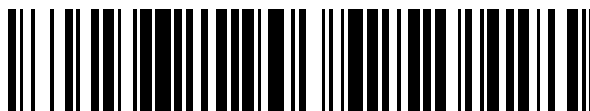


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 784**

51 Int. Cl.:  
**A23L 2/02** (2006.01)  
**C07J 73/00** (2006.01)  
**G01N 33/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **10013392 .5**  
96 Fecha de presentación: **09.10.2008**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2274991**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.01.2011**

54 Título: **Control de las características de sabor e indicador de la frescura de un zumo de frutas**

30 Prioridad:  
**09.10.2007 US 978515 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**31.07.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**31.07.2012**

73 Titular/es:  
**TROPICANA PRODUCTS, INC.**  
**1001 13th Avenue East**  
**Bradenton, FL 34208, US**

72 Inventor/es:  
**Havekotte, Margaret;**  
**Hofmann, Thomas;**  
**Glabasnia, Anneke;**  
**Rakofsky, Todd;**  
**Nagle, Cheryl;**  
**Morello, Michael y**  
**Jordan, Rachel L.**

74 Agente/Representante:  
**Carpintero López, Mario**

ES 2 385 784 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Control de las características de sabor e indicador de la frescura de un zumo de frutas

**Campo de la invención**

- 5 La presente invención se refiere al control de las características de sabor y del gusto a frescura en zumos de frutas. En particular, la presente invención se refiere al control de las características de sabor y del gusto a frescura en zumos de frutas cítricas, y en especial zumo de naranja.

**Antecedentes de la invención**

- 10 Desde hace tiempo, las frutas cítricas se han reconocido como fuentes valiosas de nutrientes importantes. En fechas más recientes, cada vez son más reconocidos los beneficios para la salud y los beneficios para tratar o retrasar enfermedades de las fuentes cítricas como beneficiosas y ventajosas cuando se ingieren. Por consiguiente, existe la creencia general de que el aumento del consumo de alimentos de origen cítrico es un objetivo beneficioso e importante en el programa global de la salud humana. A muchos consumidores también les gustan las frutas cítricas simplemente porque son sabrosas.

- 15 Una manera conveniente de ingerir productos cítricos es en forma de zumo. El zumo puede fabricarse con facilidad y puede transportarse y consumirse de manera muy práctica. El zumo fresco o zumo "no procedente de concentrado" es muy apreciado por su sabor y su calidad. El zumo también puede ser concentrado y después reconstituirse cuando convenga al consumidor. El zumo concentrado también se distribuye desde la fuente hasta el consumidor de una manera eficaz y barata. Además, el zumo puede ser consumido con más facilidad que la fruta por personas que tienen dificultad para ingerir alimentos sólidos.

- 20 Sin embargo, a algunos consumidores no les gustan ciertas características de los zumos de cítricos, tales como el amargor, la acidez, las notas de sabor desagradable, la astringencia, el color oscuro, y una consistencia espesa. Todas las frutas cítricas, incluyendo los pomelos, las naranjas, las mandarinas, las limas y los limones, pueden presentar estos problemas. Algunos consumidores prefieren zumos que no sean muy dulces, mientras que otros prefieren un producto muy dulce. Además a menudo es difícil lograr una uniformidad en las características de sabor, por ejemplo, desde el principio de la temporada hasta el final de la temporada.

- 25 El amargor a menudo es un problema importante para los consumidores. Un nivel bajo de amargor puede proporcionar una contribución deseable a las propiedades organolépticas y a las características del zumo para muchos consumidores. Estos consumidores disfrutan de la nota de sabor picante cuando existe un ligero amargor. Sin embargo, la mayoría de los consumidores también están de acuerdo que un amargor excesivo afecta de forma adversa a las propiedades organolépticas y a las características del zumo, haciendo que su consumo sea desagradable. Los consumidores además asocian a menudo el amargor con la falta de frescura, con el zumo concentrado y/o con un zumo de menor calidad.

- 30 Los sabores amargos se encuentran en cada tipo de fruto cítrico en diversas cantidades. Existen diferencias en las concentraciones de estos sabores entre cultivares de la misma fruta y entre frutas del mismo cultivar procedentes del inicio de la temporada hasta el final de la temporada. Por tanto, la fuente de la fruta, el momento de la temporada y otras variables afectan a las concentraciones de sabores amargos en la fruta.

- 35 La astringencia es una característica de los zumos, en particular de los zumos de cítricos, que a menudo no le gusta a los consumidores. En particular, la astringencia en los zumos de cítricos a menudo se caracteriza por una sensación aterciopelada, envolvente en la boca. Muchos consumidores consideran que esta sensación en la boca es desagradable.

- 40 A los consumidores también les importa la acidez del zumo de frutas. Los consumidores a menudo consideran que los zumos de cítricos son ácidos. Con frecuencia, los consumidores asocian la acidez no sólo con un sabor fuerte desagradable sino también con una sensación de malestar o molestias en el estómago y con la eructación.

- 45 Hasta la fecha no se han realizado muchos esfuerzos por reducir el amargor, la acidez y otras propiedades y características organolépticas desagradables, generalmente mediante la eliminación de compuestos seleccionados. La limonina es uno de estos compuestos. Otros procedimientos excluyen partes de la fruta, tales como semillas y cáscaras, de la fuente de zumo, para minimizar la concentración del sabor amargo.

- 50 Además, la frescura es una característica deseada por los consumidores. A menudo se considera que el zumo procedente de concentrado tiene menos calidad que el zumo fresco. Se conocen diversos procedimientos para tratar zumos congelados y concentrados de zumos. Sin embargo, hasta la fecha el zumo procedente de concentrado adolece de efectos perjudiciales en el sabor, y no se ha comercializado ningún zumo completamente satisfactorio, tanto fresco como congelado.

La técnica anterior incluye un zumo de naranja navelina sin limonina y una bebida de leche que incluye dicho zumo de naranja, según se describe en el documento US 3.647.476; un procedimiento para producir una sabor de alta calidad, según se describe en el documento EP 0719502, y glucósidos de limonina en Tetradium Rutaecarpa, Phytochemistry, vol. 30, nº 7, pp. 2365-2367, 1991.

- 5 Por tanto, es necesario un zumo en el que se controle el sabor amargo dentro de unos límites que los consumidores consideren en general agradables y no excesivamente amargos. También es necesario un zumo que tenga un gusto a frescura.

**Breve resumen de la invención**

La invención se define en las reivindicaciones.

10 **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 ilustra un esquema de reacción que muestra la degradación enzimática del limonin-17-β-D-glucopiranosido (1) a través de la lactona de anillo A de limonoato (2) para producir la limonina (3) de sabor amargo.

La figura 2 ilustra la influencia del valor del pH sobre la formación dependiente del tiempo de limonina (3) en una disolución acuosa de limonin-17-β-D-glucopiranosido (1) conservada a 20 °C.

- 15 La figura 3 ilustra la influencia de la temperatura sobre la formación dependiente del tiempo de limonina (3) en una disolución acuosa de limonin-17-β-D-glucopiranosido (1) a pH 3,0.

La figura 4 es un cromatograma de RP-HPLC-MS/MS obtenido a partir de una disolución acuosa (pH 3,0) de limonin-17-β-D-glucopiranosido (1) incubada durante diez semanas a 30 °C y que muestra los picos de limonina (3) y un producto de la hidrólisis desconocido (4).

- 20 La figura 5 es un espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz) de la C<sub>17</sub>-epilimonina (4) purificada.

La figura 6 ilustra una secuencia de reacción que muestra la degradación hidrolítica del limonin-17-β-D-glucopiranosido (1) para producir la limonina (3) y la C<sub>17</sub>-epilimonina (4) a través de un carbocatión de furfuralideno como intermedio clave.

- 25 La figura 7 ilustra la generación de limonina (A) y C<sub>17</sub>-epilimonina (B) tras el almacenaje de un zumo de naranja a 20 °C, como una función del tiempo.

La figura 8 ilustra la generación de limonina y C<sub>17</sub>-epilimonina (A) y sobre la proporción de C<sub>17</sub>-epilimonina/limonina (B) tras un tratamiento con calor del zumo de naranja a lo largo del tiempo.

**Descripción detallada de la invención**

- 30 La invención se dirige al control de las características de sabor de zumos de frutas. En particular, las realizaciones de la invención se dirigen al control del amargor en zumos de cítricos mediante el control de las concentraciones de sabores amargos clave, al control de la astringencia mediante el control de la causa de las características clave de la astringencia, al control de la acidez mediante el control de las concentraciones y las proporciones relativas de ácidos, y al control del dulzor mediante el control de las concentraciones y las proporciones relativas de azúcares.

- 35 La invención también se dirige a impartir un gusto a frescura a un zumo. En particular, las realizaciones de la invención se dirigen al control de un componente en un zumo de frutas para hacer que el zumo tenga un gusto a frescura.

- 40 Los expertos en la técnica reconocerán que la concentración de un componente de sabor en un producto alimentario debe superar un umbral antes de que el consumidor sea capaz de detectar este componente de sabor. Los umbrales para la detección de diferentes características de sabor, tales como la astringencia y el amargor, son diferentes. Por tanto, hasta la fecha, los esfuerzos para identificar compuestos que contribuyen a las características de sabor se han dirigido a aquellos compuestos que están presentes a concentraciones mayores que el umbral del gusto pertinente.

- 45 Los inventores han descubierto que el sabor amargo del zumo de frutas cítricas, en particular del zumo de naranja, está provocado, al menos en parte, por la interacción de tres grupos de sustancias amargas, y se ve afectado por la concentración de azúcar en el zumo. Este descubrimiento de la sinergia entre estos tres grupos de sustancias amargas y formas de azúcares es la base de la capacidad de controlar el amargor en zumos de cítricos. Hasta la fecha, los expertos en la técnica no sabían que tres grupos de sustancias amargas y los azúcares controlaban la sensación de amargor en el zumo de naranja.

La limonina, una sustancia conocida por los expertos en la técnica por provocar amargor en el zumo de naranja, no es la única responsable de la totalidad del amargor del zumo de naranja. Al contrario, el amargor en el zumo de naranja está provocado por la interacción de los siguientes tres grupos de sustancias amargas:

- (1) Limonina, isolimonina y, en un grado menor, nomilina;
- 5 (2) Flavonas polimetoxiladas (PMF); y
- (3)  $\beta$ -D-glucopiranosidos limonoides.

Así, el control de las concentraciones relativas de estos componentes, junto con el control de la concentración de azúcar en el zumo controlará la sensación de amargor en el zumo.

- 10 Las concentraciones de los miembros de estos grupos de sustancias amargas varían en función del cultivar, el momento del crecimiento y de la temporada de recolección (es decir, si es el inicio, la mitad o el final de la temporada), y de las condiciones de procesamiento. Por ejemplo, se ha descubierto que la limonina se desarrolla en mayor grado en el zumo obtenido de naranjas recolectadas en la mitad o el final de la temporada que en el zumo obtenido de naranjas recolectadas al final de la temporada. La comprensión de la relación entre los tres grupos de sustancias amargas y el azúcar permite controlar el amargor del zumo de naranja y de zumos de cítricos que
- 15 comprenden estos componentes.

Los umbrales de gusto de los miembros de estos grupos de sustancias amargas se indican en la siguiente tabla:

| Componente  | Umbral del gusto amargo, $\mu\text{mol/l}$ |
|---|--|
| Limonina  | 4  |
| Nomilina  | 13   |
| PMF   | >130                                       |
| 5,7,8,3',4'-pentametoxiflavona                                  | 32,3                                       |
| 3,5,7,8,3',4'-hexametoxiflavona                                 | >250                                       |
| 5,6,7,3',4'-pentametoxiflavona                                  | 56   |
| 3,5,6,7,3',4'-hexametoxiflavona                                 | 19   |
| 5,7,8,4'-tetrametoxiflavona                                     | >120                                       |
| 5,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavona                                 | 103  |
| $\beta$ -D-glucopiranosidos limonoides                          | >130                                       |
| 5,6,7,4'-tetrametoxiflavona                                     | 44   |
| 3,5,6,7,8,3',4'-heptametoxiflavona                              | 24-31                                      |
| 5,6,7,8,4'-pentametoxiflavona                                   | 93   |
| 4'-hidroxi-3',5,6,7,8-pentametoxiflavona                        | 25   |
| 5,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavona-3-O- $\beta$ -D-glucopiranosido | 78   |
| 5,6,7,3',4'-pentametoxiflavona-3-O- $\beta$ -D-glucopiranosido  | 61   |
| 5,6,7,3',4'-pentametoxiflavonaglucósido                         | 61   |
| 5,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavonaglucósido                        | 78   |
| 5,7,8,3',4'-pentametoxiflavona                                  | 32   |
| 5,6,7,3',4'-pentametoxiflavona                                  | 56   |
| 3,5,6,7,3',4'-hexametoxiflavona                                 | 19   |

|  |      |
|--|------|
| 5,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavona                  | 103  |
| 5,6,7,4'-tetrametoxiflavona                      | 150  |
| 7,3',4'-trimetoxiflavona                         | >400 |
| 7,8,3',4'-tetrametoxiflavona                     | >400 |
| Limonin-17-β-D-glucopiranosido                   | 106  |
| Ácido desacetilnomilínico-17-β-D-glucopiranosido | 68   |
| Ácido epiisobacunoico-17-β-D-glucopiranosido     | 42   |
| Ácido nomílico-β-glpc                            | >800 |
| Nomilin-β-glpc                                   | >700 |
| Obacunon-β-glpc                                  | 49   |
| Desacetilnomilina                                | >106 |

Tal como puede observarse en las fórmulas estructurales de estos compuestos, los miembros de estos grupos de sustancias amargas tienen características estructurales comunes.

5 Los inventores han descubierto que concentraciones subumbral de PMF y, en un grado menor, de nomilina, potencian el amargor inducido por limonina en productos de naranjas, tales como zumos. Este efecto es sorprendente, porque los expertos en la técnica no esperarían que un compuesto que esté presente por debajo del umbral del gusto contribuya al amargor.

10 La nomilina está a una concentración cercana al umbral en el zumo de naranja Hamlin, y puede alcanzar el umbral al principio de la temporada. Los β-D-glucopiranosidos limonoides están por encima del umbral en el zumo de naranja Hamlin y valenciana.

Estos miembros de los grupos de sustancias amargas son muy amargos. En particular, son significativamente más amargos que los compuestos que generalmente se encuentran en el té y refrescos carbonatados. Por ejemplo, la limonina es casi 200 veces más amarga que la cafeína y es 150 veces más amarga que la catequina. La nomilina es casi 150 veces más amarga que la cafeína y 45 veces más amarga que la catequina.

15 Aunque cada miembro de un grupo de sustancias amargas tiene un umbral de gusto, el amargor no está relacionado de modo lineal con la concentración. Por ejemplo, la duplicación de la concentración del componente no duplica el amargor. Además, los inventores han descubierto que no es necesario que la concentración de un compuesto alcance el umbral de gusto para que ese compuesto contribuya al amargor. Más bien los componentes actúan de modo sinérgico para producir un sabor amargo mayor que el que podría predecirse por la suma de las partes individuales.

20 El azúcar se mide en grados Brix. Los inventores han descubierto que el amargor percibido disminuye a medida que aumentan los grados Brix y, en particular, a medida que aumenta la proporción de grados Brix/ácido.

25 Así, con las orientaciones proporcionadas en la presente, los expertos en la técnica pueden controlar el amargor del zumo de cítricos controlando los grados Brix y, en particular, la proporción de grados Brix/ácido, y la concentración de estos miembros de los grupos de sustancias amargas en un producto de zumo. Por ejemplo, la concentración de estos compuestos puede reducirse con el procesamiento apropiado, tal como intercambio iónico, destilación, u ósmosis inversa. De manera similar, diferentes zumos que tengan diversas concentraciones de cada compuesto pueden mezclarse para producir un zumo que tenga concentraciones menores de estos compuestos que las concentraciones que producen un sabor amargo.

30 Los inventores han descubierto que la limonina se forma a través de diversas vías. La limonina generalmente no se encuentra en la fruta completa a una concentración mayor que el umbral de gusto. Sin embargo, la limonina se forma por la lactonización acelerada por enzimas.

35 La figura 1 ilustra esta vía. El limonin-17-β-D-glucopiranosido 1 se convierte, mediante la acción de la 17-β-D-glucopiranosil glucosidasa, para formar una lactona de anillo A de limonato 2. Esta lactona se reduce en presencia de la lactona de anillo D de limonina hidrolasa bajo condiciones ácidas (pH < 6,5) para formar limonina 3. Debido a

que la lactona de anillo A se convierte en limonin-17- $\beta$ -D-glucopiranosido a medida que la fruta madura, la concentración de glucósido aumenta hasta aproximadamente 200 wppm.

5 También se cree que la limonina puede generarse en el zumo a través de la hidrólisis ácida. Esta hidrólisis ácida se acelera disminuyendo el pH y aumentando la temperatura y el tiempo. Así, otros procedimientos para controlar la limonina en el zumo son evitar el calentamiento, almacenar el zumo durante un tiempo limitado a temperatura baja y/o aumentar el pH del zumo.

10 La concentración de cada miembro de los grupos de sustancias amargas puede determinarse mediante una cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Sin embargo, un análisis de cromatografía líquida/espectrometría de masas (LCMS) o un análisis de LCMS/MS proporcionarán una medición más definitiva. Los expertos en la técnica comprenden estos y otros métodos de medición de las concentraciones de los miembros de los grupos de sustancias amargas.

Los inventores han descubierto que, al igual que el amargor, una pluralidad de compuestos presentes en el zumo de naranja por debajo del umbral de astingencia contribuyen a la sensación astringente en la boca del zumo. Los umbrales de gusto para estos compuestos astringentes individuales se indican en la siguiente tabla:

| Componente  | Umbral de gusto de astringencia, $\mu\text{mol/l}$ |
|---|--|
| 5,7,8,3',4'-pentametoxiflavona                                  | 13,3   |
| 3,5,7,8,3',4'-hexametoxiflavona                                 | 125  |
| 5,6,7,3',4'-pentametoxiflavona                                  | 24   |
| 3,5,6,7,3',4'-hexametoxiflavona                                 | 9  |
| 5,7,8,4'-tetrametoxiflavona                                     | 44   |
| 5,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavona                                 | 51   |
| 5,6,7,4'-tetrametoxiflavona                                     | 21   |
| 3,5,6,7,8,3',4'-heptametoxiflavona                              | 4-5  |
| 5,6,7,8,4'-pentametoxiflavona                                   | 19   |
| 4'-hidroxi-3',5,6,7,8-pentametoxiflavona                        | 6  |
| 5,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavona-3-O- $\beta$ -D-glucopiranosido | 20   |
| 5,6,7,3',4'-pentametoxiflavona-3-O- $\beta$ -D-glucopiranosido  | 21   |
| 5,6,7,3',4'-pentametoxiflavonaglucósido                         | 21   |
| 5,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavonaglucósido                        | 20   |
| 5,7,8,3',4'-pentametoxiflavona                                  | 13   |
| 5,6,7,3',4'-pentametoxiflavona                                  | 24   |
| 3,5,6,7,3',4'-hexametoxiflavona                                 | 9  |
| 5,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavona                                 | 51   |
| 5,6,7,4'-tetrametoxiflavona                                     | 31   |
| 7,3',4'-trimetoxiflavona  | 15   |
| 7,8,3',4'-tetrametoxiflavona                                    | 44   |
| Limonin-17- $\beta$ -D-glucopiranosido                          | 17   |
| Ácido desacetilnomilínico-17- $\beta$ -D-glucopiranosido        | 27   |
| Ácido epiisobacunoico-17- $\beta$ -D-glucopiranosido            | 16   |

|                   |         |
|-------------------|---------|
| Desacetilnomilina | 13,2    |
| Limonina          | 4       |
| Isolimonina       | 10 mg/l |

5 Así, con las orientaciones proporcionadas en la presente, los expertos en la técnica pueden controlar la astringencia de un zumo de cítricos mediante el control de las concentraciones de estos compuestos astringentes en un producto de zumo. Por ejemplo, la concentración de estos compuestos puede reducirse con el procesamiento apropiado, tal como intercambio iónico, destilación, u ósmosis inversa. De manera similar, diferentes zumos que tengan diversas concentraciones de cada compuesto pueden mezclarse para producir un zumo que tenga concentraciones menores de estos compuestos que las concentraciones que producen un sabor astringente.

La acidez también es un problema para los consumidores. Un producto con sabor ácido es desagradable y tiene un sabor fuerte. Además, la acidez a menudo provoca molestias y daños en el estómago y en el esófago, y eructación.

10 Los inventores han descubierto que la acidez percibida está relacionada con las concentraciones relativas de al menos ácido málico y ácido cítrico. Las concentraciones y las proporciones relativas de estos compuestos afectan a la percepción de la acidez.

15 Los umbrales del gusto ácido para el ácido málico y para el ácido cítrico son conocidos en la técnica. Aunque las proporciones relativas de estos ácidos varían entre los zumos de diferentes cultivares y con el momento de la temporada, los ácidos generalmente están por encima del umbral del gusto ácido, y así contribuyen a la sensación de gusto ácida.

20 Así, con las orientaciones proporcionadas en la presente, los expertos en la técnica pueden controlar la acidez de zumos de cítricos mediante el control de las concentraciones de estos ácidos en un producto de zumo. Por ejemplo, la concentración de estos compuestos puede reducirse con el procesamiento apropiado, tal como intercambio iónico, destilación, u ósmosis inversa. De manera similar, diferentes zumos que tengan diversas concentraciones de cada ácido pueden mezclarse para producir un zumo que tenga concentraciones menores de estos ácidos que las concentraciones que producen un sabor ácido.

25 El dulzor también es un problema para los consumidores. Aunque algunos consumidores prefieren un sabor dulce, otros no. Por tanto, la capacidad para controlar el dulzor presenta la oportunidad para aumentar la satisfacción del consumidor.

Los inventores han descubierto que el dulzor percibido está relacionado con las concentraciones relativas de al menos los azúcares glucosa, fructosa y sacarosa. Las concentraciones y las proporciones relativas de estos azúcares afectan a la percepción del dulzor.

30 Los umbrales del gusto dulce para la glucosa, la fructosa y la sacarosa son conocidos en la técnica. Las proporciones relativas de estos azúcares varían entre zumos de diferentes cultivares y con el momento de la temporada. Sin embargo, con las orientaciones proporcionadas en la presente, los expertos en la técnica pueden controlar el dulzor de zumos de cítricos mediante el control de las concentraciones de estos azúcares en un producto de zumo. Por ejemplo, la concentración de estos azúcares puede reducirse con el procesamiento apropiado, tal como intercambio iónico, destilación, u ósmosis inversa. De manera similar, diferentes zumos que tengan diversas concentraciones de cada compuesto pueden mezclarse para producir un zumo que tenga concentraciones menores de estos compuestos que las concentraciones que producen un sabor ácido.

40 Los inventores también han descubierto que la presencia de isolimonina, un compuesto formado a partir de uno de estos  $\beta$ -D-glucopiranosidos limonoides, es un indicador de la frescura. La isolimonina también es conocida como C<sub>17</sub>-epilimonina. La isolimonina se forma por la hidrólisis ácida de la limonina después de una pasteurización. La isolimonina también se forma de modo no enzimático a partir de limonin-17- $\beta$ -D-glucopiranosido. La concentración de isolimonina en un concentrado de zumo de naranja congelado es aproximadamente el doble que la del zumo de naranja fresco, lo cual indica que si el zumo se "estresa" esto contribuye a la formación de isolimonina. Así, la presencia de isolimonina a una concentración mayor que la del producto fresco indica que el producto puede no ser fresco (porque la isolimonina se forma a lo largo del tiempo) o que ha sido congelado.

45 **Ejemplos**

Los siguientes ejemplos ilustran diversos aspectos relacionados con la invención. El ejemplo 1 se dirige al aislamiento del limonin-17- $\beta$ -D-glucopiranosido a partir de semillas de naranja. El ejemplo 2 resume estudios a diversas temperaturas y valores de pH para determinar la velocidad a la que aparece la limonina en disoluciones.

La identificación de la limonina y la isolimonina mediante HPCL y LC-MS y RMN se indica en el ejemplo 3.

El ejemplo 4 se dirige a la cuantificación de la limonina y la isolimonina en zumo de naranja. El ejemplo 5 se dirige al análisis sensorial.

5 Para estos ejemplos se obtuvieron los siguientes compuestos en el mercado: limonina (Sigma, Steinheim, Alemania); ácido fórmico, metanol y acetonitrilo (Merck, Darmstadt, Alemania); disolventes deuterados (Aldrich, Taufkirchen, Alemania); el agua desionizada utilizada para la cromatografía se purificó mediante un sistema Milli-Q de gradiente 10A (Millipore, Billerica, EEUU). Las semillas de naranja y el zumo de naranja preparado a partir de naranjas (Valencia Late) recolectadas en Florida (EEUU) en marzo de 2006, así como el zumo de naranja concentrado congelado preparado a partir del mismo lote de frutas, se obtuvieron en la industria del zumo de naranja (EEUU). Las naranjas frescas (Valencia Late) se obtuvieron de un vendedor local.

#### *Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)*

15 El aparato de HPLC consiste en dos bombas (Sykam, S 1122), un mezclador de gradiente (Sunchrom, mezclador de gradiente dinámico/estadístico), un inyector Rheodyne (bucle de 200  $\mu$ l), un automuestreador (Spark, Midas 380), un detector de matriz de diodos (Sunchrom, SpectraFlow 600 DAD) que controla el efluente en un intervalo de longitud de onda entre 200 y 600 nm, un módulo de división (Upchurch, microdivisor graduado P-470), y un detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD) (S.E.D.E.R.E., Sedex 85 LT-ELSD, p = 2,6 bar, T = 40 °C) equipado con un nebulizador (S.E.D.E.R.E., nebulizador de HPLC de 200  $\mu$ l/min-2,5 ml/min).

#### *Cromatografía líquida/espectrometría de masas (LC/MS)*

20 El análisis de LC-MS/MS se realizó utilizando un sistema de HPLC Agilent 1100 conectado al LC-MS/MS API 4000 (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemania) que se hace funcionar en el modo de ionización de electronebulización negativa (ESI) o positiva (ESI<sup>+</sup>). El voltaje de nebulización se ajustó a -4500 V, el nitrógeno actuó como gas de cortina (0,14 MPa), y el potencial de desagregación se ajustó a -65 V. Mediante el modo de control de múltiples reacciones (MRM), los compuestos 2 y 3 se analizaron utilizando las transiciones de masas descritas anteriormente.

#### *Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)*

25 Los experimentos espectroscópicos de <sup>1</sup>H, COSY, HMQC, y HMBC se realizaron en un DPX RMN de 400 MHz de Bruker (Rheinstetten, Alemania). Las muestras se disolvieron en DMSO-d<sub>6</sub> o MeOD-d<sub>4</sub> con tetrametilsilano como patrón interno, y se colocaron en tubos de RMN (Schott Professional 178 x 5 mm) antes de la medición. El procesamiento de los datos se realizó utilizando el programa informático de RMN Mestre-C.

#### **Ejemplo 1: Aislamiento del limonin-17- $\beta$ -D-glucopiranosido a partir de semillas de naranja**

30 Las semillas de naranja (100 g) se lavaron a fondo con agua, seguido de acetona, y se congelaron en nitrógeno líquido, se trituraron en un molino de trituración, y después se extrajeron dos veces con metanol (300 ml) durante 4 h a 60 °C. Después de una filtración, el extracto se retiró del disolvente al vacío para producir los extractables de metanol como un polvo amorfo (28 g).

35 Se suspendió una parte alícuota (2 g) de este aislado bruto en agua (10 ml), se aplicó sobre la parte superior de una columna de vidrio enfriada con agua (300 mm x 35 mm) rellena con una suspensión del material Amberlite XAD-2 (BDH Chemicals Ltd., Poole, Reino Unido) acondicionada con agua. La cromatografía, que se realizó con un caudal de 5 ml/min, se llevó a cabo comenzando con agua (200 ml, fracción I), seguido de mezclas de metanol/agua que contenían 20% (200 ml, fracción II), 40% (200 ml, fracción III), 60% (200 ml, fracción IV), 80% (200 ml, fracción V) y metanol (200 ml, fracción VI). Las fracciones individuales se recolectaron por separado, se retiró el disolvente al vacío a 30 °C, y después se liofilizaron para producir las fracciones I-VI como polvos amorfos.

40 Las fracciones II-IV se reunieron, se disolvieron en una mezcla de metanol y ácido fórmico acuoso al 0,1% (20/80, en v/v), y después de una filtración con membrana, se fraccionaron partes alícuotas (250  $\mu$ l) mediante una HPLC semipreparativa en una columna Microsorb-MV, RP-18, 250 x 10 mm d.i., 5  $\mu$ m (Varian, Alemania). Se realizó una cromatografía, controlando el efluente mediante un detector de UV a 220 nm, así como mediante un detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD), a un caudal de 3,5 ml/min, comenzando con una mezcla de acetonitrilo y ácido fórmico acuoso al 0,1% (10/90, en v/v), aumentando el contenido en acetonitrilo hasta 20% en 15 min, manteniendo durante 15 min, y por último aumentando el contenido en acetonitrilo hasta 100% en 5 min. El efluente del pico detectado a 17 min se recogió en un matraz enfriado en hielo, el disolvente orgánico se retiró al vacío, y la capa acuosa se aplicó sobre la parte superior de un cartucho Strata C 18-E SPE (10 g, 55  $\mu$ m; Giga Tubes, Phenomenex) acondicionado con agua. El cartucho se enjuagó con agua (150 ml), después se secó haciendo pasar una corriente de nitrógeno a través de él, y por último se eluyó con metanol (100 ml). El cartucho SPE elimina las cantidades traza de ácido fórmico para evitar la liberación catalizada por protones de la aglicona. Se retiró al vacío



el disolvente del efluente orgánico, el residuo se suspendió en agua (5 ml) y se liofilizó para producir limonin-17-β-D-glucopiranosido como un polvo amorfo blanco con una pureza de más del 99%.

Limonin-17-β-D-glucopiranosido, 1, en la figura 1: UV/VIS (acetonitrilo/agua, pH 2,5):  $\lambda_{\text{max}} = 220 \text{ nm}$ ; LC/MS(ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  649 ([M-H]<sup>-</sup>); LC/MS(ESI);  $m/z$  668 ([M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>), 673 ([M+Na]<sup>+</sup>), 689 ([M+K]<sup>+</sup>); RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>, COSY):  $\delta$  0,66 [s, 3H, H-C(24)], 0,98 [s, 3H, H-C(25b)], 1,21 [s, 3H, H-C(25a)], 1,40 [s, 3H, H-C(18)], 1,66 [m, 1H, H-C(12)], 1,78 [m, 2H, H-C(11)], 1,99 [m, 1H, H-C(12)], 2,43 [dd, 1H,  $J = 7,4, 22,1 \text{ Hz}$ , H-C(6)], 2,55 [dd, 1H,  $J = 5,6, 19,0 \text{ Hz}$ , H-C(6)], 2,68 [d, 1H,  $J = 4,3 \text{ Hz}$ , H-C(9)], 2,71 [d, 2H,  $J = 4,1 \text{ Hz}$ , H-C(2)], 2,79 [dd, 1H,  $J = 5,6, 14,7 \text{ Hz}$ , H-C(5)], 2,94 [s, 1H, H-C(15)], 3,11 [m, 2H, H-C(2'), H-C(5')], 3,20 [m, 1H, H-C(4')], 3,27 [m, 1H, H-C(3')], 3,48 [m, 1H, H-C(6')], 4,20 [s, 1H, HC(1)], 4,29 [d, 1H,  $J = 7,6 \text{ Hz}$ , H-C(1')], 4,40 [d, 2H,  $J = 8,1 \text{ Hz}$ , H-C(19)], 5,42 [s, 1H, H-C(17)], 6,53 [d, 1H,  $J = 1,3 \text{ Hz}$ , HC(11)], 7,24 [s, 1H, H-C(23)], 7,63 [s, 1H, H-C(22)]; RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>, HMQC, HMBC):  $\delta$  17,1 [C, C(11)], 18,4 [C, C(24)], 20,8 [C, C(25b)], 24,7 [C, C(18)], 26,8 [C, C(12)], 29,2 [C, C(25a)], 35,2 [C, C(2)], 36,4 [C, C(6)], 44,8 [C, C(13)], 45,1 [C, C(9)], 45,2 [C, C(10)], 50,7 [C, C(8)], 54,8 [C, C(5)], 59,8 [C, C(15)], 61,7 [C, C(6')], 63,8 [C, C(19)], 69,1 [C, C(14)], 70,4 [C, C(4')], 75,4 [C, C(2')], 76,0 [C, C(5')], 76,9 [C, C(3')], 78,1 [C, C(17)], 78,4 [C, C(1)], 80,8 [C, C(4)], 104,3 [C, C(1')], 112,3 [C, C(21)], 125,4 [C, C(20)], 140,3 [C, C(22)], 142,3 [C, C(23)], 173,0 [C, C(3), C(16)], 209,6 [C, C(7)].

### Ejemplo 2: Desarrollo de limonina a partir de limonin-17-β-D-glucopiranosido

Para investigar la liberación no enzimática putativa de limonina a partir de limonin-17-β-D-glucopiranosido durante el almacenamiento de zumo de naranja, disoluciones acuosas del glucopiranosido ajustadas a un valor de pH de un zumo de naranja recién exprimido (pH 3,5) o al intervalo de valores de pH que se encuentra en concentrados de zumos de naranja (pH 2,0 y 3,0) se mantuvieron a 20 °C durante hasta 14 semanas en la oscuridad. En intervalos de tiempo regulares se retiraron partes alícuotas de las disoluciones modelo y se analizaron para la cantidad de limonina liberada del glucopiranosido mediante una HPLC-MS/MS que se hizo funcionar en el modo de MRM. Independientemente del valor de pH de la disolución modelo, se generó limonina según aumentaba el tiempo de almacenamiento, tal como se muestra en la figura 2, pero unos valores de pH decrecientes favorecieron la producción del compuesto amargo. Por ejemplo, se liberaron 0,85% molar de limonina del glucopiranosido cuando se mantuvo a pH 2,0, mientras que a pH 3,5 sólo se generó 0,25% del compuesto amargo.

Para investigar la influencia de la temperatura sobre la generación de limonina se mantuvieron disoluciones acuosas del glucopiranosido ajustadas a pH 3,0 a 4 °C, 20 °C y 30 °C hasta 14 semanas en la oscuridad. En intervalos de tiempo regulares se determinaron las cantidades de limonina mediante una HPLC-MS/MS que se hizo funcionar en el modo de MRM. Los resultados que se indican en la figura 3 demuestran claramente que la liberación de limonina a partir de limonin-17-β-D-glucopiranosido se acelera a 30 °C cuando se compara con las disoluciones modelo mantenidas a 4 °C y 20 °C, respectivamente. Por ejemplo, la limonina se liberó de su precursor con un rendimiento de casi 4,0% cuando se incubó a 30 °C, mientras que sólo resultó detectable 0,2% del compuesto amargo después de almacenar la disolución de precursor a 4 °C durante 14 semanas.

En particular, disoluciones acuosas de limonin-17-β-D-glucopiranosido (0,35 mg/l) ajustadas a un valor de pH de 2,0, 3,0 y 3,5, respectivamente, añadiendo cantidades traza de ácido clorhídrico (1 mol/l) se mantuvieron a diferentes temperaturas (4 °C, 20 °C, 30 °C) durante hasta 14 semanas en viales cerrados en la oscuridad. En intervalos de tiempo regulares se retiraron muestras (5 µl) con una jeringa y se analizaron para la generación de limonina mediante LC-MS/MS en una columna Synergi Fusion, 150 x 2 mm d.i., 4 µm (Phenomenex). Para lograr esto la cromatografía se realizó con una caudal de 250 µl/min comenzando con una mezcla de ácido fórmico acuoso al 0,1% y acetonitrilo (80/20, en v/v), aumentando el contenido en acetonitrilo hasta 40% en 10 min, después hasta 80% en 5 min, se mantuvo durante 5 min, y por último hasta 100% en 5 min. Utilizando la ionización de electronebulización negativa se analizó la limonina en el modo de control de múltiples reacciones (MRM) utilizando la transición de masas  $m/z$  469 → 229. Se realizó un análisis cuantitativo comparando las áreas de los picos obtenidas para la cantidad traza de masa con las de disoluciones patrón definidas de limonina en metanol.

La figura 4 indica que el cromatograma de LC-MS/MS no muestra sólo el limonin-17-β-D-glucopiranosido (1) y la limonina (3), sino que sorprendentemente también un tercer pico (4) que eluye a 16,59 min y que muestra la misma transición de masas  $m/z$  469 → 229 que se encuentra en la limonina, lo cual implica la existencia de un estereoisómero de limonina. Puesto que la estructura química de este compuesto aún no ha sido confirmada de manera inequívoca mediante experimentos espectroscópicos de RMN, se intentaron otros experimentos para producir el compuesto 4 en cantidades suficientes para realizar experimentos espectroscópicos.

### Ejemplo 3: Identificación de la limonina y del compuesto 4 liberado del limonin-17-β-D-glucopiranosido

Para determinar la estructura química del compuesto 4 identificado en el ejemplo 2 e ilustrado en la figura 4, una disolución acuosa de limonin-17-β-D-glucopiranosido, ajustada a pH 1,5, se incubó durante 4 h a 60 °C, el compuesto 4 se aisló y se purificó mediante una HPLC semipreparativa, y su estructura química se determinó mediante experimentos de LC-MS/MS y 1D/2D-RMN. En el espectro de RMN de <sup>1</sup>H, que aparece en la figura 5, se

observaron 21 señales, entre las cuales diez señales que mostraron unos desplazamientos químicos de  $\delta$  1,44, 1,72, 2,00, 2,25, 2,66, 2,66, 2,73, 2,75, 2,91, y 4,14 ppm estaban bastante en línea con las resonancias de los protones alquílicos H-C(12a), H-C(11), H-C(12b), H-C(6a), H-C(2a), H-C(5), H-C(2b), H-C(9), H-C(6b), y H-C(1) de la limonina. La asignación de estas señales fue confirmada de manera inequívoca mediante experimentos de correlación hemonuclear (COSY) y heteronuclear (HMQC, HMBC). Los protones diastereotrópicos que resuenan a 4,51 y 4,78 ppm están en línea con los protones metilénicos H-C(19), indicando así un anillo A intacto presente en la limonina. Además las señales de resonancia observadas a 6,62, 7,60 y 7,70 ppm para los protones furánicos H-C(21), H-C(22) y H-C(23) demuestran la similitud estructural con la limonina. Sin embargo, el compuesto 4 muestra diferencias llamativas con la limonina en los desplazamientos químicos de los protones H-C(15), H-C(17) y H-C(18). El protón H-C(17) mostró un desplazamiento de campo alto desde 5,48 ppm (3) a 5,05 ppm (4), mientras que los protones H-C(15) y H-C(18) mostraron un desplazamiento de campo bajo desde 4,21 y 1,11 ppm (3) a 4,50 y 1,48 ppm (4), respectivamente. Además, experimentos de 2D-RMN identificaron diferencias en los desplazamientos químicos de C(17)/C(18) que resuenan a 77,9/20,0 ppm para la limonina (3) y 85,1/27,1 ppm para el compuesto 4, indicando con ello una epimerización de la limonina en la posición C(17) en la estructura del compuesto 4. Tomando en consideración todos los datos espectroscópicos, el compuesto 4 se identificó por primera vez de forma inequívoca como el C<sub>17</sub>-epímero de la limonina que tiene un anillo de furano en C(17) en una orientación  $\beta$ , en lugar de la orientación  $\alpha$  de la limonina. Aunque se ha especulado que el compuesto 4, denominado C<sub>17</sub>-epilimonina o isolimonina, es un metabolito plasmático humano del limonin-17- $\beta$ -D-glucopiranosido, esta es la primera confirmación de la estructura de este epímero de la limonina basada en datos espectroscópicos y que demuestra su liberación hidrolítica del glucopiranosido.

En particular, una disolución de limonin-17- $\beta$ -D-glucopiranosido (35 mg) en agua (20 ml) se ajustó a pH 1,5 con cantidades traza de ácido clorhídrico (1 mol/l) y se incubó durante 4 h a 60 °C. Después de enfriar, la disolución se aplicó a la parte superior de un cartucho Strata C 18-E SPE acondicionado con agua (10 g, 55  $\mu$ m, Giga Tubes, Phenomenex), después se enjuagó con agua (150 ml), seguido de una mezcla de agua/metanol (50/50, en v/v, 100 ml), y metanol (150 ml). Se retiró el disolvente de la fracción metanólica al vacío, se disolvió en una mezcla de metanol y ácido fórmico acuoso al 1%, y se separaron partes alícuotas (100  $\mu$ l) mediante una HPLC semipreparativa en una columna Microsorb-MV, RP-18, 250 x 10 mm d.i., 5  $\mu$ m (Varian, Alemania). Se realizó una cromatografía, controlando el efluente mediante un detector de UV a 220 nm, así como un ELSD, con un gradiente de disolvente con un caudal de 3,5 ml/min y comenzando con una mezcla de acetonitrilo y ácido fórmico acuoso al 0,1% (30/70, en v/v), aumentando el contenido en acetonitrilo al 40% en 15 min, después al 80% en 10 min, y por último al 100% en 10 min. Se detectaron dos picos; el efluente de cada pico se recogió por separado en matraces enfriados en hielo, se retiró el disolvente al vacío, y después se liofilizó. Los compuestos aislados se identificaron mediante experimentos de LC-MS y RMN como limonina y su estereoisómero C<sub>17</sub>-epilimonina que previamente no se había divulgado, también denominado isolimonina.

*Limonina*, 3: UV/VIS (acetonitrilo/agua, pH 2,5):  $\lambda_{\max}$  = 220 nm; LC/MS(ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  509 ([M+K]<sup>+</sup>), 493 ([M+Na]<sup>+</sup>), 488 ([M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>); LC/MS(ESI<sup>-</sup>):  $m/z$  469 ([M-H]<sup>-</sup>); RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, COSY):  $\delta$  1,00 [s, 3H, H-C(24)], 1,02 [s, 3H, H-C(25b)], 1,11 [s, 3H, H-C(18)], 1,19 [s, 3H, H-C(25a)], 1,23 [m, 1H, H-C(12)], 1,73 [1m 2H, H-C(11)], 1,83 [m, 1H, H-C(12)], 2,27 [dd, 1H,  $J$  = 3,0, 14,7 Hz, H-C(6)], 2,46 [dd, 1H,  $J$  = 3,0, 15,7 Hz, H-C(5)], 2,55 [m, 1H, H-C(9)], 2,62 [m, 1H, H-C(2)], 2,77 [d, 1H,  $J$  = 16-4 Hz, H-C(2)], 3,10 [t, 1H,  $J$  = 15,5 Hz, H-C(6)], 4,11 [m, 1H, H-C(1)], 4,12 [s, 1H, H-C(15)], 4,48 [d, 1H,  $J$  = 12,9 Hz, H-C(19)], 4,92 [d, 1H,  $J$  = 12,9 Hz, H-C(19)], 5,48 [s, 1H, H-C(17)], 6,51 [s, 1H, H-C(22)], 7,66 [s, 1H, H-C(21)], 7,72 [s, 1H, H-C(23)]; RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>, HMQC, HMBC):  $\delta$  17,4 [C, C(24)], 18,1 [C, C(11)], 20,0 [C, C(18)], 20,4 [C, C(12)], 22,3 [C, C(25b)], 30,1 [C, C(25a)], 35,9 [C, C(2)], 36,5 [C, C(6)], 37,5 [C, C(13)], 45,7 [C, C(10)], 46,9 [C, C(9)], 50,5 [C, C(8)], 54,3 [C, C(15)], 58,2 [C, C(5)], 65,3 [C, C(19)], 67,4 [C, C(14)], 77,9 [C, C(17)], 78,9 [C, C(1)], 80,4 [C, C(4)], 110,9 [C, C(22)], 120,6 [C, C(20)], 141,9 [C, C(23)], 143,9 [C, C(21)], 168,7 [C, C(16)], 170,9 [C, C(3)], 208,5 [C, C(7)].

*C<sub>17</sub>-epilimonina*, o isolimonina, 4: UVMS (acetonitrilo/agua, pH 2,5):  $\lambda_{\max}$  = 220 nm; LC/MS(ESI<sup>+</sup>)  $m/z$  509 ([M+K]<sup>+</sup>), 493 ([M+Na]<sup>+</sup>), 488 ([M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>); LC/MS(ESI<sup>-</sup>):  $m/z$  469 ([M-H]<sup>-</sup>); RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, COSY):  $\delta$  0,99 [s, 3H, H-C(24)], 0,99 [s, 3H, H-C(25b)], 1,19 [s, 3H, H-C(25a)], 1,44 [m, 1H, H-C(12)], 1,72 [m, 2H, H-C(11)], 2,00 [m, 1H, H-C(12)], 2,25 [dd, 1H,  $J$  = 3,7, 16,2 Hz, H-C(6)], 2,66 [m, 1H, H-C(2)], 2,66 [m, 1H, H-C(5)], 2,73 [m, 1H, H-C(2)], 2,75 [m, 1H, H-C(9)], 2,91 [t, 1H,  $J$  = 15,8 Hz, H-C(6)], 4,14 [d, 1H,  $J$  = 3,68 Hz, H-C(1)], 4,50 [s, 1H, H-C(15)], 4,51 [d, 1H,  $J$  = 13,2 Hz, H-C(19)], 4,78 [d, 1H,  $J$  = 13,2 Hz, H-C(19)], 5,05 [s, 1H, H-C(17)], 6,62 [s, 1H, H-C(22)], 7,60 [s, 1H, H-C(21)], 7,70 [s, 1H, H-C(23)]; RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>, HMQC, HMBC):  $\delta$  18,3 [C, C(11)], 19,3 [C, C(24)], 22,1 [C, C(12)], 22,1 [C, C(25b)], 27,1 [C, C(18)], 30,6 [C, C(25a)], 36,6 [C, C(2)], 36,9 [C, C(6)], 40,3 [C, C(13)], 45,0 [C, C(9)], 45,1 [C, C(10)], 47,6 [C, C(8)], 56,3 [C, C(5)], 56,6 [C, C(15)], 65,4 [C, C(19)], 70,4 [C, C(14)], 79,1 [C, C(1)], 79,9 [C, C(4)], 85,1 [C, C(17)], 112,9 [C, C(22)], 122,4 [C, C(20)], 143,8 [C, C(21)], 144,2 [C, C(23)], 168,8 [C, C(16)], 170,5 [C, C(3)], 208,3 [C, C(7)].

Aunque los inventores no pretendan limitación alguna por la teoría, la figura 6 ilustra una vía de reacción que muestra la formación de limonina (3) e isolimonina, o C<sub>17</sub>-epilimonina (4), a partir de limonin-17- $\beta$ -D-glucopiranosido. Puesto que la glucosa es un buen grupo saliente, la hexosa se escinde de la posición  $\alpha$  del grupo furfuralideno de 1 bajo

condiciones ácidas, produciendo con ello la liberación de un catión de furfuralideno deslocalizado como principal intermedio transitorio. La ciclación intramolecular inducida por un ataque nucleófilo de la función carboxi entonces produce la limonina (3) que porta el anillo de furano en la orientación  $\alpha$ , así como la isolimonina/C<sub>17</sub>-epilimonina que muestra un anillo de furano en C(17) con la orientación  $\beta$ .

- 5 Además, se ha demostrado que la incubación de la limonina en una disolución acuosa que tiene un pH de 3 no produce una cantidad significativa de isolimonina, de manera que la isolimonina no se forma por la epimerización directa de la limonina.

#### 10 Ejemplo 4: Cuantificación de la limonina y la isolimonina en zumo de naranja

Para investigar la generación de limonina y de isolimonina/C<sub>17</sub>-epilimonina durante el almacenaje de zumo de naranja se almacenó zumo de naranja recién exprimido (pH 3,5) durante hasta cuatro semanas a 4 °C y 20 °C y después se determinó cuantitativamente la limonina y la isolimonina/C<sub>17</sub>-epilimonina mediante HPLC-MS/MS utilizando el modo de MRM. Tal como se muestra en la figura 7A, la concentración de limonina en el zumo de naranja aumentó ligeramente durante el almacenaje desde 70,0 µg/100 g en el zumo recién exprimido a 80 y 85 µg/100 g cuando se mantiene durante 2 semanas a 4 °C y 20 °C, respectivamente. El almacenaje del zumo de naranja también induce un aumento en la concentración de C<sub>17</sub>-epilimonina, por ejemplo en las muestras mantenidas durante cuatro semanas a 4 °C y 20 °C, respectivamente, se observó un aumento en 1,5 o 2 veces de la cantidad de C<sub>17</sub>-epilimonina (figura 7B). La comparación del aumento inducido por el almacenaje de la cantidad de limonina con el de la isolimonina demuestra claramente que la formación de limonina se ve favorecida por el almacenaje del zumo de naranja frente a la de su C<sub>17</sub>-epímero, lo cual apoya los descubrimientos que aparecen en la bibliografía de que, durante el almacenaje, la lactona de anillo A de limonoato presente en el zumo se convierte lentamente en limonina tras una catálisis ácida.

En un segundo conjunto de experimentos, se investigó la influencia del tratamiento con calor sobre la generación de limonina y de isolimonina/C<sub>17</sub>-epilimonina. Para lograr eso, zumo de naranja recién exprimido se trató con calor a 70 °C durante 10 min, y para comprender mejor la velocidad máxima de liberación de estos compuestos, a 95 °C durante hasta 240 min. Un análisis de HPLC-MS/MS (MRM) reveló que la concentración de limonina e isolimonina en el zumo no calentado recién preparado era de 70,0 y 1,3 µg/100 g, respectivamente (figura 8A). Tras el tratamiento con calor, las concentraciones de ambos terpenoides aumentaron significativamente, por ejemplo un calentamiento durante 10 min a 70 °C indujo un aumento de la isolimonina en un factor de cinco hasta alcanzar una concentración de 6,1 µg/100 g, mientras que la concentración de limonina alcanzó una concentración 100 µg/100 g.

El calentamiento del zumo de naranja a 95 °C influye en las cantidades de limonina e isolimonina aún más. Tras calentar el zumo durante 10 min a 95 °C, la cantidad de C<sub>17</sub>-epilimonina ya aumenta en un factor de diez (figura 8A). Después de calentar durante 30 y 60 min, respectivamente, se generan 20 y 30 µg/100 g. Tras calentar durante 80 min, la concentración de limonina aumenta de 70 a 115 µg/100 g, y se aproxima a un valor máximo de 140 µg/100 g después de 4 h. El cálculo de la proporción entre ambos limonoides en las muestras de zumo de naranja calentadas reveló que la proporción de C<sub>17</sub>-epilimonina/limonina cambia drásticamente cuando se aumenta el tiempo de calentamiento y alcanza un máximo de 0,50 después de 240 min (figura 8B).

Para realizar estas determinaciones las naranjas se cortaron por la mitad y se exprimieron con cuidado a mano con un exprimidor de cítricos de cocina (Citromatic MPZ 22, Braun, Alemania). Para investigar la influencia del almacenaje en frío sobre la concentración de limonina e isolimonina en el zumo de naranja se mantuvieron partes alícuotas (300 ml) del zumo de naranja recién exprimido a 4 °C y 20 °C durante 4 semanas en la oscuridad. Para estudiar la formación de limonina e isolimonina a temperaturas elevadas, se trataron con calor partes alícuotas (300 ml) de zumo de naranja recién exprimido a 70 °C durante 10 min, o a 95 °C durante hasta 240 min.

Para los análisis cuantitativos, partes alícuotas (8 g) del zumo de naranja fresco y tratado, respectivamente, se centrifugaron durante 10 min a 3000 rpm, el material no soluble se suspendió y se mezcló a fondo con agua (8 ml), y de nuevo se centrifugó durante 10 min a 3000 rpm. Los sobrenadantes se reunieron y se colocaron sobre la parte superior de un cartucho C 18-E SPE acondicionado con agua (1 g, 5 µm, Phenomenex). Después de enjuagar con agua (20 ml), el cartucho se secó haciendo pasar una corriente de nitrógeno a través de él, y después se eluyó con metanol (20 ml). Se retiró el disolvente del efluente metanólico al vacío y se constituyó hasta 3,0 ml con metanol. Se analizaron partes alícuotas (5 µl) para determinar la limonina y la isolimonina/C<sub>17</sub>-epilimonina mediante LC-MS/MS en una columna Synergi Fusion, 150 x 2 mm d.i., 4 µm (Phenomenex). Para lograr esto, se realizó una cromatografía con un caudal de 250 µl/min comenzando con una mezcla (80/20, en v/v) de ácido fórmico acuoso al 0,1% y acetonitrilo, aumentando el contenido en acetonitrilo hasta 40% en 10 min, después al 80% en 5 min, manteniendo durante 5 min, y por último al 100% en 5 min. Utilizando la ionización de electronebulización negativa se analizó la limonina y la isolimonina/C<sub>17</sub>-epilimonina en el modo de control de múltiples reacciones (MRM) utilizando la transición de masas  $m/z$  469 → 229. El análisis cuantitativo se realizó comparando las áreas de los picos obtenidos para la cantidad traza de masa con las de disoluciones patrón definidas de limonina y C<sub>17</sub>-epilimonina en metanol.

Un experimento final se centró en la influencia del procedimiento de concentración del zumo de naranja sobre las

cantidades de 3 y 4. Para lograr esto, se analizó cuantitativamente la concentración de C<sub>17</sub>-epilimonina en un zumo de naranja fresca y un concentrado de zumo de naranja congelado producido a partir del mismo lote de zumo de naranja en una concentración en 6,6 veces. Mientras que el zumo de naranja contenía isolimonina/C<sub>17</sub>-epilimonina en cantidades de 1,6 µg/100 g, se encontraron aproximadamente 21,0 µg/100 g de isolimonina en el correspondiente zumo concentrado congelado. Teniendo en cuenta que el concentrado se produjo por una concentración en 6,6 veces del zumo de naranja, se espera encontrar 10,6 µg/100 g del epímero en el zumo concentrado. Pero estaba presente una cantidad dos veces mayor de 21,0 µg/100 g en el concentrado congelado, demostrando con ello claramente por primera vez que la C<sub>17</sub>-epilimonina se forma en cantidades significativas durante la fabricación de zumo de naranja concentrado congelado.

5

#### 10 **Ejemplo 5: Análisis sensorial**

Para estudiar la influencia de la quiralidad de C(17) sobre la actividad sensorial de estos limonoides, se determinaron concentraciones umbral de amargor para la limonina y la C<sub>17</sub>-epilimonina. Estos estudios sensoriales revelaron una concentración umbral de amargor de 10,0 µg/l (agua) para la C<sub>17</sub>-epilimonina que es bastante cercana a la obtenida para la limonina (4,0 µmol/l), demostrando así una actividad sensorial similar de ambos compuestos de lactona triterpenoides.

15

Para realizar estas evaluaciones, once asesores (cuatro mujeres y siete hombres, con edades de 23-39 años), que habían participado durante al menos dos años en sesiones de entrenamiento semanales, determinaron las concentraciones umbral de reconocimiento de sabor en agua embotellada (pH 5,1) mediante un procedimiento de elección forzosa entre tres alternativas con concentraciones crecientes del estímulo siguiendo el procedimiento indicado previamente en Stark, T., Barenther, S., Hofmann, T. (2005), J. Agric. Food Chem., 53:5407-5418.

20

Los ejemplos indican que mientras que el cierre del anillo de la lactona de anillo A de limonoato (2) sólo permite la formación de limonina (figura 1), la degradación hidrolítica del limonin-17-β-D-glucopiranosido (1) a través del catión de furfuralideno produce la limonina (3) y la C<sub>17</sub>-epilimonina (4) (figura 6). Como sólo se encontraron cantidades traza de isolimonina generadas tras el almacenaje en frío del zumo de naranja, pero se liberaron cantidades significativamente mayores de su precursor limonin-17-β-D-glucopiranosido a temperatura elevada, la proporción de C<sub>17</sub>-epilimonina/limonina puede ser un marcador adecuado que permita la determinación analítica del aporte térmico aplicado durante el procesamiento del zumo de naranja.

25

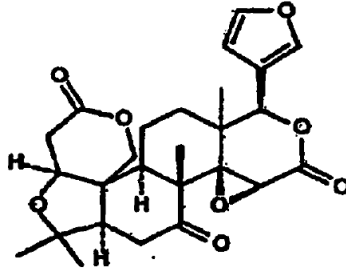
Tal como se puede observar en la figura 8, la proporción de isolimonina/limonina aumenta de 0 a aproximadamente 0,25 en aproximadamente 20 minutos, y a aproximadamente 0,40-0,45 en aproximadamente 60 minutos a 100 °C. Así, la proporción de isolimonina/limonina (también expresada como la proporción de C<sub>17</sub>-epilimonina/limonina) tiende a indicar la gravedad del calentamiento.

30

REIVINDICACIONES

1.- Un procedimiento para determinar la cantidad de estrés térmico que se ha infligido a un zumo de frutas, comprendiendo dicho procedimiento determinar la proporción de isolimonina a limonina.

5 2.- El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la isolimonina es el C<sub>17</sub>-epímero de la limonina que muestra el anillo de furano en C(17) con una orientación β según la siguiente fórmula:

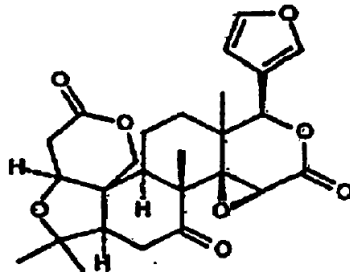


3.- El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la isolimonina es liberada de su precursor limonin-17-β-D-glucopiranosido.

4.- El procedimiento según la reivindicación 4, en el que la isolimonina es liberada mediante la degradación hidrolítica del limonin-17-β-D-glucopiranosido a través del catión de furfuralideno.

10 5.- El uso de la isolimonina para determinar la cantidad de estrés térmico infligida al zumo de frutas.

6.- El uso según la reivindicación 5, en el que la isolimonina es el C<sub>17</sub>-epímero de la limonina que muestra el anillo de furano en C(17) con una orientación β según la siguiente fórmula:



7.- El uso de la limonina para determinar la cantidad de estrés térmico infligida al zumo de frutas.

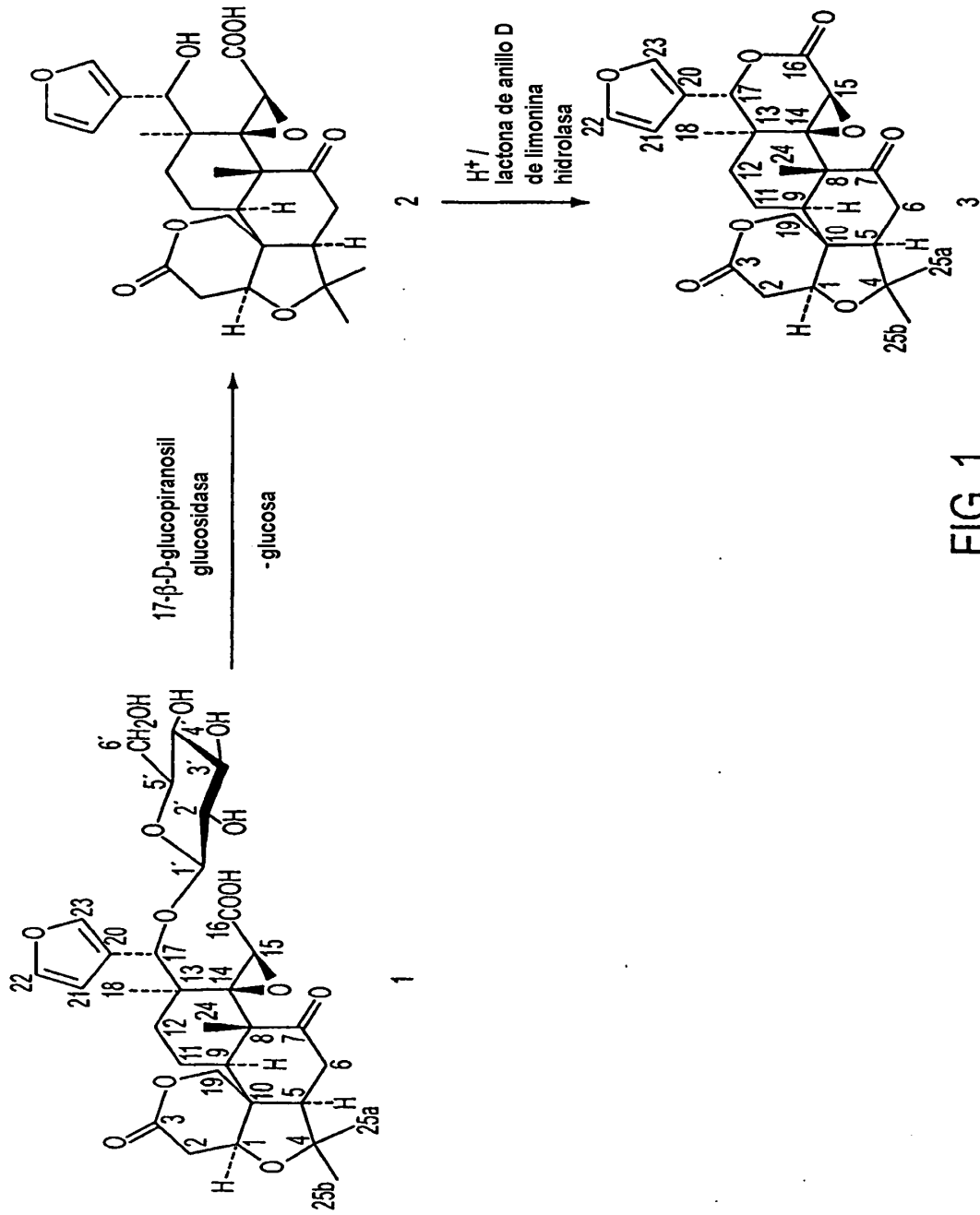


FIG. 1

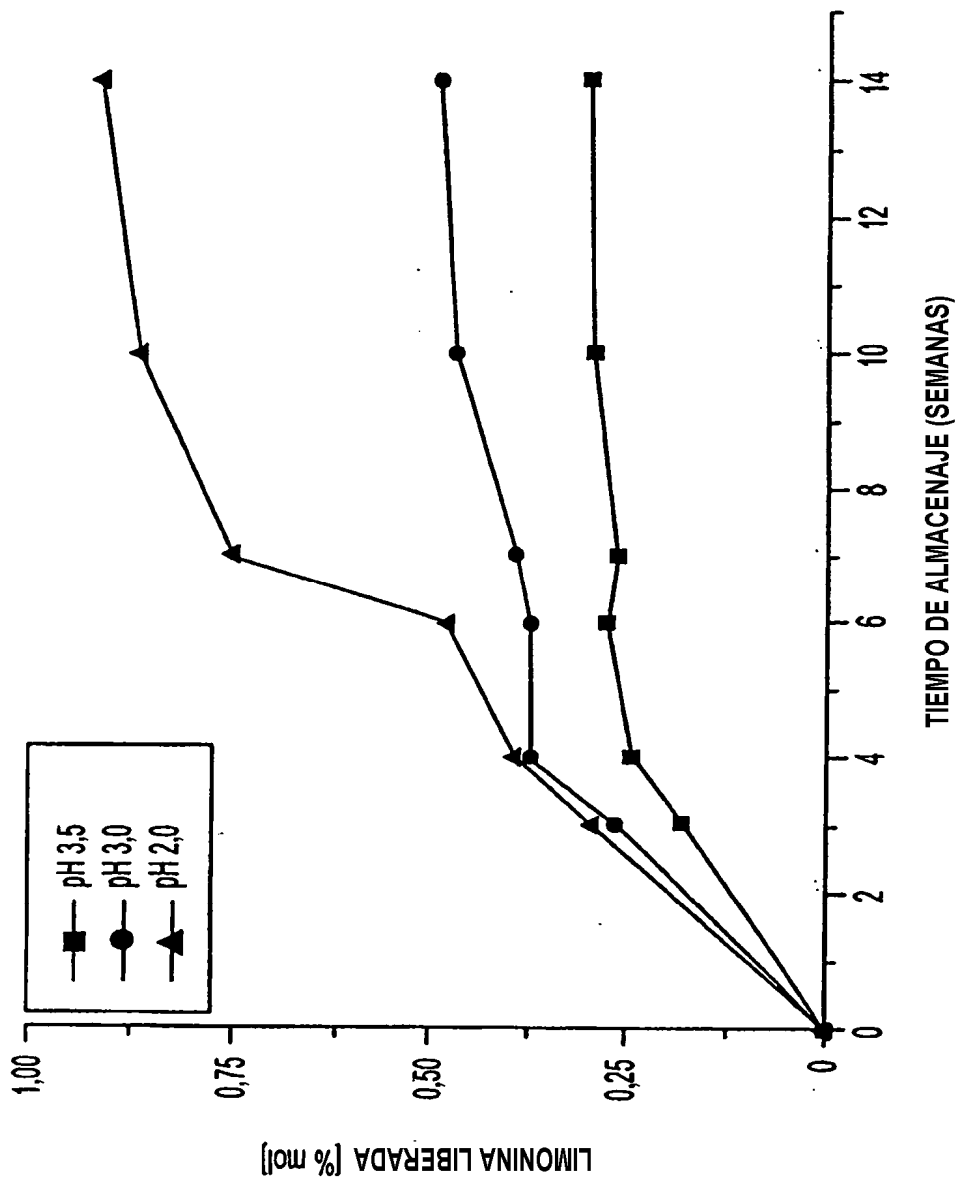


FIG. 2

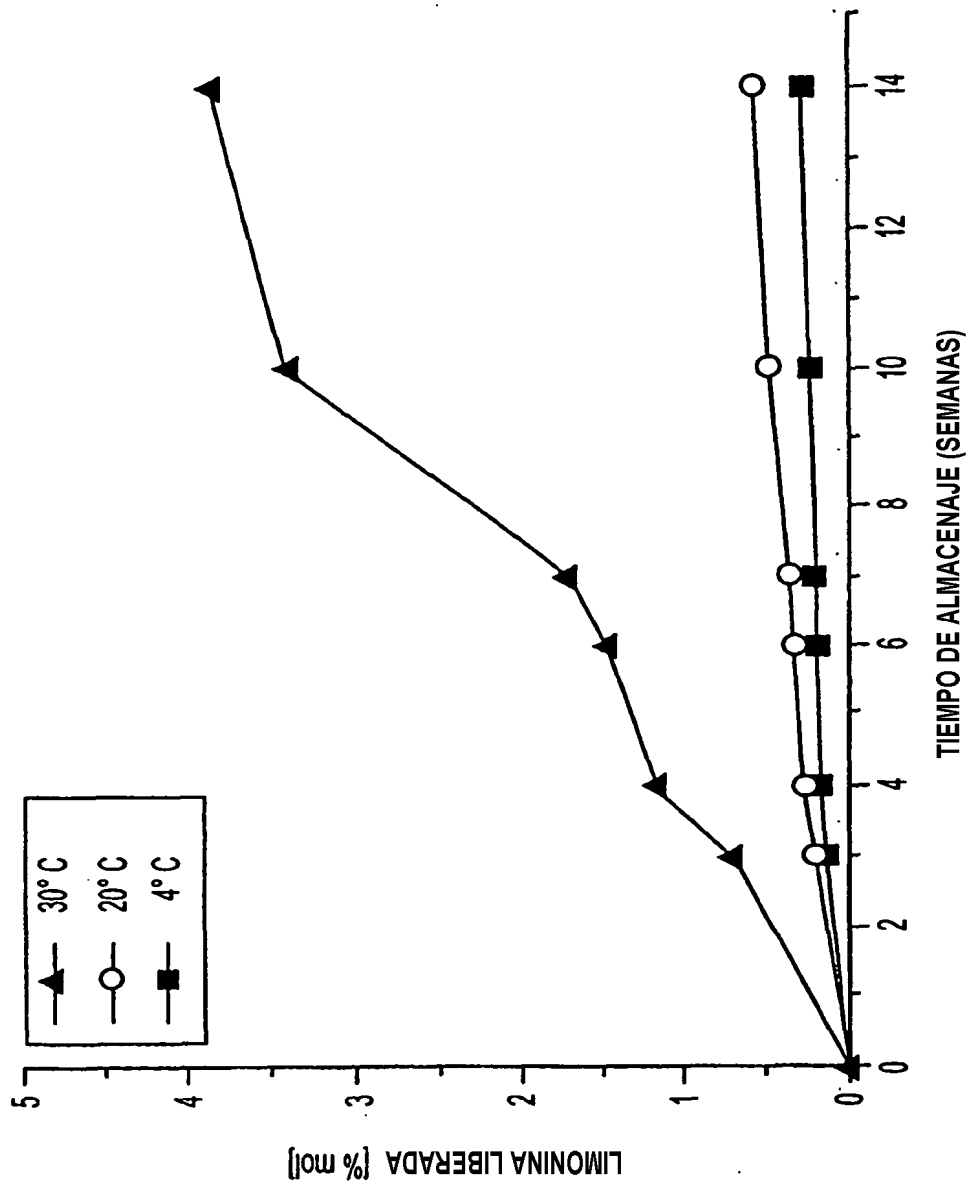


FIG. 3



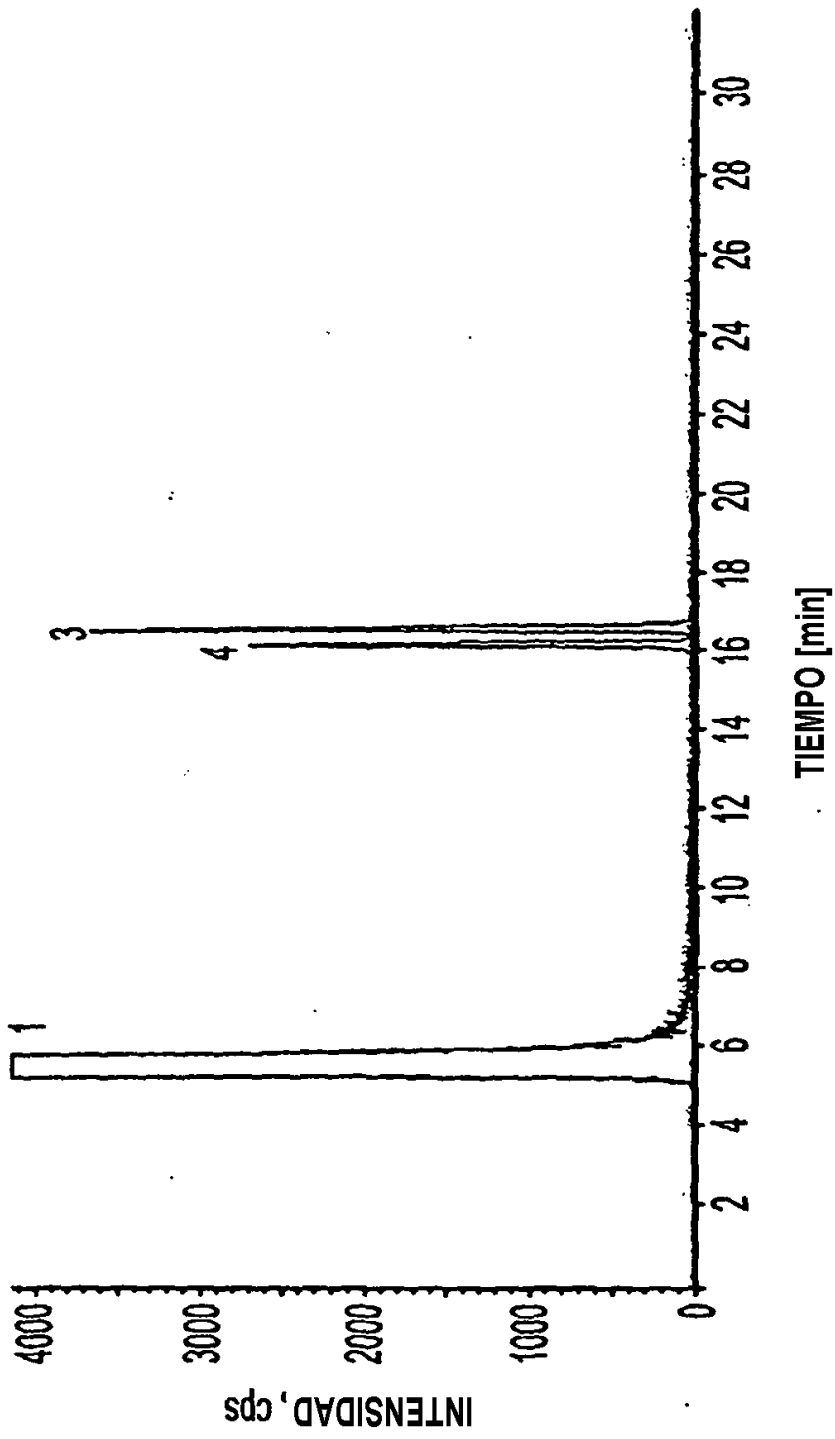
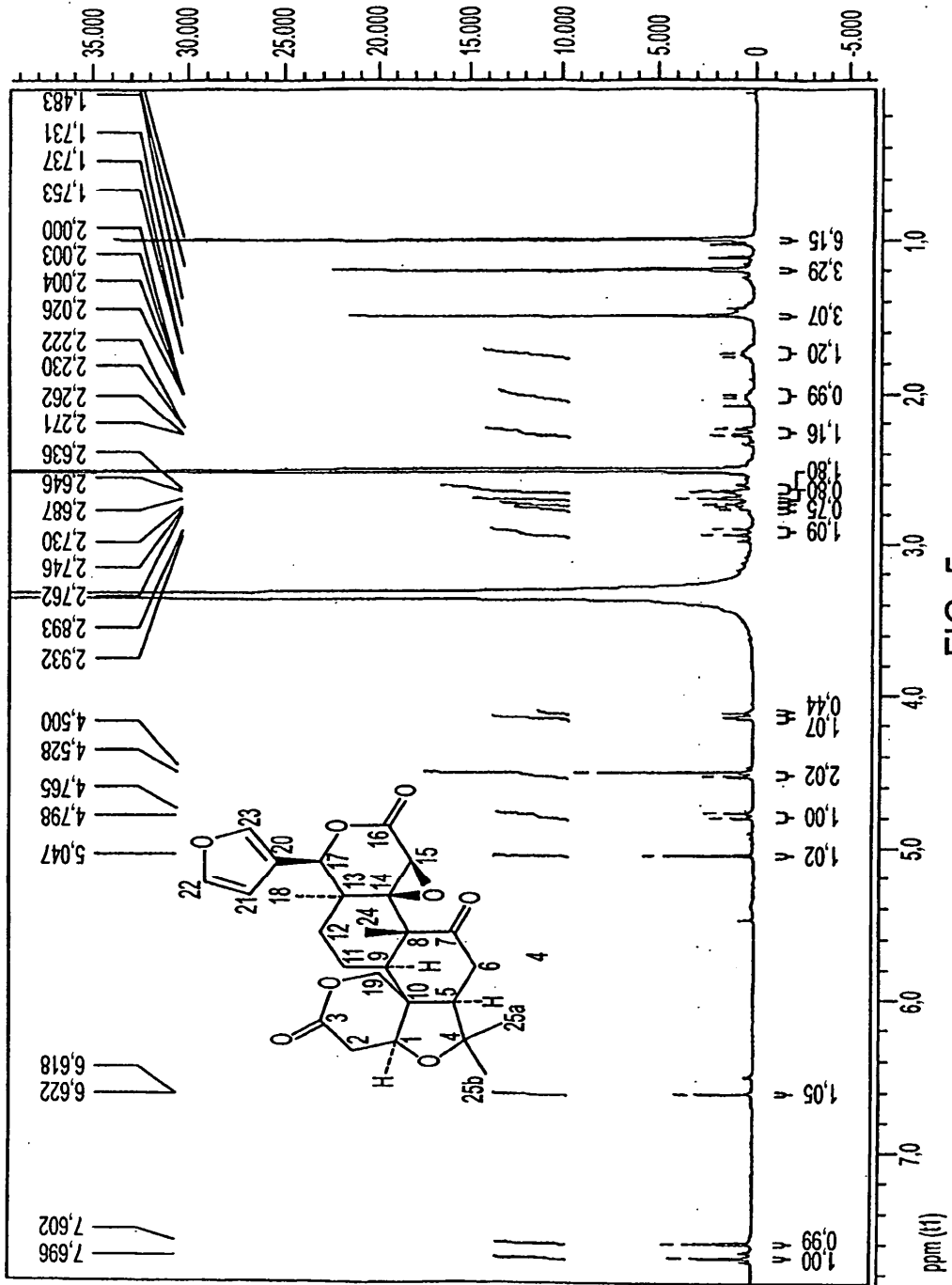


FIG. 4



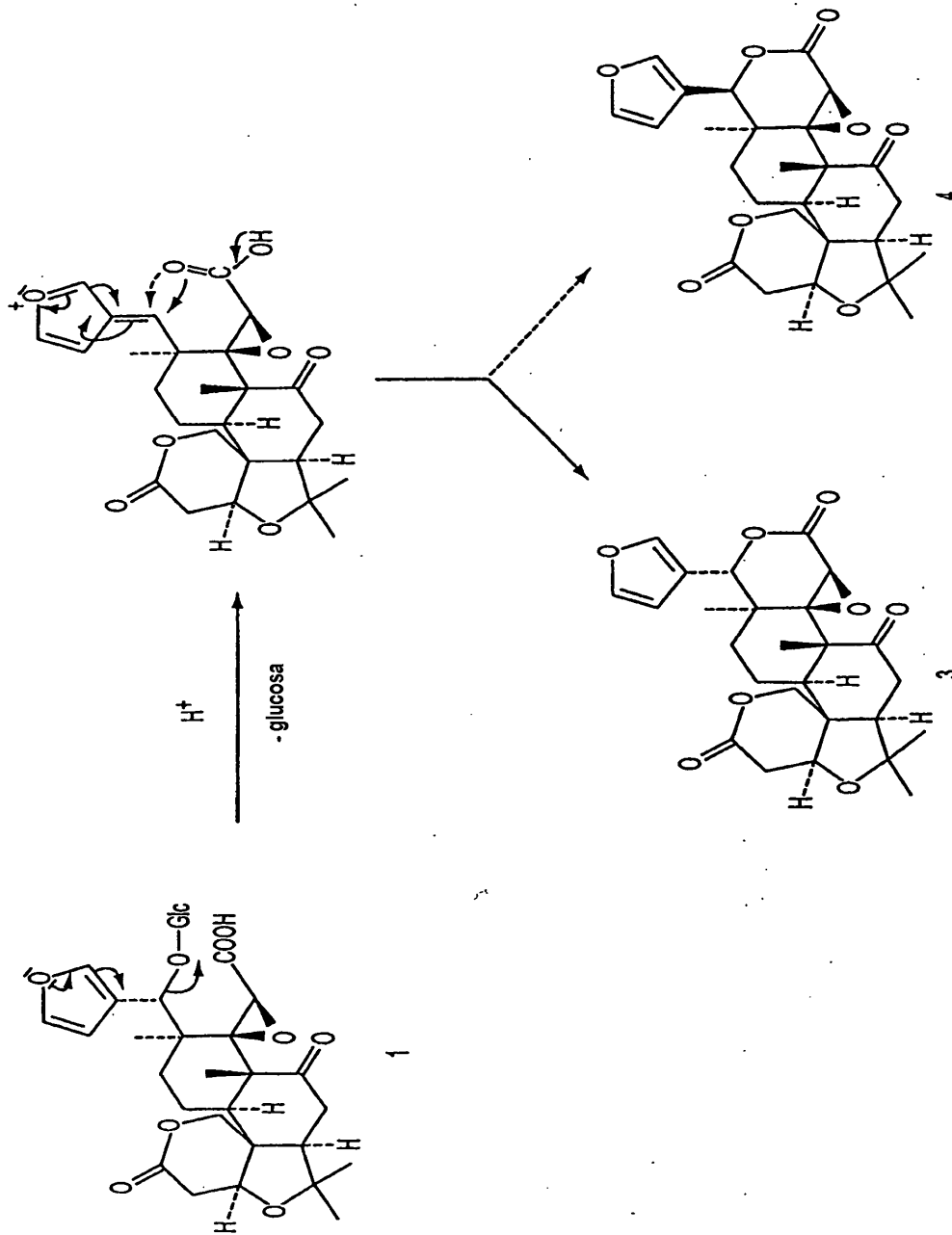


FIG. 6

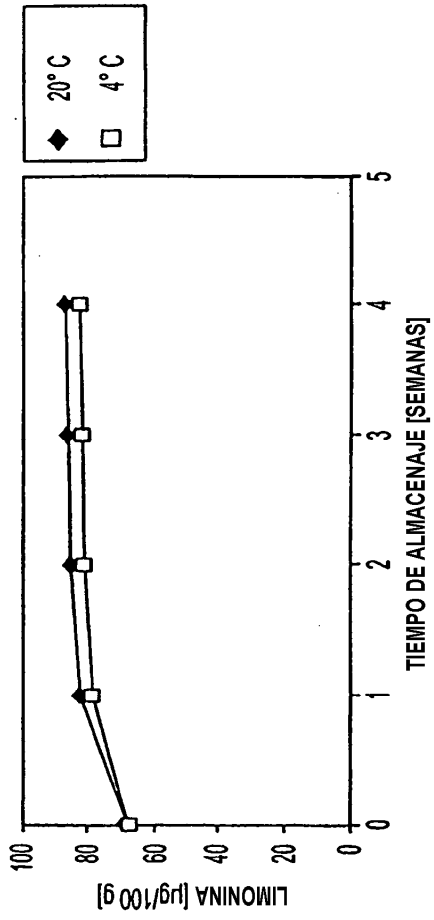


FIG. 7A

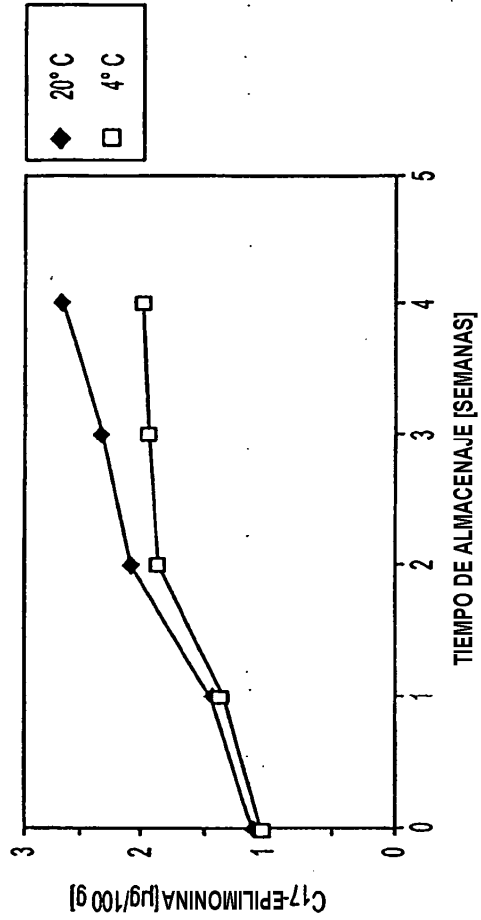


FIG. 7B

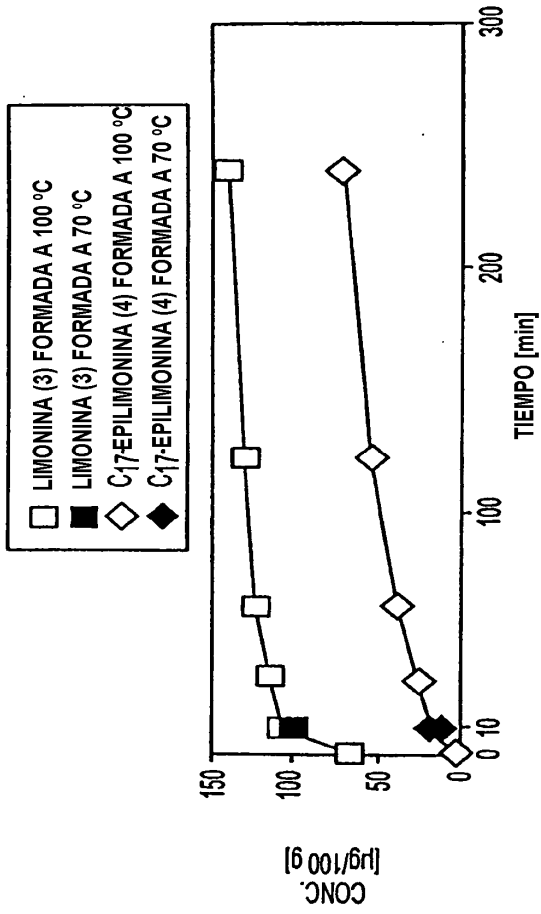


FIG. 8A

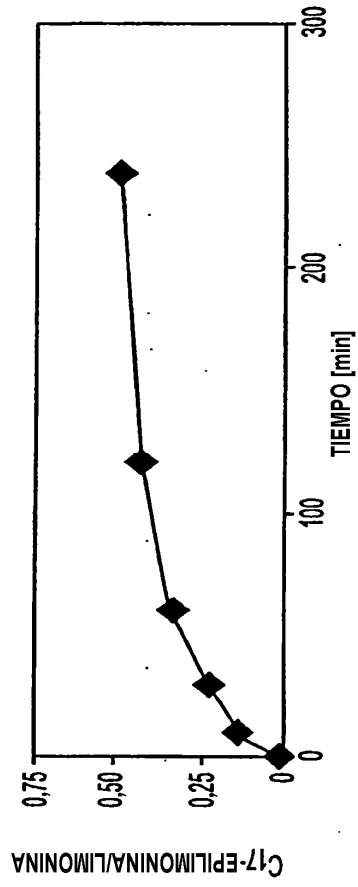


FIG. 8B