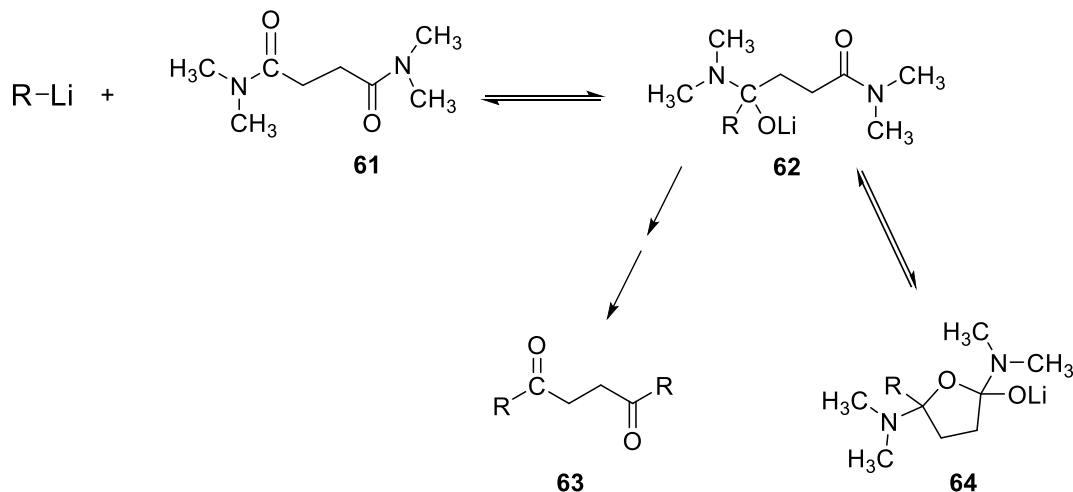
En la literatura se indica que las *N,N*-dialquilamidas reaccionan con alquil-litios^{143,144,145} y reactivos de Grignard para dar compuestos de carbonilo, y es particularmente relevante la síntesis de 1,4- y 1,5-dicetonas de *N,N,N',N'*-tetrametilsuccinimida y *N,N,N',N'*-tetrametilglutaramida, respectivamente, y reactivos de organolitio. Se observó, sin embargo, que aunque las tetrametildiamidas **61** (Esquema 11) reaccionan instantáneamente con el reactivo organolitio. La dicetona **63** toma a menudo un tiempo considerable para su aparición, lo que se atribuye a la ciclación del producto de mono-adición **62** para dar el intermedio relativamente estable **64**. Un resultado relacionado es la formación de 3-oxo-*N,N*-dietilhexanamida (EtCO·CH₂CH₂·CONEt₂) con un rendimiento del 63% y sólo un rendimiento del 3% del octano-3,6-diona en sólo un rendimiento del 3% por reacción de *N,N,N',N'*-tetraetilsuccinimida con un exceso de bromuro de etilmagnesio.

Claramente, se esperaría que la relación *trans* de los grupos *N,N*-dimetilcarboxamida alrededor del anillo de 1,3-dioxolano en **59** (Esquema 10) desfavorecería la ciclación en comparación con un análogo acíclico, lo que sugiere que la formación de dicetona podría ser particularmente favorecida en tales derivados de ácido (*2R,3R*)-tartárico en reacción con reactivos organometálicos.

¹⁴³ E. A. Evans, *J. Chem. Soc.*, **1956**, 4691.

¹⁴⁴ P. T. Izzo and S. R. Safir, *J. Org. Chem.*, **1959**, 24, 701.

¹⁴⁵ N. F. Scilly, The preparation of Aldehydes and Ketones via the *in situ* Reaction of Organolithium Compounds with Carboxamides or Carbamates. *Synthesis*, **1973**, 160.



Esquema 11. Reacción de tetrametildiamida **61** con reactivo organolitio conduce a un compuesto relativamente estable **64** por la ciclación del producto **62**. La aparición de la dicetona **63** tarda en formarse debido a que primero sucede la ciclación del intermediario **62**.

El tratamiento del diéster **58**¹⁴⁶ (Esquema 10) con dimetilamina en metanol produjo la diamida cristalina **59** con un rendimiento del 94%. La reacción de este compuesto con cloruro de metilmagnesio en tetrahydrofurano proporcionó después de cromatografía en columna el dioxolano **60** con un rendimiento del 50%. Un producto menor, identificado únicamente en sus propiedades espectrales fue el dioxolano **65**. (Figura 13).

Se ha reportado la hidrólisis ácida del acetal **60** (Esquema 10) en solución 9:1 (v/v) de ácido trifluoroacético-agua, que proporcionó el producto de autocondensación **66** (Figura 13) altamente cristalino, p.f. 199-201 °C, en lugar de la esperada (3*R*,4*R*)-3,4-dihidroxihexano-2,5-diona (**46**) (Esquema 10), al intentar la cristalización del producto crudo de la hidrólisis del acetato de etilo o metanol.

¹⁴⁶ D. Seebach, H.-O. Kalinowski, B. Bastani, G. Crass, H. Daum, H. Dorr, N. P. DuPreez, V. Ehrig, W. Langer, C. Nussler, H.-A. Oei, and M. Schmidt, *Helv. Chim. Acta*, **1977**, 60, 301.

Posteriormente, se encontró que la trituración de este producto crudo de la hidrólisis con éter dietílico seco y frío, permitió la obtención de la dihidroxidiona **46**, p.f. 75-78 °C, que al intentar su recristalización se convirtió rápidamente en el producto de autocondensación relativamente insoluble **66**.

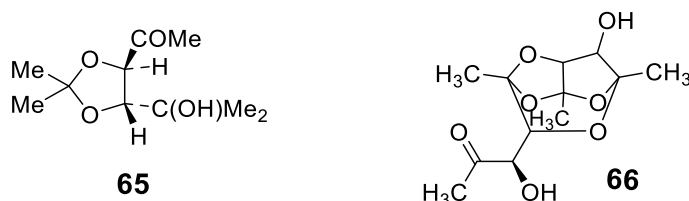


Figura 13. Un producto en menor proporción identificado en el espectro fue el dioxolano **65**. Producto de autocondensación **66** altamente cristalino por la hidrólisis del acetal **60** (Esquema 10) en lugar de obtener el dihidroxihexano **46** (Esquema 10).

Aunque los espectros de RMN ^1H y RMN ^{13}C son consistentes con la estructura **46** (Esquema 10), podría obtenerse una rápida medición en solución de cloroformo deuterado, ocurriendo una precipitación de **66** (Figura 13) a la temperatura de la prueba del espectro. En vista de esta inestabilidad relativa, la dihidroxidiona cruda **46** se usó directamente para promover la transformación.

Se han utilizado varios catalizadores para producir la ciclación de 3,4-dihidroxi-2,5-dionas a la furanona HDMF (**1**) (Esquema 10), pero al parecer se prefiere acetato de piperidinio. Cuando se calienta a reflujo durante 7 días una solución acuosa de dihidroxidiona **46** (Esquema 10) conteniendo acetato de piperidinio, la furanona **1** es el producto principal, como se indica por cromatografía gas-líquido (GLC). La extracción de la solución acuosa con éter dietílico, y la sublimación del producto así obtenido, proporcionó HDMF **1** con un rendimiento del 48%, lo que dio un valor de espectro de I.R. indistinguible a partir de una muestra original de L-ramnosa.¹⁴⁷

¹⁴⁷ J. E. Hodge, and B. E. Fisher, Abstracts, 145th National Meeting of the American Chemical Society, New York, N.Y. September, **1963**, p. 3D.

Debe mencionarse que se ha informado que el uso de benceno que contiene **1** (Esquema 10) equivalente de éter dietílico como disolvente en reacciones de Grignard sobre nitrilos¹⁴⁹ conduce a un aumento de los rendimientos de cetonas en comparación con reacciones similares realizadas en éter dietílico.

De las dos rutas (Esquema 10) para obtener HDMF (**1**) a partir del ácido (2*R*,3*R*)-tartárico, se prefiere claramente la de mayor rendimiento, más corta, procedente de la vía bis(dimetilamida) **59** (19% de rendimiento total en cinco pasos) que el procedimiento a través del dinitrilo **67** (9% en seis pasos).

10.2 Formación de 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2*H*)-furanona a partir de D-fructosa-1,6-difosfato.

Se cree que las furanonas naturales en frutas y microorganismos se forman enzimáticamente. Sin embargo, hasta ahora no se ha identificado ninguna enzima responsable de esta transformación. Sobre la base de estudios químicos y bioquímicos, Pisarnitskii¹⁵⁰, Zabetakis y Holden¹⁵¹ postulan a los 6 desoxi azúcares como precursores naturales, respectivamente. En contraste, los estudios de Hecquet¹⁵² y Roscher¹⁵³, mostraron la transformación eficiente de D-fructosa 1,6-difosfato en HDMF mediante la levadura *Zygosaccharomyces rouxii* y en frutos de fresa, respectivamente.

También, en la reacción de Maillard, la D-fructosa 1,6-difosfato se convierte rápidamente en DMHF.¹⁵⁴ Dado que al menos una etapa de reducción es necesaria durante la transformación de la D-fructosa 1,6-difosfato a HDMF, se supone la participación de los nicotinamida-adenina-dinucleótidos NAD(P)H, cofactores de la mayoría de las deshidrogenasas. Además, las reducciones no enzimáticas realizadas por NADH, así como los modelos NAD están bien documentados y los cofactores también contienen funciones amino libres que promueven la reacción de Maillard en condiciones suaves.

¹⁴⁹ P. Canonne, G. B. Foscolos, and G. Lemay, *Tetrahedron Lett.* **1980**, 21, 155.

¹⁵⁰ Pisarnitskii A. F.; Demechenko A. G.; Egorov I. A., *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* **1992**, 28, 123–127.

¹⁵¹ Zabetakis I.; Holden M. A. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* **1996**, 45, 25–29.

¹⁵² Hecquet L.; Sancelme M.; Bolte J.; Demuyne C. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, 44, 1357–1360.

¹⁵³ Roscher R.; Bringmann G.; Schreier P.; Schwab W. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, 1488–1493.

¹⁵⁴ Schieberle, P.; Teranishi, R. Formation of Furaneol in Heat-Processed Foods. *In Flavor Precursors*, ACS, **1992**, 164-174.

Mientras se investigaba la transformación biológica de la D-fructosa 1,6-difosfato, se observó una formación no enzimática significativa y selectiva de HDMF a partir de D-fructosa 1,6-difosfato en presencia de NADH. Se estudió en detalle la influencia de diversos parámetros en la formación de HDMF. Los experimentos que usaron NADH marcado con deuterio demostraron una transferencia de hidruro no enzimático de NADH a un producto intermedio desconocido posicionado que se origina de D-fructosa-1,6-difosfato dando como resultado la formación selectiva de HDMF.

La formación química selectiva de 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2*H*)-furanona (HDMF) a partir de D-fructosa-1,6-difosfato en presencia de dinucleótidos reducidos de nicotinamida-adenina (NAD(P)H) se realiza empleando técnicas para su identificación tales como: HPLC-DAD y HPLC-UV-MS/MS.¹⁵⁵

Para la obtención del HDMF se hace obligatorio el empleo de los cofactores NADH y NADPH. La presencia de albúmina de suero de bovino (BSA) (pI 4.9) dio un incremento significativo en la obtención del HDMF. El empleo de otras proteínas tales como amiloglucosidasa (pI 3.6) y tripsinógeno (pI 9.3) muestran efectos similares en el incremento de la producción del HDMF.

La temperatura óptima de incubación para la obtención del HDMF es de 30° C, donde el rango de temperaturas evaluadas son de 20–50° C (Figura 15), a temperaturas de 40 y 50° C la producción del HDMF se ve disminuido por reacciones laterales del HDMF con grupos aminos libres de las proteínas estabilizadoras (BSA) dando reacciones del tipo Millard.

Durante la investigación¹⁵⁵ se evalúa el efecto del pH en la obtención del HDMF, el sistema buffer de citrato-fosfato y buffer de fosfato con valores de pH 3–8 conlleva a la obtención de 1.8 µg/mL. Por otra parte, el empleo de buffer Tris–Cl con valores de pH 7–10 conduce al incremento significativo de HDMF a 2.8 µg/mL.

¹⁵⁵ Hauck, T.; Landmann, C.; Raab, T.; Brühlmann, F.; Schwab, W. Chemical formation of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3[2*H*]-furanone from D-fructose 1,6-diphosphate. *Carbohydrate Research* **2002**, 337, 1185-1191.

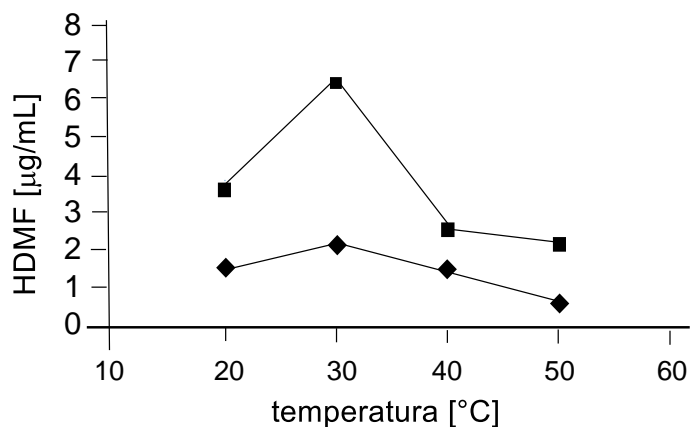


Figura 15. Efecto de la temperatura en la formación del HDMF en buffer Tris-Cl pH 7.5 (◆) y el buffer Tris-Cl pH 7.5, suplementado con 4.6 µg/mL BSA (■).

Para observar el efecto de las concentraciones tanto de cofactores (NAD y NADPH) como de sustrato D-fructosa 1,6-difosfato, se evaluaron por separado. Los rendimientos de HDMF se incrementaron significativamente al emplear cantidades mayores de 0.2 µg/mL de cofactores para posteriormente permanecer constantes (Figura 16).

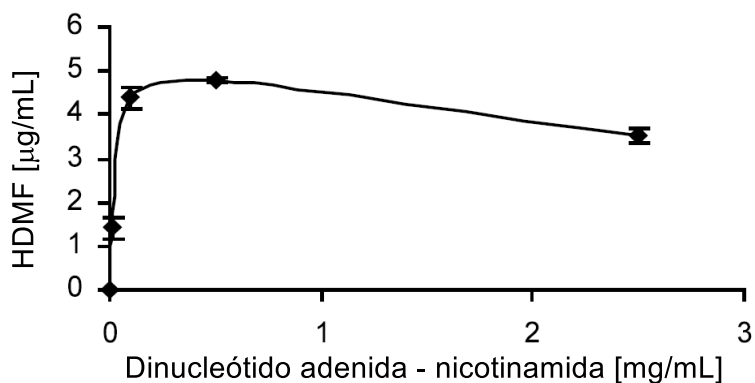


Figura 16. Efecto de la concentración del cofactor en la formación del HDMF.

En contraste, el porcentaje de rendimiento del HDMF muestra una dependencia lineal de la concentración de D-fructosa 1,6-difosfato y no se observa saturación del sustrato por parte de los cofactores. Estas observaciones implican que el re arreglo de la D-fructosa 1,6-difosfato a algún intermediario, el cual puede ser reducido por los cofactores siendo el paso limitante en la síntesis del HDMF (Figura 17).

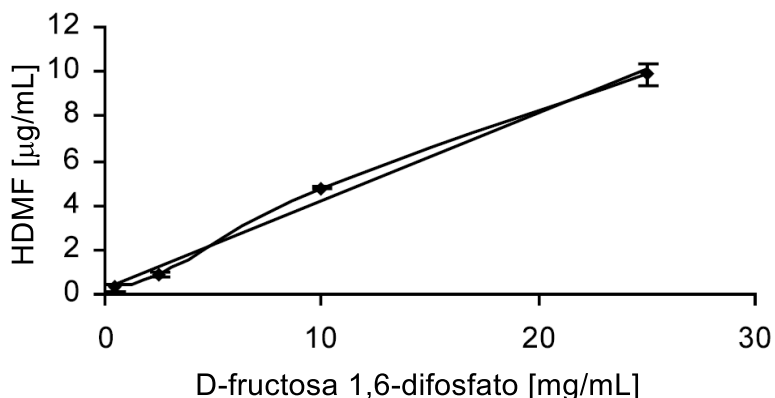


Figura 17. Efecto de la concentración de la D-fructosa 1,6-difosfato en la formación del HDMF.

Se propone un mecanismo de reacción que se muestra en el Esquema 12, donde una porción notable de D-fructosa 1,6-difosfato está disponible en la forma de carbonilo reactivo (1.7%),¹⁵⁶ una enolización inicial a través de una estructura enodiol conduce a la eliminación de fosfato inorgánico. La formación de enodiol adicional y la eliminación de fosfato producen las estructuras isoméricas de 3,4,5-trihidroxi-3,5-hexadien-2-ona (acetilformoína). El HDMF puede formarse después de la reducción del enlace doble carbono-carbono o la función carbonilo en la posición 2 o en la 5 mediante una transferencia de hidruro de NADH a C-1 (C-6) o C-2 (C-5), ciclación y deshidratación. Sin embargo, incubaciones en condiciones idénticas con acetilformoína en lugar del azúcar fosfato no produjeron HDMF. Esto podría explicarse por el hecho de que, en soluciones acuosas, la acetilformoína está disponible únicamente en su tautómero cíclico.¹⁵⁷

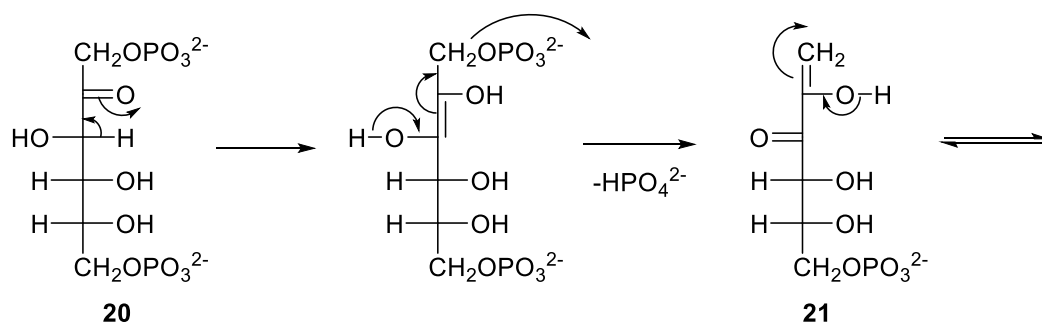
Experimentos simulados con NADH y carbonilos que han demostrado que después de la formación de un enlace covalente se produce una transferencia de hidruro intramolecular.¹⁵⁸ De acuerdo con esto, se supone que una enamina intermedia formada a partir de NADH y D-fructosa 1,6-difosfato inhibe la ciclación del anillo de piranosa y de este modo mejora la reactividad y promueve la eliminación de fosfato.

¹⁵⁶ Benkovic S. J. *Methods Enzymol.* **1979**, 63, 370– 379.

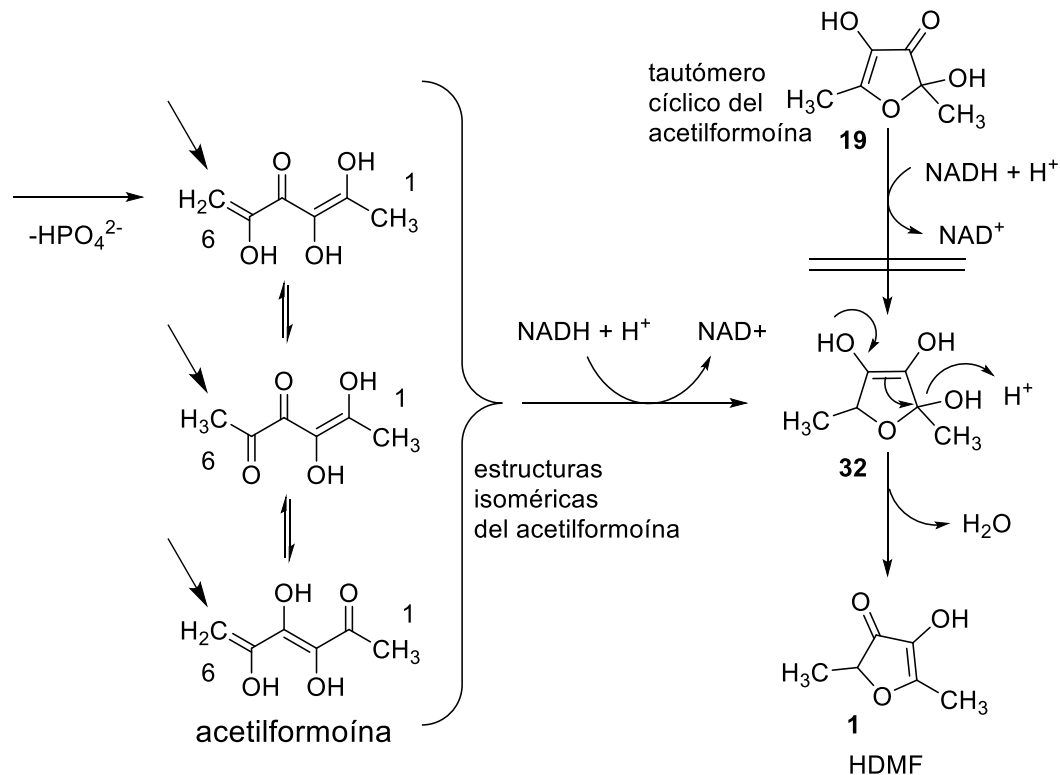
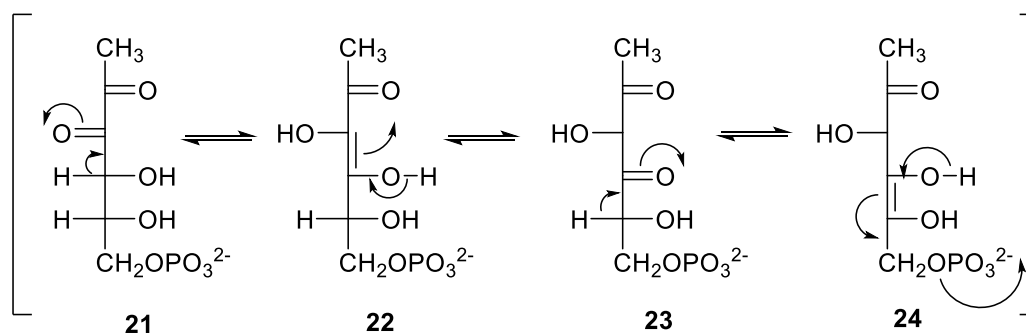
¹⁵⁷ Engel W.; Hofmann T.; Schieberle P. *Eur. Food Res. Technol.* **2001**, 213, 104– 106.

¹⁵⁸ Meyers A. I.; Brown J. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 3155– 3156.

Después de una transferencia de hidruro intramolecular, se libera NAD^+ y se forma HDMF. La propuesta está respaldada por el hecho de que la acetilformoína en forma cíclica y el NADH no producen HDMF.



D-fructosa 1,6-difosfato



Esquema 12. Propuesta mecánica para la formación del HDMF, a partir de D-fructosa 1,6-difosfato.

La incubación de [1-¹³C]-D-fructosa 1,6-difosfato con [4*R*,*S*-²H₂]-NADH doblemente marcada [4*R*,*S*-²H₂]-NADH se incubó en condiciones estándar con [1-¹³C]-D-fructosa 1,6-difosfato para localizar el marcador de deuterio en la molécula blanco. El patrón de fragmentación solo puede explicarse suponiendo que la marca ²H está unida al carbono C-5 o C-6 cuando la numeración comienza con ¹³C en la posición 1. Esto implica que el hidruro se transfiere a C-5 o C-6 del esqueleto D-fructosa 1,6-difosfato, lo cual está sustentado por muestras analizadas por CG-MS.

Finalmente, se muestra por primera vez que el HDMF se puede formar en condiciones fisiológicas (pH 7,5, 30 °C) a partir de D-fructosa 1,6-difosfato mediante una reducción no enzimática con NAD(P)H. Aunque el rendimiento químico es bastante bajo (aproximadamente 0,1%), los experimentos con NADH marcado con deuterio demostraron claramente la transferencia de hidruro de NADH a C-5 o C-6 de la estructura de hidratos de carbono. Se han informado concentraciones naturales de D-fructosa 1,6-difosfato de 0,02-0,05 mg/g de peso fresco de fruta que son en un factor de al menos 200 veces^{159,160} más baja que las concentraciones que se usaron en los experimentos. Por lo tanto, se asumió una vía de formación enzimática adicional en sistemas biológicos.

11. Importancia del HDMF en la industria de los alimentos

11.1. Hidrofuranos como saborizantes de fresa para productos alimenticios y bebidas.

El HDMF se utiliza para impartir aroma de fresa fresca a productos alimenticios y bebidas que no presentan aroma y sabor, o aquellos que contienen proporciones menores del saborizante. Los sabores de fresa se usan ampliamente para aromatizar productos alimenticios tales como: confitería, helados, yogurt, bebidas lácteas, jarabes, bebidas carbonatadas, etc.¹⁶¹ Se utilizan dos tipos de sabores de fresa en la industria de alimentos y bebidas: extractos naturales y sabores de imitación preparados a partir de ingredientes

¹⁵⁹ Salminen S. O.; Young R. E. *Plant Physiol.* **1975**, 55, 45– 50.

¹⁶⁰ Parekh L. J.; Sakariah K. K.; Shah V. J. *Enzymol. Acta Biocatal.* **1970**, 38, 23– 28.

¹⁶¹ Thomas, A. F.; Willhalm, B. US Patent 3455702 A, **1969**.

sintéticos aromatizantes. Muchos de los extractos de sabor naturales comercialmente disponibles tienen un sabor y aroma no definidos y carecen de frescura. Otra desventaja de los extractos de aroma natural reside en el hecho de que tienen una resistencia al aroma relativamente baja y por lo tanto deben utilizarse en proporciones relativamente altas para obtener los efectos aromatizantes deseados en los productos alimenticios y bebidas. Además, los extractos naturales de sabor a fresa no pueden utilizarse en productos alimenticios que durante su elaboración se someten a un tratamiento a alta temperatura; por ejemplo, en la fabricación de productos horneados y dulces duros. Con el fin de superar los inconvenientes inherentes a los extractos naturales de sabor de fresa, se han hecho esfuerzos para proporcionar sabores de imitación utilizando productos sintéticos que tienen características aromatizantes uniformemente reproducibles. Como se puede entender fácilmente, es muy difícil, si no imposible, igualar exactamente el sabor natural de las fresas frescas. Los sabores de fresa de imitación comercialmente disponibles carecen de algunas de las notas características de aroma y sabor a fresa natural. Se ha descubierto que ciertos derivados funcionales del HDMF, en particular derivados en los que el grupo hidroxilo está eterificado con un alquilo como metilo o etilo, pueden usarse para desarrollar un sabor a fresa a bajas concentraciones en productos alimenticios y bebidas. Las propiedades aromatizantes de los derivados son algo menos potentes que las del compuesto padre.¹⁶¹

11.2. Composiciones de sabor de carne de furanona

Se ha reportado el uso de furanonas para impartir un sabor nítido a diversos productos alimenticios que contienen carne o productos que simulan un producto cárnico en el que el sabor a carne se simula y se mejora mediante la incorporación de 2,5-dietil- o 2,5-metil-etil-4-hidroxi-2,3-dihidrofuran-3-ona o un precursor de estos compuestos. Se ha propuesto mejorar el sabor de diversos productos alimenticios que contienen carne o producto que simula sabor a carne, mediante la adición de ciertos componentes como el

hidrolizado de proteína, glutamato monosódico, nucleótidos, ácidos carboxílicos orgánicos y similares. Aunque los productos así obtenidos a menudo poseen un sabor a carne, su olor generalmente no es satisfactorio.

Se ha demostrado que un sabor a carne puede mejorarse o impartirse a un producto alimenticio que contiene carne o un producto simulador de carne mediante la incorporación de ciertas furanonas como la 4-hidroxi-2,3-dihidrofuran-3-ona (1) de fórmula general (Figura 19) en la que R_1 y R_2 representan un grupo alquilo que contiene uno o dos átomos de carbono, y en el que la suma de los átomos de carbono de R_1 y R_2 juntos es de 3-4. La dihidrofuranona se puede incorporar como tal, o en forma de precursores o reactivos que producen el compuesto deseado al término de preparación del producto alimenticio para su consumo.¹⁶²

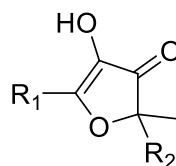


Figura 19. Fórmula general de la 4-hidroxi-2,3-dihidrofuran-3-ona, en donde R_1 y R_2 representan un grupo alquilo conteniendo uno o dos átomos de carbono.

11.3. Nuevos derivados del HDMF, usos como potenciadores del sabor

La cetona de piña es un nombre común del compuesto 2,5-dimetil-4-hidroxi-3(2*H*)-furanona (HDMF). Se forma mediante el proceso de dorado no enzimático que se produce durante el tostado y la cocción. Debido a su sabor a azúcar dulce y azúcar caramelizado, la cetona de la piña se usa ampliamente en los sabores, compuestos sintéticos. La cetona de piña reacciona fácilmente con aminas, aldehídos y con el oxígeno. En tales casos, se reduce el contenido de cetona de la piña de los sabores, disminuyendo la efectividad del sabor. Cuando la cetona de la piña se utiliza en la goma de mascar, se "lava" rápidamente mediante el proceso de masticación, lo que produce una rápida pérdida de sabor. Este efecto de "lavado" se debe a que la cetona de piña es soluble en agua.

¹⁶² De Groot C., Hobbs C., Tonsbeek C. US Patent 3709697A, 1969.

Un nuevo compuesto de carbonato de cetona de piña¹⁶³ de fórmula general, (Figura 20) en que se detalla que R₁ y R₂ son independientemente -H, -CH₃ o -CH₂CH₃; y R₃ puede ser un alquilo de 1 a 10 carbonos o un arilo de 6 a 10 carbonos.

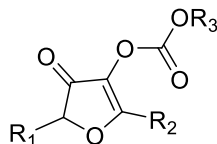


Figura 20. Fórmula general de cetona de piña modificada en la que R₁ y R₂ son independientemente -H, -CH₃ o -CH₂CH₃; y R₃ es un alquilo de 1 a 10 carbonos o un arilo de 6 a 10 carbonos.

Este nuevo compuesto resuelve los problemas de lavado asociados con el uso de cetona de piña, mientras que extiende el sabor durante un período de tiempo más largo. Al reaccionar la cetona de la piña con un cloroformiato de etilo u otros cloroformiatos de alquilo en la trietilamina, se forman los nuevos y mejorados carbonatos de cetona de la piña.

¹⁶³ Byrne B., Belleville, N.J.; Louise M.L., Goshen, N.Y. US Patent 4758680A, 1984.

12. Conclusiones

La publicación de datos técnicos y propiedades fisicoquímicas, han permitido a la industria de los alimentos, la inducción y el control de las condiciones que favorecen la formación del HDMF en los alimentos naturales y así como en los alimentos procesados.

El conocer la estabilidad del HDMF dentro de los parámetros de solubilidad, pH y temperatura que influyen en su reactividad química con la matriz de los alimentos en que se encuentra a partir de sus precursores y al conjugar el conocimiento de las propiedades organolépticas de los umbrales de olor y de sabor; han permitido que la industria de los alimentos, diversifique la aplicación del HDMF en diferentes líneas de producción como son: la repostería, la confitería, las bebidas refrescantes no alcohólicas, las salsas de soya, los aderezos, los vinos, y los productos derivados de la leche y de la carne.

Lo anterior demuestra la importancia que tiene para la Industria la publicación de datos y el valor agregado del conocimiento que existe del HDMF.

La información bibliografía que señala la presencia y cuantificación del HDMF en productos naturales como en alimentos procesados; así como el uso de materia prima y disolventes para su biosíntesis y síntesis química, ha permitido a las diferentes organizaciones locales como internacionales legislar, conformar el registro y seguimiento del saborizante para certificar, regular y verificar el buen uso del HDMF por la industria y así poder sancionar cuando se superen los máximos permisibles, específicamente cuando el HDMF se utiliza como un aditivo en la elaboración de alimentos.

Actualmente la síntesis del HDMF tiene un riesgo a nivel de producción en la industria por el uso del tetraóxido de osmio para la síntesis química de este saborizante; por lo cual la investigación y la industria, deben combinar la síntesis orgánica con la biosíntesis, utilizando especialmente las sepas aplicadas en el área de las bebidas y de la panificación.

Simplicidad y disminución de costos en la síntesis del HDMF, disponiendo de materia prima de bajo costo y fácil producción aun cuando se pierda la quiralidad del producto, o maniobrar el porcentaje de los integrantes de la mezcla racémica, utilizando los métodos de la síntesis orgánica conjugados con los métodos de la biosíntesis.

Sin embargo, a pesar de estos problemas, la conclusión para la calidad del sabor sigue siendo genética. Los agricultores, los industriales, los técnicos y profesionales de la industria alimentaria, necesitan más información y herramientas analíticas para seleccionar la calidad del sabor.

En los últimos años se han logrado progresos sustanciales en la elucidación de la ruta biosintética que conduce al HDMF, y como es señala en la bibliografía; el uso de marcadores moleculares que se relacionan con el sabor, pueden ayudar a identificar enzimas específicas en las rutas metabólicas del sabor.

Es importante que entiendan los involucrados, lo importante que es permitir la publicación de información científica y técnica de logros y hallazgos en la síntesis del HDMF. El registro de una patente debe proteger los derechos de autor pero también debe permitir que se conozcan los avances en la química del sabor, en los métodos sensoriales y en la aplicación de nuevas técnicas como la biología molecular, sin tener que esperar décadas para mejorar la calidad de los aditivos en los alimentos.