

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER  
MÓDULO DE QUÍMICA ORGÁNICA

REACCIONES DESTINADAS A DISMINUIR EL  
CONTENIDO DE (*R*)-(+)-PULEGONA EN ACEITES  
ESENCIALES DE MENTA DE USO ALIMENTICIO

**Autor: Favio Daniel Torossi Baudino**

**Tutora: Dra. Carla Isabel Nieto Gómez**

FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA Y BIO-ORGÁNICA

Septiembre de 2021

# ÍNDICE GENERAL

1	INTRODUCCIÓN .....	1
1.1	El género <i>Mentha</i> .....	1
1.2	Los aceites esenciales de menta.....	3
1.3	La pulegona: un compuesto natural potencialmente tóxico .....	8
1.4	Formas usuales de exposición humana hacia la ( <i>R</i> )-(+)-pulegona .....	10
1.5	Absorción, metabolismo y excreción .....	12
1.6	Toxicidad de la ( <i>R</i> )-(+)-pulegona.....	15
1.7	Contexto normativo: concentraciones máximas permitidas, IDT.....	19
1.8	Estandarización y parámetros de calidad para los aceites esenciales de menta ....	21
2	OBJETIVOS.....	22
2.1	Objetivo general.....	22
2.2	Objetivos específicos .....	22
3	DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	23
3.1	Disminución del contenido de pulegona en aceites esenciales de menta mediante reacciones químicas .....	23
3.2	Reacciones químicas específicas para disminuir el contenido de pulegona en aceites esenciales de menta de uso alimenticio.....	26
3.2.1	Reacción A: Disminución del contenido de mentofurano y pulegona mediante una reacción de Diels-Alder .....	27
3.2.2	Reacción B: Disminución del contenido de pulegona mediante reducción estereoespecífica por hidrogenación .....	31
3.2.3	Reacción C: Disminución del contenido de pulegona mediante adición de sulfito de sodio neutro .....	37
4	CONCLUSIONES.....	45
5	BIBLIOGRAFIA .....	48
6	ANEXO .....	54

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS, SIGLAS Y SÍMBOLOS

---

**Ac<sub>2</sub>O:** Anhídrido acético.

**AcONa:** Acetato de sodio.

**AE:** Aceite(s) Esencial(es).

**A/S:** Aromatizante(s)/Saborizante(s).

**CAA:** Código Alimentario Argentino.

**CEFS:** Committee of Experts on Flavouring Substances (Comité de Expertos en Sustancias Aromatizantes/Saborizantes).

**CIELAB:** Commission Internationale de l'Eclairage (CIE) L\* a\* b\* (LAB).

**CYP-450:** Cytochrome P450 (citocromo P450).

**DCM:** Diclorometano.

**DMAPP:** Dimetilalil difosfato.

**DMO:** Dementholised oil (aceite esencial desmentolizado).

**DXP:** 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato.

**Ec:** Ecuación.

**EC:** European Community (Comunidad Europea: CE).

**EEC:** Economic European Community (Comunidad Económica Europea: CEE).

**EFSA:** European Food Safety Authority (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria).

**EtOH:** Etanol o alcohol etílico.

**FAO:** Food and Agriculture Organization (Organización para la Alimentación y la Agricultura).

**FCC:** Food Chemicals Codex (Código de Sustancias Químicas para Alimentos).

**FDA:** Food and Drug Administration (Administración de Alimentos y Medicamentos).

**FEMA:** Flavor and Extract Manufacturers (Asociación de Fabricantes de Aromas y Sabores).

**FO:** Función (es) orgánica (s).

**FOM:** Frontier orbitals molecular (orbitales moleculares frontera).

**GC:** Gas chromatography (cromatografía de gases).

**GC-MS:** Gas chromatography-Mass spectrometry (cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas).

**GC-O:** Gas chromatography olfactometry (cromatografía de gases acoplada a olfactometría).

**GF:** Grupo(s) funcional(es).

**GPP:** Geranil difosfato.

**GRAS:** Generally recognized as safe (generalmente reconocido como seguro).

**GSH:** Glutathione (glutati6n).

**h:** Hora (s).

**HMPC:** Herbal Medicinal Products Committee (Comité de Productos Medicinales Herbarios).

**HOMO-LUMO:** Highest occupied and lowest unoccupied molecular orbital. (orbital molecular ocupado de mayor energía-orbital molecular desocupado de menor energía).

**IA:** Índice de acidez.

**IDA:** Ingestia diaria admisible o aceptable.

**IDT:** Ingesta diaria tolerable.

**IE:** Índice de éster.

**INS:** International Numbering System (Sistema Internacional de Numeración para Aditivos Alimentarios)

**IPP:** Isopentenil difosfato.

**IRAM:** Instituto de Racionalización Argentino de Materiales. (Actualmente: Instituto Argentino de Normalización y Certificación).

**IUPAC:** Union of Pure and Applied Chemistry (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada).

**ISO:** International Organization for Standardization.

**JECFA:** Joint Expert Committee on Food Additives (Comité Mixto de Expertos sobre Aditivos Alimentarios).

**Mar:** *Mentha arvensis* L. (nombre botánico) - Menta arvensis (nombre común).

**MF:** (*R*)-(+)-mentofurano.

**min:** Minuto (s).

**Mpi:** *Mentha x piperita* L. (nombre botánico) - Menta piperita (nombre común).

**Mpo:** *Mentha pulegium* L. (nombre botánico) - Menta poleo (nombre común).

**Msp:** *Mentha spicata* L. (nombre botánico) - Menta spicata (nombre común).

**MT:** Monoterpeno (s).

**MTO:** Monoterpeno (s) oxigenado (s).

**MVA:** Ácido mevalónico.

**OMS:** Organización Mundial de la Salud (World Health Organization: WHO).

**PC:** Perfil cromatográfico.

**pcd:** Peso corporal por día.

**PUL:** (*R*)-(+)-pulegona.

**SAIPA:** Sociedad Argentina para la Investigación de Productos Aromáticos.

**TRP:** Transient receptor potential (receptor de potencial transitorio).

**TO:** Terpeno (s) oxigenado (s).

**UE:** Unión Europea.

**US:** United States (Estados Unidos).

**USA:** United States of América (Estados Unidos de Norteamérica).

**vol.:** Volumen(es).

**v/p:** Porcentaje volumen en peso (mL de AE que se pueden extraer a partir de 100 gramos de material vegetal).

**v/v:** Porcentaje en volumen o porcentaje volumen en volumen.

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

<b>Figura 1.</b> Rutas biosintéticas de los principales MTO presentes en los AE de <i>Msp</i> y <i>Mpi</i> (adaptado de Mahmoud y Croteau). <sup>27</sup> .....	5
<b>Figura 2.</b> Estructura, nomenclatura y principales propiedades físicas de la (R)-(+)-pulegona. <sup>38</sup> .....	9
<b>Figura 3.</b> Traducción errónea del término poleo por pennyroyal (menta poleo) en el rótulo de un envase de yerba mate compuesta. ....	10
<b>Figura 4.</b> Principales vías metabólicas de la (R)-(+)-pulegona y sus correspondientes metabolitos secundarios (adaptado de Gordon y Khojasteh). <sup>36</sup> .....	13
<b>Figura 5.</b> Principales modificaciones estructurales de la (R)-(+)-pulegona llevadas a cabo durante las vías metabólicas de oxidación secundaria y de reducción. ....	16
<b>Figura 6.</b> Mapas de Potencial Electrostático de la PUL y el MF en comparación con el mentol realizado con la base Hartree-Fock de geometrías optimizadas del conjunto básico 3-21G. <sup>31</sup> .....	19
<b>Figura 7.</b> Compuestos de mayor valor sintético o comercial factibles de obtener a partir de la modificación estructural de la (R)-(+)-pulegona (adaptado de Kumar y col.). <sup>65</sup> .....	24
<b>Figura 8.</b> Reacción de Diels-Alder para la disminución del contenido de MF en un AE de <i>Mpi</i> , según la metodología propuesta por Blackwell y col. <sup>54</sup> .....	26
<b>Figura 9.</b> Representación esquemática y diagrama de orbitales moleculares frontera de una reacción de Diels-Alder. <sup>72</sup> .....	27
<b>Figura 10.</b> Formación de aductos (MF-PUL y MF-MF) mediante una reacción de Diels-Alder en un AE de <i>Mpi</i> según la metodología propuesta por Johnson. <sup>55</sup> .....	28
<b>Figura 11.</b> Cromatogramas obtenidos mediante GC de un AE de <i>Mpi</i> antes y después de una reacción de Diels-Alder. <sup>55</sup> .....	30
<b>Figura 12.</b> Reacción de reducción estereoespecífica por hidrogenación de la (R)-(+)-pulegona propuesta por Spencer: condiciones experimentales, productos y subproductos de reacción. <sup>53</sup> .....	32
<b>Figura 13.</b> Ecuaciones para el cálculo de reactivos en el procedimiento de Spencer. <sup>74</sup> .....	33
<b>Figura 14.</b> Separación mediante GC de los MTO identificados en la ruta biosintética del mentol en un AE de <i>Mpi</i> . <sup>79</sup> .....	35
<b>Figura 15.</b> Distribución de las especies S[IV] en medio acuoso según el pH. <sup>85-88</sup> .....	37
<b>Figura 16.</b> Equilibrios de disociación de las especies S[IV] en medio acuoso. <sup>85-88</sup> .....	38
<b>Figura 17.</b> Estructuras resonantes de los aniones HSO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (bisulfito) y SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> (sulfito). ....	39
<b>Figura 18.</b> Mecanismo general de adición de Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> a cetonas y cetonas α,β-insaturadas. ....	39
<b>Figura 19.</b> Principales MTO cíclicos de los AE de menta con estructuras cetona, enona y enona conjugada. ....	40
<b>Figura 20.</b> Mecanismo de adición conjugada o adición 1,4 del Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> a la PUL. ....	41
<b>Figura 21.</b> Aductos formados a partir de la reacción entre el Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> y los MTO con estructuras enona y enona conjugada presentes en los AE de menta. <sup>90</sup> .....	42
<b>Figura 22.</b> Modelos de bolas y varillas (ball and stick) de la mentona e isomentona. <sup>92</sup> .....	43

<b>Figura 23.</b> Colores característicos de los AE de las especies de mentas de mayor interés comercial e industrial. <sup>53</sup> .....	56
<b>Figura 24.</b> Diagrama del espacio de color CIELAB: I (Mpi); II (Msp); III (Mpo) y IV (Mar). <sup>53</sup> .....	56
<b>Figura 25.</b> Cromatograma típico obtenido mediante GC de un AE de Mpi según un análisis cuantitativo por el método de porcentaje de áreas sin corrección de factores de respuesta. <sup>12</sup> .....	59
<b>Figura 26.</b> Componentes representativos del aroma de Mpo detectados mediante GC-O. <sup>100</sup> .....	60
<b>Figura 27.</b> Ejemplo numérico para calcular el porcentaje de disminución del contenido de PUL en los AE de menta. <sup>48</sup> .....	60

## ÍNDICE DE TABLAS

---

<b>Tabla 1.</b> Denominaciones y propiedades de las principales mentas y hierbas silvestres argentinas con las que son usualmente confundidas. ....	2
<b>Tabla 2.</b> Compuestos representativos del AE de Mpi y sus concentraciones relativas. <sup>10,11,13</sup> .....	7
<b>Tabla 3.</b> Compuestos representativos del AE de Mar y sus concentraciones relativas. <sup>10,13</sup> .....	7
<b>Tabla 4.</b> Compuestos representativos del AE de Mpo y sus concentraciones relativas. <sup>2</sup> .....	8
<b>Tabla 5.</b> Compuestos representativos del AE de Msp y sus concentraciones relativas. <sup>10,13</sup> .....	8
<b>Tabla 6.</b> Evaluación del porcentaje de PUL liberada tras la masticación de una goma de mascar conteniendo AE de Mpi (Johson y Tan, 2014 citado por Cohen y col.). <sup>8</sup> .....	11
<b>Tabla 7.</b> Valores energéticos de los orbitales frontera HOMO-LUMO para los principales componentes de la Mpi calculados de forma teórica mediante el conjunto de bases Hartree-Fock model 3-21G (en medio acuoso) del software Spartan 10 V1.1.0. <sup>31</sup> .....	18
<b>Tabla 8.</b> Niveles máximos permitidos de PUL y MF conforme al Reglamento 1334/2008 y al CAA. ..	20
<b>Tabla 9.</b> Principales métodos de conversión estructural de la PUL mediante reducción catalítica selectiva (adaptado de Kumar y col.) <sup>62</sup> .....	25
<b>Tabla 10.</b> Porcentajes de MF y PUL determinados mediante GC-MS durante el transcurso de una reacción de Diels-Alder con un AE de Mpi. <sup>55</sup> .....	29
<b>Tabla 11.</b> Porcentajes de MF y PUL en AE comerciales de diferentes especies de mentas determinados mediante GC. <sup>53</sup> .....	30
<b>Tabla 12.</b> Porcentajes de pulegona, mentona y mentol determinados por GC antes y después de la reacción propuesta por Spencer con un AE de Mpi. <sup>74</sup> .....	35
<b>Tabla 13.</b> Porcentajes de disminución de pulegona y del incremento de mentona y mentol luego de las reacciones de reducción estereoespecífica por hidrogenación ejemplificadas por Spencer. <sup>74</sup> .....	35
<b>Tabla 14.</b> Síntesis integradora comparativa de las tres reacciones analizadas en esta investigación	44

# 1 INTRODUCCIÓN

---

## 1.1 *El género Mentha*

---

Bajo la denominación genérica de menta se conocen a las hojas y sumidades florecidas de diversas plantas, cultivadas o silvestres, pertenecientes al género *Mentha* (mint) de la familia botánica *Lamiaceae*, denominada antiguamente como *Labiatae*, por sus flores cigomorfas provistas de dos labios.<sup>1,2</sup> Debido a la frecuente hibridación entre especies, a la elevada plasticidad fenotópica y a la variabilidad genética, se trata de un género taxonómicamente complejo,<sup>3</sup> con más de 3000 nombres publicados desde 1753, en su mayoría sinónimos o denominaciones aún sin resolver.<sup>2</sup> Aunque en la bibliografía no exista consenso para una clasificación sistemática inequívoca, una revisión reciente, basada en características morfológicas, citológicas y genéticas permite dividirlo en 42 especies, 15 híbridos y cientos de subespecies, variedades y cultivares distribuidos en los cinco continentes.<sup>4</sup>

De todas las mentas conocidas, las de mayor interés comercial e industrial son las especies *Mentha x piperita* L. (Mpi), *Mentha arvensis* L. (Mar) y *Mentha spicata* L. (Msp).<sup>2</sup> Incluyéndose, además, a la *Mentha pulegium* L. (Mpo) por su importancia farmacológica y toxicológica.<sup>5</sup> Desde la antigüedad, este género ha sido utilizado con fines alimenticios, cosméticos y medicinales. Además de sus valoradas características organolépticas, la investigación en los últimos años ha demostrado su importante actividad biológica,<sup>6</sup> en particular, por sus propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antiinflamatorias, insecticidas y anticancerígenas.<sup>5,7</sup> Aunque estas especies son aditivos aromatizantes/saborizantes (A/S) reconocidos como GRAS (Generally recognized as safe) por la Asociación de Fabricantes de Aromas y Sabores (FEMA) de Estados Unidos (USA),<sup>8</sup> poseen concentraciones variables de pulegona (PUL), un compuesto tóxico con potenciales riesgos para la salud pública.

La similitud organoléptica, la variedad de nombres utilizados y el desconocimiento popular sobre las diferencias entre especies, han transformado a la *Mentha* en un género objeto de gran confusión. En Argentina, por ejemplo, la presencia de hierbas silvestres como la peperina y el poleo, con nombres y/o propiedades similares a las mentas, no solo incrementan dicha confusión sino que, además, plantean nuevos riesgos toxicológicos. Frente a este escenario, se considera imprescindible una síntesis integradora que unifique denominaciones y características propias del género en estudio (Tabla 1). Aunque las mentas sean muy utilizadas en forma de hojas frescas (fines culinarios), de extractos (en cosmética y farmacología), o en forma herbolaria para infusiones, su cultivo e industrialización a nivel mundial está destinado, fundamentalmente, a la extracción de sus aceites esenciales (AE).

**Tabla 1.** Denominaciones y propiedades de las principales mentas y hierbas silvestres argentinas con las que son usualmente confundidas.

Especie (nombre común)	Nombre botánico (género y especie)	Otros nombres comunes	Principales aplicaciones alimenticias	Presencia de pulegona (%)	Actividad biológica	Particularidades
<b>Menta Piperita</b> (Mpi) (Familia Lamiaceae)	<b><i>Mentha x piperita</i> L.</b>	<u>Español:</u> Menta inglesa. <sup>1</sup> Mote yuyo. Yerba buena. <sup>9,11</sup> <u>Inglés:</u> Peppermint, mint. <sup>4,9</sup>	A/S de golosinas, pastas y enjuagues bucales. <sup>2</sup>	0,5 - 3,0 <sup>10</sup> Máx. 4,0 <sup>11</sup> Máx. 3,0 <sup>13</sup>	Colerética, colagoga, anti-flatulenta, espasmolítica, anti inflamatoria, antimicrobiana. <sup>9</sup> Antifúngica. <sup>4</sup>	Híbrido estéril entre la <i>M. aquatica</i> y la <i>M. spicata</i> . <sup>4,9</sup> Posee un sabor picante parecido a la pimienta (pepper). <sup>9</sup>
<b>Menta arvensis</b> (Mar) (Familia Lamiaceae)	<b><i>Mentha arvensis</i> L.</b>	<u>Español:</u> Menta japonesa. <sup>1,9</sup> <u>Inglés:</u> Cornmint. <sup>8</sup>	Para la obtención de mentol. <sup>8,9</sup> Para la elaboración de talcos y pastas dentales. <sup>9</sup>	0,5 – 2,5 <sup>10</sup> Máx. 1,5 <sup>13</sup>	Antibacteriana, antimicótica. <sup>9</sup>	Principal fuente de (-)-mentol por simple cristalización en frío. <sup>8</sup> El AE desmentolado se simboliza como DMO.
<b>Menta spicata</b> (Msp) (Familia Lamiaceae)	<b><i>Mentha spicata</i> L. em. Huds.</b> Sinonimia: <sup>10-13</sup> <b><i>Mentha viridis</i> L.</b>	<u>Español:</u> Yerba buena o Hierba buena. <sup>1,9</sup> <u>Inglés:</u> Spearmint. <sup>1,9</sup>	A/S de golosinas, pastas y enjuagues bucales. <sup>2</sup>	< 0,1 <sup>2</sup> 2,0 <sup>9</sup>	Antibacteriana frente a gérmenes Gram (+), Gram (-) y levaduras. <sup>9</sup>	Las nuevas variedades Erospicata (de gran resistencia climática) y Curly mint (perenne) son una alternativa a la tradicional Mpi. <sup>8</sup>
<b>Menta poleo</b> (Mpo) (Familia Lamiaceae)	<b><i>Mentha pulegium</i> L.</b>	<u>Español</u> Menta poleo, Poleo, Poleo menta, Poleo europeo. <sup>9</sup> <u>Inglés:</u> Pennyroyal mint, European pennyroyal. <sup>9</sup>	A/S natural en alimentos. <sup>8</sup>	50,0-80,0 <sup>2</sup>	Acaricida y anti-miomas. <sup>5</sup> Actividad antimicrobiana comparable a vancomicina, eritromicina y gentamicina. <sup>4</sup> Bioinsecticida. <sup>7</sup>	El quimiotipo Hedeoma pulegioides (L) Pers. (o falso poleo) posee una fitoquímica similar pero con 30% de PUL (30%). <sup>2</sup>
<b>Peperina</b> (Familia Lamiaceae)	<b><i>Minthostachys mollis</i> (Kunth) Griseb</b> Sinonimia: <b><i>Minthostachys verticillata</i> (Griseb) Epling. <i>Bystropogon mollis</i> Kunth</b> <sup>1,9</sup>	<u>Español:</u> Peperita, Menta peperina. <sup>1</sup> Piperina. <sup>9</sup>	A/S de bebidas aperitivas amargas <sup>9</sup>	35,0-64,3 <sup>12</sup>	Antimicrobiana, insecticida, fungicida, antiespasmódica. <sup>9</sup> Antibacteriana, antiviral. <sup>14</sup>	AE posiblemente exento de toxicidad por efectos sinérgicos-antagónicos de la mentona. <sup>14</sup> DL <sub>50</sub> moderada. Con dosis repetidas evidencia toxicidad hepática. <sup>15</sup>
<b>Poleo</b> (Familia Verbenaceae)	<b><i>Lippia turbinata</i> Griseb</b> <sup>14</sup>	<u>Español:</u> té criollo, té del país, <sup>9</sup> poleo. <sup>9,16</sup>	A/S de licores y bebidas aperitivas amargas. <sup>9</sup>	No detectada <sup>16</sup>	Inhibidor del herpes simplex virus tipo 1 (HSV-1) y del virus Junín (cepa IV4454). <sup>9</sup>	Contiene lippiona que se metaboliza a lippiafenol, tóxico abortivo. <sup>16</sup>



## 1.2 Los aceites esenciales de menta

---

Los aceites esenciales (AE), esencias o esencias naturales,<sup>1</sup> son una mezcla compleja de sustancias de origen vegetal que presentan la particularidad de ser volátiles a temperatura y presión atmosférica normal.<sup>15</sup> Son productos del metabolismo secundario de las plantas, sintetizados a partir de metabolitos primarios como glúcidos, lípidos y proteínas que confieren aromas y propiedades características a las especies que los contienen.<sup>16</sup> Se sintetizan y acumulan en estructuras secretoras especializadas llamadas tricomas glandulares que,<sup>3,17</sup> en el caso de las mentas, se encuentran localizadas en sus hojas y sumidades.<sup>8</sup> Aunque la bibliografía recoja múltiples definiciones sobre los AE, todas son coincidentes en cuanto al método de extracción, es decir, solo son AE los productos obtenidos mediante hidrodestilación, arrastre de vapor o por expresión y destilación en seco para el caso particular de los cítricos.<sup>10</sup>

Si bien los AE pueden contribuir significativamente a la supervivencia evolutiva de las plantas, el término “*esencial*” no está relacionado con una prescindencia celular, de hecho, no todas las especies vegetales los producen, sino que puede considerarse derivado del vocablo “*quintessence*” utilizado por los vitalistas del siglo XVI para referirse al espíritu o fuerza vital de las plantas aromáticas como quinto elemento alquímico.<sup>18</sup> En este sentido, los AE están constituidos por metabolitos secundarios que no cumplen funciones precisamente vitales en los tejidos y representan, en ocasiones, compuestos de desecho metabólico. Generalmente, no están involucrados con el crecimiento y desarrollo de los vegetales, ni participan de los procesos destinados a la obtención de energía.<sup>19</sup> Sin embargo, son de gran importancia en ecología química; disciplina que estudia las interacciones bióticas mediadas por moléculas que funcionan como señales para iniciar, modular o finalizar diferentes procesos biológicos.<sup>20</sup>

Los AE en general, y los de las diversas especies de mentas en particular, se encuentran en muy pequeñas proporciones. Dado que su rendimiento depende del historial previo de cada especie (condiciones climáticas durante el crecimiento, formas de recolección, métodos de extracción etc.) el mismo puede ser muy variado. Para la Mpi, por ejemplo, oscila entre 0,5-4% (v/p en base seca).<sup>10</sup> Sin embargo, pese a hallarse en pequeñas proporciones, representan un complejo sistema abordado por la fitoquímica; disciplina que estudia los constituyentes químicos de las plantas, sus estructuras, metabolismo, distribución, función biológica, extracción y evaluación cuali-cuantitativa.<sup>19</sup>

El término fitoquímica suele ser utilizado como sinónimo de composición química. En este sentido, los AE poseen una fitoquímica muy compleja debido a las grandes variaciones que presentan, incluso, entre miembros de una misma especie. Esta sorprendente variabilidad

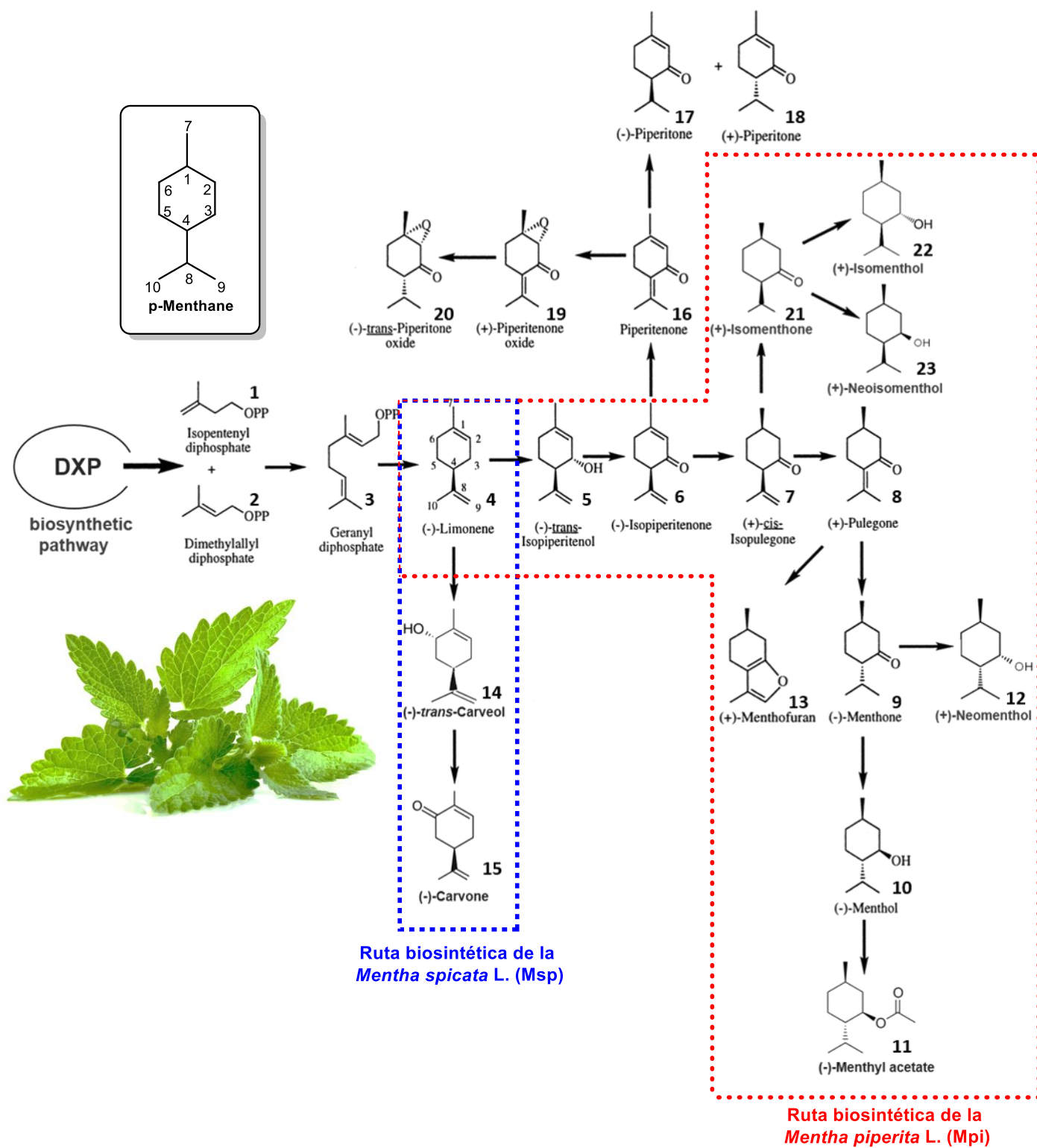
puede considerarse derivada de factores tanto internos (genéticos, fisiológicos, etapa de desarrollo o parte de la planta) como externos (tipo de suelo, ubicación geográfica, temperatura, exposición solar e hídrica y tipo de cosecha, entre otros).<sup>21</sup> Si bien en este trabajo se utilizará el término “*fitoquímica*” como sinónimo de composición química, no debe ser confundido con el de “*fitoquímico*”, que hace alusión a los compuestos químicos no nutritivos de las plantas, con importantes propiedades antioxidantes y de protección celular contra el daño oxidativo causado por la exposición solar y el oxígeno.<sup>22</sup>

### **Composición química de los aceites esenciales de menta**

Los principales componentes químicos de los AE son los “*terpenos*”, vocablo derivado del inglés “*turpentine*” o del español “*trementina*”, en relación a las resinas aromáticas de las coníferas donde fueron identificados originariamente por Kekulé en 1880.<sup>15,18</sup> Usualmente, estos compuestos son asociados a la familia de los lípidos por sus características oleosas semejantes a los aceites y por su inmiscibilidad en agua,<sup>23</sup> e incluso, las Normas ISO los denominan simplemente como “*aceites de...*” (seguido del nombre de la planta de la cual deriven).<sup>10</sup> Sin embargo, no son acilglicéridos, son compuestos biosintéticos con estructuras carbonadas formalmente derivadas del 2-metil-1,3-butadieno o isopreno (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>),<sup>24</sup> unidad estructural básica advertida por Otto Wallach en 1887 y tomada como referencia para la regla del isopreno.<sup>25</sup>

Aunque en la bibliografía los términos “*terpeno*”, “*terpenoide*” e “*isoprenoide*” son usados de forma indistinta, en este trabajo se emplearán de acuerdo a las directrices de la IUPAC, la cual considera a los “*terpenos*” como hidrocarburos de origen biológico con un esqueleto carbonado formalmente derivado del isopreno, a los “*terpenoides*” como terpenos oxigenados (TO) con funciones orgánicas (FO) cetona, alcohol, éster, éter, etc. y a los “*isoprenoides*” como la conjunción de los dos anteriores.<sup>18,24,26</sup> Los AE de las mentas están constituidos principalmente por mezclas de monoterpenoides o monoterpenos oxigenados (MTO) alicíclicos resultantes de la condensación de dos unidades de isopreno (C<sub>10</sub>), usualmente, a través de reordenamientos y ciclaciones de uniones tipo cabeza-cola.<sup>15</sup>

Aun tratándose de mezclas complejas, cada especie de menta está caracterizada por MTO representativos que, en su conjunto, definen tanto la fitoquímica como las propiedades fisicoquímicas, organolépticas y biológicas de las mismas. La presencia y preponderancia de estos compuestos puede comprenderse analizando las rutas biosintéticas de las especies *Mentha x piperita* L. y de la *Mentha spicata* L. (Figura 1),<sup>27-29</sup> las cuales, si bien proporcionan una secuencia sintética general para todo el género *Mentha*,<sup>30</sup> la de la *Mentha x piperita* L en particular, es la utilizada principalmente como referencia, dada la correspondencia entre sus reacciones con las del metabolismo general de los MTO.<sup>17,31</sup>



**Figura 1.** Rutas biosintéticas de los principales MTO presentes en los AE de *Msp* y *Mpi* (adaptado de Mahmoud y Croteau).<sup>27</sup>

A diferencia de otros isoprenoides, los MT y MTO se sintetizan en los plástidos y cloroplastos celulares a partir de la 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato (DXP), una vía independiente de la clásica ruta del ácido mevalónico (MVA), efectuada tanto en el citoplasma como en las mitocondrias celulares.<sup>15</sup> Aunque los MT y MTO proceden estructuralmente del isopreno, éste no es su precursor *in vivo*. Son derivados del isopentenil difosfato (IPP) **1** y su isómero dimetilalil difosfato (DMAPP) **2**, unidades estructurales o building blocks que, tras su condensación, conducen al geranil difosfato (GPP) **3**, el precursor *in vivo* de todos los MT y MTO. Mientras que la vía del MVA genera únicamente **1**, la vía del DXP genera tanto **1** como **2**. La formación de los diferentes MT y MTO se realiza a través de un mecanismo S<sub>N</sub>1, también conocido como reacción de preniltransferencia (prenyl transfer reaction).<sup>15</sup>

Así, el (-)-limoneno **4** es el primer eslabón de una serie de compuestos que poseen una estructura común denominada *p*-mentano (1-metil-4-isopropilciclohexano),<sup>32</sup> los cuales son sintetizados por un complejo sistema enzimático de elevada regio y estereoespecificidad que, mediante hidroxilaciones, reacciones redox, migración de dobles enlaces y conjugaciones (glicosilaciones y acilaciones) genera enantiómeros específicos de relevante actividad biológica y organoléptica. Todos los pasos de las rutas biosintéticas son estereoespecíficos a excepción de la reducción de **8** donde la enzima pulegona reductasa forma mayoritariamente **9** pero también algo de **21**.<sup>8</sup> A partir de **4**, los MTO predominantes de una especie de menta puede corresponderse con la ruta biosintética de la Mpi o de la Msp.<sup>30</sup>

La principal diferencia entre ambas rutas biosintéticas radica en la posición del hidroxilo en el ciclo *p*-mentano. Mientras que la hidroxilación en C3 orienta la síntesis hacia MTO representativos de las especies **Mpi** (compuestos **9, 10, 11 y 21**); **Mpo** (compuestos **8, 9, 16, 17 y 21**) y de la especie **Mar** (compuestos **9, 10, 11, 12 y 21**), la hidroxilación en C6 orienta la síntesis principalmente hacia la formación de **15**, compuesto típico de la especie **Msp**.<sup>2,30</sup> Debido a la compleja fitoquímica de los AE en general, y a los de menta en particular, es necesario diferenciar los compuestos “representativos” de los “característicos”. Mientras que los primeros se encuentran en todos los AE de una determinada especie de menta, ya sea de forma minoritaria o mayoritaria (con porcentajes superiores al 0,5-1,0%); los compuestos característicos vienen definidos por una o más sustancias cuya concentración es característica para cada AE. Esta diferenciación es fundamental para determinar la calidad del AE y para precisar sus propiedades organolépticas.<sup>33</sup>

Como resultado de una compleja biosíntesis estereoespecífica, la mayoría de los componentes de los AE son quirales y se corresponden con un solo compuesto del par enantiomérico. Antiguamente, la única propiedad física con la cual se podía diferenciar a los enantiómeros era mediante la rotación óptica ( $\alpha_D$ ) medida con un polarímetro. Así, los que

desviaban el plano de la luz polarizada hacia la derecha (dextrógiros) se los identificaba con el símbolo (+) o *d*- y los que lo hacían hacia la izquierda (levógiros) con el símbolo (-) o *l*-. Dicha notación, antecedida al nombre del compuesto, aún se sigue utilizando en el campo de los AE (Figura 1). Sin embargo, dicha simbología nada tiene que ver con la configuración absoluta del o los centros asimétricos presentes en los compuestos, los cuales vienen identificados con los descriptores estereoquímicos *R/S* (*rectus/sinister*) conforme a las reglas de secuencia de la convención Cahn-Ingold-Prelog (CIP).<sup>18</sup> Los compuestos representativos de los AE de las principales especies de mentas se recogen en las Tablas 2-5. De todos ellos, la (*R*)-(+)-pulegona **8** es el de mayor interés para esta investigación debido a su toxicidad.

**Tabla 2.** Compuestos representativos del AE de *Mpi* y sus concentraciones relativas.<sup>10,11,13.</sup>

<b><i>Mentha x piperita</i> L. (<i>Mpi</i>)</b>				
Componentes	ISO 856:2006 <sup>10</sup>		IRAM 18517:2013 <sup>11</sup>	Farmacopea Europea <sup>13</sup>
	Dif. orígenes Mín. - Máx. (%)	USA Mín. - Máx. (%)	Argentina Mín. - Máx. (%)	Europa Mín. - Máx. (%)
Mentol	32,0 - 36,0	36,0 - 45,0	30,0 - 55,0	30,0 - 55,0
Mentona	13,0 - 28,0	15,0 - 23,0	14,0 - 32,0	4,0 - 32,0
Isomentona	2,0 - 8,0	2,0 - 4,5	1,5 - 10,0	1,5 - 10,0
Acetato de mentilo	2,0 - 8,0	3,0 - 6,5	2,5 - 10,0	2,8 - 10,0
1,8-Cineol	3,0 - 8,0	4,0 - 6,0	3,5 - 9,0	3,5 - 8,0
Mentofurano	1,0 - 8,0	1,5 - 6,0	1,0 - 9,0	1,0 - 8,0
Neomentol	2,0 - 6,0	2,5 - 4,5	2,5 - 6,0	Sin especificar
<b>Pulegona</b>	<b>0,5 - 3,0</b>	<b>0,5 - 2,5</b>	<b>Máx. 4,0</b>	<b>Máx. 3,0</b>
$\beta$ -Cariofileno	1,0 - 3,5	1 - 2,5	0,4 - 1,5	Sin especificar
Limoneno	1,0 - 3,0	1,0 - 2,5	1,0 - 5,0	1,0 - 3,5
<i>trans</i> -Sabineno hidrato	0,5 - 2,0	0,5 - 2,3	0,1 - 0,5	Sin especificar
3-Octanol	0,1 - 0,5	0,1 - 0,4	0,1 - 0,4	Sin especificar
Piperitona	Sin especificar	Sin especificar	- 1,0	Sin especificar

**Tabla 3.** Compuestos representativos del AE de *Mar* y sus concentraciones relativas.<sup>10,13</sup>

<b><i>Mentha arvensis</i> L. (<i>Mar</i>) (desmentolada)</b>				
Componentes	Farmacopea Europea <sup>13</sup>	ISO 9776:1999 <sup>10</sup>		
	Europa Mín. Máx. (%)	China Mín. Máx. (%)	India Mín. Máx. (%)	Otros Orígenes Mín. Máx. (%)
Mentol	30,0 - 50,0	33,0 - 45,0	33,0 - 45,0	30,0 - 46,0
Mentona	7,0 - 35,0	18,0 - 30,0	17,0 - 26,0	17,0 - 32,0
Isomentona	5,0 - 13,0	8,0 - 12,0	8,0 - 14,0	6,0 - 13,0
Neomentol	Sin especificar	4,0 - 8,0	4,0 - 10,0	3,0 - 11,0
Acetato de mentilo	1,5 - 7,0	1,5 - 4,0	1,5 - 5,0	2,0 - 7,0
Limoneno	1,5 - 7,0	1,5 - 4,0	1,0 - 4,0	1,0 - 7,0
<b>Pulegona</b>	<b>Máx. 1,5</b>	<b>0,5 - 2,5</b>	<b>0,5 - 2,5</b>	<b>0,5 - 2,5</b>
3-Octanol	Sin especificar	0,5 - 3,0	0,2 - 1,8	0,2 - 2,0
1,8-Cineol	Máx. 1,5	0,3 - 1,5	0,2 - 1,0	0,1 - 2,0
$\beta$ -Cariofileno	Sin especificar	0,5 - 2,0	0,5 - 2,0	0,5 - 2,0
Isopulegol	1,0 - 3,0	Sin especificar	Sin especificar	Sin especificar
Carvona	Máx. 2,0	Sin especificar	Sin especificar	Sin especificar

**Tabla 4.** Compuestos representativos del AE de Mpo y sus concentraciones relativas.<sup>2</sup>

<b>Mentha pulegium L. (Mpo)</b>	
<b>Componentes</b>	<b>Lawrence, B. M. <sup>2</sup> Mín. - Máx. (%)</b>
<b>Pulegona</b>	<b>50,0 – 80,0</b>
Isomentona	1,0 – 10,0
Mentona	1,5 – 8,0
Piperitenona	0,5 – 3,5
Limoneno	0,1 – 3,5
3- Octanol	0,5 – 3,0

**Tabla 5.** Compuestos representativos del AE de Msp y sus concentraciones relativas.<sup>10,13</sup>

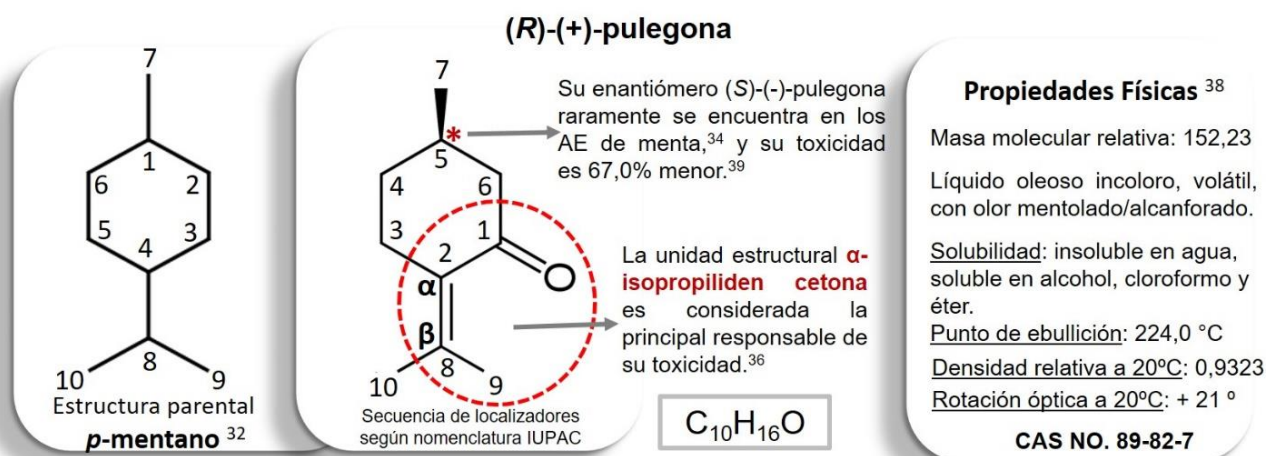
<b>Mentha spicata L. (Msp)</b>			
<b>Componentes</b>	<b>ISO 3033-3:2005 <sup>10</sup></b>		
	<b>India Mín. - Máx. (%)</b>	<b>China tipo 80% Mín. - Máx. (%)</b>	<b>China tipo 60% Mín. - Máx. (%)</b>
Carvona	60,0 - 70,0	78,0 - 84,0	57,0 - 66,0
Limoneno	11,5 - 16,5	0,5 - 3,0	10,0 - 22,0
cis-Dihidrocarvona	1,0 - 2,5	2,0 - 4,0	2,0 - 4,0
trans-Dihidroacetato	0,1 - 0,6	1,5 - 4,0	1,5 - 3,5
Mentona	Máx. 0,15	0,8 - 2,0	0,8 - 2,0
β-Bourboneno	1,0 - 2,0	0,5 - 1,2	0,5 - 1,2
3-Octanol	0,6 - 1,4	trazas - 0,4	0,2 - 0,8
trans-Sabineno hidrato	0,5 - 1,5	Máx. 0,1	Máx. 0,1
cis-Carvilacetato	0,1 - 0,6	0,1 - 0,3	0,1 - 0,3
cis-Jasmona	0,1 - 0,4	Máx. 0,1	Máx. 0,1

### 1.3 La pulegona: un compuesto natural potencialmente tóxico

La pulegona (PUL) es un MTO alicíclico con un arreglo estructural tipo “enona” característico de los compuestos carbonílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados; en particular, se trata de una cetona cíclica  $\alpha,\beta$ -insaturada (Figura 2). Debido a que su estructura presenta un centro asimétrico, son posibles dos formas enantioméricas: la (S)-(-)-pulegona, que rara vez se encuentra en los AE de menta,<sup>34</sup> y la (R)-(+)-pulegona que se presenta naturalmente en dichas esencias y en el de otras hierbas sápidas-aromáticas y medicinales como la peperina (35-64,3%),<sup>12</sup> el falso poleo (30%),<sup>2</sup> la muña-muña (19,2%)<sup>14a</sup> y a muy bajas concentraciones, en el oregano, el té y los frijoles.<sup>35</sup> La toxicidad de esta sustancia es conocida desde la antigüedad, de hecho, los términos “pulegona” y “pulegium” derivan del latín “pulex” (pulga), en alusión al poder insecticida y repelente de la Mpo contra las pulgas.<sup>2,36,37</sup> Asimismo, sus posibles efectos vinculados con partos prematuros y abortos espontáneos<sup>28</sup> son muy conocidos por la medicina popular local y han sido, desde la antigüedad, transmitidos de generación en generación.

<sup>a</sup> Una hierba nativa argentina con propiedades afrodisíacas muy valoradas por las etnias autóctonas.<sup>14</sup>

De las tres especies de mentas de mayor uso alimenticio, solo la Mpi y la Mar poseen concentraciones suficientes de PUL que justifican su regulación por parte de los entes normativos. Entre ambas, la Mpi es la que exhibe una mayor concentración. En cuanto a la Mpo, su empleo en la industria alimentaria es controvertido puesto que, debido a su fragancia, algunas reglamentaciones permiten su uso solo como aromatizante.<sup>8</sup> Sin embargo, el CAA no contempla su utilización puesto que, como puede apreciarse en la Tabla 4, de todas las especies de mentas, es la que posee la mayor concentración de PUL (50-80%).<sup>2</sup>



Nombre común: **(+)-pulegona**; Nombre sistemático: **(R)-(+)-2-isopropiliden-5-metilciclohexanona**; Nombre semisistemático: **p-ment-4(8)-en-3-ona**.<sup>32,38</sup>

**Figura 2.** Estructura, nomenclatura y principales propiedades físicas de la (R)-(+)-pulegona.<sup>38b</sup>

Debido a que sus características organolépticas son similares a las de otras mentas, la Mpo suele ser confundida y utilizada (especialmente en el ámbito familiar) con la misma finalidad, lo que supone un gran riesgo toxicológico. En Argentina, por ejemplo, es muy frecuente el uso del poleo (*Lippia turbinata* Griseb),<sup>14</sup> una hierba sávido-aromática con propiedades digestivas y carminativas que no pertenece al género *Mentha*, no contiene PUL y es muy utilizada en infusiones, licores y bebidas aperitivas amargas.<sup>9</sup> Por compartir la misma denominación que la Mpo (a la cual también se la suele llamar poleo), ésta última puede ser utilizada en su lugar, aumentando así el grado de exposición y los riesgos toxicológicos.

La confusión puede darse a la inversa, por ejemplo, una reconocida empresa líder argentina de yerba mate compuesta (yerba mate adicionada con hierbas aromáticas), traduce al idioma inglés en el rótulo de sus envases el término “poleo” como “pennyroyal”, que es la traducción de la “*menta poleo*”<sup>9</sup> (Figura 3). Este error, sin ser de gravedad en términos

<sup>b</sup> En este trabajo, la secuencia de localizadores en la estructura de la (R)-(+)-pulegona se indicará conforme al p-mentano, cuando se haga referencia a su biosíntesis y a la IUPAC cuando se haga alusión a su metabolismo y reactividad.<sup>32</sup>

toxicológicos, evidencia la importancia del primer objetivo específico planteado en este trabajo. Una confusión similar puede ocurrir con la hierba silvestre “*peperina, peperita o menta peperina*” (*Minthostachys mollis* Kunth Griseb) que no pertenece al género *Mentha* pero por su denominación y aroma mentolado suele ser confundida con la “*menta piperita*”. Mientras que la primera posee un 35-64,3% de PUL<sup>12</sup> en la segunda, el porcentaje es solo del 0,5-4%.<sup>10</sup>



**Figura 3.** Traducción errónea del término *poleo* por *pennyroyal* (*menta poleo*) en el rótulo de un envase de yerba mate compuesta.

Tradicionalmente, el AE y los extractos e infusiones de Mpo han sido utilizados en la medicina popular como emenagogo, es decir, como estimulante o regulador de la menstruación y también como abortivo.<sup>5,37,39,40</sup> Aunque para esta última finalidad, no existan evidencias científicas certeras y el efecto sea atribuido a una posible irritación uterina seguida de intensas contracciones detectadas en ensayos con roedores,<sup>40,41</sup> su ingesta durante el embarazo está contraindicada.<sup>41,42</sup> Autores como Lamiri y col. han señalado que dosis de 1 a 3 mínimos de PUL (1 mínimo = 0.065 g) son suficientes para inducir la menstruación.<sup>43</sup> El consumo reiterado de dosis elevadas no solo está asociado a severos cuadros hepatotóxicos sino que, en muchos casos, han ocasionado la muerte de las pacientes.<sup>40,44</sup>

#### **1.4 Formas usuales de exposición humana hacia la (R)-(+)-pulegona**

---

Los AE son considerados aditivos A/S naturales, es decir, mezclas de sustancias naturales con propiedades odoríferas y/o sápidas, capaces de conferir o intensificar el aroma y/o el sabor de los alimentos.<sup>45</sup> Si bien estos aditivos reciben diferentes denominaciones de acuerdo a la traducción del idioma y del país en que se haga, en este trabajo se los considera como sinónimos de los términos aromatizantes, saborizantes y aromas alimentarios utilizados en la UE,<sup>46</sup> y de los vocablos ingleses *flavor*<sup>c</sup> y *flavoring* (USA) o *flavour* y *flavouring*

---

<sup>c</sup> El término *flavor* o *flavour* puede comprenderse como el conjunto de percepciones de estímulos olfativos, gustativos, táctiles y kinestésicos que permiten a un individuo identificar a un determinado producto.<sup>19</sup>



(Inglaterra).<sup>8</sup> Dentro de este contexto, es imprescindible diferenciar los A/S naturales de los A/S sintéticos, que son compuestos químicamente definidos obtenidos por síntesis o aislados de fuentes naturales mediante procedimientos químicos y que poseen estructuras idénticas a las sustancias presentes en los AE.<sup>45</sup>

Conforme a lo expuesto, la forma primaria de exposición es a través del consumo de alimentos que contienen AE de menta con fines A/S.<sup>47,48</sup> De acuerdo a la ingesta diaria per cápita, las especies más utilizadas son Mpi, Msp y, en menor medida, Mpo.<sup>8</sup> Los principales alimentos incluyen golosinas (caramelos, pastillas, gomas de mascar y chocolates),<sup>3,4,39,48</sup> productos horneados (pudines),<sup>4,39,48</sup> helados y postres lácteos congelados,<sup>39,48</sup> gelatinas,<sup>48</sup> bebidas alcohólicas (licores) y analcohólicas como los refrescos saborizados.<sup>39,48</sup> Un estudio realizado por Johnson y Tan en 2014 evaluó el porcentaje de liberación de los principales componentes del AE de Mpi tras la masticación durante 5, 10 y 20 min de una goma de mascar (2,7 g) adicionada con dicha esencia. Las muestras fueron extraídas con cloroformo y el extracto analizado mediante GC-MS, detectándose concentraciones del orden del 16,7 - 25,0 y 41,7% de PUL (Tabla 6).<sup>8</sup> Dado que los AE de menta también son empleados como conservantes naturales para prolongar la vida media de los alimentos (shelf-life),<sup>4</sup> esto supone un espectro aún más amplio de productos que pueden contenerlos.

**Tabla 6.** Evaluación del porcentaje de PUL liberada tras la masticación de una goma de mascar conteniendo AE de Mpi (Johnson y Tan, 2014 citado por Cohen y col.).<sup>8</sup>

Constituyentes	% de liberación		
	5 min	10 min	20 min
I-Mentol	12,1	17,1	28,1
I-Mentona	15,1	18,9	28,1
Isomentona	14,0	23,3	32,6
Acetato de metilo	7,0	9,3	14,0
Limoneno/ 1,8-cineol	22,7	27,3	36,4
Mentofurano	17,9	21,4	28,6
β-Cariofileno	5,6	11,1	11,1
<b>Pulegona</b>	<b>16,7</b>	<b>25,0</b>	<b>41,7</b>

Por otro lado, debido a las propiedades estimulantes, digestivas, carminativas, antiespasmódicas, saporíferas, antiinflamatorias y antihelmínticas de las mentas en general,<sup>3</sup> otra forma importante de exposición es a través de los productos medicinales herbarios como las hojas deshidratadas para infusiones.<sup>48</sup> Ésto plantea grandes riesgos puesto que, aunque no existan efectos toxicológicos informados a partir de la ingesta de AE o de infusiones de Mpi,<sup>48</sup> el consumo reiterado de la especie Mpo (la de mayor porcentaje de PUL) por equivocación, desconocimiento y hasta por una inexacta identificación por parte del mercado herbolario,<sup>3</sup> puede resultar potencialmente peligrosa.

Por ejemplo, una infusión preparada con 50 g de hojas disecadas de Mpo en 1.000 mL de agua hirviendo, tras ser sometida a un proceso de extracción y analizada mediante GC, revela la existencia de un 75,9% de PUL. Es decir que, una taza de té de 250 mL, contendría aproximadamente 0,06 g de PUL, la dosis requerida para inducir la menstruación y favorecer el parto.<sup>43,49</sup> Dado que solo el análisis micrográfico puede identificar y diferenciar correctamente a cada una de las especies de mentas,<sup>9</sup> y éste no siempre se realiza, se recomienda que el principal grupo de riesgo (sano) frente a la PUL como son los niños y las embarazadas no ingieran infusiones de ninguna especie de menta.<sup>50</sup>

Además de los reconocidos usos en productos cosméticos, como las pastas dentales para proporcionar buen aliento y minimizar el crecimiento bacteriano,<sup>7</sup> en los últimos tiempos se ha visto un gran incremento de la utilización del AE de Mpi (o sus extractos) en farmacología, ya sea como principio activo o como excipiente.<sup>48</sup> Así, colagogos comerciales (Cholagogum Nattermann®), medicamentos gastrointestinales (Gastricholan®, Iberogast®, Ventrodigest®, Colpermint®, Gaviscon®), hipnóticos y sedativos (Nerventee Stada®, Esberinervin®), bálsamos expectorantes (Pinimenthol Forte®) y suplementos dietarios,<sup>28,31</sup> también representan diferentes formas de exposición. Recientemente, los principales portales médicos internacionales se han hecho eco de las alarmantes concentraciones de PUL halladas en los compuestos a base de menta y mentol utilizados en los cigarrillos electrónicos y en el de otros productos como el tabaco sin humo, detectándose niveles muy superiores a los establecidos por la FDA para la ingesta de alimentos.<sup>51</sup>

## **1.5 Absorción, metabolismo y excreción**

---

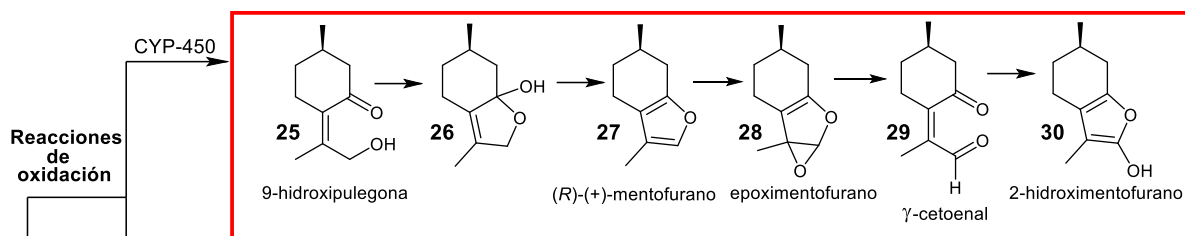
### **Absorción oral**

Aunque no existan estudios toxicocinéticos formales en seres humanos,<sup>48</sup> múltiples investigaciones llevadas a cabo tanto *in vitro* como *in vivo* en humanos y roedores,<sup>36,39</sup> han demostrado que la PUL, tras su ingreso de forma oral,<sup>48</sup> es absorbida rápidamente en el tracto intestinal y metabolizada en el hígado a través de diferentes vías enzimáticas caracterizadas por la formación de determinados metabolitos secundarios (Figura 4). Cada una de estas vías responden al curso normal de desintoxicación de xenobióticos (sustancias extrañas del cuerpo humano) y consisten, a excepción de la conjugación directa (**VÍA D**), en procesos primarios de oxidación o reducción que conducen a la formación de metabolitos hidrosolubles por introducción de grupos polares (reacciones de Fase 1), seguidos de conjugaciones con moléculas endógenas como ácido glucurónico o glutatión (reacciones de Fase 2) para formar especies fácilmente eliminables por la orina.<sup>16</sup>

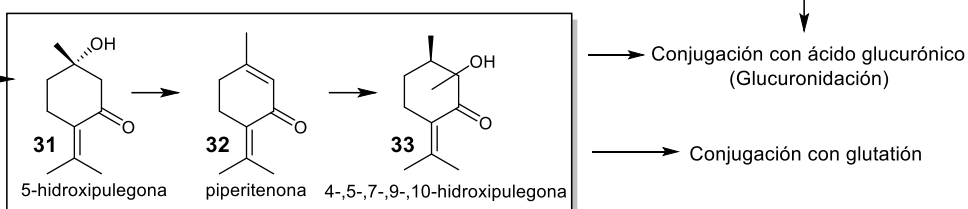
Evidencias experimentales demuestran que los AE con bajas concentraciones de PUL no son tóxicos puesto que ésta se metaboliza completamente mediante la conjugación directa con glutatión (reacción de Fase 2 en **VÍA D**).<sup>48</sup> El glutatión (GSH) es un tripéptido muy abundante en las células hepáticas que participa en la desintoxicación xenobiótica y por ende, en la protección tisular. Posee un GF sulfhidrilo (-SH) que, actuando como nucleófilo, se conjuga con el doble enlace del grupo isopropilideno de la PUL produciendo derivados mercaptúricos **38** fácilmente eliminables a través de la orina. Frente a grandes dosis de PUL se ha comprobado que su concentración disminuye drásticamente, aproximadamente un 75% en 3 h,<sup>39,48</sup> el metabolismo se satura y queda PUL sin conjugar que se bioactiva principalmente a través de la **VÍA A**, generando metabolitos extremadamente hepatotóxicos como los representados dentro del recuadro rojo de la Figura 4.

### VÍAS METABÓLICAS USUALES ANTE LA INGESTA DE ALTAS CONCENTRACIONES DE PUL

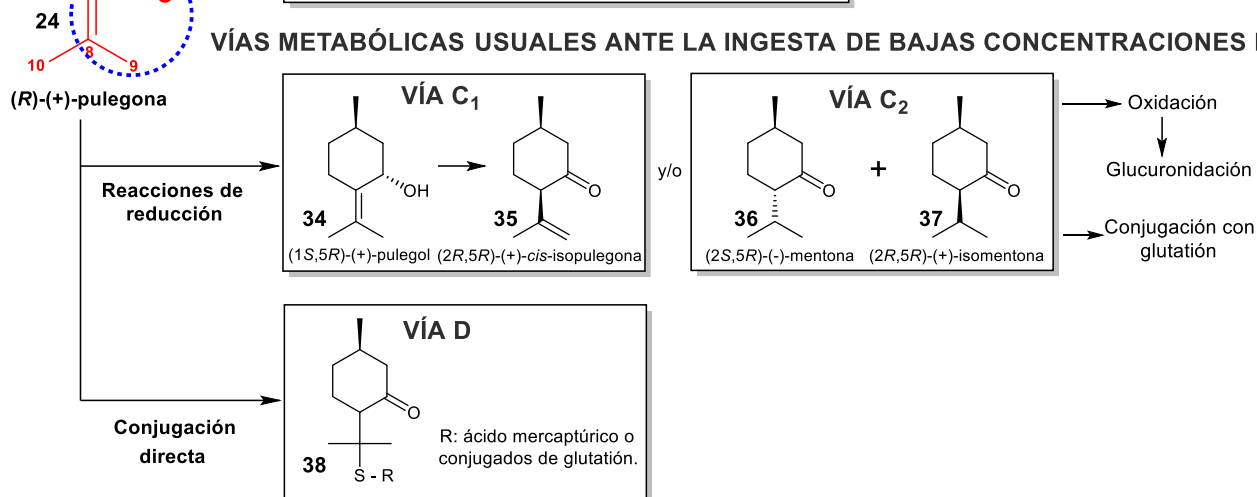
#### VÍA A: vía metabólica principal



#### VÍA B: vía metabólica secundaria



### VÍAS METABÓLICAS USUALES ANTE LA INGESTA DE BAJAS CONCENTRACIONES DE PUL



**Figura 4.** Principales vías metabólicas de la (R)-(+)-pulegona y sus correspondientes metabolitos secundarios (adaptado de Gordon y Khojasteh).<sup>36</sup>

Ante un exceso de PUL, la principal vía metabólica es la **VÍA A**, la cual involucra la hidroxilación del C9 de la PUL (**24**) para formar **25**, seguida de una ciclación intramolecular para generar un hemiacetal **26** que, posteriormente, se deshidrata para formar MF (**27**). El cual, a su vez, se transforma en  $\gamma$ -cetoenal (**29**), una especie muy reactiva responsable de daño hepático. El MF (**27**) es el metabolito mayoritario de la PUL y la toxicidad de ésta es debida, en parte, a su formación.<sup>35,36</sup> Así, algunos estudios llevados a cabo con roedores enfatizan que el MF es más tóxico que la PUL.<sup>36,39</sup> Sin embargo, otros estudios, realizados con tejido vivo de hígado humano, demuestran que la PUL es mucho más tóxica que el MF.<sup>52</sup> Frente a estos antecedentes, los principales referentes científicos recomiendan evaluar sus toxicidades de forma conjunta.<sup>35,47,48</sup> No obstante, se debe tener presente que, de acuerdo a la bibliografía, el porcentaje de MF que suelen presentar los AE es muy bajo. Hecho que hemos constatado en nuestras propias investigaciones al comprobar que, por ejemplo, en muestras comerciales de AE de Mar y Msp no se ha evidenciado la presencia de MF mientras que, en muestras de Mpi y Mpo los valores observados fueron de 0,2% y menores al 0,2% respectivamente.<sup>53</sup>

De acuerdo a lo expuesto, puede concluirse que la toxicidad de la PUL no es atribuible a su presencia "*per se*", sino a su bioactivación durante el proceso metabólico que la transforma en especies reactivas, en particular MF, el cual se convierte finalmente en compuestos altamente hepatotóxicos. Aunque el MF es un componente habitual de ciertas especies de mentas (principalmente Mpi) que contribuye al flavour del AE, su presencia en altas concentraciones es fácilmente detectable debido a la formación de compuestos con aromas y sabores desagradables, generados a partir de su propia autooxidación.<sup>2,54,55</sup> Por lo tanto, un AE con alto contenido de MF, debido a su potencial toxicológico, difícilmente puede superar los controles mínimos de calidad para ser utilizado con fines alimenticios.

La segunda vía metabólica en importancia cuando se han ingerido grandes concentraciones de PUL es la **VÍA B**, la cual involucra la hidroxilación del C5 de la PUL (**24**) para formar **31**, la generación de **32** por deshidratación, una posterior hidroxilación **33** y finalmente, una conjugación con GSH y/o ácido glucurónico.<sup>48</sup> En los mamíferos, las vías oxidativas están catalizadas por enzimas específicas pertenecientes al sistema Citocromo P450 (CYP-450). Curiosamente, la biotransformación *in vivo* de PUL a MF en las plantas de la especie Mpi, también están mediadas por enzimas CYP-450 y los compuestos intermedios son coincidentes con los de la biotransformación en los mamíferos.<sup>56</sup> Así, como puede apreciarse en la Figura 1, la biosíntesis normal de la PUL (**8**) tiende a la formación de los compuestos **9 a 12**, pero si las condiciones ambientales de la planta son hostiles (altas temperaturas, baja luminosidad, estrés hídrico, etc.),<sup>57</sup> la biosíntesis se orienta en gran medida hacia la formación de MF (**13**), lo que justifica su excesiva concentración en determinados AE.

Las vías metabólicas usuales cuando se ingieren bajas concentraciones de PUL, involucran fundamentalmente a la **VÍA D** (conjugación directa con GSH), a la **VÍA C<sub>1</sub>** (reducción de **24** a **34** y posterior isomerización reversible a **35** mediante posibles radicales libres intermedios),<sup>36,38,39</sup> y/o la **VÍA C<sub>2</sub>** (reducción de **24** a **36** y **37**). Para el caso de las vías metabólicas **C<sub>1</sub>** y **C<sub>2</sub>**, los metabolitos generados siguen procesos oxidativos que conllevan a posteriores glucuronidaciones y/o conjugaciones directas con GSH.<sup>44</sup>

### ***Absorción dérmica e inhalatoria***

Aunque no existen estudios dérmicos e inhalatorios formales,<sup>48</sup> se ha demostrado que la mentona, el mentol y la PUL podrían facilitar significativamente la absorción transdérmica de fármacos tanto lipofílicos como hidrofílicos. Aunque en menor grado que los dos primeros, la PUL debilitaría la barrera de permeabilidad del estrato córneo (la capa más externa de la epidermis) por interacción con la partes lipofílicas y polares de los lípidos intracelulares.<sup>58</sup> En cuanto a la absorción inhalatoria, investigaciones recientes han demostrado que la PUL es un potente irritante de las vías respiratorias inferiores (tráquea-bronquios-pulmones) y que actúa como ligando de los canales iónicos TRP (Transient receptor potential).<sup>59</sup>

Los TRP (tales como TRPA1, TRPV1 y TRPM8), son proteínas modulares que forman canales en las membranas celulares y que, al ser estimuladas de forma térmica, mecánica o química, activan una corriente catiónica de Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> responsable de las sensaciones de dolor, ardor, picor y frescor (como la causada por el mentol y los agentes de enfriamiento) entre otras.<sup>29,59</sup> En particular, la PUL actuaría como un potente agonista del canal TRPA1 (asociado directamente con la irritación y el dolor) y como activante parcial del canal TRPV1 y del TRPM8 (vinculado con la sensación refrescante producida por sustancias como el mentol). En este último caso, se ha detectado que la PUL podría incluso hasta inhibirlo, intensificando aún más sus efectos irritantes.<sup>59</sup>

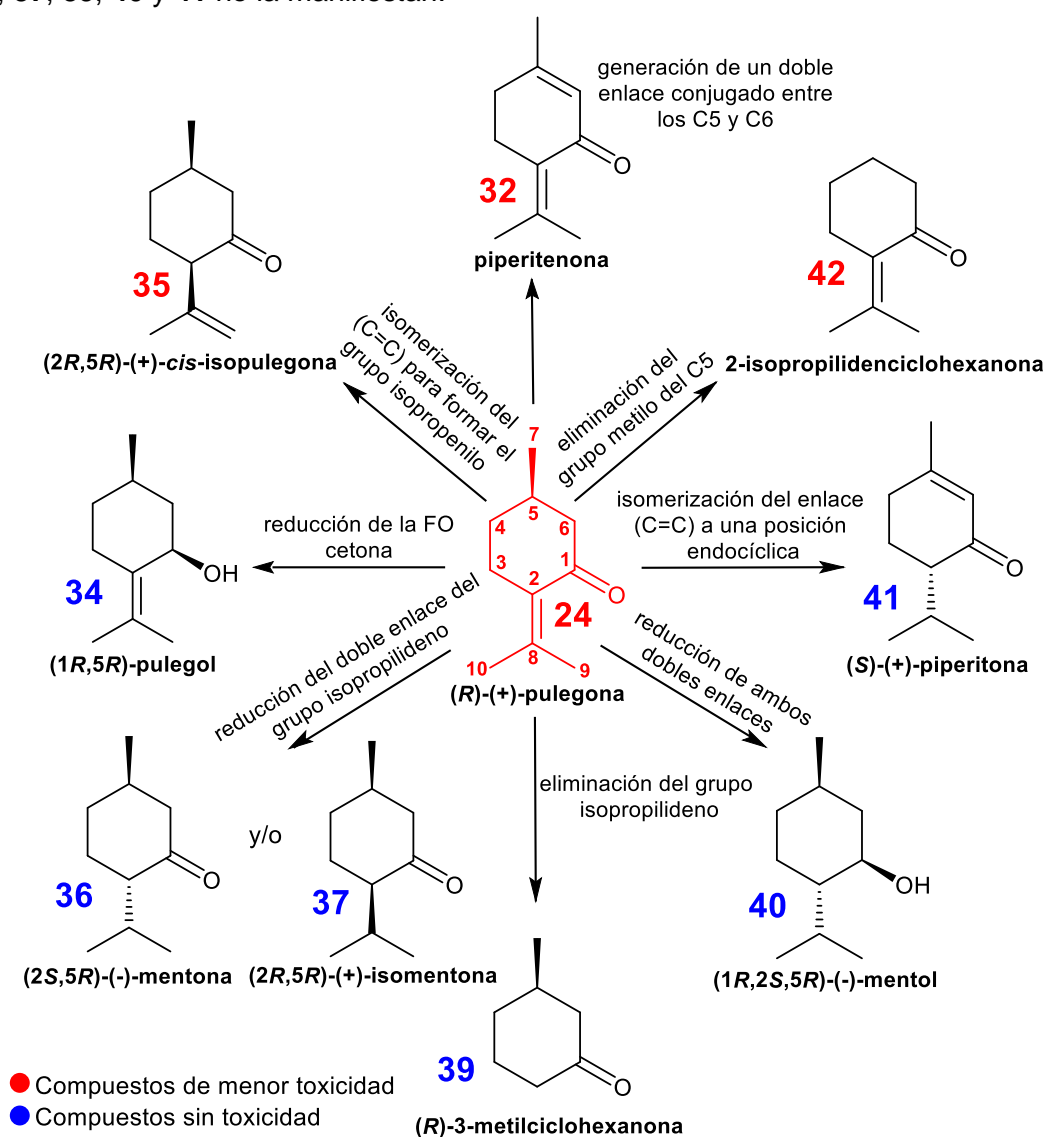
## **1.6 Toxicidad de la (R)-(+)-pulegona**

---

El interés toxicológico por la PUL comenzó a profundizarse a partir del año 1979 con la publicación de dos casos de mujeres jóvenes que habían ingerido AE de Mpo con fines abortivos y de las cuales una falleció.<sup>41</sup> Otros casos reportados,<sup>43</sup> inclusive el deceso de un lactante al cual se le había suministrado una infusión de Mpo como aliviador de cólicos,<sup>46</sup> motivaron una intensa investigación que, durante las últimas cuatro décadas, permitió comprender su metabolismo, toxicidad y establecer un marco regulatorio al respecto.<sup>37,39,43</sup> En términos generales, la toxicidad de esta sustancia puede ser comprendida a partir de cuatro indicadores interrelacionados y complementarios entre sí:

## Estructura

Estudios metabólicos en roedores permitieron asociar la toxicidad de la PUL (y MTO relacionados), a la unidad estructural “ *$\alpha$ -isopropiliden cetona*” (Figura 2).<sup>36,39</sup> La fácil hidroxilación del carbono alílico (C9) del grupo isopropilideno (isopropyliden group) en posición *syn* con respecto al carbonilo y la deslocalización electrónica entre éste y el doble enlace conjugado, propician la formación de compuestos altamente tóxicos como el MF. No obstante, determinadas reacciones efectuadas durante el transcurso de las vías metabólicas **B**, **C<sub>1</sub>**, **C<sub>2</sub>** y **D** demuestran que pueden originarse compuestos de menor toxicidad e inclusive, inocuos, tras la modificación de dicha unidad estructural (Figura 5). Así, los compuestos **32**, **35** y **42** poseen una hepatotoxicidad relativa inferior a la PUL mientras que los compuestos **34**, **36**, **37**, **39**, **40** y **41** no la manifiestan.<sup>35,36,60</sup>



**Figura 5.** Principales modificaciones estructurales de la *(R)*-*(+)*-pulegona llevadas a cabo durante las vías metabólicas de oxidación secundaria y de reducción.

Otro aspecto estructural importante es el estereoquímico. En cierto modo, la toxicidad es una cuestión estereoespecífica (o al menos, estereoselectiva), por ejemplo, observaciones histopatológicas y mediciones plasmáticas efectuadas en humanos con una enzima indicadora de enfermedades hepáticas como es la transaminasa glutámico-pirúvica, revelaron que la (S)-(-)-pulegona presenta una toxicidad equivalente a un tercio (33,33%) de la (R)-(+)-pulegona,<sup>39</sup> es decir, un 67% inferior. Esto puede ser explicado a partir de la estereoespecificidad de una enzima desconocida (o de identidad controvertida) que hidroxila el C9 de la (R)-(+)-pulegona transformándola en MF. Para el caso de la (S)-(-)-pulegona, en cambio, la enzima hidroxilaría su C10 dificultando la generación de MF y por lo tanto, disminuyendo su potencial toxicidad.<sup>34</sup>

### **Bioactivación**

Para que la toxicidad de la PUL se manifieste, es imprescindible su previa bioactivación por acción enzimática, es decir, su transformación en compuestos de elevada toxicidad durante la vía metabólica **A** o vía principal frente a grandes concentraciones de PUL. La oxidación de la misma, se lleva a cabo en el hígado de los mamíferos a través de enzimas CYP que generan compuestos muy reactivos como el MF (**27**), a partir del cual se derivan otros altamente electrofílicos como el **28** y el  $\gamma$ -cetoenal (**29**).<sup>35,39,47,48</sup> Este último, reacciona con los grupos nucleofílicos de las proteínas del hígado formando aductos covalentes que modifican las estructuras proteicas provocando una insuficiencia hepática caracterizada por una degeneración centrilobular y necrosis celular.<sup>36,44</sup>

También se ha evidenciado, en menor medida, necrosis pulmonar, renal y bronquial,<sup>35</sup> (para este último caso, solo en roedores suministrados con MF).<sup>39</sup> Las enzimas CYP-450 no solo cumplen un rol fundamental en la bioactivación de la PUL sino que, además, potencian su toxicidad. Al tratarse de enzimas fácilmente inducibles por diferentes sustancias, se ha observado que el tabaco y el consumo de alcohol incrementa su toxicidad.<sup>36</sup> Mientras que la genotoxicidad no ha podido ser demostrada, existen evidencias de efectos carcinogénicos en roedores (carcinomas hepáticos, metaplasia pulmonar y otros tipos de neoplasias)<sup>50</sup> que, a juicio de los referentes científicos, deben ser investigados con mayor profundidad.<sup>48</sup>

### **Reactividad**

Masomeh y col.<sup>31</sup> calcularon de forma teórica las energías de los orbitales frontera HOMO-LUMO (highest occupied and lowest unoccupied molecular orbital) de los principales componentes de la Mpi para determinar sus estabilidades y reactividades relativas (Tabla 7). La diferencia energética ( $\Delta E_{\text{Gap}}$ ) entre el orbital HOMO (donante de  $e^-$ ) y el LUMO (aceptor de  $e^-$ ) es un valioso indicador de la estabilidad termodinámica molecular (a mayor  $\Delta E_{\text{Gap}}$  mayor estabilidad y menor reactividad). Como puede observarse en la Tabla 7, tanto la PUL como el

MF son los menos estables y por lo tanto, los más reactivos.<sup>31</sup> Entre ambos compuestos, la PUL es la que posee un menor  $\Delta E_{\text{Gap}}$ , lo que evidencia la reactividad de la unidad estructural  $\alpha$ -isopropilidén cetona analizada previamente. Pero la reactividad de ambas sustancias no solo repercute en el aspecto biológico sino que, además, tiene incumbencia directa sobre lo tecnológico. En efecto, la estabilidad de un AE es muy importante durante su almacenamiento. La reactividad de la PUL y del MF propiciarían la isomerización de los MTO, el incremento de la densidad por polimerización y, junto a la fácil oxidabilidad del MF (asociada a la formación de productos perjudiciales para el aroma), darían cuenta de las principales causas del envejecimiento de los AE.

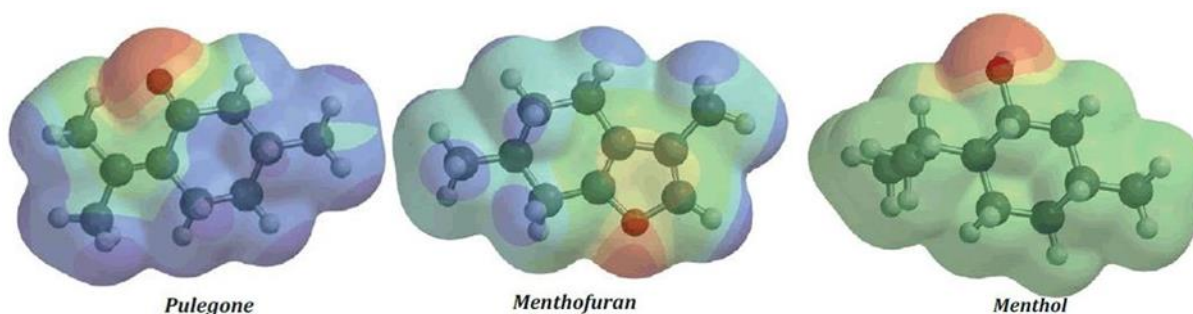
**Tabla 7.** Valores energéticos de los orbitales frontera HOMO-LUMO para los principales componentes de la Mpi calculados de forma teórica mediante el conjunto de bases Hartree-Fock model 3-21G (en medio acuoso) del software Spartan 10 V1.1.0.<sup>31</sup>

Compuestos	HOMO (eV)	LUMO (eV)	$\Delta E_{\text{Gap}}$ (eV)
Mentol	-10,9	6,0	16,9
Cineole	-10,1	6,3	16,4
Acetato de mentilo	-11,0	5,0	16,0
Mentona	-10,6	4,2	14,8
Isopulegol	-9,7	5,0	14,7
Isomentona	-10,3	4,4	14,7
Limoneno	-9,1	5,0	14,1
<b>Mentofurano</b>	<b>-8,4</b>	<b>4,8</b>	<b>13,2</b>
<b>Pulegona</b>	<b>-9,3</b>	<b>3,3</b>	<b>12,6</b>

Para predecir los posibles sitios reactivos en las moléculas de los principales componentes de la Mpi, estos mismos autores han calculado sus correspondientes Mapas de Potencial Electrostático (MPE o simplemente mapas de potencial), es decir, los diagramas tridimensionales aportados por la química computacional que representan la distribución de carga en una determinada especie química.<sup>26</sup> Para su interpretación, se hace uso de una convención de graduación de colores donde el rojo representa la mayor densidad electrónica, el verde la neutralidad y el azul la menor densidad electrónica.

Desde este contexto, como puede apreciarse en la Figura 6, tanto la PUL como el MF presentan, en comparación con el mentol, evidentes zonas nucleofílicas de alta densidad electrónica (color rojo) capaces de reaccionar con electrófilos y, al mismo tiempo, sectores electrofílicos (color azul) capaces de ser atacados por nucleófilos. Si bien la reactividad de estos sectores electrofílicos no se manifiestan en todos los procesos de transformación metabólica representados en la Figura 4, se evidencian durante el transcurso de las oxidaciones y conjugaciones con ácido glucurónico (reacciones de Fase 2) que el lector puede consultar en el trabajo de Cohen y col.<sup>8</sup>





**Figura 6.** Mapas de Potencial Electrostático de la PUL y el MF en comparación con el mentol realizado con la base Hartree-Fock de geometrías optimizadas del conjunto básico 3-21G.<sup>31</sup>

## Dosis

En este trabajo se entiende por dosis a la cantidad total de una sustancia (por ejemplo, un compuesto químico o un nutriente) suministrada, consumida o absorbida por un organismo, población o ecosistema individual.<sup>61</sup> Como ya se ha expresado, los AE con bajas concentraciones de PUL no son tóxicos puesto que ésta se metaboliza completamente mediante la conjugación directa con GSH. Frente a grandes dosis de PUL la concentración de GSH disminuye drásticamente (75% en 3 h),<sup>39,48</sup> el metabolismo se satura y queda PUL sin conjugarse que se bioactiva generando metabolitos extremadamente hepatotóxicos. La especie Mpo es la que presenta mayor hepatotoxicidad (la ingesta de 10 mL de AE puede producir daños moderados o severos y 15 mL o más, pueden ocasionar la muerte).<sup>36,48</sup> Como se abordará en el próximo apartado, el Comité de Expertos en Sustancias A/S (CEFS) del Consejo de Europa establece una ingesta diaria tolerable (IDT) de 0,1 mg/kg de peso corporal por día (pcd).<sup>48</sup>

### 1.7 Contexto normativo: concentraciones máximas permitidas, IDT

La legislación sobre los AE está supeditada al uso para el cual se destinen. Para fines alimenticios, son evaluados como A/S y confirmados por al menos tres organismos independientes autorizados: la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), la Asociación de Fabricantes de Aromas y Sabores (FEMA) de USA y el Comité Mixto de Expertos sobre Aditivos Alimentarios (JECFA) bajo la supervisión de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO).<sup>8</sup> A partir de ahí, pueden o no ser incorporados por los diferentes países (o grupos de países) a través de organismos específicos (FDA), códigos alimentarios (CAA), farmacopeas y demás reglamentaciones de salud pública.

La Comunidad Europea (CE o EC) ha determinado mediante el Reglamento 1334/2008 (que reemplaza a la Directiva 88/388 EEC preexistente), las concentraciones máximas de PUL y MF que deben contener los alimentos adicionados con A/S de menta. Para ambas sustancias se establece que las concentraciones máximas son dependientes de los tipos de alimentos que las contengan, y que ninguna puede ser adicionada como tal a los productos alimenticios ni a los A/S.<sup>46</sup> Actualmente, el CAA continúa manteniendo incorporada la antigua Directiva 88/388 EEC por lo que la descripción de los tipos de alimentos y sus contenidos máximos de PUL no son coincidentes con los especificados por la CE (Tabla 8).<sup>1,46</sup>

**Tabla 8.** Niveles máximos permitidos de PUL y MF conforme al Reglamento 1334/2008 y al CAA.

<b>Reglamento 1334/2008 Comunidad Europea (CE)</b>	<b>Mentofurano*</b>	<b>Pulegona*</b>
<b>Tipo de alimento</b>	Concentración Máx. (mg/kg)	
Bebidas no alcohólicas a base de menta	300	20
Bebidas alcohólicas a base de menta	sin especificar	100
Productos de confitería que contienen menta, excepto las micropastillas para refrescar el aliento	500	250
Goma de mascar	1000	350
Micropastillas para refrescar el aliento	3000	2000
* No debe ser adicionado como tal a los productos alimenticios o a los A/S.		
<b>CAA. Capítulo XVIII Aditivos Alimentarios (Resolución GMC N° 10/06). Incorporado del Anexo II de la ex Directiva 88/388 EEC</b>		<b>Pulegona*</b>
<b>Tipo de alimento</b>	Concentración Máx. (mg/kg)	
Alimentos	25	
Bebidas	100	
<b>Excepciones y/o restricciones especiales</b>		
Bebidas aromatizadas con menta	250	
Productos elaborados con menta (pastillas, caramelos y otros)	350	
* No debe ser adicionado como tal a los productos alimenticios o a los A/S. Puede aparecer en el producto alimenticio en estado natural, luego de la adición de A/S preparados a partir de materias primas naturales.		

Según el Comité de Productos Medicinales Herbarios (HMPC), las estimaciones de ingesta per cápita de PUL son muy variables y es difícil contabilizar una evaluación general de su exposición.<sup>48</sup> Dentro de este contexto, existen datos muy controversiales, por ejemplo, mientras que el CEFS establece una ingesta diaria tolerable (IDT) de 0,1 mg/kg de peso corporal por día (pcd), la UE recomienda una dosis máxima de 1,2 mL por día de AE de Mpi. De acuerdo a esto, considerando un AE de Mpi con una  $d_{20}^{20} = 0,916$  y un contenido máximo de PUL de 32,97 mg; una persona de 50 kg ingiere una dosis de 0,66 mg/kg pcd, claramente superior al IDT.<sup>48</sup> En esta investigación se tomará al IDT como parámetro de disminución del porcentaje de PUL (en página 60 del Anexo se presenta un ejemplo para su cálculo).

El IDT es un índice de toxicidad utilizado para evaluar riesgos en los alimentos y es obtenido a partir de estudios de dosis-respuesta para minimizar la exposición hacia los contaminantes químicos. Representa una estimación de la cantidad de sustancia presente en

un alimento o agua potable “*que no es agregada deliberadamente*” y que puede ser ingerida diariamente por un individuo a lo largo de su vida sin presentar un riesgo apreciable para su salud.<sup>61</sup> Se diferencia de la ingesta diaria admisible o aceptable (IDA), en que ésta última se refiere a sustancias “*que si son agregadas deliberadamente*” a los alimentos como es el caso de los aditivos alimentarios. Como la (R)-(+)-pulegona no es un aditivo, se habla en términos de IDT y no de IDA. Dentro de este contexto, el consumo de sustancias que aun siendo tóxicas, se encuentran asociadas inevitablemente a alimentos sanos y nutritivos, el término tolerable lleva implícito el significado de permisibilidad en lugar de aceptabilidad.<sup>62</sup>

## **1.8 Estandarización y parámetros de calidad para los aceites esenciales de menta**

---

En las últimas dos décadas se ha incrementado el interés, tanto de los consumidores como el de los empresarios, por los productos naturales de origen vegetal.<sup>15</sup> Esta preferencia puede comprenderse desde diferentes perspectivas, por un lado, cierta parte de la población ha optado cada vez más por consumir alimentos naturales (mínimamente procesados y sin aditivos sintéticos) y por el otro, los empresarios han vislumbrado un medio para promocionar sus productos. En efecto, además de actuar como A/S, los AE han demostrado importantes actividades biológicas con potenciales beneficios para la salud.

Sin embargo, dentro de la selección de los alimentos naturales hay que tener presente que natural no es sinónimo de inocuidad. Existen sobrados ejemplos de alimentos naturales que, como en el caso de los AE de menta, poseen compuestos químicos potencialmente peligrosos para la salud como es el caso de la (R)-(+)-pulegona. Desde esta perspectiva, resulta evidente la importancia que tiene la estandarización y el uso de normas de calidad para el análisis y control de los AE, mas aún, si se tiene en cuenta la enorme versatilidad que existe entre lo que el mercado exige y lo que la naturaleza ofrece.<sup>15</sup>

La estandarización surge como una necesidad de normalizar la calidad de un producto y no solo para cumplimentar con las exigencias industriales que requieren las mismas características (con independencia del origen, año y época de cosecha) si no que, además, surge como una obligación para asegurar la inocuidad de los mismos.<sup>15</sup> Dentro de este contexto, los AE en general y los de menta en particular, deben cumplimentar con una serie de exigencias normativas que, para el caso particular de la República Argentina, están especificadas en el CAA a través de los Artículos N° 1300 (incisos 28,30 y 31) y N° 1302 del Capítulo XVI: Correctivos y Coadyuvantes y las técnicas para llevarlas a cabo, regladas mediante Normas IRAM-SAIPA, IRAM, ISO y por la Farmacopea Argentina, las cuales se resumen y exponen en el Anexo de esta memoria.

## 2 OBJETIVOS

---

### 2.1 *Objetivo general*

---

Realizar una revisión e investigación bibliográfica sobre las reacciones químicas destinadas a disminuir el contenido de (*R*)-(+)-pulegona en aceites esenciales de menta de uso alimenticio, en particular, de las especies *Mentha x piperita* L. (Mpi) y *Mentha arvensis* L. (Mar). Incluyéndose, además, la *Mentha pulegium* L. (Mpo) por su importancia toxicológica.

### 2.2 *Objetivos específicos*

---

- a) Confeccionar un cuadro integrador de las diferentes denominaciones (nombres comunes, botánicos y sinónimos), aplicaciones y porcentajes relativos de PUL de las principales mentas de uso alimenticio, junto al de las hierbas silvestres poleo y peperina para que pueda ser utilizado como marco de referencia y advertencia ante posibles usos o aplicaciones erróneas.
- b) Especificar y describir los indicadores de toxicidad de la pulegona en relación a su estructura, bioactivación, reactividad y dosis para justificar sus efectos hepatotóxicos.
- c) Dilucidar y fundamentar los mecanismos de reacción implicados en las diferentes reacciones destinadas a disminuir el contenido de (*R*)-(+)-pulegona en los AE de las especies de menta analizadas en este trabajo, para evaluar posibles modificaciones que permitan optimizar las condiciones experimentales, la calidad de los productos y el rendimiento de los mismos.
- d) Contrastar las diferentes ventajas y desventajas de las metodologías investigadas a modo de directrices fundamentales que permitan ser consideradas en futuras líneas de investigación.
- e) Proporcionar el fundamento y el interés analítico de los diferentes ensayos exigidos por los organismos de control en relación a la determinación de las propiedades organolépticas, fisicoquímicas y cromatográficas que permitan constatar y estandarizar la calidad de los aceites esenciales de menta.

### 3 DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN BIBLIOGRÁFICA

---

Este trabajo de investigación bibliográfica se enmarca dentro de una metodología de carácter cualitativo. La búsqueda bibliográfica se realizó a partir de la consulta efectuada en las siguientes bases de datos: Web of Science, Google Scholar, Google Book, SciFinder Scholar, Scopus, PubMed, ScienceDirect, Elsevier y SciELO mediante las siguientes palabras claves (keywords): pulegone, reduction pulegone, mentha, essential oil, mentha essential oil, pulegone toxicity, regulation pulegone, mentha piperita, mentha arvensis, mentha pulegium y mentha spicata.

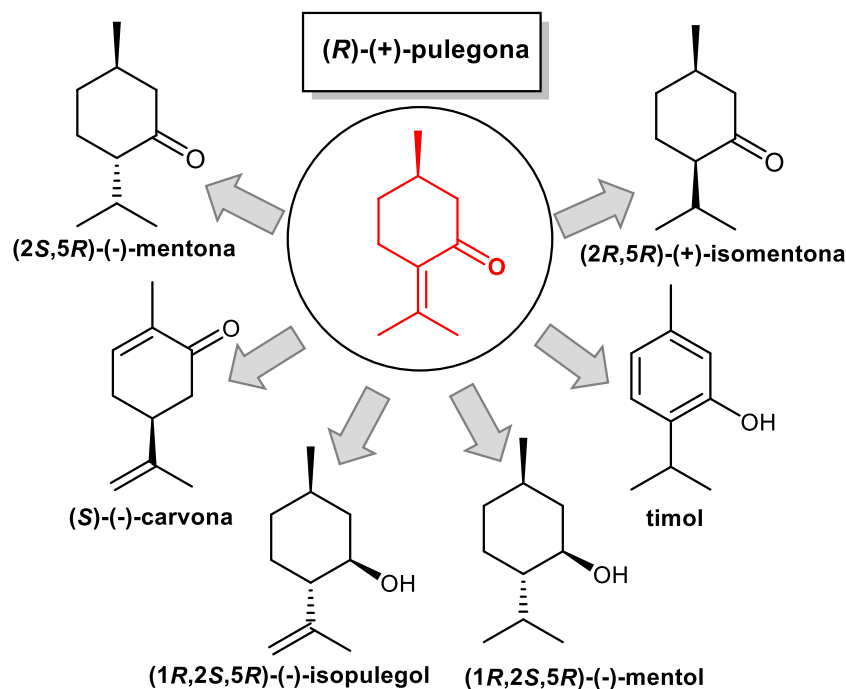
La elección de la bibliografía se realizó en función de los correspondientes índices (en el caso de libros y monográficos tanto digitales como en soporte papel) y en función de las palabras claves presentes en los títulos de los trabajos de investigación y de la información proporcionada en sus correspondientes resúmenes. Igual metodología fue implementada para la consulta de patentes. Una vez seleccionada la bibliografía, en el caso de los libros se analizaron los correspondientes capítulos y en el caso de las revistas y patentes se analizaron sus objetivos, el marco teórico y metodológico, los resultados, conclusiones y las referencias bibliográficas. A partir de dicho análisis preliminar, todo el material se dividió en categorías que, sin ánimo de ser taxativas, permitieron abordar la investigación desde diferentes aspectos: a) biosintético, b) toxicológico, c) normativo, d) químico y e) experimental.

#### 3.1 *Disminución del contenido de pulegona en aceites esenciales de menta mediante reacciones químicas*

---

Los AE en general, y los de menta en particular, son estratégicos reservorios naturales de compuestos con importantes actividades biológicas y de sustancias quirales (chiral pool) de bajo costo y gran disponibilidad para síntesis enantioselectiva.<sup>18</sup> Recientemente, estudios llevados a cabo mediante acoplamiento molecular (molecular docking), revelaron la posible utilidad de la PUL y otros MTO como potentes inhibidores de la proteína SARS-CoV-2 del COVID-19.<sup>63</sup> Al tratarse de recursos renovables y fácilmente asequibles, representan además, una fuente de sustratos muy valorados en semisíntesis química para obtener compuestos similares a los aislados de la naturaleza pero con propiedades diferentes.<sup>64</sup>

En este sentido, la modificación estructural de un compuesto químico económico y renovable como la PUL, para obtener sustancias de mayor valor sintético (especialmente para la industria farmacéutica) o comercial (como el mentol y sus isómeros), con propiedades físicas, químicas, organolépticas y biológicas distintas (Figura 7), cuenta con amplios antecedentes bibliográficos.



**Figura 7.** Compuestos de mayor valor sintético o comercial factibles de obtener a partir de la modificación estructural de la (R)-(+)-pulegona (adaptado de Kumar y col.).<sup>65</sup>

Dado que los AE de menta con porcentajes de PUL que exceden a los normados son considerados industrialmente indeseables para fines alimenticios, cosméticos o medicinales, la mayoría de las investigaciones relacionadas con dichas transformaciones se han desarrollado con el objetivo de convertir a la (R)-(+)-pulegona en compuestos de mayor valor sintético o comercial, y no para disminuir su concentración y permitir que los AE sean utilizados especialmente por la industria alimentaria. Lo expresado puede corroborarse con la reciente revisión realizada por Kumar y col., quienes resumieron los principales métodos de conversión estructural de la PUL mediante reducción catalítica selectiva (Tabla 9).<sup>65</sup>

Si bien los autores proporcionan un análisis crítico en relación a las ventajas y limitaciones de cada uno de ellos, concluyen que su posible aplicación en el contexto de los AE debe ser objeto de investigación, particularmente, en lo relacionado con la funcionalidad de los catalizadores. En efecto, dado que la reacción de transformación se lleva a cabo en los centros activos de los catalizadores, éstos pueden sufrir procesos de envenenamiento y una consecuente disminución de actividad debido a la presencia de los demás constituyentes de los AE.

Pero no solo es una cuestión de rendimiento en el proceso de conversión por parte del catalizador sino que, además, toma preponderancia la posible modificación de la compleja fitoquímica del AE dando lugar a la aparición de propiedades organolépticas, físicas y

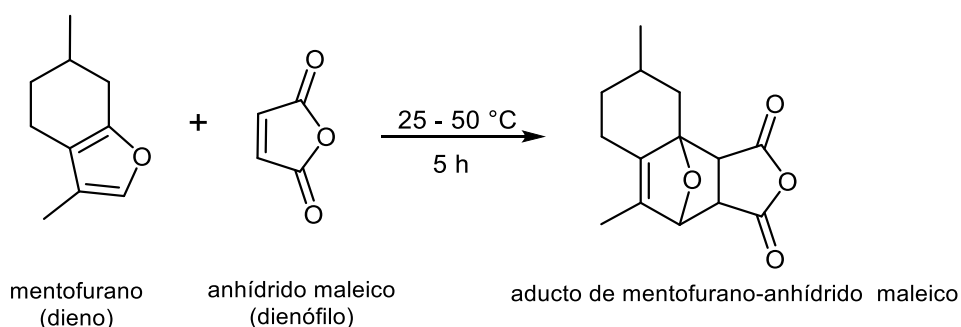
químicas indeseables. En este sentido, Kumar y col. expresan que han desarrollado catalizadores heterogéneos con metales de transición escasos en la naturaleza (tierras raras) que permiten, mediante estrategias one pot (en un solo reactor y sin separaciones y/o purificaciones posteriores), convertir la PUL en compuestos de gran valor comercial como mentol, mentona, isomentona, timol, etc. en condiciones muy suaves.<sup>65</sup> Si bien los autores proporcionan citas de sus propias investigaciones patentadas, éstas no pudieron ser consultadas por no encontrarse publicadas.

**Tabla 9.** Principales métodos de conversión estructural de la PUL mediante reducción catalítica selectiva (adaptado de Kumar y col.)<sup>62</sup>

Productos de reducción	Sistema catalítico	Referencias
<b>Mentona e Isomentona</b>	Catalizador de Pt soportado sobre SiO <sub>2</sub> para obtener mentona (28%) e isomentona (30%). Selectividad: 58%	Vetere y col., 2002 <sup>66</sup>
	Ni Raney + β-ciclodextrina (BCD). Selectividad: 98%	Ravi y col., 1999 <sup>67</sup>
	Hidrogenación mediante Pd/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> bajo CO <sub>2</sub> supercrítico. Selectividad: 98,6%. Proceso muy costoso con elevada inversión tecnológica.	Bogel-Lukasik, 2015 <sup>68</sup>
	Hidrogenación electrocatalítica con ánodos de Ni y cátodos de Fe/Ni y Cu. Selectividad (65-68%). Proceso muy costoso.	Lima y col., 2008 <sup>69</sup>
<b>Mentol y sus isómeros</b>	Catalizadores bimetalicos sin grupos orgánicos PtSn-BM. Selectividad: 83%. PtSn/SiO <sub>2</sub> . Selectividad: 99%	Vetere y col., 2002 <sup>66</sup>
	Ni Raney + β-ciclodextrina (0.1) + 0.3 mL de NaOH al 10%. Selectividad: 95.4%.	Ravi y col., 1999 <sup>67</sup>
<b>Pulegol y sus isómeros</b>	NaBH <sub>4</sub> + derivados de β-ciclodextrinas (BCD) + disolución alcalina para dar <i>cis</i> (-) pulegol. Selectividad: 99%	Ravichandran y col., 1996 <sup>70</sup>
	NaBH <sub>4</sub> para producir <i>cis</i> (-) pulegol (86%) más mentol e isómeros (14%).	Vetere y col., 2002 <sup>66</sup>
<b>Timol</b>	Proceso de reducción con CO <sub>2</sub> supercrítico + Rh/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> + H <sub>2</sub> a presión. Selectividad: 99,8%. Proceso extremadamente costoso.	Bogel-Lukasik, 2015 <sup>68</sup>
<b>Carvona</b>	Proceso de reducción con CO <sub>2</sub> supercrítico + Ru/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> + H <sub>2</sub> a presión. Selectividad: 99,4%. Proceso extremadamente costoso.	Bogel-Lukasik, 2015 <sup>68</sup>

En 1984, Blackwell y col., patentan un procedimiento para estabilizar el AE de Mpi mediante la disminución del contenido de MF.<sup>54</sup> El objetivo, netamente tecnológico y no toxicológico, está centrado en la disminución del MF, sustancia fácilmente oxidable y responsable de la formación de compuestos “*off-note*”, es decir, sustancias con “*notas*” o “*sensaciones al olfato*” desagradables y perjudiciales para el AE.<sup>19,55</sup> Se trata de una reacción pericíclica de Diels-Alder o reacción de cicloadición [4+2] donde el MF (dieno) reacciona con anhídrido maleico (dienófilo o filodieno), originando aductos que cristalizan a baja temperatura y se eliminan por filtración tras la reacción (Figura 8).<sup>54</sup> El término “*aducto*” (adduct) hace

alusión a los productos obtenidos mediante reacciones de adición, donde dos especies A y B se combinan para formar una nueva sin pérdidas de átomos.<sup>24</sup> Como las propiedades fisicoquímicas y organolépticas del AE no se ven afectadas, es un antecedente importante en tiempos donde no existía tanto interés y demanda de productos naturales o exentos de aditivos artificiales. En esta misma línea, nuevos dienófilos como las maleimidias *N*-sustituidas (imidias insaturadas derivadas del anhídrido maleico), fueron empleadas para disminuir el contenido de MF en AE de la especie *Mpi*.<sup>71</sup>



**Figura 8.** Reacción de Diels-Alder para la disminución del contenido de MF en un AE de *Mpi*, según la metodología propuesta por Blackwell y col.<sup>54</sup>

La disminución del contenido de PUL *in situ*, es decir, en el contexto de los AE que la contienen, plantea al menos tres desafíos importantes: 1) lograr su disminución sin modificar negativamente tanto la fitoquímica del AE como sus características organolépticas, 2) que la transformación sea eficiente, es decir, que en caso de utilizar catalizadores éstos no se envenenen por la presencia de los demás constituyentes y 3) que la metodología sea económica, segura en términos de salubridad y responda a los principios de la química verde. En el próximo apartado se abordará el análisis de reacciones específicas para disminuir el contenido de PUL en los AE de menta de uso alimenticio y los desafíos expuestos, obrarán como principios rectores para obtener conclusiones fundadas que permitan su posible utilización en el contexto planteado por este trabajo.

### **3.2 Reacciones químicas específicas para disminuir el contenido de pulegona en aceites esenciales de menta de uso alimenticio**

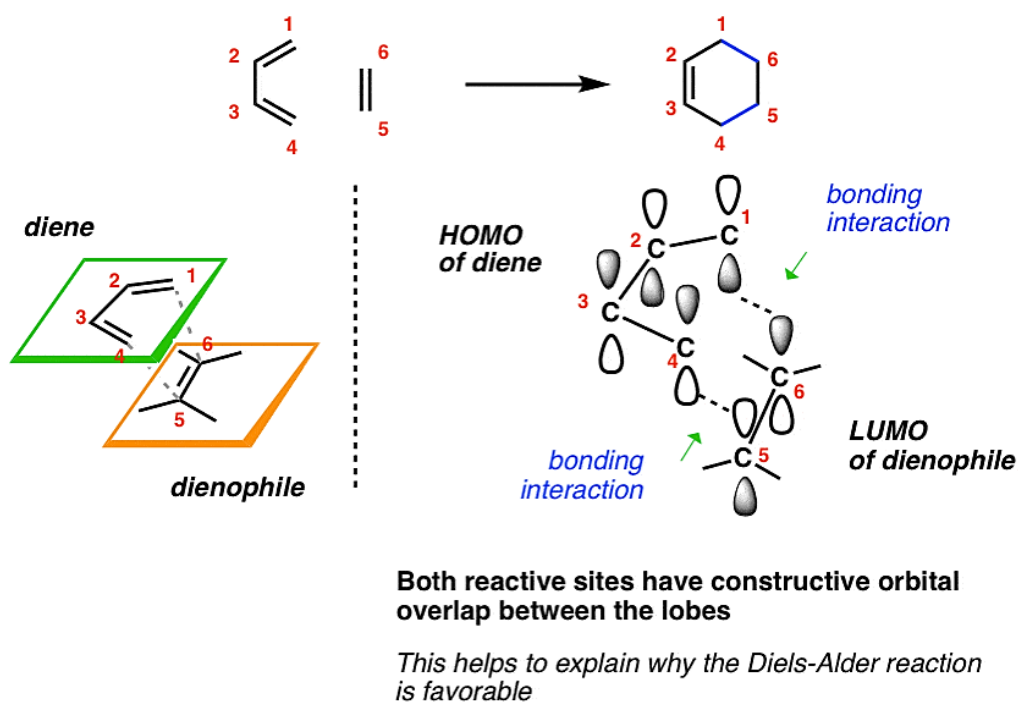
De la exhaustiva revisión bibliográfica efectuada solo se han encontrado dos reacciones específicamente destinadas a disminuir el contenido de (*R*)-(+)-pulegona en AE de menta de uso alimenticio (reacciones A y B). Dado que la reacción B utiliza el mismo reactivo empleado para purificar y cuantificar aldehídos y cetonas mediante la formación de aductos por adición de sulfito de sodio neutro, esta reacción (C) será analizada, también, como un posible procedimiento tendiente a disminuir el contenido de PUL en diferentes AE de menta.



### 3.2.1 **Reacción A:** Disminución del contenido de mentofurano y pulegona mediante una reacción de Diels-Alder

#### Fundamentación teórica

El método fue patentado por Sonya S. Johnson de la Wrigley Company (USA) en el año 1993 (U.S. Patent 5,204,128) y consiste en un procedimiento para disminuir de forma conjunta tanto el contenido de PUL como el de MF en los AE de las especies Mpi (principalmente), Mar y Msp. Se trata de una reacción de Diels-Alder donde el MF actúa como dieno y la PUL como dienófilo en presencia de un ácido de Lewis (HCl) como catalizador.<sup>55</sup> La eficiencia de la reacción se puede evaluar teniendo en cuenta tanto la estructura de las especies reaccionantes como el diagrama de orbitales moleculares frontera (FOM) de las mismas (Figura 9).<sup>72</sup> En una reacción de Diels-Alder de demanda electrónica normal, es decir, donde participan un dieno rico en electrones y un dienófilo electrónicamente deficiente, la principal interacción se produce entre el HOMO del dieno y el LUMO del dienófilo. Cuanto menor diferencia energética y mayor solapamiento exista entre ambos orbitales, la reacción ocurrirá de forma más rápida y eficiente.<sup>73</sup>

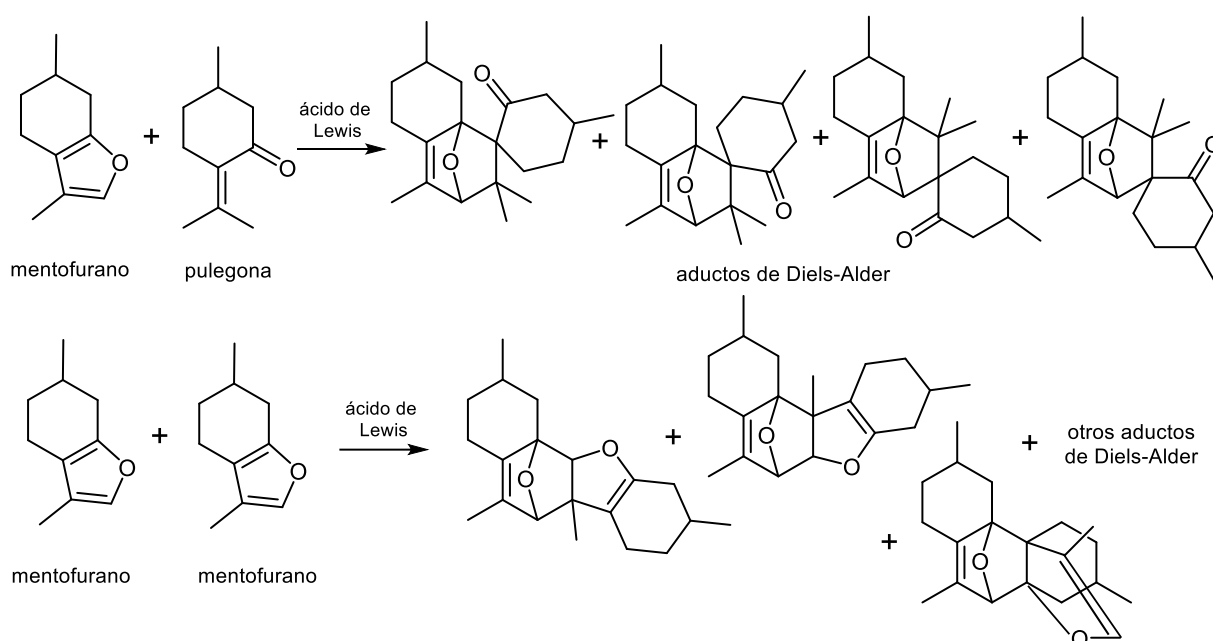


**Figura 9.** Representación esquemática y diagrama de orbitales moleculares frontera de una reacción de Diels-Alder.<sup>72</sup>

En 1960, Yates y Eaton descubrieron que un ácido de Lewis como el tricloruro de aluminio ( $\text{AlCl}_3$ ) era capaz de activar y acelerar la cicloadición de Diels-Alder, lo que supuso un gran avance para este tipo de reacciones.<sup>73</sup> El proceso de activación puede comprenderse

como un proceso de coordinación entre el ácido de Lewis y el grupo carbonilo contiguo al doble enlace del grupo isopropilideno de la PUL (que es el que actúa como dienófilo). Además de HCl y AlCl<sub>3</sub>, Johnson expresa que otros tipos de ácidos de Lewis pueden ser utilizados: trifluoruro de boro (BF<sub>3</sub>), estearato de trifluoruro de boro (BF<sub>3</sub>C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>), tetracloruro de estaño (SnCl<sub>4</sub>), trióxido de azufre (SO<sub>3</sub>) e hidruro de aluminio (AlH<sub>3</sub>).<sup>55</sup> En todos los casos, la influencia de estos ácidos de Lewis puede explicarse a partir de los diagramas de orbitales frontera.

La coordinación de un ácido de Lewis reduce la diferencia energética entre el HOMO del dieno y el LUMO del dienófilo y al mismo tiempo, aumenta la diferencia energética entre el HOMO del dienófilo y el LUMO del dieno, propiciando así, una estabilización del complejo reactivo y una mayor rapidez de la transformación.<sup>73</sup> De acuerdo al procedimiento propuesto por Johnson, los productos de reacción son cicloaductos de Diels-Alder entre las especies MF-PUL y MF-MF de elevado punto de ebullición (Figura 10) que pueden separarse fácilmente del AE mediante destilación al vacío.<sup>55</sup>



**Figura 10.** Formación de aductos (MF-PUL y MF-MF) mediante una reacción de Diels-Alder en un AE de Mpi según la metodología propuesta por Johnson.<sup>55</sup>

## Procedimiento experimental

**Ejemplo 1:** 200 g de AE de Mpi “Prime Natural” Yakima peppermint oil (A. M. Todd Company, Kalamazoo, Mich. U.S.A)

En un matraz redondo de 1000 mL se añade AE de Mpi (200 g) y HCl (12N; 2 mL). Se coloca el matraz sobre una plancha calefactora, se adapta a un sistema de reflujo, se coloca un termómetro y se calienta con agitación constante a una temperatura de 60 °C por espacio de 5 h a presión atmosférica normal. Al inicio de la reacción y a intervalos de 1 h se toman muestras para ser analizadas mediante GC-MS. Tras 5 h, la mezcla se transfiere a un frasco de vidrio ámbar de 500 mL donde se neutraliza con NaOH durante 30 min. A continuación, se separa la fase acuosa por filtración y se deshidrata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Posteriormente, se filtra nuevamente y se procede a purificar el AE mediante destilación al vacío (0,6 a 1,0 mm Hg) con agitación constante y a una temperatura que se incrementa gradualmente hasta los 74 °C durante 4 h. Rendimiento del proceso de purificación: 55%.

### Identificación y cuantificación de mentofurano y pulegona

La monitorización de la reacción y la cuantificación de MF y PUL fue llevada a cabo mediante GC-MS, utilizándose una columna capilar tubular abierta de sílice fundida de 60 m (metil sílice tipo OV-1) y una inyección de un microlitro de AE dividido en una proporción (80:1). El programa de temperatura se mantuvo a 70 °C durante 3 min y se aumentó posteriormente a razón de 3° por min hasta los 220 °C, temperatura a la cual se llevó a cabo la determinación.

### Resultados: análisis y discusión

Según la autora, la inexistencia en los AE de Mpi de otros dienos y dienófilos interferentes, propicia la disminución del 29% de PUL y del 51% de MF tras 5 h de reacción (Tabla 10). Sin embargo, como el MF se encuentra en menor proporción que la PUL, siempre se debe añadir una cantidad extra de este compuesto o de otro dieno (que no se especifica) para que la reacción se complete.<sup>55</sup> A diferencia del MF que puede actuar como dieno y como dienófilo, la PUL solo puede hacerlo como dienófilo puesto que, estructuralmente, no es un dieno reactivo que permita llevar a cabo una reacción de Diels-Alder.

**Tabla 10.** Porcentajes de MF y PUL determinados mediante GC-MS durante el transcurso de una reacción de Diels-Alder con un AE de Mpi.<sup>55</sup>

Tiempo (horas)	% mentofurano (MF)	% pulegona (PUL)
0	4,60	3,12
1	2,96	2,26
2	2,84	<b>2,39</b>
3	2,62	2,15
4	2,41	2,03
5	2,26	<b>2,21</b>

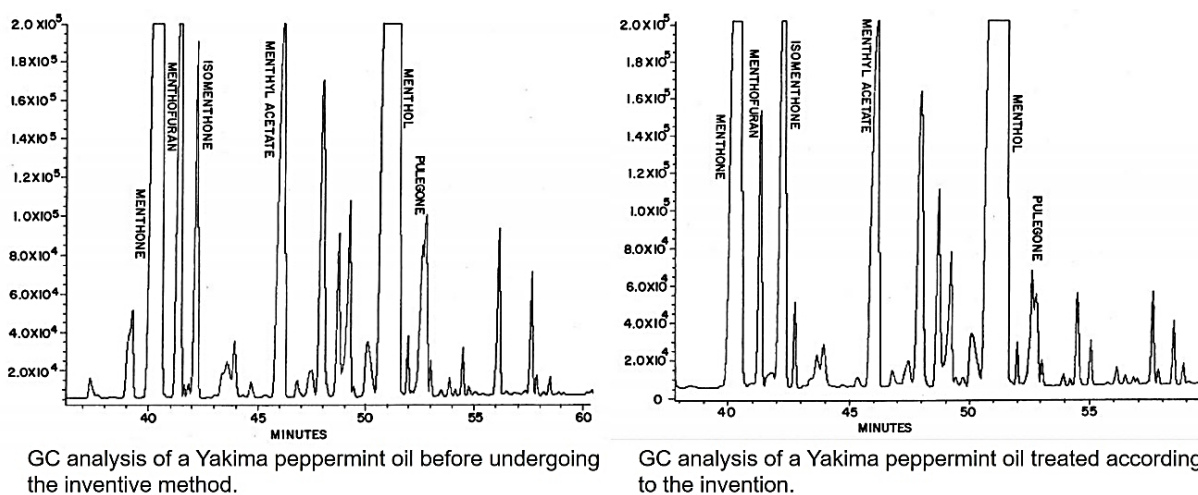
El requerimiento de AE con concentraciones mayores de MF que de PUL, o al menos similares, supone una gran limitación para la reacción puesto que, como hemos comprobado en nuestras investigaciones, solo los AE de las especies Mpi y Mpo presentan MF y, como

puede apreciarse en la Tabla 11, su presencia es muy baja.<sup>53</sup> Frente a esto, sería necesario añadir grandes cantidades de MF, un compuesto hepatotóxico exhaustivamente regulado por las autoridades sanitarias. Aún así, y aunque Johnson no lo manifieste, de la Tabla 10 se puede inferir que los estados de transición de los aductos MF-MF estarían más favorecidos que los MF-PUL (de ahí el escaso porcentaje de disminución de PUL). Sin embargo, esto propiciaría la investigación de nuevos dienos que no sean tóxicos y que posibiliten reacciones con mayores rendimientos. Dentro de este contexto, el 1,3-ciclopentadieno y el furano no podrían ser utilizados, por el olor desagradable del primero y la toxicidad del segundo.

**Tabla 11.** Porcentajes de MF y PUL en AE comerciales de diferentes especies de mentas determinados mediante GC.<sup>53</sup>

Especies de mentas	% mentofurano (MF)	% pulegona (PUL)
<b>Mentha pulegium L. (Mpo)</b> Origen Marruecos. CAS N° 8013-99-8	menor a 0,2	76,6
<b>Mentha x piperita L. (Mpi)</b> Origen Paraguay. CAS N° 8006-90-4	0,2	1,7
<b>Mentha arvensis L. DMO (Mar)</b> Origen India. CAS N° 68917-18-0	no detectado	1,0
<b>Mentha spicata L. (Msp)</b> Origen India. CAS N° 8008-79-5	no detectado	no detectada

A pesar de las limitaciones expuestas, se trata de un procedimiento sencillo y económico (aunque con bajos rendimientos), aplicable tanto a pequeña como a gran escala y sin residuos perjudiciales para el medioambiente. Dado que la fitoquímica del AE solo se modifica en relación a la PUL y el MF, esto no alteraría el flavor general de la esencia y se obtendría un AE con menor concentración de PUL y una mayor estabilidad frente a las autooxidaciones por la disminución de la concentración de MF (Figura 11).



**Figura 11.** Cromatogramas obtenidos mediante GC de un AE de Mpi antes y después de una reacción de Diels-Alder.<sup>55</sup>

### 3.2.2 **Reacción B: Disminución del contenido de pulegona mediante reducción estereoespecífica por hidrogenación**

#### **Fundamentación teórica**

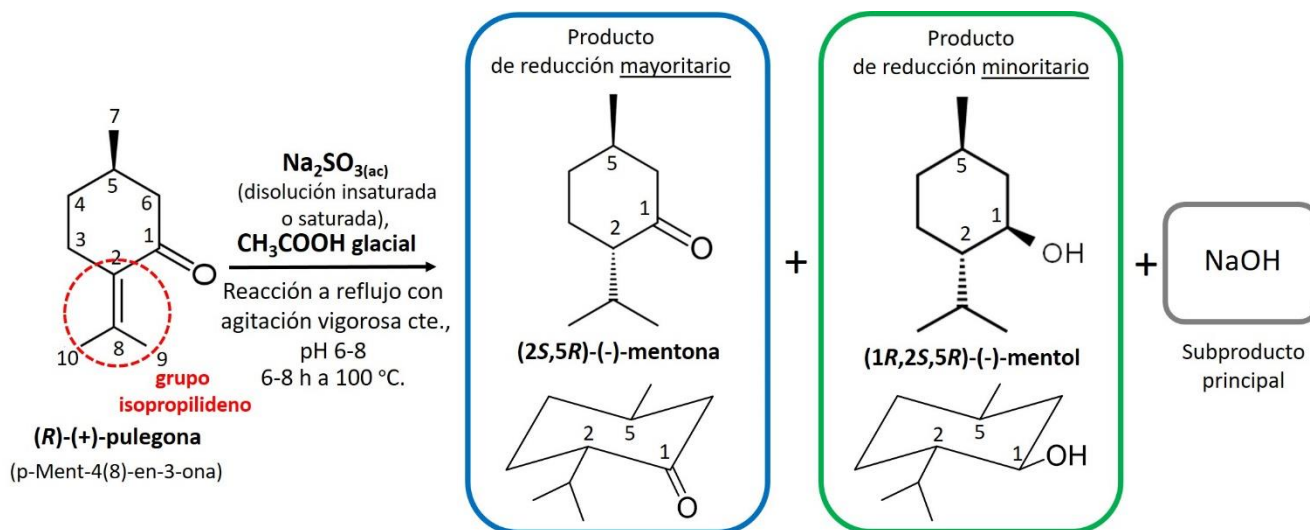
Se trata de un método patentado por Jeffrey S. Spencer de la A. M. Todd Company (USA) en el año 1989 (U.S. Patent 4,861,616), cuya finalidad es la de disminuir el contenido de PUL mediante una reacción de reducción estereoespecífica por hidrogenación.<sup>74</sup> El procedimiento consiste en modificar la estructura de la PUL reduciendo su grupo isopropilideno a isopropilo mediante una disolución acuosa (insaturada o saturada) de sulfito de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) en presencia de ácido acético glacial ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) a pH entre 6 y 8. Como agente reductor se utiliza el  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (un aditivo alimentario reconocido por el Codex Alimentarius FAO/OMS),  $\text{H}_2\text{O}$  (como disolvente y como suministro de protones) y  $\text{CH}_3\text{COOH}$  glacial (para mantener el pH de la reacción).<sup>74</sup>

En la bibliografía, la capacidad reductora del  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  no resulta ser esclarecedora. Algunas teorías argumentan la reducción del doble enlace  $\text{C}=\text{C}$  por adición de átomos de hidrógeno denominados “*nacientes*” y otras, en cambio, lo atribuyen a la adición de electrones y iones positivos. No obstante, son coincidentes en considerar que se trata de una reducción llevada a cabo por un agente químico (para diferenciarla de las electrolíticas y catalíticas), que es imprescindible un doble enlace conjugado a un grupo carbonilo, arilo o etileno y que es fundamental el accionar del disolvente.<sup>75</sup> En este sentido, Spencer solo se limita a expresar que la reacción requiere de  $\text{H}_2\text{O}$  como disolvente y como suministro de protones para cooperar con los iones sodio (proporcionados por el sulfito) en el proceso general de reducción.<sup>74</sup>

Sabiendo que determinadas sales metálicas pueden ser utilizados para reducir compuestos orgánicos en presencia de agentes capaces de transferir protones.<sup>76</sup> Toma sentido la importancia atribuida por Spencer al disolvente. En efecto, el catión sodio, al ser un electrólito fuerte, propicia que el  $\text{H}_2\text{O}$  se pueda ionizar más y por lo tanto, que pueda actuar como una mejor fuente proveedora de protones. Al aumentar la fuerza iónica del medio, las concentraciones teóricas que tienen los iones del  $\text{H}_2\text{O}$  quedan desfasados y por ello, ésta se debe ionizar más para compensar dicho efecto.<sup>77</sup>

Según el autor, se trata de una reacción estereoespecífica donde se transforma un compuesto potencialmente tóxico como la (*R*)-(+)-pulegona en (*2S,5R*)-(-)-mentona y, tras una reducción adicional, en (*1R,2S,5R*)-(-)-mentol (Figura 12).<sup>53</sup> Dos productos de gran valor organoléptico, sin efectos hepatotóxicos<sup>74</sup> y termodinámicamente estables (todos sus sustituyentes en posición ecuatorial) favorecidos, posiblemente, por el propio mecanismo de reducción.<sup>78</sup> De acuerdo a Spencer, estos productos de reacción se corresponderían con los

teorizados durante la biosíntesis *in vivo* llevada a cabo en las plantas de la especie *M. piperita*. Al respecto, se debe tener presente que todos los pasos de las rutas biosintéticas *in vivo* son estereoespecíficos, a excepción de la reducción de la (*R*)-(+)-pulegona, donde la enzima pulegona reductasa genera de forma mayoritaria (*2S,5R*)-(-)-mentona pero también algo de (*2R,5R*)-(+)-isomentona.<sup>8</sup>



**Figura 12.** Reacción de reducción estereoespecífica por hidrogenación de la (*R*)-(+)-pulegona propuesta por Spencer: condiciones experimentales, productos y subproductos de reacción.<sup>53</sup>

De acuerdo a lo expresado, algunos autores consideran que la hidrogenación *in vitro* de la PUL genera mezclas de mentona e isomentona, los cuales se convierten posteriormente en cuatro diastereoisómeros del mentol,<sup>66</sup> o que, aún obteniéndose (*2S,5R*)-(-)-mentona de forma mayoritaria, ésta se reduce posteriormente a (*1R,2S,5R*)-(-)-mentol y (*1S,2S,5R*)-(+)-neomentol.<sup>29</sup> Conforme a esto, se estaría frente a una reacción más estereoselectiva que estereoespecífica, hecho que se corrobora aún más cuando Spencer advierte que durante el transcurso de la reacción se puede producir una reducción adicional debida a la piperitenona y que debe ser contemplada en los cálculos estequiométricos.<sup>74</sup> La piperitenona es un MTO con tres dobles enlaces conjugados entre los C1, C2 y C6 que si bien se encuentra presente en muchas especies de mentas, su preponderancia la exhibe el AE de Mpo.

Aunque la estereoespecificidad esté relacionada con la formación exclusiva de un determinado estereoisómero, donde el mecanismo y la estereoquímica del material de partida determinan la estereoquímica del producto,<sup>26</sup> no necesariamente debe ser total (100%), es decir, todo proceso estereoespecífico es necesariamente estereoselectivo pero no a la inversa.<sup>24</sup> Así, la preponderancia de ciertos compuestos sobre otros depende del método de reducción, del catalizador y de las condiciones generales de reacción.<sup>66</sup>

El condicionante más importante de la reacción propuesta por Spencer es garantizar las características organolépticas y fitoquímicas del AE. En este sentido, el autor enfatiza que reductores como borohidruro de sodio (NaBH<sub>4</sub>), hidruro de Li y Al (LiAlH<sub>4</sub>) y catalizadores metálicos como el Pd/C resultan inespecíficos puesto que producen un AE de calidad inaceptable y no pueden ser utilizados. En particular, señala que el uso de carbón activado es inadecuado debido a su capacidad de adsorber otros compuestos químicos presentes en el AE.<sup>74</sup> Dentro de este contexto, es relevante la posibilidad de usar un agente reductor como el Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> que, según el autor, no perjudica la calidad del AE y que, además, es un reconocido aditivo alimentario.

### Procedimiento experimental

En la exposición de su trabajo, Spencer proporciona ecuaciones para el cálculo teórico tanto del Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> requerido para la reacción, como del H<sub>2</sub>O necesaria para la preparación de la disolución saturada (Figura 13). Dado que el Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> no es soluble en el AE y que debe ponerse en contacto con la PUL a través de un medio acuoso, el autor recomienda utilizarlo en exceso, multiplicando por 4 la cantidad teórica calculada. Además, como uno de los subproductos de la reacción es el NaOH, cuya evolución hace aumentar continuamente el pH de la reacción, es fundamental controlarlo y mantenerlo cercano a la neutralidad mediante el agregado de CH<sub>3</sub>COOH glacial. Spencer expone la metodología general mediante dos ejemplos concretos: uno utilizando una disolución de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> insaturada y el otro, empleando una disolución de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> saturada. Ambas metodologías se presentan a continuación:

Cálculo del contenido de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>:

$$g \text{ de Na}_2\text{SO}_3 = \frac{(W \times 3P1 \times \text{factor 1}) + (W \times 2P2 \times \text{factor 2})}{100} \times 4$$

Dónde:

*W* = peso del AE a tratar (g)

*P1* = porcentaje de piperitenona del AE de partida (g/100)

*P2* = porcentaje de pulegona del AE de partida (g/100)

*F1* = factor de reducción 0,839

*F2* = factor de reducción 0,827

Cálculo del contenido de agua destilada:

$$g \text{ de agua} = \frac{g \text{ de Na}_2\text{SO}_3}{34,7} \times 100$$

Dónde:

34,7 = coeficiente de solubilidad del Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>

**Figura 13.** Ecuaciones para el cálculo de reactivos en el procedimiento de Spencer.<sup>74</sup>

**Ejemplo 1:** Reacción de reducción mediante una disolución insaturada de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ . AE de Mpi (Lot. 3322 from Willamette Valley, Oregon). Contenido inicial de PUL: 2,35%.

En un matraz de reacción se coloca agua destilada (900 mL),  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (180 g), y  $\text{CH}_3\text{COOH}$  glacial (40 mL), se agita y se agrega AE de Mpi (900 g). El matraz se coloca en baño de glicerina sobre una placa de agitación-calefacción y se adapta un sistema a reflujo con refrigerante tipo Liebig. La reacción se lleva a cabo a una temperatura 100 °C por un tiempo de 8 h con agitación constante y el progreso de la misma se monitoriza mediante GC. Una vez finalizada la reacción, las fases oleosa y acuosa se separan mediante una ampolla de decantación y el AE tratado se purifica mediante una destilación por arrastre de vapor.

**Ejemplo 2:** Reacción de reducción mediante una disolución saturada de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ . AE de Mpi (Lot. 3376 from Yakima Valley, Washington). Contenido inicial de PUL: 1,20%.

En un matraz de reacción se coloca agua destilada (320 mL),  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (112 g), y  $\text{CH}_3\text{COOH}$  glacial (30 mL), se agita y se agrega AE de Mpi (900 g). El matraz se coloca en baño de glicerina sobre una placa de agitación-calefacción y se adapta un sistema a reflujo con refrigerante tipo Liebig. La reacción se lleva a cabo a una temperatura de 100 °C por un tiempo de 6 h con agitación constante. Transcurrido dicho tiempo se comprueba el pH, si es básico por formación de NaOH, se agrega  $\text{CH}_3\text{COOH}$  glacial (10 mL) y se deja reaccionar durante 1 h más, al cabo de la cual, las fases oleosa y acuosa se separan mediante una ampolla de decantación y el AE tratado se purifica mediante destilación por arrastre de vapor.

### **Identificación y cuantificación de PUL junto a los demás constituyentes del AE de Mpi**

Los porcentajes de PUL junto al de los otros constituyentes se monitorizaron mediante GC con un cromatógrafo Varian Modelo 6000 (TM) equipado con un detector de ionización de llama (FID), una columna Supercowax de 0,25  $\mu\text{m}$  10 (TM) de 60 metros con un diámetro interno de 0,25 mm. El programa de temperatura consistió en 75 °C (8 min), luego a 4 °C por min hasta 200 °C y 25 min de tiempo de mantenimiento superior a 200 °C. Se realizó una cuantificación comparativa en base al porcentaje en peso y al recuento de picos.

### **Resultados: análisis y discusión**

Los porcentajes de PUL, mentona y mentol antes y después de la reacción se presentan en la Tabla 12 y los porcentajes de disminución del contenido de PUL y el aumento de la concentración de mentona y mentol en la Tabla 13. Dado que no se trata del mismo AE de Mpi, no es posible formular conclusiones válidas entre las dos reacciones. No obstante, puede comprobarse que la reducción llevada a cabo con una disolución insaturada de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  permite una mayor disminución del contenido de PUL y que en ambas reacciones se observa un apreciable incremento de los porcentajes de mentona y mentol. Con respecto al uso de



disoluciones saturadas de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  hay que tener presente la formación de  $\text{NaOH}$  durante el transcurso de la reacción y que el agregado de  $\text{CH}_3\text{COOH}$  glacial es fundamental para mantener el pH cercano a la neutralidad y garantizar así, un óptimo proceso de reducción.

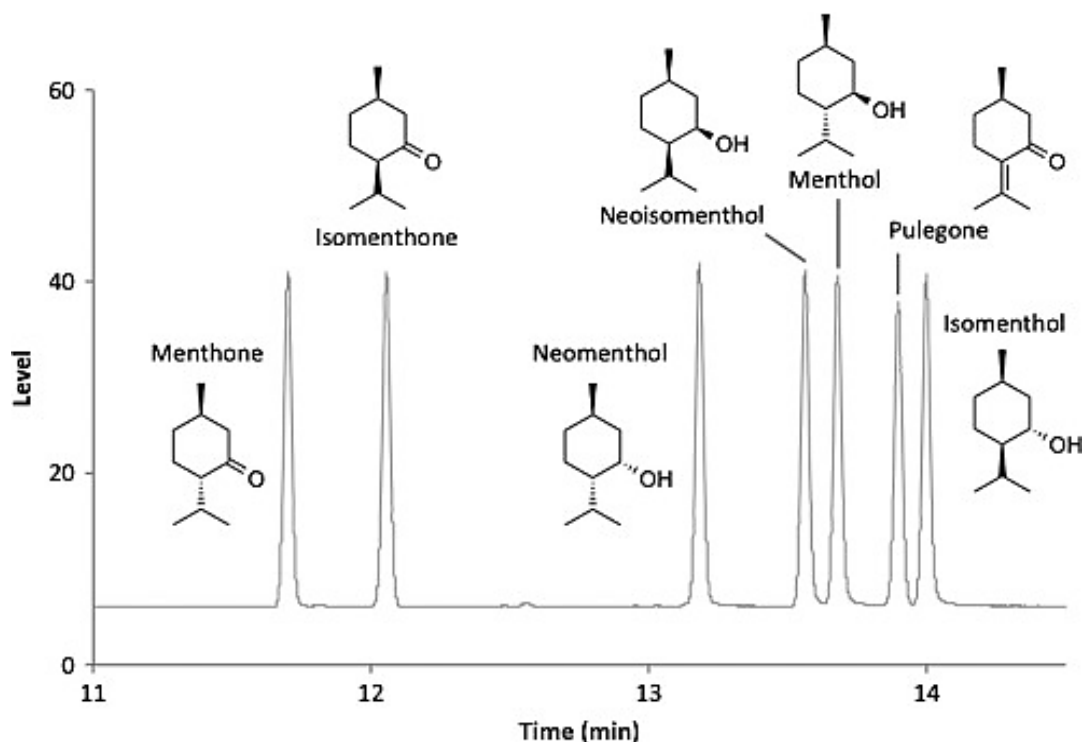
**Tabla 12.** Porcentajes de pulegona, mentona y mentol determinados por GC antes y después de la reacción propuesta por Spencer con un AE de Mpi.<sup>74</sup>

Ejemplos de reacciones efectuadas	% pulegona pre-reacción	% pulegona post-reacción	% mentona pre-reacción	% mentona post-reacción	% mentol pre-reacción	% mentol post-reacción
AE de Mpi con disolución insaturada de $\text{Na}_2\text{SO}_3$	2,350	0,340	17,520	18,034	40,772	42,683
AE de Mpi con disolución saturada de $\text{Na}_2\text{SO}_3$	1,200	0,410	21,958	23,004	38,131	39,644

**Tabla 13.** Porcentajes de disminución de pulegona y del incremento de mentona y mentol luego de las reacciones de reducción estereoespecífica por hidrogenación ejemplificadas por Spencer.<sup>74</sup>

Ejemplos de reacciones efectuadas	% Disminución de pulegona	% Incremento de mentona	% Incremento de mentol
AE de Mpi con disolución insaturada de $\text{Na}_2\text{SO}_3$	86,0	2,93	4,69
AE de Mpi con disolución saturada de $\text{Na}_2\text{SO}_3$	66,0	4,76	3,97

La identificación y cuantificación de todos los compuestos mencionados a lo largo de este análisis puede llevarse a cabo mediante GC, una herramienta imprescindible para evaluar la transformación general de la PUL durante el proceso de reducción (Figura 14).<sup>79</sup>



**Figura 14.** Separación mediante GC de los MTO identificados en la ruta biosintética del mentol en un AE de Mpi.<sup>79</sup>

Como ya se ha manifestado, otros reductores utilizados por Spencer como el borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ), el hidruro de Li y Al ( $\text{LiAlH}_4$ ) y catalizadores metálicos como el Pd/C modificarían desfavorablemente la calidad del AE. En cuanto a los disolventes factibles de ser utilizados, el autor expresa que lo más eficiente es el agua puesto que el empleo de alcoholes como el metanol y el etanol, si bien son solubles en el AE, producen esencias de baja calidad y son difíciles de separar de la mezcla de reacción.<sup>74</sup>

En un interesante trabajo realizado por Gade y More,<sup>80</sup> una muestra de AE de Mpi fue sometido a destilación para obtener diferentes fracciones que luego fueron enfriadas (entre 5-10 °C) para cristalizar el mentol y obtener fracciones desmentolizadas (DMO). Posteriormente, dichas fracciones fueron hidrogenadas (reducidas) bajo distintas condiciones experimentales para evaluar la formación de mentol tras el proceso de reducción. La hidrogenación la llevaron a cabo mediante dos metodologías distintas: una utilizando un catalizador de Ni y la otra, mediante borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ). En ambos casos, se evidenció la presencia de mentol a diferentes concentraciones sin perjudicar las propiedades generales del AE, en particular, la densidad relativa a 20 °C ( $d_{20}^{20}$ ) y el índice de refracción ( $n_D^t$ ).

Aunque estos resultados, a diferencia de lo expresado por Spencer, permitirían el uso del  $\text{NaBH}_4$  y los catalizadores de Ni como posibles reductores en los AE de menta, para hacer inferencias concluyentes, los ensayos se deberían hacer en las mismas condiciones experimentales especificadas por Spencer. Un aspecto interesante descrito por Gade y More es la interacción conformacional de la mentona y la isomentona durante el proceso de adsorción-desorción en la superficie del catalizador.<sup>80</sup> Si bien los autores adjudican la formación del mentol solo a partir de la reducción de estos dos compuestos, sería interesante investigar la interacción de la (*R*)-(+)-pulegona en el contexto de las mismas condiciones experimentales para dilucidar los aspectos estereoquímicos de su reducción.

En cuanto a la utilización de disolventes no acuosos, Gade y More informaron algunos aspectos coincidentes con Spencer, por ejemplo, mientras que la utilización de alcohol isopropílico (IPA) en el proceso de reducción catalítica con Ni no afecta la adsorción de los compuestos y propicia una mejor conversión de los mismos. La hidrogenación con  $\text{NaBH}_4$  en agua a temperatura ambiente resulta más eficiente que cuando se utiliza IPA, evidenciando así, la contribución de la polaridad del disolvente en la selectividad de la conversión.<sup>80</sup> En el trabajo de Gade y More, además de la técnica analítica de GC se utilizaron dos parámetros físicos sencillos para evaluar la efectividad de las reacciones efectuadas: la determinación de la densidad relativa a 20 °C ( $d_{20}^{20}$ ) y el índice de refracción ( $n_D^t$ ). Como se podrá consultar en el Anexo de esta Memoria, ambas determinaciones son muy importantes al momento de evaluar cambios desfavorables en la calidad de un AE.

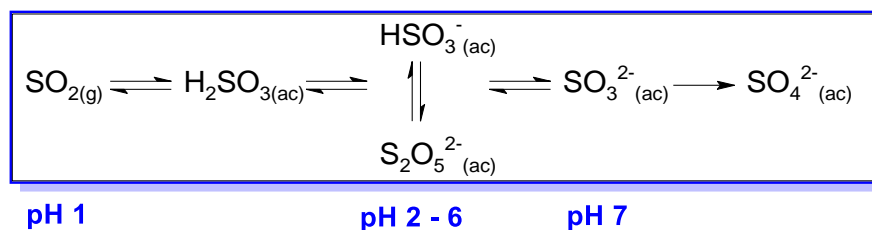
### 3.2.3 **Reacción C:** Disminución del contenido de pulegona mediante adición de sulfito de sodio neutro

#### Fundamentación teórica

La adición de sulfito de sodio neutro ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) a un carbono carbonílico o al carbono  $\beta$  (en compuestos carbonílicos  $\alpha$ - $\beta$ -insaturados) es un método oficial propuesto por el Food Chemicals Codex (FCC-Apéndice VI: AE y Flavors, 2004) para cuantificar aldehídos y cetonas en los AE y el método oficial propuesto por la Farmacopea de US para determinar carvona en el AE de Msp.<sup>81</sup> La reacción consiste en transformar dichos compuestos en productos de adición (aductos) generalmente solubles en agua que se pueden separar por simple filtración. Otras metodologías emplean también el bisulfito de sodio ( $\text{NaHSO}_3$ ), recomendando el uso de este último para AE ricos en MTO con FO aldehído y el  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  para aquellas esencias con mayores porcentajes de compuestos con FO cetona.<sup>82</sup>

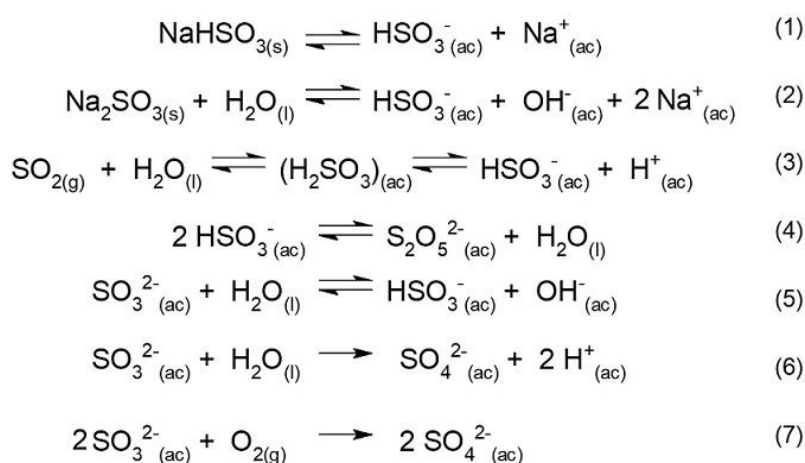
El  $\text{NaHSO}_3$  reacciona con el GF carbonilo mediante una adición nucleofílica y es muy utilizado para purificar o aislar aldehídos y cetonas estéricamente no impedidas de una mezcla de reacción.<sup>83,84</sup> En efecto, como los aductos formados suelen ser cristalinos, la purificación se hace sencillamente por recristalización.<sup>64</sup> El  $\text{NaHSO}_3$  también es muy empleado para la derivatización quimiosselectiva en la protección de grupos carbonilos y en la obtención de intermedios reactivos para la síntesis de compuestos como las cianhidrinas.<sup>64</sup> En la bibliografía, como las diferencias en cuanto al empleo de una u otra de estas sales no suele ser muy esclarecedora, se considera oportuno puntualizar algunas precisiones al respecto:

Los términos “sulfitos”, “agentes sulfitantes” o “especies S[IV]” son comúnmente utilizados para describir a los compuestos de azufre con estado de oxidación +IV como el  $\text{SO}_{2(g)}$  y las sales de Na, K y Ca de los aniones  $\text{SO}_3^{2-}$  (sulfito o sulfito neutro),  $\text{HSO}_3^-$  (bisulfito o sulfito ácido) y  $\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$  (metabisulfito o disulfito).<sup>85,86</sup> En particular, los compuestos  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (INS 221),  $\text{NaHSO}_3$  (INS 222) y  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  (INS 223), son aditivos alimentarios muy utilizados como antioxidantes, inhibidores enzimáticos, blanqueadores y como agentes reductores.<sup>87</sup> En disolución acuosa, estos compuestos se interconvierten unos en otros en diferentes especies según el pH del medio, la concentración y el contenido de agua (Figura 15).<sup>85-88</sup>



**Figura 15.** Distribución de las especies S[IV] en medio acuoso según el pH.<sup>85-88</sup>

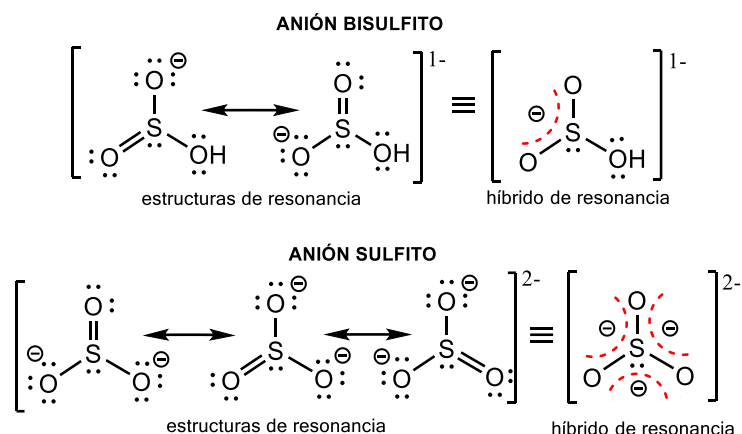
Las sales de  $\text{NaHSO}_3$  y  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  se disocian en agua conforme a los equilibrios representados en las Ec 1-2 y el resto de las especies según las Ec 3-7 (Figura 16).<sup>85-88</sup> Por debajo de pH 2 predomina el  $\text{SO}_2$  en disolución acuosa, el cual se desprende fácilmente como  $\text{SO}_{2(g)}$  (16% a pH 2.5; 37% a pH 2 y 86% a pH 1). Entre pH 2 y 6 la especie predominante es el  $\text{HSO}_3^-$  formado a partir de un hipotético ácido sulfuroso ( $\text{H}_2\text{SO}_3$ ) como intermedio (Ec. 3). A este mismo rango de pH, el  $\text{HSO}_3^-$  se convierte en  $\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$  en muy poca cantidad (Ec. 4) pero con altas concentraciones y baja actividad de agua su presencia aumenta significativamente. Por encima de pH 7 prevalece el  $\text{SO}_3^{2-}$  (Ec. 5) pero si el pH se torna excesivamente alcalino se transforma en  $\text{SO}_4^{2-}$  de forma irreversible (Ec 6 y 7). Todos los sulfitos son solubles en agua y sus precipitados se disuelven en disoluciones ácidas.<sup>85-88</sup>



**Figura 16.** Equilibrios de disociación de las especies S[IV] en medio acuoso.<sup>85-88</sup>

Conforme a lo anterior, la fácil conversión entre especies propiciaría que en un rango de pH 6-8 ambos aniones ( $\text{HSO}_3^-$  y  $\text{SO}_3^{2-}$ ) puedan actuar como nucleófilos. Sin embargo, cuando se utiliza  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  en un medio neutro o levemente alcalino, el anión  $\text{SO}_3^{2-}$  es el que actúa como nucleófilo favorecido por procesos de difusión. En cambio, cuando se utiliza  $\text{NaHSO}_3$  en las mismas condiciones experimentales, el equilibrio general está favorecido hacia la formación del anión  $\text{HSO}_3^-$ , cuya mayor nucleofilia estaría acompañada de una mayor estabilidad termodinámica de los aductos formados con los compuestos carbonílicos.<sup>83</sup>

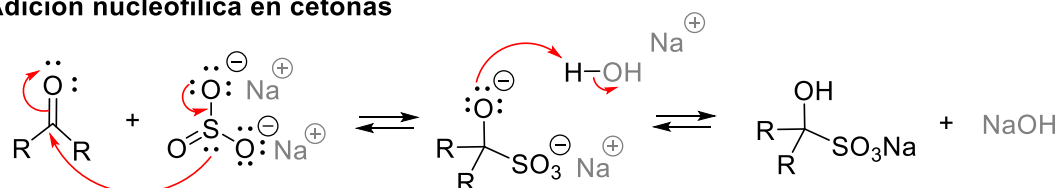
En relación al aspecto nucleofílico tanto del  $\text{SO}_3^{2-}$  como del  $\text{HSO}_3^-$ , es importante precisar qué parte de la estructura de estos aniones actúa realmente como nucleófilo: ambas especies poseen oxígenos con cargas negativas estabilizadas por resonancia (Figura 17) y aunque éstos son bases más fuertes que el azufre, como se estabilizan por deslocalización electrónica y se solvatan fácilmente (lo que limita la cantidad de pares de electrones libres para actuar como nucleófilos), el azufre (menos electronegativo que el oxígeno) se transforma en un mejor nucleófilo a partir de su par de electrones no enlazados.<sup>89</sup>



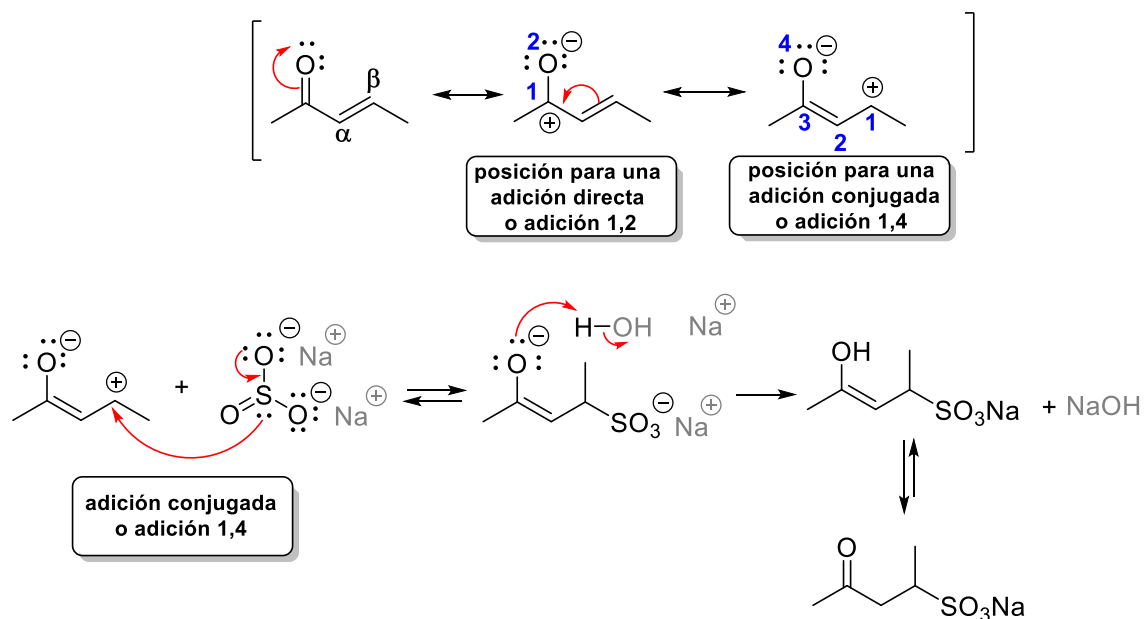
**Figura 17.** Estructuras resonantes de los aniones  $\text{HSO}_3^-$  (bisulfito) y  $\text{SO}_3^{2-}$  (sulfito).

La reacción general de adición de sulfito de sodio consiste en una adición nucleofílica al carbono del GF carbonilo o al carbono en posición  $\beta$  (en compuestos carbonílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados), para originar aductos generalmente solubles en agua que se pueden separar fácilmente de los AE por su diferencia de solubilidad con respecto a la fase oleosa (Figura 18).

**Adición nucleofílica en cetonas**



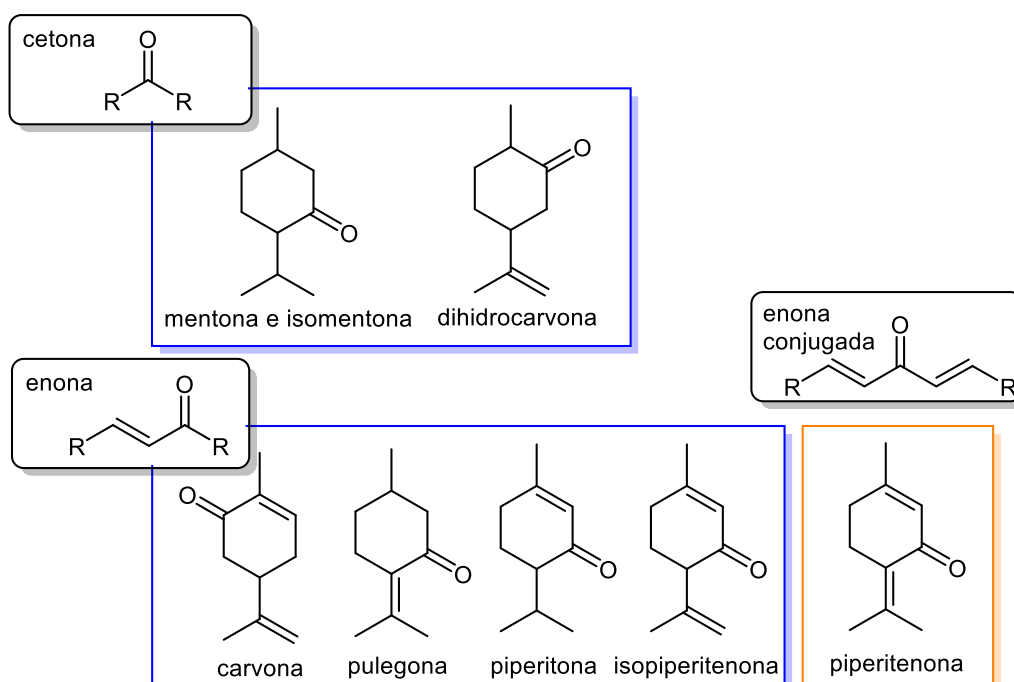
**Adición nucleofílica en cetonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas**



**Figura 18.** Mecanismo general de adición de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  a cetonas y cetonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas.

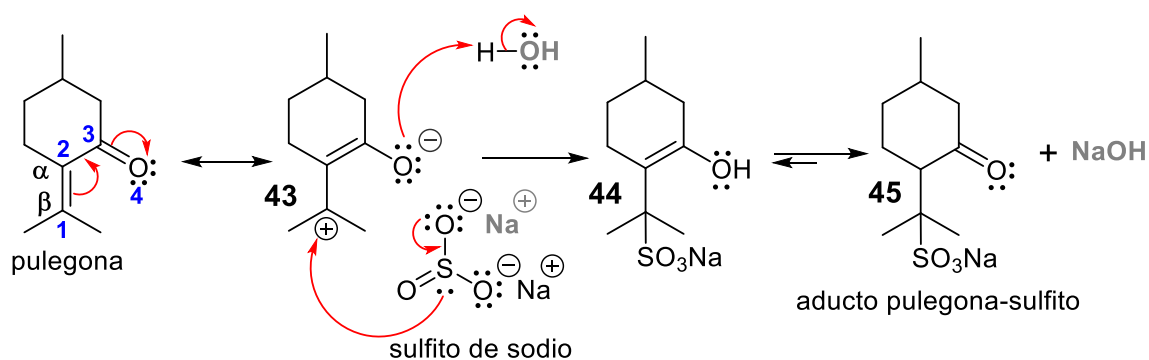
Dado que los MTO con la FO aldehído no forman parte de la fitoquímica normal de los AE de menta,<sup>2</sup> la adición de sulfito de sodio neutro la experimentan únicamente los MTO que contengan la FO cetona. Cuando la adición se efectúa en el carbono del GF carbonilo se denomina genericamente como adición nucleofílica. Cuando la adición se produce en cetonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas, la deslocalización electrónica del sistema conjugado propicia dos tipos diferentes de adiciones nucleofílicas: una directa o adición 1,2 en el carbono del grupo carbonilo y una conjugada o adición 1,4 en el carbono  $\beta$ , también conocida como adición de Michael (Figura 18). Que se produzca una u otra depende de la naturaleza del nucleófilo, la estructura del compuesto carbonílico  $\alpha,\beta$ -insaturado y de las condiciones de reacción.<sup>64,78</sup>

Los MTO con FO cetona, enona y enona conjugada que forman parte de la fitoquímica normal de los AE de las diferentes especies de mentas se presentan en la Figura 19. En un principio, todos ellos podrían reaccionar con el sulfito de sodio. Al respecto, se debe tener presente que la adición nucleofílica a los compuestos carbonílicos es muy sensible a los efectos estéricos y que solo los compuestos estéricamente no impedidos podrán reaccionar.<sup>83,84</sup> De acuerdo a lo expresado y a lo informado por Shibamoto y col., la mentona, isomentona y la dihidrocarvona no reaccionan con el sulfito de sodio.<sup>90</sup> Hecho que puede explicarse a partir de la confluencia de varios factores estéricos: el impedimento que genera el propio anillo de ciclohexano junto a la presencia del grupo voluminoso isopropilo en posición  $\alpha$  (en el caso de la mentona e isomentona), del grupo metilo (en el caso de la dihidrocarvona) y al gran volumen que posee el anión sulfito como reactivo nucleofílico.



**Figura 19.** Principales MTO cíclicos de los AE de menta con estructuras cetona, enona y enona conjugada.

Un comportamiento distinto lo presentan las cetonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas con estructuras tipo enona (carvona, pulegona, piperitona e isopiperitenona) y enona conjugada (piperitenona). Estos MTO cíclicos reaccionan con el sulfito de sodio neutro mediante un mecanismo de adición conjugada o adición 1,4 que involucra a los átomos extremos (C1-O4) de la estructura enona.<sup>90</sup> Para el caso particular de la PUL, el ataque nucleofílico se produce sobre el carbono electrofílico en posición  $\beta$  (por resonancia del sistema conjugado) generando el enolato **43** que se protona a enol **44** y tautomeriza, finalmente, a la forma ceto **45** (Figura 20). En los AE de menta, solo los MTO cíclicos que posean estructuras enonas y enonas conjugadas podrán reaccionar mediante este mecanismo y formar aductos o compuestos de adición de sulfito neutro fácilmente eliminables una vez producida la reacción.



**Figura 20.** Mecanismo de adición conjugada o adición 1,4 del  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  a la PUL.

### Procedimiento experimental

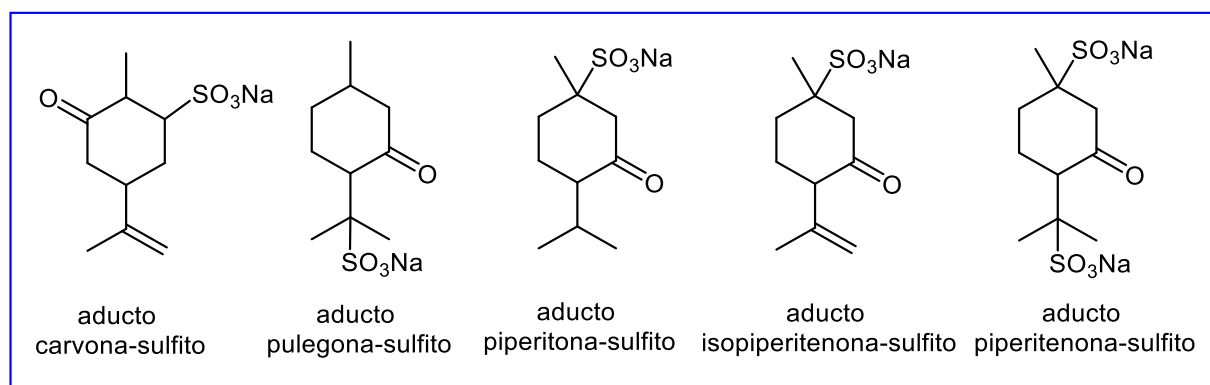
En un matraz volumétrico Cassia de 100 mL de capacidad provisto de tapón se agrega la muestra de AE (10 mL), una disolución de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  recién preparada (30% v/p; 50 mL), 2 gotas de fenolftaleína TS (Test Solution) y se neutraliza con  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (50% v/v). La mezcla se calienta en un baño de agua hirviendo, agitando repetidamente y neutralizando de vez en cuando con gotas de  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (50% v/v) cuidando de estar siempre tapado para evitar la pérdida de compuestos volátiles. Tras la desaparición de la coloración de la fenolftaleína por el agregado de gotas de este reactivo, la mezcla se calienta durante 15 min más. Se enfría a temperatura ambiente y cuando los líquidos se hayan separado por completo, se agrega suficiente disolución de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (30% v/p) para elevar el nivel más bajo de la capa aceitosa dentro de la porción graduada del cuello del matraz y así poder realizar la lectura de forma directa. Tiempo aproximado de reacción: 4 h.

### Cuantificación

Se calcula el porcentaje v/v de los MTO con FO cetona mediante la ecuación: **AK = 100 – (V x 10)** dónde **AK** es el % v/v de MTO y **V** los mL del AE separado (sin reaccionar) en el cuello graduado del matraz.

## Resultados: análisis y discusión

De acuerdo al mecanismo de adición nucleofílica conjugada o adición 1,4 analizado para esta reacción, solo los MTO cíclicos que posean estructuras estéricamente no impedidas del tipo enona (carvona, pulegona, piperitona e isopiperitenona) y enona conjugada (piperitenona) podrán formar aductos o compuestos de adición con el sulfito de sodio neutro (Figura 21). De lo expuesto se puede concluir que mediante este procedimiento no solamente reaccionaría la PUL sino que, además, todos los otros MTO estructuralmente similares a ella. Si bien dichos compuestos se encuentran en los AE en pequeñas proporciones, se deberían investigar dos cuestiones fundamentales: 1) si en las condiciones experimentales de reacción el AE no sufre modificaciones organolépticas indeseables y 2) cual sería el efecto de la modificación fitoquímica del AE en relación a sus propiedades fisicoquímicas características.

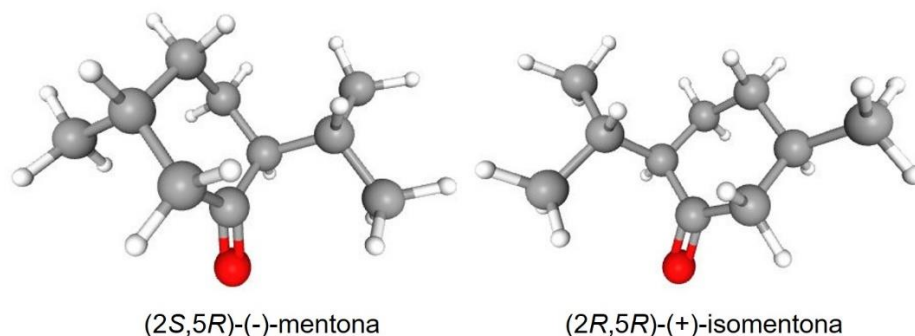


**Figura 21.** Aductos formados a partir de la reacción entre el  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  y los MTO con estructuras enona y enona conjugada presentes en los AE de menta.<sup>90</sup>

Tanto la mentona como la isomentona (MTO naturales y abundantes en las diferentes especies de mentas), no reaccionarían con el sulfito de sodio neutro debido al impedimento estérico que presenta el GF carbonilo. En efecto, dicho impedimento puede considerarse originado a partir de la propia estructura cíclica en la cual se encuentra y en particular, por la presencia del grupo isopropilo en posición  $\alpha$  (Figura 22). Lo mismo ocurre con la dihidrocarvona, un MTO menos abundante, que posee un grupo metilo en posición  $\alpha$ .<sup>90</sup>

No obstante a lo expresado, los resultados de esta misma reacción llevados a cabo por Bechstein con AE de Mpo, revelan que tanto la PUL como la piperitona reaccionan con el sulfito de sodio en un 100% y la piperitenona en un 99,5%, pero también se evidencia la formación de aductos con la isomentona en un 7% y con la mentona en un 2%.<sup>91</sup> Antecedente que, indudablemente, debe ser tenido en cuenta al momento de evaluar el transcurso de la reacción mediante GC y su posterior cuantificación.





**Figura 22.** Modelos de bolas y varillas (ball and stick) de la mentona e isomentona.<sup>92</sup>

La adición de sulfito de sodio neutro es una técnica sencilla y económica. Presenta la ventaja de no requerir disoluciones valoradas ni pesadas de precisión puesto que solo se requiere de un matraz de Cassia con cuello graduado. Los resultados se obtienen como % v/v y la reacción suele completarse al cabo de 4 h.<sup>91</sup> No obstante, como durante el transcurso de la misma se genera NaOH (Figura 15), es necesario neutralizarlo para que la reacción no se transforme en reversible. En efecto, con una disolución acuosa de NaOH al 30% v/p (medio fuertemente alcalino detectable con fenolftaleína) y luego de agitar vigorosamente, todos los aductos formados se disocian.<sup>91</sup> Este proceso de reversibilidad es de gran utilidad para recuperar las enonas y enonas conjugadas en forma original.<sup>83,84</sup>

El hecho que en la reducción estereoespecífica por hidrogenación (reacción B) y en la reacción aquí analizada se utilice el mismo reactivo ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) en similares condiciones experimentales, plantea el interrogante de constatar hasta que punto en la reacción B, la adición nucleofílica conjugada no compite con la reducción propuesta por Spencer. Esto es un factor muy importante puesto que se estaría frente a una disminución del contenido de PUL y de MTO con estructuras similares por formación de aductos y no por su transformación en compuestos de gran cuantía organoléptica como son la (2S,5R)-(-)-mentona y el (1R,2S,5R)-(-)-mentol.

En la Tabla 14 se proporciona, a manera de síntesis, un resumen comparativo de las tres reacciones analizadas en esta investigación. Nótese que en todos los casos se trata de procedimientos sencillos, con reactivos y materiales de laboratorio fácilmente asequibles y de bajo costo. No obstante, su aplicación a muestras de AE de diferentes especies de mentas, junto a la constatación de su efectividad (en cuanto al logro de AE con propiedades tanto fisicoquímicas como organolépticas deseables) y la factibilidad de ser implementadas a nivel industrial, están supeditadas a un riguroso estudio experimental.

**Tabla 14.** Síntesis integradora comparativa de las tres reacciones analizadas en esta investigación.

	<b>REACCIÓN A (Johnson, 1993)</b>	<b>REACCIÓN B (Spencer, 1989)</b>	<b>REACCIÓN C (Food Chemicals Codex, 2004)</b>
<b>Tipo de reacción</b>	Reacción pericíclica de Diels-Alder o reacción de cicloadición [4+2] con un ácido de Lewis (HCl) como catalizador	Reacción de reducción por hidrogenación del doble enlace C=C mediante Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> en medio acuoso	Reacción de adición nucleofílica conjugada (o adición 1,4) de Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> neutro al carbono β de cetonas α,β-insaturadas
<b>Variedad de AE y cantidad de muestra ensayada</b>	Mpi, Mar y Msp (200 g)	Mpi (900 g)	Todas las especies (10 mL)
<b>MTO reaccionantes</b>	MF y PUL	PUL y piperitenona	PUL, carvona, piperitona, isopiperitona y piperitona
<b>Disminución del contenido de PUL</b>	<b>29%</b>	<b>86%</b> (c/ dis. insaturada) <b>66%</b> (c/ dis. saturada)	<b>90-100%</b>
<b>Transformación de la PUL</b>	Cicloaductos de MF-PUL	(2 <i>S</i> ,5 <i>R</i> )-(-)-mentona y (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>R</i> )-(-)-mentol	Aductos de PUL-sulfito
<b>Reactivos</b>	HCl (12N; 2 mL) NaOH Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> (112 g), CH <sub>3</sub> COOH glacial (40 mL) H <sub>2</sub> O destilada (320 mL)	Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> (30% v/p; 50 mL) CH <sub>3</sub> COOH (50% v/v) fenoltaleína TS (gotas)
<b>Materiales y equipos</b>	Matraz de reacción, placa de agitación-calefacción, sistema a reflujo, termómetro	Matraz de reacción, placa de agitación-calefacción, sistema a reflujo, termómetro	Matraz volumétrico Cassia de 100 mL y baño de agua hirviendo
<b>Condiciones experimentales de reacción</b>	Calentamiento a reflujo (60 °C), 5 h, pH sin especificar	Calentamiento a reflujo (100 °C), 8 h, pH 6-8	Calentamiento en matraz Cassia (100 °C), 4 h, pH 7-8
<b>Condiciones de purificación</b>	Destilación al vacío (74 °C), 4 h. Rendimiento: 55%	Destilación por arrastre de vapor	Sin especificar
<b>Calidad del AE obtenido</b>	Alta calidad, estable a la autooxidación, flavor mejorado, mínima modificación fitoquímica.	Alta calidad, coloración cristalina, 40-50% más estable a la autooxidación, enriquecido en mentona y mentol.	Sin especificar
<b>Monitorización de la reacción y cuantificación final</b>	GC-MS	GC-FID: cuantificación comparativa en base al porcentaje en peso y el recuento de picos	Lectura del volumen de AE sin reaccionar mediante el matraz Cassia
<b>Proyección industrial</b>	Proceso batch (por lote) a pequeña y gran escala.	Sin especificar	Solo a escala laboratorio

## 4 CONCLUSIONES

---

La (R)-(+)-pulegona es una sustancia tóxica natural que forma parte de la fitoquímica normal de los AE de las especies *Mentha x piperita* L. y *Mentha arvensis* L., muy utilizadas como aditivos A/S en una gran variedad de alimentos de consumo masivo y también, en la *Mentha pulegium* L., de uso más controvertido por su gran concentración. Los efectos hepatotóxicos comprobados junto a la posibilidad de causar partos prematuros y abortos espontáneos, la han transformado en una sustancia regulada y de exautivo control por parte de diferentes organismos internacionales.

La similitud organoléptica, la variedad de nombres utilizados y el desconocimiento popular sobre las diferencias entre especies, han transformado a la *Mentha* en un género objeto de gran confusión. En Argentina, por ejemplo, la presencia de hierbas aromáticas silvestres como la peperina y el poleo, con nombres y propiedades similares a las mentas, no solo incrementan dicha confusión sino que, además, plantean nuevos riesgos toxicológicos. En este sentido, el presente trabajo hace un valioso aporte en cuanto al esclarecimiento de denominaciones, sinonimias, aplicaciones y concentraciones relativas típicas de PUL en los AE de las principales mentas y especies silvestres con las cuales son usualmente confundidas.

En la bibliografía existen escasos procedimientos tendientes a reducir la PUL de los AE de menta con fines alimenticios. Hecho que puede explicarse a partir de dos motivos diferentes: en primer lugar, los AE de menta con porcentajes de PUL que exceden los normados son considerados industrialmente indeseables para fines alimenticios, medicinales o cosméticos, por lo que son sometidos a procedimientos tendientes a transformar dicha sustancia en compuestos de mayor valor comercial como el mentol y sus isómeros. En segundo lugar, la utilización de A/S sintéticos supone menores costos económicos. No obstante, se debe tener presente que en la actualidad, como gran parte de la población tiende a consumir alimentos preferentemente naturales, los industriales han vislumbrado en este hecho, un medio para promocionar sus productos. En efecto, los AE de menta, además de actuar como A/S, han demostrado importantes actividades biológicas con potenciales efectos benéficos para la salud. Así, estos argumentos son razones fundadas para pretender reducir las concentraciones de PUL en AE indeseables que luego puedan ser utilizados por la industria alimentaria.

La reacción de Diels-Alder propuesta por Johnson (Reacción A) resulta de aplicación muy limitada puesto que, como el MF actúa como dieno y la PUL como dienófilo, se requiere de AE con similares concentraciones de ambas sustancias o al menos, con una mayor proporción de MF. De acuerdo a estudios llevados a cabo por nuestro equipo de investigación, los AE de Mpi y Mpo no solo son los únicos que evidencian la presencia de MF sino que, además, lo contienen en concentraciones muy bajas (0,2% para Mpi y menos del 0.2% para Mpo). Conforme a ello, para llevar a cabo la reacción se debería agregar grandes concentraciones de MF, una sustancia que, junto a la PUL, también se encuentra regulada por sus efectos hepatotóxicos comprobados. No obstante, esto plantea la investigación de nuevos dienos que no sean tóxicos y que permitan llevar a cabo la reacción con mayores rendimientos.

La reducción estereoespecífica por hidrogenación propuesta por Spencer (Reacción B) parecería ser la más prometedora para disminuir el contenido de (*R*)-(+)-pulegona de los AE de menta con fines alimenticios. Se trata de un procedimiento sencillo y económico que emplea como agente reductor a un aditivo alimentario como el sulfito de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) y donde la concentración de la (*R*)-(+)-pulegona disminuye por su conversión a compuestos de gran valor organoléptico como la (*2S,5R*)-(-)-mentona y el (*1R,2S,5R*)-(-)-mentol. No obstante, como esta reacción se ha propuesto únicamente para el AE de Mpi, se debería investigar su aplicación en esencias de otras especies de mentas. Aunque la reacción se haya catalogado como estereoespecífica, la posible formación de (*2R,5R*)-(+)-isomentona, diferentes isómeros del mentol junto a la reducción en forma paralela de la piperitenona, la posicionarían en una reacción más bien estereoselectiva.

La adición de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  al grupo carbonilo o al  $\text{C}\beta$  en compuestos carbonílicos  $\alpha$ - $\beta$ -insaturados (reacción C) es un método oficial propuesto por el Food Chemicals Codex para cuantificar aldehídos y cetonas en los AE. Se trata de un método sencillo, rápido y económico. Sin embargo, como la reacción transcurre a través de una adición nucleofílica conjugada (o adición 1,4), todos los MTO que posean estructuras del tipo enona como la carvona, pulegona, piperitona e isopiperitenona y del tipo enona conjugada como la piperitenona (componentes normales de los AE de menta) podrán reaccionar y formar aductos o compuestos de adición con el  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ . Este hecho debe ser investigado puesto que, si bien la carvona, la piperitona y la piperitenona son compuestos minoritarios en los AE de Mpi, Mar y Mpo, su eliminación junto a la PUL podría modificar negativamente las propiedades organolépticas de los AE. Del mismo modo, esta situación debe ser analizada para el caso de la Reacción B, puesto que ambas metodologías utilizan el mismo reactivo en similares condiciones experimentales. Concretamente, se debería indagar hasta que punto en la reacción B, la adición nucleofílica conjugada no compite con la reducción propuesta por Spencer.

La reducción estereoespecífica por hidrogenación (Reacción B) y la adición de sulfito de sodio neutro (Reacción C) tienen en común el mismo reactivo ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) y similares condiciones experimentales. Aunque dicho reactivo actúe con finalidades diferentes (como reductor en la primera y como formador de aductos en la segunda), es necesario investigar si durante el proceso de reducción del primer procedimiento no se forman aductos con los MTO carvona, piperitona y piperitenona y por el contrario, si en la segunda reacción no se producen reducciones de la PUL a mentona que impidan su eliminación en forma de aductos solubles. En este sentido, toma relevancia la utilización de la CG-MS como técnica imprescindible para evaluar tanto el transcurso de las reacciones como la composición final de los AE obtenidos. Del mismo modo, la determinación conjunta de las propiedades físicas, químicas y sensoriales son las que indicarán de forma concluyente la viabilidad de cada procedimiento con cada AE en particular.

Finalmente, si bien la Agencia de Medicia Europea recomienda una Ingestia Diaria Tolerable (IDT) de 0,1 mg/Kg de peso corporal por día, se debe tener presente que las estimaciones de la ingesta per cápita de PUL son muy variables y es difícil precisar una evaluación general de su exposición. Por ello, aunque no se pueda determinar fehacientemente una IDT para la sustancia en estudio, pretender disminuir su concentración en los AE de uso alimenticio que la contienen o transformar los indeseables para que puedan ser utilizados en la industria de los alimentos, permite en definitiva, reducir su grado de exposición.

## 5 BIBLIOGRAFIA

---

1. Código Alimentario Argentino Capítulo XVI: Correctivos y Coadyuvantes. Art.1228, 1300 y ss. Capítulo XVIII: Aditivos Alimentarios (Resolución GMC N° 10/06). [http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/marco/CAA/capitulospdf/Capitulo\\_XVI.pdf](http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/marco/CAA/capitulospdf/Capitulo_XVI.pdf) (accessed 7 enero, 2021).
2. Lawrence, B. M. *Mint: the genus Mentha. Medicinal and aromatic plants -industrial profiles*; CRC Press. Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL. USA, 2007; Vol. 1.
3. Bonzani, N.; Costuguta, M.; Barboza, G. Estudios anatómicos en especies de Mentha (Fam. Lamiaceae) de Argentina. *Arnaldoa*. **2007**, *14*, 77-96.
4. Salehi, B.; Stojanović-Radić, Z.; Matejić, J.; Sharopov, F.; Antolak, H.; Kręgiel, D.; Sen, S.; Sharifi-Rad, M.; Acharya, K.; Sharifi-Rad, R.; Martorell, M.; Sureda, A.; Martins, N.; Sharifi-Rad, J. Plants of Genus Mentha: From Farm to Food Factory. *Plants*. **2018**, *7*, 7-36.
5. Hadi, M. Y.; Hameed, I. H.; Ibraheam, I. A. Mentha pulegium: Medicinal uses, Anti-Hepatic, Antibacterial, Antioxidant effect and Analysis of Bioactive Natural Compounds: A Review. *Research J. Pharm. and Tech*. **2017**, *10*, 1827-1831.
6. Jackson, C. M.; Esnouf, M. P.; Winzor, D. J.; Duewer, D. L. Defining and measuring biological activity: applying the principles of metrology. *Accredit. Qual. Assur*. **2007**, *12*, 283-294.
7. Fatih, B.; Madani, K.; Chibane, M.; Duez, P. Chemical Composition and Biological Activities of Mentha Species. In *Aromatic and Medicinal Plants. Back to Nature*; El-Shemy, H., Ed.; IntechOpen: London. UK., 2017; Vol. 1, pp 47-79.
8. Cohen, S. M.; Eisenbrand, G.; Fukushima, S.; Gooderham, N. J.; Guengerich, F. P.; Hecht, S. S.; Rietjens, I. M.; Bastaki, M.; Davidsen, J. M.; Harman, C. L. FEMA GRAS assessment of natural flavor complexes: Mint, buchu, dill and caraway derived flavoring ingredients. *Food Chem. Toxicol*. **2020**, *135*, 110870.
9. Alonso, J. *Tratado de Fitofármacos y Nutraceuticos*; Corpus Editorial y Distribuidora: Rosario. Argentina, 2007; Vol. 1, pp 720-730.
10. ISO Essential oil. ISO 856:2006 (Oil of peppermint: Mentha x piperita L.); ISO 3033-2:2005. Oil of Spearmint. Part 2 (Chinese type 80% and 60% Mentha viridis redistilled oil); ISO 3033-3:2005. Oil of Spearmint. Part 3 (Indian type Mentha spicata L. redistilled oil); ISO 9776:1999 (Oil of Mentha arvensis partially dementholized). **2006**.
11. IRAM. Productos Aromatizantes: Aceites Esenciales. Normas N° 18512:2013 (Contenido de ésteres);N° 18517:2013 (Aceite de Mentha x piperita. Argentina). **2013**.
12. IRAM-SAIPA. Productos Aromatizantes: Aceites Esenciales. Normas N° 18504:2002 (Densidad relativa a 20 °C); N° 18505:2002 (Índice de refracción); N° 18507:2002 (Rotación óptica); N° 18510:2003 (Solubilidad en soluciones de etanol); N° 18511:2001 (Índice de acidez); N° 18515:1984 (Compuestos carbonílicos); N° 18526:1997 (Aceite de Menta spicata);N° 18562:1983 (Menta arvensis parcialmente desmentolizada); N° 18606:2003 (Aceite de peperina tipo argentino); N° 18624:1987 (Aceite de Mentha pulegium). *IRAM* **2003**.
13. European Pharmacopoeia *Ph. Eur. 0405 (Mentha x piperita essential oil)*. *Ph. Eur.* 1838 (*Mentha arvensis essential oil*). Strasbourg: Council of Europe: France, 2010; Vol. 1.
14. Barbieri, N.; Costamagna, M.; Gilabert, M.; Perotti, M.; Schuff, C.; Isla, M. I.; Benavente, A. Antioxidant activity and chemical composition of essential oils of three aromatic plants from La Rioja province. *Pharm. Biol*. **2016**, *54*, 168-173.

15. Zygadlo, J. *Aceites Esenciales: Química, Ecología, Comercio, Producción y Salud*. Universitas: Córdoba, Argentina, 2012; Vol. 1, pp 11-53.
16. Claramunt Villespí, R. M.; Farrán Morales, M.; López García, C.; Pérez Torralba, M.; Santa María Gutiérrez, D. *Química Bioorgánica y Productos Naturales*; Grado en Química; Editorial UNED: España, 2013; Vol. 1, pp 195-218.
17. McConkey, M. E.; Gershenzon, J.; Croteau, R. B. Developmental regulation of monoterpene biosynthesis in the glandular trichomes of peppermint. *Plant Physiol.* **2000**, *122*, 215-224.
18. Sadgrove, N.; Jones, G. A contemporary introduction to essential oils: chemistry, bioactivity and prospects for Australian agriculture. *Agriculture.* **2015**, *5*, 48-102.
19. Ringuelet, J. A.; Viña, S. Z. *Productos naturales vegetales*; Libros de Cátedra; Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP): La Plata. Argentina, 2013; Vol. 1, pp 173-187.
20. Hartmann, T. The lost origin of chemical ecology in the late 19th century. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2008**, *105*, 4541-4546.
21. Moghaddam; Mehdizadeh. Chemistry of Essential Oils and Factors Influencing Their Constituents. In *Soft Chemistry and Food Fermentation*; Grumezescu, A. M., Holban, A. M., Eds.; Academic Press: London. U.K., 2017; Vol. 3, pp 399-409.
22. de Haro Conde, K.; Chávez, Y. F.; MacQuarrie, A. F.; Meza, K. A. T. Fitoquímicos y su aplicación clínica. *Nutrición enteral y parenteral* **2012**, *1*, 622-626.
23. Blanco, A.; Blanco, G. *Química Biológica*; El Ateneo: Buenos Aires. Argentina, 2016; Vol. 1, pp 95-113.
24. IUPAC Gold Book: Compendium of Chemical Terminology. <https://goldbook.iupac.org/> (accessed 24 marzo, 2021).
25. Hillier, S.; Lathe, R. Terpenes, hormones and life: isoprene rule revisited. *J. Endocrinol.* **2019**, *242*, R9-R22.
26. Bruice, P. Y. *Organic Chemistry: Global Edition*; Pearson Education Limited: England, 2017; Vol. 1.
27. Mahmoud, S. S.; Croteau, R. B. Menthofuran regulates essential oil biosynthesis in peppermint by controlling a downstream monoterpene reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2003**, *100*, 14481-14486.
28. Mimica-Dukic, N.; Bozin, B. *Mentha L.* species (Lamiaceae) as promising sources of bioactive secondary metabolites. *Curr. Pharm. Des.* **2008**, *14*, 3141-3150.
29. Lange, B. M. Biosynthesis and biotechnology of high-value p-menthane monoterpenes, including menthol, carvone, and limonene. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **2015**, *148*, 319-353.
30. Fuchs, S.; Beck, T.; Mosandl, A. Different stereoselectivity in the reduction of pulegone by *Mentha* species. *Planta Med.* **2001**, *67*, 260-262.
31. Masomeh, L.; Narges, M.; Hassan, R.; Hadi, A. Peppermint and its Functionality: A Review. *Arch. Clin. Microbiol.* **2017**, *8*, 1-16.
32. Favre, H. A.; Powell, W. H. *Nomenclature of organic chemistry: IUPAC recommendations and preferred names 2013*; International Union of Pure and Applied Chemistry; Royal Society of Chemistry: Cambridge, England, 2013; Vol. 1, pp 1293-1438.
33. ISO Essential Oil ISO 11024-1 (General guidance on chromatographic profiles-Part 1: Preparation of chromatographic profiles for presentation in standards), 1998.

34. Engel, W. In vivo studies on the metabolism of the monoterpene pulegone in humans using the metabolism of ingestion-correlated amounts (MICA) approach: explanation for the toxicity differences between (S)-(-)-and (R)-(+)-pulegone. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 6589-6597.
35. European Food Safety Authority, (EFSA) Pulegone and Menthofuran in flavourings-Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in contact with Food (AFC). *EFSA Journal.* **2008**, *6*, 1-32.
36. Gordon, P.; Khojasteh, S. C. A decades-long investigation of acute metabolism-based hepatotoxicity by herbal constituents: a case study of pennyroyal oil. *Drug Metab. Rev.* **2015**, *47*, 12-20.
37. French, L. G. Isolation of (R)-(+)-Pulegone from the European Pennyroyal Mint, *Mentha Pulegium*. *Chem. Educator.* **2002**, *7*, 270-277.
38. PubChem; National Institutes of Health, (NIH) Pulegone Compound Summary. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pulegone> (accessed 7 January, 2021).
39. Gordon, W. P.; Forte, A. J.; McMurtry, R. J.; Gal, J.; Nelson, S. D. Hepatotoxicity and pulmonary toxicity of pennyroyal oil and its constituent terpenes in the mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1982**, *65*, 413-424.
40. Sullivan, J. B.; Rumack, B. H.; Thomas, H.; Peterson, R. G.; Bryson, P. Pennyroyal oil poisoning and hepatotoxicity. *JAMA.* **1979**, *242*, 2873-2874.
41. Conover, E. A. Herbal agents and over-the-counter medications in pregnancy. *Best Pract. Res. Cl. En.* **2003**, *17*, 237-251.
42. Dosoky, N. S.; Setzer, W. N. Maternal Reproductive Toxicity of Some Essential Oils and Their Constituents. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 2380.
43. Lamiri, A.; Lhaloui, S.; Benjilali, B.; Berrada, M. Insecticidal effects of essential oils against Hessian fly, *Mayetiola destructor* (Say). *Field Crops Res.* **2001**, *71*, 9-15.
44. Anderson, I. B.; Mullen, W. H.; Meeker, J. E.; Khojasteh-Bakht, S. C.; Oishi, S.; Nelson, S. D.; Blanc, P. D. Pennyroyal toxicity: measurement of toxic metabolite levels in two cases and review of the literature. *Ann. Intern. Med.* **1996**, *124*, 726-734.
45. Mercosur GMC/Res. N° 10/06. Reglamento Técnico Mercosur sobre Aditivos Aromatizantes/Saborizantes. **2006**.
46. Área de Gestión de Riesgos Químicos. Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. *Guía de Aplicación de la Legislación de Aromas Alimentarios*. AECOSAN: España, 2016; Vol. 1, pp 6-8.
47. National Toxicology Program Toxicology and carcinogenesis studies of pulegone (CAS No. 89-82-7) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies). *National Toxicology Program Technical Report Series* **2011**, *563*, 1-201.
48. HMPC (Committee on Herbal Medicinal Products).European Medicines Agency. Public statement on the use of herbal medicinal products1 containing pulegone and menthofuran (EMA/HMPC/138386/2005. Rev.1). <https://www.ema.europa.eu/en/use-herbal-medicinal-products-containing-pulegone-menthofuran> (accessed 18 april, 2021).
49. Agrelo de Nassiff, A.; Ricciardi, G.; Torres, A.; Ricciardi, A. Contenido en pulegona de la infusión de *Mentha pulegium* L. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Universidad Nacional del Noreste.* **2004**, 1-3.
50. Bakerink, J. A.; Gospe, S. M.; Dimand, R. J.; Eldridge, M. W. Multiple organ failure after ingestion of pennyroyal oil from herbal tea in two infants. *Pediatrics.* **1996**, *98*, 944-947.



51. Jabba, S. V.; Jordt, S. Risk Analysis for the carcinogen pulegone in mint-and menthol-flavored e-cigarettes and smokeless tobacco products. *JAMA Internal Medicine*. **2019**, *179*, 1721-1723.
52. Zárbynický, T.; Matoušková, P.; Lancošová, B.; Šubrt, Z.; Skálová, L.; Boušová, I. Inter-individual variability in acute toxicity of R-pulegone and R-menthofuran in human liver slices and their influence on miRNA expression changes in comparison to acetaminophen. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1805.
53. Seling, G.; Torossi, F. Aplicación de una reacción de reducción estereoespecífica para disminuir el contenido de (+)-pulegona en aceites esenciales de diferentes especies de mentas. *I Jornadas de Estudiantes Investigadores y Extensionistas. III Congreso de Bromatología y Nutrición. Facultad de Bromatología. UNER.* **2019**.
54. Blackwell, B.; Netherwood, S.; Piccolo, D. J. U.S. Patent 4,456,621, 1984.
55. Johnson, S. S. U.S. Patent 5,204,128, 1993.
56. Berteau, C. M.; Schalk, M.; Karp, F.; Maffei, M.; Croteau, R. Demonstration that menthofuran synthase of mint (*Mentha*) is a cytochrome P450 monooxygenase: cloning, functional expression, and characterization of the responsible gene. *Arch. Biochem. Biophys.* **2001**, *390*, 279-286.
57. Nelson, S. D.; McClanahan, R. H.; Thomassen, D.; Perry Gordon, W.; Knebel, N. Investigations of mechanisms of reactive metabolite formation from (R)-(+)-pulegone. *Xenobiotica*. **1992**, *22*, 1157-1164.
58. Lan, Y.; Wang, J.; Li, H.; Zhang, Y.; Chen, Y.; Zhao, B.; Wu, Q. Effect of menthone and related compounds on skin permeation of drugs with different lipophilicity and molecular organization of stratum corneum lipids. *Pharm. Dev. Technol.* **2016**, *21*, 389-398.
59. Jabba, S. V.; Jordt, S. E. Activation of Respiratory Irritant Receptors by Pulegone, A Toxic Flavor Chemical in Mint- or Menthol-Flavored Electronic Cigarettes. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2020**, *201*.
60. International Agency for Research on Cancer, (IARC). Pulegone. In *Some Drugs and Herbal Products. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human*. WHO Press. World Health Organization: Switzerland, 2016; Vol. 108, pp 141-154.
61. European Food Safety Authority. EFSA Glossary. <https://www.efsa.europa.eu/en/glossary-taxonomy-terms> (accessed Mar 22, 2021).
62. Herrman, J. L.; Younes, M. Background to the ADI/TDI/PTWI. *Regul. Toxicol. Pharm.* **1999**, *30*, S109-S113.
63. Kulkarni, S. A.; Nagarajan, S. K.; Ramesh, V.; Palaniyandi, V.; Selvam, S. P.; Madhavan, T. Computational evaluation of major components from plant essential oils as potent inhibitors of SARS-CoV-2 spike protein. *J. Mol. Struct.* **2020**, *1221*, 128823.
64. Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S.; Wothers, P. *Organic Chemistry*; Oxford University Press: New York, USA, 2012; Vol. 1, pp 138-140.
65. Kumar, P.; Sahoo, D.; Chanotiya, C. S. Valorization of undesired pulegone in *Mentha* essential oil by selective catalytic reduction: An overview. *J. Med. Aromat. Plants Sci.* **2020**, *42*, 86-93.
66. Vetere, V.; Santori, G. F.; Moglioni, A.; Iglesias, G. Y. M.; Casella, M. L.; Ferretti, O. A. Hydrogenation of (-)-Menthone, (+)-Isomenthone, and (+)-Pulegone with Platinum/Tin Catalysts. *Catal. Letters.* **2002**, *84*, 251-257.

67. Ravi, P.; Ravichandran, R.; Divakar, S. Stereoselective hydrogenation of (*R*)-(+)-pulegone and (2*S*,5*R*)-(-)-menthone in presence of  $\beta$ -cyclodextrin and its derivatives. *J. Mol. Catal. A.* **1999**, *148*, 145-155.
68. Bogel-Lukasik, E. Selective catalytic conversion of pulegone in supercritical carbon dioxide towards natural compounds: carvone, thymol or menthone. *J. Supercrit. Fluid.* **2015**, *99*, 121-128.
69. Lima, M. V.; Menezes, F. D.; de Barros Neto, B.; Navarro, M. A factorial design analysis of (+)-pulegone electrocatalytic hydrogenation. *J. Electroanal. Chem.* **2008**, *613*, 58-66.
70. Ravichandran, R.; Divakar, S.  $\beta$ -Cyclodextrin and its derivatives directed axial attack of hydride ion in the reduction of (*R*)-(+)-pulegone and (2*S*,5*R*)-(-)-menthone. *J. Mol. Catal. A.* **1996**, *109*, 201-208.
71. Justice, R. J. I. The In-Situ Removal of Menthofuran from Peppermint Oil and Subsequent Reactions of the Solid-Supported Adduct. *Western Michigan University.* **2010**.
72. Ashenhurst; James HOMO and LUMO In the Diels Alder Reaction. Master Organic Chemistry. <https://www.masterorganicchemistry.com/2018/03/23/molecular-orbitals-in-the-diels-alder-reaction/> (accessed Mar 12, 2021).
73. Vallejo Lázaro, S. Estudio de la reacción de Diels-Alder intramolecular organocatalizada usando el anillo de furano como dieno (IMDAF), Universidad de Valladolid., Facultad de Ciencias, 2018.
74. Spencer, J. S. U.S. Patent 4,861,616, 1989.
75. Campbell, K. N.; Campbell, B. K. The Addition of Hydrogen to Multiple Carbon-Carbon Bonds. *Chem. Rev.* **1942**, *31*, 77-175.
76. Johnstone, R. A.; Wilby, A. H.; Entwistle, I. D. Heterogeneous catalytic transfer hydrogenation and its relation to other methods for reduction of organic compounds. *Chem. Rev.* **1985**, *85*, 129-170.
77. Ayres, G. H.; Pérez, S. V. *Análisis Químico Cuantitativo*. Oxford University Press: México, 2001; Vol. 1, pp 59-62.
78. Smith, M. B. *Organic Synthesis*; Academic Press: USA, 2010; Vol. 1, pp 453-455.
79. Toogood, H. S.; Tait, S.; Jervis, A.; Cheallaigh, A. N.; Humphreys, L.; Takano, E.; Gardiner, J. M.; Scrutton, N. S. Natural Product Biosynthesis in *Escherichia coli*: *Mentha* Monoterpenoids. *Meth. Enzymol.* **2016**, *575*, 247-270.
80. Gade, J.; More, S. Extraction of Menthol using Different Methods from Peppermint Oil. *Int. J. Pharmtech Res.* **2017**, *10*, 186-193.
81. Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. *Food Chemicals Codex*; National Academy Press: Washington, D.C., 2004; Vol. 1, pp 929-933.
82. D'Acampora Zellner, B.; Dugo, P.; Dugo, G.; Mondello, L. Analysis of Essential Oils. In *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications.*; Can Başer Hüsni, Gerhard Buchbauer, Ed.; CRC Press: Boca Raton. FL. USA, 2015; Vol. 1, pp 199.
83. Furigay, M. H.; Boucher, M. M.; Mizgier, N. A.; Brindle, C. S. Separation of aldehydes and reactive ketones from mixtures using a bisulfite extraction protocol. *JoVE.* **2018**, *134*, e57639.
84. Boucher, M. M.; Furigay, M. H.; Quach, P. K.; Brindle, C. S. Liquid-liquid extraction protocol for the removal of aldehydes and highly reactive ketones from mixtures. *Org. Process. Res. Dev.* **2017**, *21*, 1394-1403.

85. Wedzicha, B. L. Chemistry of sulphiting agents in food. *Food Addit. Contam.* **1992**, 9, 449-459.
86. Garcia-Fuentes, A. R.; Wirtz, S.; Vos, E.; Verhagen, H. Short review of sulphites as food additives. *European J. Nutr. Food Saf.* **2015**, 5, 113-120.
87. Fazio, T.; Warner, C. R. A review of sulphites in foods: analytical methodology and reported findings. *Food Addit. Contam.* **1990**, 7, 433-454.
88. Müller, I. A.; Brunner, B.; Breuer, C.; Coleman, M.; Bach, W. The oxygen isotope equilibrium fractionation between sulfite species and water. *Geochim. Cosmochim. Acta.* **2013**, 120, 562-581.
89. Guthrie, J. P.; Wu, Y.; Bannister, A. R.; Peiris, S.; Povar, I.; Wilson, E. A.; Wang, Q. Rate constants for formation of bisulfite addition compounds: an examination in terms of No Barrier Theory. *Can. J. Chem.* **2015**, 93, 227-233.
90. Shibamoto, T.; Enomoto, Y.; Akiyama, T. Sulphite adducts of cyclic monoterpene ketones. *Food Chem.* **1981**, 7, 219-225.
91. Bechstein, E. L. Composición química del aceite esencial de poleo (*Mentha pulegium*), original de Misiones, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Buenos Aires. Argentina, 1953.
92. PubChem; National Institutes of Health, (NIH) (-)-Menthone and (+)-Isomenthone 3 D Structures. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Menthone#section=3D-Conformer> (accessed Jun 12, 2021).
93. Salim, R. A.; Abu-Goukh, A. A.; Khalid, H.; El-Hassan, G. M. Effect of refinery on spearmint (*Mentha spicata* var. *Viridis* l) oil quality. *Int. J. Food Process. Technol.* **2015**, 6, 1.
94. Montes, A. Bromatología. Tomo III. Ed. EUDEBA, Universitaria de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina **1981**, (3).
95. McGuire, R. G. Reporting of objective color measurements. *HortScience.* **1992**, 27, 1254-1255.
96. Mathias-Rettig, K.; Ah-Hen, K. El color en los alimentos un criterio de calidad medible. *Agro Sur.* **2014**, 42, 57-66.
97. Tarhan, S.; Telci, I.; Tuncay, M. T.; Polatci, H. Product quality and energy consumption when drying peppermint by rotary drum dryer. *Ind. Crop. Prod.* **2010**, 32, 420-427.
98. Ministerio de Salud de la Nación; ANMAT; INAME. *Farmacopea Argentina*; Ministerio de Salud de la Nación: Buenos Aires. Argentina, 2003; Vol. 1.
99. ISO Essential oil ISO 1241:1996 (Determination of ester values, before and after acetylation, and evaluation of the contents of free and total alcohols), 1996.
100. Diaz Maroto, M. C.; Pérez Coello, M. S. Análisis de los compuestos responsables del aroma de las especias. *An. Quím.* **2006**, 102(3), 31-35.
101. Turek, C.; Stintzing, F. C. Stability of essential oils: a review. *Compr. Rev. Food Sci. F.* **2013**, 12, 40-53.

## 6 ANEXO

### MÉTODOS FUNDAMENTALES DE ANÁLISIS PARA LOS AE DE MENTA

Se presenta, a continuación, el fundamento, interés analítico y forma de expresar los resultados de cada uno de los métodos de análisis que permiten caracterizar a los AE de uso alimenticio abordados en este trabajo. Los mismos, se corresponden con los parámetros de calidad exigidos por el CAA en los Artículos N° 1300 (inciso 28, 30 y 31) y N° 1302 del Capítulo XVI: Correctivos y Coadyuvantes y las técnicas para llevarlos a cabo, con la Normas IRAM-SAIPA.

### PROPIEDADES FÍSICAS

#### Determinación de la densidad relativa a 20°C (IRAM-SAIPA N 18504:2002)<sup>12</sup>

La densidad relativa ( $d_{20}^{20}$ ) es la relación entre la masa de un vol. dado de AE a 20 °C con respecto a la masa de igual vol. de agua destilada a 20 °C. La determinación se basa en pesar de forma sucesiva, iguales vol. de AE y de agua destilada a 20 °C en un picnómetro y relacionar, posteriormente, ambas masas. Como la densidad está relacionada directamente con la composición del AE, su determinación permite detectar adulteraciones.<sup>93</sup>

$$d_{20}^{20} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

Siendo:

$d_{20}^{20}$  = densidad relativa (adimensional).

$m_0$  = masa del picnómetro vacío (g).

$m_1$  = masa del picnómetro enrasado con agua (g).

$m_2$  = masa del picnómetro enrasado con AE (g).

#### Determinación del índice de refracción a 20 °C (IRAM-SAIPA N 18505:2002)<sup>12</sup>

El índice de refracción ( $n_D^t$ ) es la relación entre el seno del ángulo de incidencia con respecto al seno del ángulo de refracción, cuando un haz de luz correspondiente a la línea D del Na ( $\lambda = 589,3 \pm 0.3$  nm), pasa del aire al AE a 20 °C. Dado que es un promedio ponderado de los índices de cada uno de los componentes del AE, proporciona información sobre el tipo de familias a las cuales pertenecen las sustancias predominantes y permite detectar adulteraciones y procesos de envejecimiento por polimerización de MT y MTO.<sup>94</sup> El índice de refracción es adimensional y se determina directamente mediante un refractómetro.

#### Determinación de la rotación óptica (IRAM-SAIPA N 18507:2002)<sup>12</sup>

La rotación óptica o poder rotatorio ( $\alpha_D^t$ ) es el valor del ángulo de rotación del plano de la luz polarizada (expresado en grado sexagesimal) cuando un haz de luz correspondiente a la línea D del Na ( $\lambda = 589,3$  nm  $\pm$  0.3 nm) atraviesa un espesor de 100 mm de AE en

condiciones determinadas de temperatura. Debido a la estereoespecificidad de su biosíntesis, los AE de las diferentes especies de mentas están constituidos químicamente por una mezcla compleja de enantiómeros específicos tanto levógiros (-) como dextrógiros (+). La preponderancia de unos sobre otros puede ser medida a través de un polarímetro, y su valor es un criterio de genuinidad que permite determinar adulteraciones o falsificaciones por el agregado de otros tipos de AE, o de sustancias sintéticas usualmente comercializadas en forma de racematos ( $\pm$ ) que modifican las propiedades organolépticas y biológicas de los AE.<sup>18</sup>

$$\alpha_D^t = \frac{A}{l} \times 100$$

Siendo:

$\alpha_D^t$  = rotación óptica o poder rotatorio.

A = valor del ángulo de rotación en grados de ángulos ( $^\circ$ ).

l = longitud del tubo que contiene la muestra en milímetros (mm).

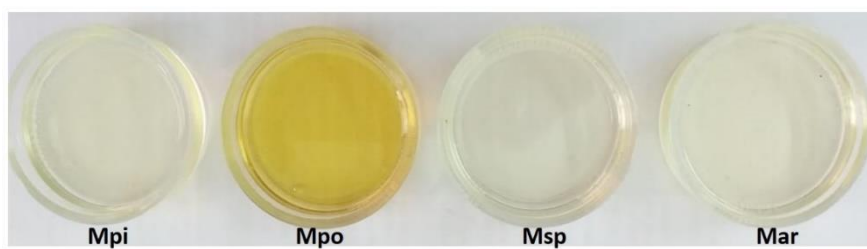
t = temperatura de la determinación en grados centígrados ( $^\circ\text{C}$ ).

### **Determinación de la solubilidad en disoluciones de etanol (IRAM-SAIPA N 18510:2003)<sup>12</sup>**

La solubilidad de un AE respecto de una disolución de EtOH en agua (a una determinada concentración), es la máxima cantidad de AE capaz de disolverse en dicha disolución a una temperatura de 20  $^\circ\text{C}$ . Para los AE de Mpi y Mpo se utiliza EtOH en agua al 70% (v/v) y para los AE de Mar y Msp al 80% (v/v). El ensayo proporciona información sobre el contenido de MTO (a mayor solubilidad, mayor contenido de MTO y menor de MT). Se trata de un ensayo cualitativo que permite detectar adulteraciones por adición de AE de baja calidad o de aceites (vegetales o minerales) insolubles en las disoluciones de EtOH. Además, es un indicativo del grado de conservación de los AE (los productos de polimerización por acción del tiempo y/o una conservación inadecuada disminuyen la solubilidad). Las solubilidades se informan como los volúmenes requeridos de EtOH (70% u 80%) para obtener una disolución límpida. Si hasta el agregado de 4 volúmenes de EtOH la solubilidad se presenta con turbidez, la misma se informa como “mayor que”, “igual a” o “menor que” en comparación con un patrón de turbidez.

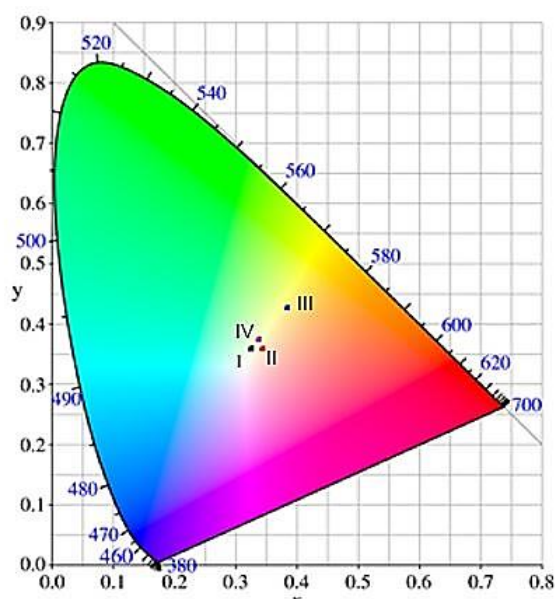
### **Determinación de color (McGuire, 1992)<sup>95</sup>**

El color es la percepción de una cierta longitud de onda reflejada por un objeto. Es un atributo tanto objetivo (propiedad física) como subjetivo (propiedad sensorial) que influye directamente en la aceptabilidad de un alimento.<sup>96</sup> Para el caso particular de los AE, este parámetro depende de su fitoquímica y es un indicador del proceso de obtención y del estado de conservación.<sup>93</sup> EL Género *Mentha* se caracteriza por AE incoloros o de coloración verde-amarillenta propensa a tornarse mas oscura debido a procesos oxidativos o de polimerización (Figura 23).<sup>53</sup>



**Figura 23.** Colores característicos de los AE de las especies de mentas de mayor interés comercial e industrial.<sup>53</sup>

En términos de propiedad física, el color se mide instrumentalmente empleando el espacio CIE L\* a\* b\* o CIELAB (Figura 24),<sup>53</sup> el cual posee tres dimensiones basadas en la teoría de los colores opuestos (un mismo material no puede tener al mismo tiempo colores opuestos). Dichas dimensiones se presentan con las letras L\* (grado de brillo o luminosidad de 0 a 100); a\* (grado de enrojecimiento o verdor de positivo a negativo) y b\* (grado de amarillez o de coloración azul de positivo a negativo).<sup>97</sup>



**Figura 24.** Diagrama del espacio de color CIELAB: I (Mpi); II (Msp); III (Mpo) y IV (Mar).<sup>53</sup>

## PROPIEDADES QUÍMICAS

### Determinación del pH (Farmacopea Argentina)<sup>98</sup>

El pH (potencial hidrógeno) es un valor numérico empleado para expresar el grado de acidez o alcalinidad de una disolución. Dado que es un indicador de la concentración de protones (H<sup>+</sup>) o hidroxilos (HO<sup>-</sup>) libres, su determinación es muy importante para controlar el transcurso de las reacciones químicas llevadas a cabo con los AE.<sup>98</sup>

### Determinación del índice de acidez (IRAM-SAIPA N 18511:2001)<sup>12</sup>

El índice de acidez (IA) se define como los mg de KOH necesarios para neutralizar los ácidos libres presentes en 1 g de AE. Es indicativo del grado de acidez de un AE, proporciona información relevante sobre el método de extracción y el estado de conservación del mismo.<sup>93</sup> Su valor aumenta por envejecimiento del AE, por la oxidación de aldehídos e hidrólisis de ésteres y prácticamente no varía cuando los AE se conservan de forma anhidra y en recipientes oscuros y herméticos luego de su extracción.

$$IA = V \times c \times \frac{56,11}{m}$$

Siendo:

IA = índice de acidez (mg/g).

V = volumen de disolución de KOH empleada en la valoración (mL).

c = concentración de la disolución de KOH (mol/L).

m = masa de la muestra de AE (g).

56,11 = masa molar del KOH (g).

### Determinación del índice de éster (IRAM 18512:2013)<sup>11</sup>

El índice de éster (IE) se define como los mg de KOH necesarios para neutralizar los ácidos liberados por la hidrólisis de los ésteres presentes en 1 g de AE. El ensayo consiste en transformar los ésteres del AE en iones carboxilatos y alcoholes mediante una disolución patrón de KOH (0,5 N). Se trata de una reacción de sustitución nucleofílica en el grupo acilo (usualmente denominada saponificación), tras la cual, el KOH no consumido se valora con una disolución patrón de HCl (0,5 N). Los ésteres en general, y el acetato de mentilo en particular, es uno de los responsables del aroma característico de la menta. Sin embargo, como se forma a partir del mentol, un contenido elevado de éster puede estar revelando procesos oxidativos de degradación del alcohol.<sup>21</sup> Dado que son compuestos fácilmente hidrolizables, los AE que los contienen deben conservarse con extremo recaudo.

$$IE = \frac{56,11 \times (V_b - V) \times N}{m}$$

Siendo:

IE = índice de éster (mg/g).

V<sub>b</sub> = volumen de HCl empleado en la valoración del blanco (mL).

V = volumen de HCl empleado en la valoración de la muestra (mL).

N = normalidad del HCl empleado en la valoración (Nº de Eq./1.000 mL).

m = masa de la muestra de AE (g).

56,11 = masa molar del KOH (g).

$$A = \frac{E \times (V_b - V) \times N}{m \times 1000}$$

Siendo:

A = contenido de ésteres (g/100g).

E = masa equivalente del éster en que se expresa el resultado (g)

V<sub>b</sub> = volumen de HCl empleado en la valoración del blanco (mL).

V = volumen de HCl empleado en la valoración de la muestra (mL).

N = normalidad del HCl empleado en la valoración (Nº de Eq./1.000 mL).

m = masa de la muestra de AE (g).

### Determinación de alcoholes totales (ISO 1241:1996)<sup>99</sup>

Los alcoholes totales representan la suma de los alcoholes libres (alcoholes presentes en los AE) más los alcoholes combinados (alcoholes en forma de ésteres). El ensayo consiste

en dos procedimientos: i) acetilar los alcoholes presentes con anhídrido acético (Ac<sub>2</sub>O) en presencia de acetato de sodio (AcONa), para transformarlos en ésteres y sus correspondientes ácidos. La cuantificación se hace a partir de la determinación del IE antes y después de la acetilación. Los alcoholes en general y el mentol en particular, poseen propiedades organolépticas, cosméticas y farmacológicas muy valiosas. Esto, sumado al particular flavor otorgado por estas sustancias, justifica su cuantificación y por ende, la detección de posibles adulteraciones realizadas por el agregado de alcoholes como diluyentes.

$$E_1 = \frac{28,05}{m} \times (V_0 - V_1)$$

$$E_2 = \frac{28,05}{m} \times (V_0 - V_1)$$

Siendo:

$E_1$  = índice de éster del AE sin acetilar (mg/g).

$E_2$  = índice de éster del AE acetilado (mg/g).

$V_0$  = volumen de HCl utilizado para valorar el blanco (mL).

$V_1$  = volumen de HCl utilizado para valorar la muestra (mL).

$m$  = masa de la muestra de AE (g).

$$\% \text{ alcoholes libres} = \frac{Mr \times (E_2 - E_1)}{561 - 0,42 \times E_2}$$

Siendo:

$Mr$  = masa molecular relativa del mentol (156,27).

$$\% \text{ alcoholes combinados} = \frac{Mr \times E_1}{561}$$

$$\% \text{ alcoholes totales} = \text{alcoholes libres} + \text{alcoholes combinados}$$

### Determinación de Compuestos Carbonílicos - (IRAM-SAIPA N 18515:1984)<sup>12</sup>

El contenido de compuestos carbonílicos se determina a partir del Índice de carbonilo, el cual representa los mg de KOH por g de AE, necesarios para neutralizar el HCl liberado en una reacción de oximación (formación de oximas: RR'C=NOH). El método consiste en oximar los grupos carbonilos de los aldehídos y cetonas con cloruro de hidroxilamonio (Cl.NH<sub>3</sub>OH), dando las aldoximas o cetoximas correspondientes. De la reacción se libera HCl, el cual es valorado mediante una disolución de KOH. Cada especie de menta está caracterizada por un MTO con FO cetona característico. Su concentración, expresada en función de la sustancia que lo contenga, es un indicio de la especie de AE que se esté analizando.

$$\text{Compuestos carbonílicos} = \frac{E \times V \times N}{m} \times 100$$

Siendo:

$E$  = compuesto en que se expresa el contenido de compuestos carbonílicos (meq).

para  $M_{pi}$  y  $M_{ar}$ : mentona (0,154 meq);  $M_{sp}$ : carvona (0,150 meq);

$M_{po}$ : pulegona (0,152 meq).

$V$  = volumen de KOH utilizado para valorar la muestra (mL).

$N$  = normalidad del KOH empleado en la valoración (0,5 N).

$m$  = masa de la muestra de AE (g).

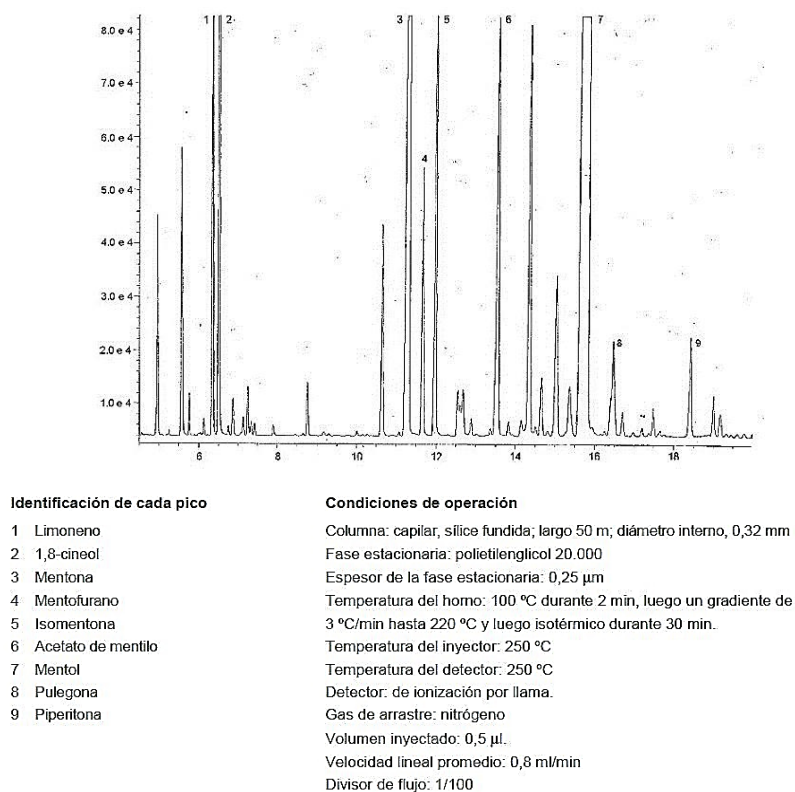


## EVALUACIÓN SENSORIAL

Las primeras etapas en la evaluación de un AE comienzan, en general, con una evaluación sensorial, un método efectivo para identificar AE adulterados. Al respecto, si bien la Norma IRAM-SAIPA 186-01 del año 1970 establece para los AE un método de valoración olfativa, éste resulta insuficiente para los tiempos actuales por lo que ha sido reemplazado, como se verá en el próximo apartado, por técnicas más modernas como la cromatografía de gases acoplada a la olfatometría (GC-O).<sup>100</sup>

## TÉCNICAS INSTRUMENTALES

La caracterización de un AE se completa con la determinación del perfil cromatográfico (PC), definido como el listado de componentes representativos y característicos del AE junto a sus límites de concentración y la relación entre dichas concentraciones.<sup>33</sup> En realidad, no se trata de una concentración real, sino de una evaluación de sus proporciones relativas. EL PC se determina mediante Cromatografía de Gases (GC) con un detector de ionización de llama (FID, Flame Ionization Detector), que proporciona la información mediante un cromatograma, usualmente también llamado PC. El cromatograma posibilita una identificación cualitativa a través de los tiempos y volúmenes de retención, y una información cuantitativa mediante la altura de los picos y la medida de sus correspondientes áreas (Figura 25).



**Figura 25.** Cromatograma típico obtenido mediante GC de un AE de Mpi según un análisis cuantitativo por el método de porcentaje de áreas sin corrección de factores de respuesta.<sup>12</sup>

Sin lugar a dudas, los métodos cromatográficos son los más eficientes para determinar la composición de los AE, detectar tanto impurezas como adulteraciones y llevar a cabo cuantificaciones.<sup>2,15,19</sup> En los últimos años se ha incrementado la utilización de la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS) y la utilización de técnicas con mayor poder de resolución como las multidimensionales o la GC enantioselectiva. Actualmente, la GC acoplada a la olfatometría (GC-O) permite separar los compuestos volátiles y evaluar la contribución de cada uno de ellos en el aroma global del AE, lo que ha transformado a esta técnica, en una herramienta fundamental para el análisis sensorial.<sup>100,101</sup> A continuación, se presenta un cromatograma típico obtenido mediante GC-O de un extracto de Mpo.<sup>100</sup>

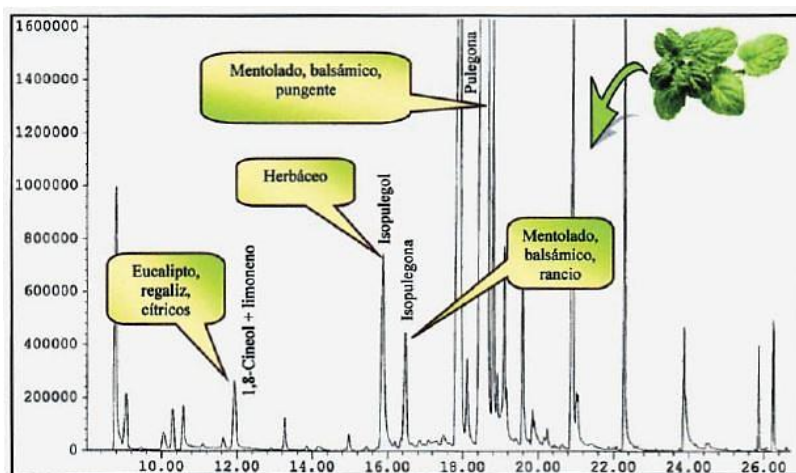


Figura 26. Componentes representativos del aroma de Mpo detectados mediante GC-O.<sup>100</sup>

### Cálculo del porcentaje de disminución del contenido de PUL para los AE de menta<sup>48</sup>

Muestra	
AE de Mpi con un contenido máximo de PUL = 3,0% (Farmacopea Europea) $d_{20}^{20} = 0,916$	
<ul style="list-style-type: none"> <li>La Unión Europea (UE) recomienda una dosis máxima de 1,2 mL por día de AE de Mpi. Conforme a la densidad, 1,2 mL de AE equivalen a 1.099,0 mg/mL.</li> <li>En 1.099,0 mg/mL de AE existe un 3,0% de PUL, es decir, 32,97 mg/mL de PUL.</li> <li>La ingesta de PUL por día de una persona de 50 kg (tomado como referencia) equivalen a 0,66 mg/kg de PUL</li> <li>Como el Comité de Expertos en Sustancias Aromatizantes/Saborizantes (CEFS) del Consejo de Europa establece una Ingesta Diaria Tolerable (IDT) de 0,1 mg/kg de peso corporal por día (pcd). Los 0,66 mg/kg de PUL en términos de IDT corresponden a 0,45% de PUL. Porcentaje al cual se debe disminuir el contenido original de PUL (3,0%) del AE de la muestra.</li> </ul>	
0,66 mg/kg.....	3,0% de PUL
0,1 mg/kg.....	x = 0,45% de PUL

Figura 27. Ejemplo numérico para calcular el porcentaje de disminución del contenido de PUL en los AE de menta.<sup>48</sup>