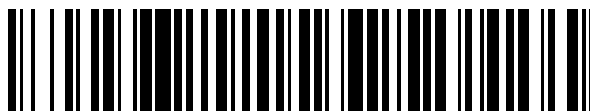


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 428 574**

51 Int. Cl.:

A23L 2/02 (2006.01)

A23L 2/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.10.2008 E 08838485 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2013 EP 2217098**

54 Título: **Control de las características de sabor e indicador de frescura en el zumo de frutas**

30 Prioridad:

09.10.2007 US 978515 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

08.11.2013

73 Titular/es:

**TROPICANA PRODUCTS, INC. (100.0%)
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 2 428 574 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 frescura en el zumo de frutas

Campo de la invención

5 La invención se refiere al control de las características de sabor y el sabor fresco en el zumo de frutas. En particular, la invención se refiere al control de las características de sabor y el sabor fresco en el zumo de frutos cítricos y, especialmente, en el zumo de naranja.

Antecedentes de la invención

10 Se han reconocido desde hace tiempo los frutos cítricos como fuentes valiosas de importantes nutrientes. Más recientemente, se ha admitido que los beneficios para la salud y los beneficios de retraso de enfermedades o de tratamiento de enfermedades de las fuentes de cítricos son más ventajosos y beneficiosos cuando se ingieren. De acuerdo con esto, existe la creencia general de que incrementar la ingesta de alimentos originarios de cítricos es un objetivo beneficioso e importante en el esquema global de la salud humana. Asimismo, muchos consumidores disfrutan los frutos cítricos simplemente porque son sabrosos.

15 Un modo conveniente de ingerir productos cítricos es en forma de zumo. El zumo puede hacerse fácilmente y transportar y consumir cómodamente. El zumo fresco o "no procedente de concentrado" es apreciado por su sabor y calidad. El zumo también se puede concentrar y después reconstituir en función de la comodidad del consumidor. El zumo concentrado también se distribuye de la fuente al consumidor de un modo eficiente y rentable. Asimismo, las personas que tienen dificultades para comer alimentos sólidos pueden consumir más fácilmente zumos.

20 No obstante, a algunos consumidores les desagradan ciertas características de los zumos cítricos, tales como el amargor, la acidez, las notas de sabor anormal, la astringencia, el cambio a color amarronado y la consistencia espesa. Todos los frutos cítricos, incluyendo pomelos, naranjas, mandarinas, limas y limones, pueden presentar estos problemas. Algunos consumidores prefieren zumos que tienen un nivel bajo de dulzor, mientras que otros prefieren un producto muy dulce. Además, a menudo es difícil conseguir consistencia en las características del sabor, por ejemplo desde principios de la estación hasta finales de la estación.

25 El amargor a menudo es un problema fundamental para los consumidores. Un nivel bajo de amargor puede proporcionar una contribución deseable a las propiedades organolépticas y las características del zumo para muchos consumidores. Dichos consumidores disfrutan la nota de sabor picante de un nivel bajo de amargor. No obstante, la mayoría de los consumidores también están de acuerdo en que el excesivo amargor afecta de forma adversa a las propiedades organolépticas y las características del zumo, convirtiéndolo en desagradable de consumir. Los consumidores suelen asociar el amargor con falta de frescor, con zumo concentrado y/o con zumo de menor calidad.

35 Los sabores amargos se encuentran en cada tipo de frutos cítricos en cantidades variables. Existen diferencias en las concentraciones de estos sabores entre variedades de la misma fruta y entre frutos de la misma variedad desde principios de la estación hasta finales de la estación. Por tanto, la fuente de la fruta, el momento de la estación y otras variables afectan a las concentraciones de sabores amargos en la fruta.

La astringencia es una característica de los zumos, en particular de los zumos de cítricos, que los consumidores suelen encontrar objetables. En concreto, la astringencia en el zumo de frutas suele estar caracterizada por una sensación aterciopelada que recubre la boca. Esta sensación en la boca se considera desagradable para muchos consumidores.

40 Los consumidores también se ven afectados por la acidez del zumo de frutas. Muchos consumidores a menudo consideran que los zumos de frutas son ácidos. Los consumidores a menudo asocian la acidez no solo con un sabor agudo objetable sino también con sensaciones de molestias o desagradables en el estómago y eructos.

45 Hasta la fecha se han realizado pocos esfuerzos para reducir el amargor, la acidez y otras propiedades y características organolépticas objetables, normalmente mediante la eliminación de compuestos seleccionados. La limonina es uno de estos compuestos. Otros procedimientos excluyen partes de la fruta, tal como las semillas y las pieles, desde la fuente del zumo, para minimizar la concentración del sabor amargo.

50 Asimismo, la frescura es una característica deseada por los consumidores. A menudo, el zumo de concentrado se considera de menor calidad que el zumo fresco. Se conocen varios procedimientos para tratar zumos congelados y concentrados de zumos. No obstante, hasta la fecha, el zumo de concentrado sufre efectos perjudiciales sobre el sabor y se han comercializado zumos no completamente satisfactorios, frescos o congelados.

Por tanto, existe la necesidad de un zumo en el que el sabor amargo esté controlado a límites en los que los consumidores generalmente encuentran agradables y no excesivamente amargos. También existe la necesidad de un zumo con sabor a fresco.

La patente de EE.UU. 4439485 divulga la preparación de zumos de cítricos, concentrados y polvos desecados con

menor amargor poniendo en contacto el zumo de frutos cítricos con una resina adsorbente de copolímero reticulado con estireno-divinilbenceno.

Breve resumen de la invención

La invención se define en las reivindicaciones.

5 Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 representa un esquema de reacción que muestra la degradación enzimática de limonin-17-β-D-glucopiranosido (1) mediante limonoato A-anillo lactona (2) para dar la limonina de sabor amargo (3).

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

10 La Fig. 3 ilustra la influencia de la temperatura sobre la formación dependiente del tiempo de limonina (3) en una solución acuosa de limonin-17-β-D-glucopiranosido (1) almacenado a un pH de 3,0.

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

15 La FIG. 5 es un espectro de RMN de ¹H (400 MHz) de C₁₇-epilimonina (4) purificada.

La Fig. 6 ilustra una secuencia de reacción que muestra la degradación hidrolítica de limonin-17-β-D-glucopiranosido (1) para dar limonina (3) y C₁₇-epilimonina (4) mediante carbo-catión de furfuralideno como intermedio fundamental.

La Fig. 7 ilustra la generación de limonina (A) C₁₇-epilimonina (B) tras almacenar un zumo de naranja a 20 °C como función del tiempo.

20 La Fig. 8 ilustra la generación de limonina y C₁₇-epilimonina (A) y la proporción de C₁₇-epilimonina / limonina (B) tras el tratamiento térmico de un zumo de naranja en el tiempo.

Descripción detallada de la invención

25 La invención está dirigida al control de las características de sabor del zumo de frutas. En concreto, las realizaciones de la invención están dirigidas a controlar el amargor en el zumo de cítricos controlando las concentraciones de sabores amargos fundamentales, a controlar la astringencia controlando la causa de las características de astringencia clave, a controlar la acidez controlando las concentraciones y las proporciones relativas de ácidos y a controlar la dulzura mediante el control de las concentraciones y las proporciones relativas de azúcares.

La invención también está dirigida a impartir un sabor fresco al zumo. En concreto, las realizaciones de la invención están dirigidas a controlar un componente en el zumo de frutas para hacer que el zumo sepa a fresco.

30 Los expertos reconocen que la concentración de un componente de sabor en un producto alimenticio debe superar un umbral antes de que un consumidor pueda sentir el componente del sabor. El umbral para la sensación de diferentes características del sabor, tal como astringencia y amargor, son diferentes. Por tanto, los trabajos hasta la fecha sobre la identificación de compuestos que contribuyen a las características de sabor se han dirigido a los compuestos que están presentes a concentraciones que superan el umbral del sabor relevante.

35 Los inventores han descubierto que el sabor amargo del zumo de frutos cítricos, en particular zumo de naranja, se debe al menos en parte a 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 azúcar sientan la base de la capacidad para controlar el amargor en el zumo de cítrico. Hasta la fecha, el experto no sabía que tres grupos de sustancias amargas y azúcar controlaban la sensación de amargor en el zumo de naranja.

40 La limonina, una sustancia que el experto sabe que produce amargor en el zumo de naranja, no es responsable por sí solo la totalidad del amargor del zumo de naranja. En su lugar, el amargor en el zumo de naranja se debe a la interacción de los siguientes tres grupos de sustancias amargas;

(1) limonina, isolimonina, y, en menor medida, nomilina;

(2) flavonas polimetoxiladas (PMF); y

45 (3) limonoide β-D-glucopiranosidos.

Por tanto, el control de las concentraciones relativas de estos componentes, junto con el control de la concentración de azúcar, en el zumo controlarán la sensación de amargor en el zumo.

Las concentraciones de los miembros de estos grupos de sustancias amargas varían en función de la variedad, el momento en la estación de crecimiento y recolección (es decir, si estamos a principios, mediados o finales de la

5 estación) y las condiciones de procesamiento. Por ejemplo, se ha descubierto que la limonina se desarrolla en mayor medida en el zumo obtenido de naranjas recolectadas a principios y a mediados de la estación que cuando el zumo se obtiene de naranjas recolectadas a finales de la estación. Conociendo la relación entre los tres grupos de sustancias amargas y el azúcar, se puede controlar el amargor del zumo de naranja y de los zumos cítricos que comprenden estos componentes.

Los umbrales del sabor de los miembros de estos grupos de sustancias amargas se exponen en la tabla siguiente:

Componente	Umbral del sabor 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
Limonoide β -D-glucopiranosidos.	> 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- β -D-glucopiranosido	78
5,6,7,3',4'-pentametoxi-flavona-3-O- β -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 17- β -D-glucopiranosido deacetilnomilínico	68
Ácido 17- β -D-glucopiranosido epiisobacunoico	42
Ácido β -glpc nomilina	> 800
β -glpc nomilina	> 700
Obacunon β -glpc	49
Desacetilnomilina	> 106

Como se puede ver 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 las concentraciones umbral de PMF y, en menor medida, de nomilina, potencian el amargor inducido por limonina en productos de naranja tales como el zumo. Este efecto es sorprendente porque el experto no esperaría que un compuesto que está presente por debajo del umbral del sabor contribuya al amargor.

La nomilina está casi a la concentración umbral en el zumo de naranja Hamlin y puede alcanzar el umbral a principios de la estación. Los limonoide β -D-glucopiranosidos están por encima del umbral en el zumo de naranja Hamlin y Valencia.

10 Estos miembros de estos grupos de sustancias amargas son muy amargos. En particular, son significativamente más amargos que los compuestos que normalmente se encuentran en los refrescos carbonatados y el té. Por ejemplo, la limonina es casi 200 veces más amarga que la cafeína y 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 del sabor, el amargor no está linealmente relacionado con la concentración. Por ejemplo, la duplicación de la concentración del componente no duplica el amargor. Además, los inventores han descubierto que la concentración de un compuesto no tiene que alcanzar el umbral del sabor para dicho compuesto para hacer una contribución al amargor. En su lugar, Los componentes actúan de forma sinérgica para dar un sabor amargo mayor que lo que predeciría 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 aumenta el número Brix y, en particular, a medida que aumenta la proporción número Brix/ácido.

25 Por tanto, con la guía proporcionada en el presente documento, el experto puede controlar el amargor del zumo de cítricos controlando el número Brix y, en particular, la proporción número Brix/ácido y las concentraciones de estos miembros de estos grupos de sustancias amargas en un producto de zumo. Por ejemplo, la concentración de estos compuestos se puede reducir con un procesamiento adecuado, tal como intercambio iónico, destilación u ósmosis inversa. De un modo similar, diferentes zumos que tienen varias concentraciones de cada compuesto se pueden mezclar para dar un zumo que tiene las concentraciones de estos compuestos inferiores a las concentraciones que tienen como resultado un sabor amargo.

30 Los inventores han descubierto que la limonina se forma mediante varias vías. Normalmente, la limonina no se encuentra en frutos enteros a una concentración por encima del umbral del sabor. No obstante, la limonina se muestra mediante lactonización acelerada por enzimas.

35 La Fig. 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 un limonato A-anillo lactosa **2**. Esta lactona se reduce en presencia de la limonin-D-anillo lactona hidrolasa en condiciones ácidas ($\text{pH} < 6,5$) para formar limonina **3**. Dado que el anillo A de lactona se convierte en limonin-17- β -D-glucopiranosido a medida que el fruto madura, la concentración de glucosa se acumula hasta aproximadamente 200 wppm.

Asimismo, se cree que la limonina se puede generar en el zumo mediante hidrólisis ácida. Esta hidrólisis ácida se acelera disminuyendo el pH y aumentando la temperatura y el tiempo. Por tanto, otros procedimientos para controlar la limonina en el zumo son evitar el calentamiento, almacenar el zumo durante un tiempo limitado a baja temperatura y/o incrementar el pH del zumo.

40 La concentración de cada miembro de los grupos de sustancias amargas se puede determinar mediante cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC). No obstante, el análisis mediante cromatografía de líquidos / espectrometría de masas (CLEM) o análisis CLEM/EM proporcionarían una medición más definitiva. El experto entiende estos y otros procedimientos de medición de las concentraciones de los miembros de los grupos de sustancias amargas.

45 Los inventores han descubierto que, como ocurre con el amargor, una pluralidad de compuestos presentes en el zumo de naranja por debajo del umbral de astringencia contribuye a la sensación astringente en la boca del zumo. Los umbrales del sabor para estos grupos astringentes de forma individual se exponen en la tabla siguiente:

Componente	Umbral de astringencia del sabor, $\mu\text{mol/l}$
5,7,8,3',4'-pentametoxiflavona	13,3
3,5,7,8,3',4'-hexametoxiflavona	125
5,6,7,3',4'-pentametoxiflavona	24

(continuación)

Componente	Umbral de astringencia del sabor, $\mu\text{mol/l}$
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- β -D-glucopiranosido	20
5,6,7,3',4'-pentametoxi-flavona-3-O- β -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- β -D-glucopiranosido	17
Ácido -17- β -D-glucopiranosido deacetilnomilínico	27
Ácido 17- β -D-glucopiranosido epiisobacunoico	16
Desacetilnomilina	13,2
Limonina	4
Isolimonina	10 mg/l

5 Por tanto, con la guía proporcionada en el presente documento, el experto puede controlar la astringencia del zumo de cítricos controlando la concentración de estos compuestos astringentes en un producto de zumo. Por ejemplo, la concentración de estos compuestos se puede reducir con un procesamiento adecuado, tal como intercambio iónico, destilación u ósmosis inversa. De un modo similar, diferentes zumos que tienen varias concentraciones de cada compuesto se pueden mezclar para dar un zumo que tiene las concentraciones de estos compuestos inferiores a las concentraciones que tienen como resultado un sabor astringente.

10 La acidez también es objeto de preocupación para los consumidores. Un producto con sabor ácido es desagradable y tiene un sabor intenso. Además, la acidez a menudo causa molestias de estómago y daños en el estómago y el esófago, y eructos.

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 las percepciones de acidez.

15 Los umbrales del sabor ácido para el ácido málico y para el ácido cítrico se conocen en la técnica. Aunque las proporciones relativas de estos ácidos varían entre zumos de diferentes variedades y con el momento de la estación, normalmente los ácidos están por encima del umbral del sabor ácido y, de este modo, contribuyen a la

sensación de sabor ácido.

Por tanto, con la guía proporcionada en el presente documento, el experto puede controlar la acidez del zumo de cítricos controlando las concentraciones de estos ácidos en un producto de zumo. Por ejemplo, la concentración de estos ácidos se puede reducir con un procesamiento adecuado, tal como intercambio iónico, destilación u ósmosis inversa. De un modo similar, diferentes zumos que tienen varias concentraciones de cada ácido se pueden mezclar para dar un zumo que tiene las concentraciones de estos ácidos inferiores a las concentraciones que tienen como resultado un sabor ácido.

El dulzor también es objeto de preocupación para los consumidores. Mientras que algunos consumidores prefieren un sabor dulce, otros no. Por tanto, la capacidad para controlar el dulzor supone la oportunidad para aumentar la satisfacción del consumidor.

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

El umbral del sabor dulce para la glucosa, fructosa y sacarosa se conoce en la técnica. Las proporciones relativas de estos azúcares varían entre los zumos de diferentes variedades y con el momento en la estación. No obstante, con la guía proporcionada en el presente documento, el experto puede controlar el dulzor del zumo de cítricos controlando las concentraciones de estos azúcares en un producto de zumo. Por ejemplo, la concentración de estos azúcares se puede reducir con un procesamiento adecuado, tal como intercambio iónico, destilación u ósmosis inversa. De un modo similar, diferentes zumos que tienen varias concentraciones de cada compuesto se pueden mezclar para dar un zumo que tiene las concentraciones de estos compuestos inferiores a las concentraciones que tienen como resultado un sabor ácido.

Los inventores también han descubierto que la presencia de isolimonina, un compuesto formado a partir de uno de estos limonoide β -D-glucopiranosidos, es un indicador de frescura. La isolimonina también se conoce como C₁₇-epilimonina. La isolimonina se forma mediante hidrólisis ácida de la limonina tras la pasteurización. La isolimonina también se forma no enzimáticamente a partir de limonin-17- β -D-glucopiranosido. La concentración de isolimonina en el concentrado de zumo de naranja congelado es de aproximadamente dos veces la del zumo de naranja fresco, lo que indica que "estresar" el zumo también contribuye a la formación de isolimonina. Por tanto, la presencia de isolimonina a una concentración más alta que la del producto fresco indica que el producto puede no estar fresco (dado que la isolimonina se forma con el tiempo) o que se ha congelado.

Ejemplos

Los ejemplos siguientes ilustran diversas formas relacionadas con la invención. El ejemplo 1 está dirigido al aislamiento de limonin-17- β -D-glucopiranosido de semillas de naranja. El ejemplo 2 resume estudios a varias temperaturas y valores de pH para determinar la velocidad a la cual se desarrolló limonina en las soluciones. La identificación de limonina e isolimonina mediante HPLC y CL-EM y RMN se expone en el ejemplo 3.

El ejemplo 4 está dirigido a la cuantificación de limonina e isolimonina en el zumo de naranja. El ejemplo 5 está dirigido a análisis sensoriales.

Para estos ejemplos, se obtuvieron los compuestos siguientes comercialmente: limonina (Sigma, Steinheim, Alemania); ácido fórmico, metanol y acetonitrilo (Merck, Darmstadt, Alemania); disolventes deuterado (Aldrich, Taufkirchen, Alemania); el agua desionizada usada para cromatografía se purificó mediante un sistema Milli-Q Gradient A10 (Millipore, Billerica, EE.UU.). Las semillas de naranja y el zumo de naranja preparado de naranjas (Valencia tardía) recolectadas en Florida (EE.UU.) en marzo de 2006 así como de zumo de naranja concentrado congelado preparado del mismo lote de rutas se obtuvieron de la industria de los zumos de naranja (EE.UU.). Los frutos de naranja frescos (Valencia tardía) se adquirieron de un proveedor local.

Cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC)

El aparato de HPLC consistía en dos bombas (Sykam, S1122), un mezclador de gradientes (Sunchrom, mezclador de gradientes dinámico/estático), un inyector Rheodyne (bucle de 250 μ l), un automuestreador (Spark, Midas 380), un detector de matriz de diodos (Sunchrom, SpectraFlow 600 DAD), monitorización del efluente en un intervalo de longitudes de onda entre 200 y 600 nm, un módulo de división (Upchurch, P-470 microdivisor graduado) y un detector de dispersión de luz evaporatorio (ELSD) (S.E.D.E.R.E., Sedex 85 LT-ELSD, p = 2,6 bares, T = 40 °C) equipado con un nebulizador (S.E.D.E.R.E., HPLC nebulizador 200 μ l/min-2.5 ml/min).

Cromatografía de líquidos / Espectrometría de masas (CL/EM)

El análisis de CL-EM/E, se realizó usando un sistema Agilent 1100 HPLC conectado a la CL-EM/EM API 4000 (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemania) en el modo de ionización por electronebulización negativa o positiva (ESI) (ESI+). La tensión de la nebulización se fijó a -4500 V, el nitrógeno sirvió como gas cortina (20 psi) y el potencial de desagrupamiento se fijó a -65 V. Por medio del modo de monitorización múltiple de la reacción (MRM), los compuestos 2 y 3 se analizaron usando las transiciones de masa descritas anteriormente.

Espectroscopia por Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Los experimentos espectroscópicos ^1H , COSY, HMQC y HMBC se realizaron en un DPX 400 MHz NMR de Bruker (Rheinstetten, Alemania). Las muestras se disolvieron en DMSO- d_6 o MeOD- d_4 con tetrametilsilano como patrón interno y se introdujeron en tubos de RMN (Schott Professional 178 x 5 mm) antes de la medición. Se realizó el procesamiento de datos usando el software para RMN Mestre-C.

Ejemplo 1 - Aislamiento de limonin-17- β -D-glucopiranosido de semillas de naranja

Las semillas de naranja (100 g) se lavaron exhaustivamente con agua, seguido de acetona, y se congelaron en nitrógeno líquido, se trituraron en un molino de molturación y después se extrajeron dos veces con metanol (300 ml) durante 4 horas a 60 °C. Después de la filtración, se liberó el extracto del disolvente en vacío, dando sustancias extraíbles en metanol como un polvo amorfo (28 g).

Se tomó un alícuota (2 g) del aislamiento bruto en agua (10 ml) aplicado sobre una columna de vidrio enfriada con agua (300 mm x 35 mm) cargada con una pasta de material Amberlite XAD-2 (BDH Chemicals Ltd, Poole, Reino Unido) acondicionado con agua. Funcionando a un caudal de 5 ml/min, la cromatografía se realizó a partir de agua (200 ml; fracción I), seguido de mezclas de metanol/agua que contienen 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 recogieron por separado, liberaron del disolvente en vacío a 30 °C y después se desecaron por congelación, para dar las fracciones I-VI como polvos amorfos.

Las fracciones II-IV se combinaron, se disolvieron en mezcla (20/80, v/v) de metanol y 0,1 % de ácido fórmico acuoso y, tras filtración en membrana, los alícuotas (250 μl) se fraccionaron mediante HPLC semi-preparativa en una columna Microsorb-MV, RP-18, 250 x 10 mm i.d., de 5 μm (Varian, Alemania). La monitorización del efluente por medio de un detector UV a 220 nm así como un detector de dispersión de luz evaporativa (ELSD), se realizó cromatografía a un caudal de 3,5 ml/min a partir de la mezcla (10/90, v/v) de acetonitrilo y 0,1 % de ácido fórmico acuoso, incrementando el contenido en acetonitrilo a 20 % en 15 minutos, manteniendo durante 5 minutos y, por último, elevando el contenido en acetonitrilo a 100 % en 5 minutos. El efluente del pico detectado a 17 minutos se recogió en un matraz enfriado en hielo, el disolvente orgánico se retiró al vacío y la capa acuosa se aplicó sobre el cartucho Strata C 18-E SPE (10 g, 55 μm ; Giga Tubes, Phenomenex) acondicionado con agua. El cartucho se aclaró con agua (150 ml), después se secó succionando una corriente de nitrógeno a su través y, por último, se eluyó con metanol (100 ml). El cartucho SPE retira los rastros de ácido fórmico para evitar la liberación catalizada por protones del aglicón. El efluente orgánico se liberó del disolvente al vacío, el residuo se suspendió en agua (5 ml) y se desecó por congelación para dar limonin-17- β -D-glucopiranosido como un polvo amorfo blanco con una pureza superior al 99 %.

Limonin-17- β -D-glucopiranosido, **1** en la Fig. 1: UV/VIS (acetonitrilo/ agua; pH 2,5): λ_{max} = 220 nm; CL/EM (ESI $^+$): m/z 649 ([M-H] $^-$); CL/EM (ESI $^-$): m/z 668 ([M+NH $_4$] $^+$), 673 ([M+Na] $^+$), 689 ([M+K] $^+$); RMN de ^1H (400 MHz, MeOD- d_4 , COSY): δ 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 Hz, H-C (6)], 2,55 [dd, 1H, J = 5,6, 19,0 Hz, H-C (6)], 2,68 [d, 1H, J = 4,3 Hz, H-C (9)], 2,71 [d, 2H, J = 4, Hz, H-C (2)], 2,79 [dd, 1H, J = 5,6, 14,7 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, H-C (1)], 4,29 [d, 1H, J = 7,6 Hz, H-C (1')], 4,40 [d, 2H, J = 8,1 Hz, H-C (19)], 5,42 [s, 1H, H-C (17)], 6,53 [d, 1H, J = 1,3 Hz, H-C (21)], 7,24 [s, 1H, H-C (23)], 7,63 [s, 1H, H-C (22)]; ^{13}C NMR (100 MHz, MeOD- d_4 , HMQC, HMBC): δ 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-B-D-glucopiranosido

Para investigar la posible liberación no enzimática de limonina a partir de limonin-17- β -D-glucopiranosido durante el almacenamiento de zumo de naranja, soluciones acuosas del glucopiranosido ajustado al valor de pH de un zumo de naranja recién exprimido (pH 3,5) o al intervalo de valores de pH hallados en zumos de naranja concentrados (pH 2,0 y 3,0) se mantuvieron a 20 °C durante hasta 14 semanas en oscuridad. A intervalos de tiempo regulares se extrajeron alícuotas de las soluciones modelo y se analizó la cantidad de limonina liberada del glucopiranosido por medio de HPLC-EM/EM funcionando en modo MRM. Con independencia del valor de pH de la solución modelo, la limonina se generó al aumentar el tiempo de almacenamiento, como se muestra en la Fig. 2, pero disminuyendo los valores de pH a favor de la producción del compuesto amargo. Por ejemplo, se liberó 0,85 % moles de limonina a partir del glucopiranosido cuando se mantiene a un pH de 2,0, mientras que a pH 3,5 solo se generó un 0,25 % del compuesto amargo.

Con el fin de investigar la influencia de la temperatura sobre la generación de limonina, las soluciones acuosas del glucopiranosido ajustadas a un pH 3,0 se mantuvieron a 4, 20, y 30 °C durante hasta 14 semanas en oscuridad. A

intervalos de tiempo regulares, las cantidades de limonina se determinaron por medio de HPLC-EM/EM funcionando en modo MRM. Los resultados expuestos en la Fig. 3 demostraron claramente que la liberación de limonina a partir de limonin-17- β -D-glucopiranosido se aceleró a 30 °C en comparación con las soluciones modelo mantenidas a 4 y 20 °C, respectivamente. Por ejemplo, se liberó limonina a partir de su precursor en un rendimiento de casi 4,0 % cuando se incubó a 30 °C, mientras que solo se pudo detectar un 0,2 % del compuesto amargo después de almacenar la solución precursora a 4°C durante 14 semanas.

En particular, las soluciones 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 pequeñas de ácido clorhídrico (1 mol/l) se mantuvieron a diferentes temperaturas (4, 20, 30 °C) durante hasta 14 semanas en viales cerrados en oscuridad. A intervalos de tiempo regulares se extrajeron muestras (5 μ l) con una jeringa y se analizó la generación de limonina por medio de CL-EM/EM en una columna Synergi Fusion, 150 x 2 mm i.d., 4 μ m (Phenomenex). Para conseguirlo, se realizó una cromatografía con un caudal de 250 μ l/min a partir de una mezcla (80/20, v/v) de 0,1 % de ácido fórmico acuoso y acetonitrilo, aumentando el contenido en acetonitrilo al 40 % en 10 minutos, después hasta 80 % en 5 minutos, mantenidos durante 5 minutos y, por último, hasta el 100 % en 5 minutos. Usando ionización por electronebulización negativa, la limonina se analizó en modo de monitorización de varias reacciones (MRM) usando transición de masas m/z 469 \rightarrow 229. Se realizó un análisis cuantitativo comparando las áreas máximas obtenidas para los rastros de masas con las soluciones patrón definidas de limonina en metanol.

La Fig. 4 ilustra que el cromatograma CL-EM/EM no mostró solo el limonin-17- β -D-glucopiranosido (**1**) y la limonina (**3**), sino, sorprendentemente, un tercer pico (**4**), que eluyó a 16,59 min y mostró la misma transición de masas m/z 469 \rightarrow 229 que la hallada para la limonina, de modo que implica la existencia de un estereoisómero de limonina. Dado que la estructura química de dicho compuesto no se había confirmado inequívocamente mediante experimentos espectroscópicos RMN, otros experimentos se dirigieron a la producción del compuesto **4** en cantidades adecuadas con el fin de realizar experimentos espectroscópicos.

Ejemplo 3 – Identificación de limonina e isolimonina (Compuesto 4)

Liberados de limonin-17- β -D-glucopiranosido

Para determinar la estructura química del compuesto **4** identificado en el ejemplo 2 e ilustrado en la Fig. 4, se incubó una solución acuosa de limonin-17- β -D-glucopiranosido, ajustada a un pH de 1,5, durante 4 horas a 60 °C, el compuesto **4** se aisló y purificó por medio de HPLC semipreparativa y su estructura química se determinó por medio de experimentos CL-EM/EM y 1D/2D-RMN. En el espectro de RMN de ^1H mostrado en la Fig. 5, se observan 21 señales entre las cuales diez señales que muestran desplazamientos químicos de δ 1,44, 1,72, 2,00, 2,25, 2,66, 2,66, 2,73, 2,75, 2,91, y 4,14 ppm eran bastante acordes con las resonancias de los protones de alquilo 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. Las asignaciones de estas señales se confirmaron inequívocamente por medio de experimentos de correlación homo (COSY) y heteronucleares (HMQC, HMBC). Los protones diaestereotrópicos en resonancia a 4,51 y 4,78 ppm eran acorde con los protones de metileno H-C(19), de modo que indican un anillo A intacto presente en la limonina. Asimismo, las señales de resonancia observadas a 6,62, 7,60, y 7,70 ppm para los protones del furano H-C(21), H-C(22) y H-C(23) demostraron la similitud estructural con la limonina. No obstante, el compuesto **4** mostró diferencias a simple vista 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 de 4,21 y 1,11 ppm (**3**) a 4,50 y 1,48 ppm (**4**), respectivamente. Además, los experimentos 2D-RMN identificaron diferencias en los desplazamientos químicos de C(17)/C(18) en resonancia a 77,9/20,0 ppm para la limonina (**3**) y 85,1/27.1 ppm para el compuesto **4**, lo que indica una epimerización de la limonina en la posición C(17) en la estructura del compuesto **4**. Teniendo en cuenta todos los datos espectroscópicos, el compuesto **4** se identificó inequívocamente por primera vez como el epímero C_{17} de la limonina que muestra el anillo furano en C(17) en una orientación β en lugar de la orientación α de la limonina. Aunque ya se ha especulado con el compuesto **4**, denominado C_{17} -epilimonina o isolimonina, como metabolito en plasma humano del limonin-17- β -D-glucopiranosido, esta es la primera confirmación de la estructura de este epímero de la limonina basándose en los datos espectroscópicos y demuestra su liberación hidrolítica del glucopiranosido.

En particular, una solución de limonin-17- β -D-glucopiranosido (35 mg) en agua (20 ml) se ajustó a un pH de 1,5 con cantidades mínimas de ácido clorhídrico (1 mol/l) y se incubó durante 4 horas a 60 °C. Después de enfriar, la solución se aplicó encima de un cartucho Strata C 18-E SPE acondicionado con agua (10 g, 55 μ m, Giga Tubes, Phenomenex), después se aclaró con agua (150 ml), seguido por una mezcla de agua/metanol (50/50, v/v; 100 ml), y metanol (150 ml). La fracción de metanol se liberó del disolvente al vacío, se disolvió en una mezcla de metanol y 1 % de ácido fórmico acuoso y se separaron alícuotas (100 μ l) por medio de una HPLC semipreparativa en Microsorb-MV, RP-18, 250 x 10 mm i.d., 5 μ m (Varian, Alemania). La monitorización del efuente por medio de un detector UV a 220 nm así como un ELSD, se realizó cromatografía mediante un gradiente de disolvente a un caudal de 3,5 ml/min y a partir de la mezcla (30/70, v/v) de acetonitrilo y 0,1 % de ácido fórmico acuoso, incrementando el contenido en acetonitrilo al 40 % en 15 minutos, después hasta el 80 % en 10 minutos y, por último, hasta el 100 % en 10 minutos. Se detectaron dos picos, el efuente de cada pico se recogió por separado en matraces enfriados con hielo, se liberó del disolvente al vacío y se desecó por congelación. Los compuestos aislados se identificaron por

medio de CL-EM y RMN como limonina y su estereoisómero previamente no indicado C₁₇-epilimonina, también conocido como isolimonina.

Limonina, 3: UV/VIS (acetonitrilo/agua; pH 2,5) λ_{\max} = 220 nm; CL/EM (ESI⁺) *m/z* 509 ([M+K]⁺), 493 ([M+Na]⁺), 488 ([M+NH₄]⁺); CL/EM (ESI⁻):

5 *m/z* 469 ([M-H]⁻); RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆, COSY):

δ 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 [m, 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 ¹³C (100 MHz, MeOD-*d*₄, HMQC, HMBC): δ 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)].

15 *C*₁₇-*Epilimonina*, o *isolimonina* 4: UV/VIS (acetonitrilo/agua; pH 2,5) λ_{\max} = 220 nm; CL/EM (ESI⁺) *m/z* 509 ([M+K]⁺), 493 ([M+Na]⁺), 488 ([M+NH₄]⁺); CL/EM (ESI⁻): *m/z* 469 ([M-H]⁻); RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆, COSY): δ 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 ¹³C (100 MHz, MeOD-*d*₄, HMQC, HMBC): δ 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)].

30 Aunque los inventores no desean quedar anclados a teoría alguna, la Fig. 6 ilustra una vía de reacción que muestra la formación de limonina (3) e *isolimonina*, o *C*₁₇-*epilimonina* (4), del limonin-17- β -D-glucopiranosido. Dado que la glucosa es un buen grupo saliente, la hexosa se divide a partir de la posición α del grupo furfuralideno de 1 en condiciones ácidas, de modo que tiene como resultado la liberación de un catión de furfuralideno deslocalizado como intermedio transitorio primario. La ciclación intramolecular inducida por un ataque nucleofílico de la función carboxi da lugar a la limonina (3) portadora del anillo furano en orientación α , así como *isolimonina*/*C*₁₇-*epilimonina* que muestra el anillo furano en C(17) en orientación β .

35 Asimismo, se ha demostrado que la incubación de limonina en solución acuosa que tiene un pH de 3 no produce una cantidad significativa de *isolimonina*, de modo que la *isolimonina* no se forma mediante epimerización directa de la limonina.

Ejemplo 4 – Cuantificación de limonina e *isolimonina* en zumo de naranja

40 Para investigar la generación de limonina e *isolimonina*/*C*₁₇-*epilimonina* durante el almacenamiento del zumo de naranja, zumo de naranja recién exprimida (pH 3,5) se almacenó durante hasta cuatro semanas a 4 y 20 °C y, después, la limonina y la *isolimonina*/*C*₁₇-*epilimonina* se determinaron cuantitativamente por medio de HPLC-EM/EM usando el modo MRM. Como se muestra en la Fig. 7A, la concentración de limonina en zumo de naranja aumentó ligeramente durante el almacenamiento de 70,0 μ g/100 g en el zumo recién exprimido a 80 y 85 μ g/100 g cuando se mantiene durante 2 semanas a 4 y 20 °C, respectivamente. El almacenamiento del zumo de naranja indujo también un incremento de la concentración de *C*₁₇-*epilimonina*, por ejemplo en las muestras mantenidas durante cuatro 45 semanas a 4 y 20 °C, respectivamente, se observó un incremento de 1,5 o 2 veces de la cantidad de *C*₁₇-*epilimonina*. En comparación con el incremento inducido por el almacenamiento de la cantidad de limonina con el de la *isolimonina* demostró claramente que la formación de limonina estaba más favorecida con el almacenamiento del zumo de naranja que la de su efímero *C*₁₇, lo que avala los hallazgos en la bibliografía de que durante el almacenamiento, la limonoato-A-anillo de lactona presente en el zumo se convierte lentamente en limonina tras catálisis ácida.

50 En un segundo conjunto de experimentos, se investigó la influencia del tratamiento térmico sobre la generación de limonina e *isolimonina*/*C*₁₇-*epilimonina*. Para llegar a esto, el zumo de naranja recién exprimido se trató térmicamente a 70 °C durante 10 minutos con el fin de obtener más información sobre la velocidad de liberación máxima de estos compuestos a 95 °C durante hasta 240 minutos. El análisis HPLC-EM/EM (MRM) reveló que la concentración de limonina e *isolimonina* en el zumo recién preparado no calentado fue 70,0 y 1,3 μ g/100g, respectivamente (Fig. 8A). Tras el tratamiento térmico, las concentraciones de ambos terpenoides aumentó 55 significativamente, por ejemplo calentando durante 10 minutos a 70 °C, indujo un incremento de la cantidad de *isolimonina* por un factor de cinco para alcanzar una concentración de 6,1 μ g/100 g, mientras que la concentración de limonina alcanzó una concentración de 100 μ g/100 g.

60 El calentamiento del zumo de naranja a 95 °C influyó sobre las cantidades de limonina e *isolimonina* todavía más. Ya

después de calentar el zumo durante 10 minutos a 95 °C, la cantidad de C₁₇-epilimonina aumentó por un factor de diez (Fig. 8A). Después de calentar durante 30 y 60 minutos, respectivamente, se generaron 20 y 30 µg/100 g de C₁₇-epilimonina. Después de calentar durante 60 minutos, la concentración de limonina aumentó de 70 a 115 µg/100 g y se acercó a un valor máximo de 140 µg/100 g después de 4 horas. El cálculo de la proporción entre ambos limonoides en las muestras de zumo de naranja calentado reveló que la proporción C₁₇-epilimonina/ limonina cambia espectacularmente aumentando el tiempo de calentamiento y alcanzó un máximo de 0,50 tras 240 minutos (Fig. 8B).

Para realizar estas determinaciones, las naranjas se partieron por la mitad y se exprimieron cuidadosamente a mano por medio de un exprimidor de cítricos de cocina (Citromatic MPZ 22, Braun, Alemania). Con el objetivo de investigar la influencia del almacenamiento en frío sobre la concentración de limonina e isolimonina en el zumo de naranja, alícuotas (300 ml) de zumo de naranja recién exprimido se mantuvieron a 4 y 20 °C durante 4 semanas en oscuridad. Con el fin de estudiar la formación de limonina e isolimonina a temperaturas elevadas, alícuotas (300 ml) del zumo de naranja recién exprimida se trataron térmicamente a 70 °C durante 10 minutos o a 95 °C durante hasta 240 minutos.

Para el análisis cuantitativo, alícuotas (8 g) del zumo de naranja fresco y tratado, respectivamente, se centrifugaron durante 10 minutos a 3.000 rpm, el material insoluble se suspendió y se mezcló íntimamente con agua (8 ml) y se centrifugó de nuevo durante 10 minutos a 3.000 rpm. Los sobrenadantes se combinaron y colocaron sobre el cartucho C 18-E SPE acondicionado con agua (1 g, 5 µm, Phenomenex). Después de aclarar con agua (20 ml), el cartucho se secó succionando una corriente de nitrógeno a su través y después se eluyó con metanol (20 ml). El efluente metabólico se liberó del disolvente al vacío y se llevó a un volumen de 3,0 ml con metanol. Los alícuotas (5 µl) se analizaron para determinar la presencia de limonina e isolimonina/ C₁₇-epilimonina por medio de CL-EM/EM en una columna Synergi Fusion, 150 x 2 mm i.d., 4 µm (Phenomenex). Para conseguirlo, se realizó una cromatografía con un caudal de 250 µl/min a partir de una mezcla (80/20, v/v) de 0,1 % de ácido fórmico acuoso y acetonitrilo, aumentando el contenido en acetonitrilo al 40 % en 10 minutos, después hasta el 80 % en 5 minutos, mantenidos durante 5 minutos y, por último, hasta el 100 % en 5 minutos. Usando ionización por electronebulización negativa, la limonina y la isolimonina/ C₁₇-epilimonina se analizaron en modo de monitorización de varias reacciones (MRM) usando transición de masas *m/z* 469→229. Se realizó un análisis cuantitativo comparando las áreas máximas obtenidas para los rastros de masas con las soluciones patrón definidas de limonina y C₁₇-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 conseguirlo, la concentración de C₁₇-epilimonina se analizó de forma cuantitativa en un zumo de naranja fresco y un concentrado de zumo de naranja congelado producido a partir del mismo lote de zumo de naranja mediante una concentración de 6,6 veces. Mientras que el zumo de naranja contenía isolimonina/C₁₇-epilimonina en cantidades de 1,6 µg/100 g, se halló aproximadamente 21,0 µg/100 g de isolimonina en el zumo concentrado congelado correspondiente. Teniendo en cuenta que el concentrado se produjo mediante una concentración de 6,6 veces del zumo de naranja, cabía esperar que hubiera en el zumo concentrado 10,6 µg/100 g del epímero. Pero había una cantidad dos veces superior de 21,0 µg/100 g en el concentrado congelado, de modo que se demuestra claramente por primera vez que se forma C₁₇-epilimonina en cantidades significativas durante la fabricación del zumo de naranja concentrado congelado.

Ejemplo 5- Análisis sensorial

Para estudiar la influencia de la quiralidad de C(17) sobre la actividad sensorial de estos limonoides se determinaron las concentraciones umbral del amargor para limonina y C₁₇-epilimonina. Estos estudios sensoriales revelaron una concentración umbral del amargor de 10,0 µg/l (agua) para C₁₇-epilimonina que es bastante próximo al obtenido para la limonina (4,0 µmol/l), de modo que se demuestra una actividad sensorial similar de ambos compuestos triterpenoides de lactona.

Para efectuar estas evaluaciones, once asesores (cuatro mujeres y siete varones de 23-29 años de edad), que participaron durante al menos dos años en sesiones de formación semanales, determinaron las concentraciones umbral de reconocimiento del sabor en agua embotellada (pH 5,1) por medio de un procedimiento de elección forzada de tres alternativas con concentraciones crecientes del estímulo siguiendo el procedimiento notificado previamente en Stark, T.; Barenther, S.; Hofmann, T. (2005) J. Agric. Food Chem. 53:5407-5418.

Los ejemplos indican que mientras que el cierre del anillo de limonoato A-anillo de lactona (2) solo permite la formación de limonina (Fig. 1), la degradación hidrolítica de limonin-17-β-D-glucopiranosido (1) mediante el catión furfuralideno da lugar a limonina (3) y C₁₇-epilimonina (4) (Fig. 6). Dado que se halló que solo se generaban cantidades mínimas de isolimonina tras el almacenamiento en frío del zumo de naranja pero que se liberaban cantidades significativamente mayores a partir de su precursor limonin-17-β-D-glucopiranosido a una temperatura elevada, la proporción C₁₇-epilimonina/limonina podría ser un marcador adecuado que permita la determinación analítica de los datos térmicos aplicados durante el procesamiento del zumo de naranja.

Como se puede ver en la Fig. 8, la proporción isolimonina/limonina aumentó de 0 a aproximadamente 0,25 en aproximadamente 20 minutos y hasta aproximadamente 0,40 - 0,45 en aproximadamente 60 minutos a 100 °C. Por tanto, la proporción isolimonina/limonina (también expresada como la proporción de C₁₇-epilimonina/limonina) tiende a indicar la intensidad del calentamiento.

Aunque la invención se ha descrito con respecto a ejemplos específicos, incluyendo los modos de llevar a cabo la invención preferidos en el presente documento, los expertos en la técnica apreciarán que hay numerosas variaciones y permutaciones de los sistemas y técnicas descritos anteriormente que entran dentro del alcance de la invención como se indica en las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para controlar el sabor de un zumo de frutos cítricos, comprendiendo dicho procedimiento:
- controlar la concentración en el mismo de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en limonina, isolimonina, nomilina y mezclas de los mismos hasta un nivel por debajo del nivel de sabor umbral de los mismos, en el que la proporción en peso de isolimonina/limonina es inferior a 0,25.
 - controlar la concentración en el mismo de flavonas polimetoxiladas hasta un nivel por debajo del nivel de sabor umbral del mismo, y
 - controlar la concentración de limonoide β -D-glucopiranosidos en el mismo hasta un nivel por debajo del nivel de sabor umbral del mismo.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende controlar la proporción valor Brix/ácido del zumo.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2 en el que la proporción valor Brix/ácido se controla reduciendo la concentración de un ácido seleccionado del grupo que consiste en ácido málico, ácido cítrico y mezclas de los mismos.
4. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores que además comprende la etapa de controlar las concentraciones de glucosa, fructosa y sacarosa en el zumo, de modo que se controla la concentración de limonina, isolimonina y nomilina.
5. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la concentración de limonina y el compuesto seleccionado del grupo que consiste en isolimonina, nomilina y mezclas de los mismos se controla mediante una técnica seleccionada del grupo que consiste en ósmosis inversa, intercambio iónico, destilación o combinaciones de los mismos.
6. Un zumo de frutos cítricos obtenible de acuerdo con el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
7. Un zumo de cítricos de acuerdo con la reivindicación 6 que es zumo de naranja, en el que las concentraciones relativas de
- (1) limonina, isolimonina y nomilina;
 - (2) flavonas polimetoxiladas (PMF); y
 - (3) limonoide β -D-glucopiranosidos, se han controlado, junto con el control de la glucosa, la fructosa y la sacarosa en el zumo de naranja.

30

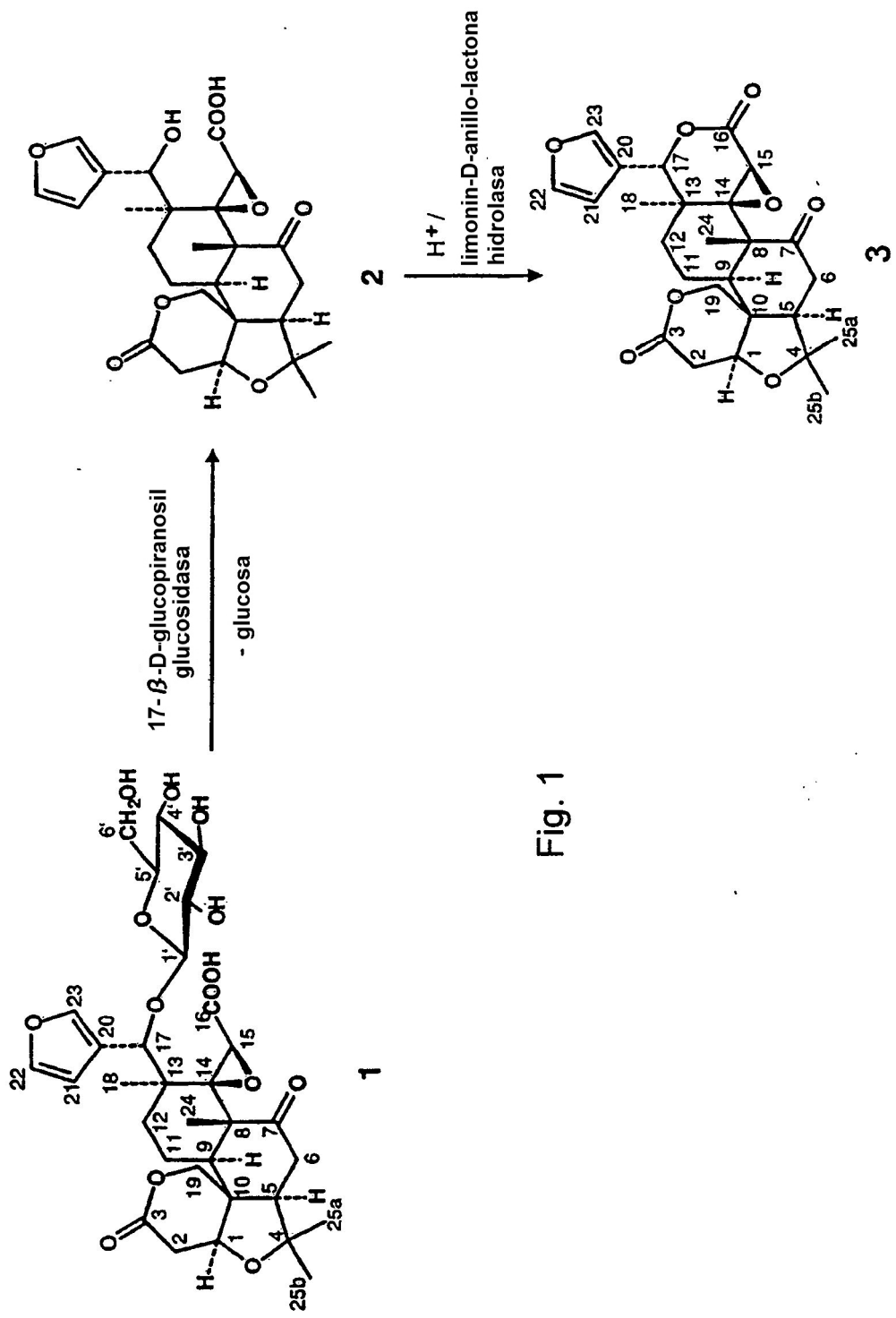


Fig. 1

Fig. 2

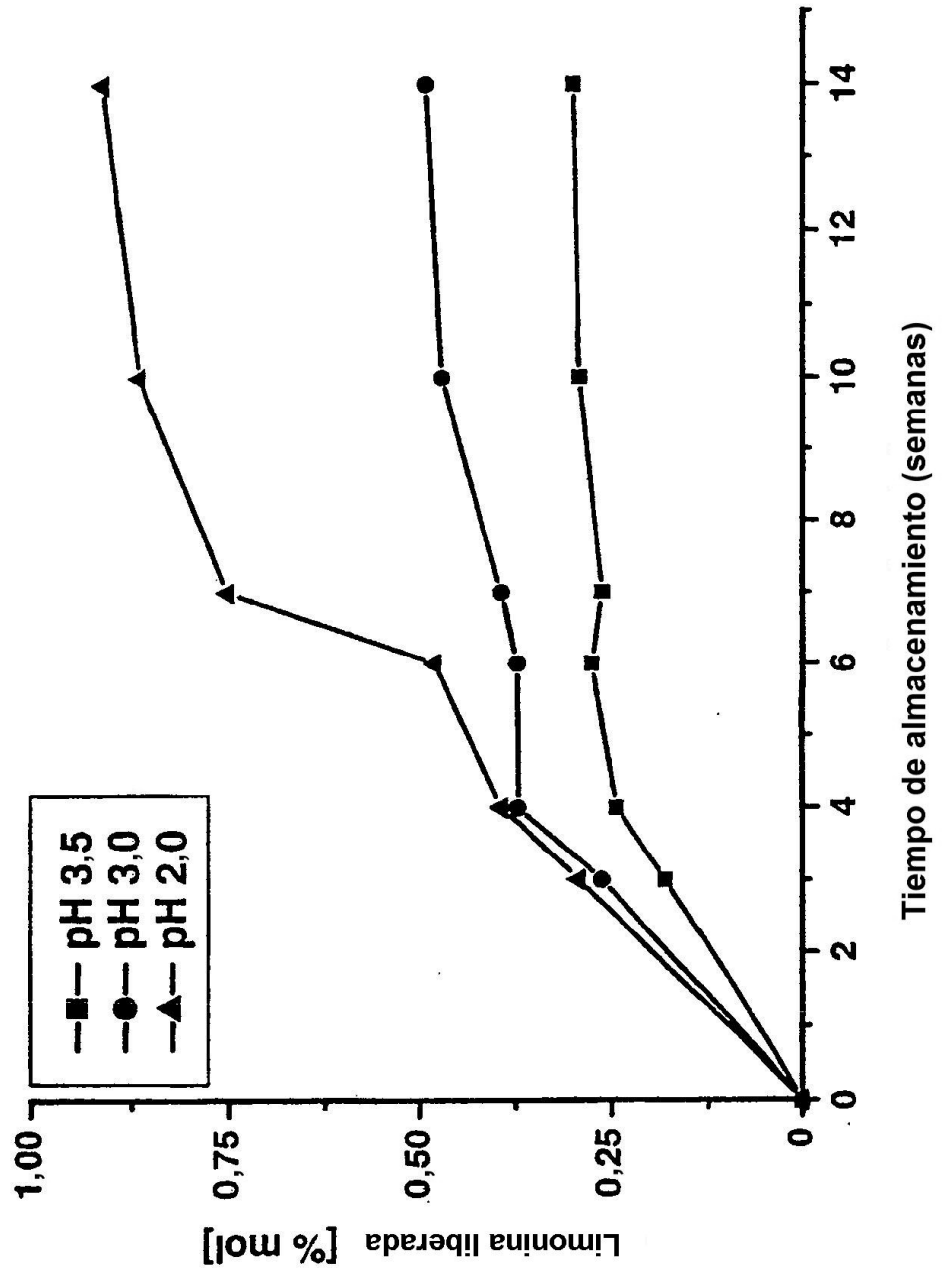


Fig. 3

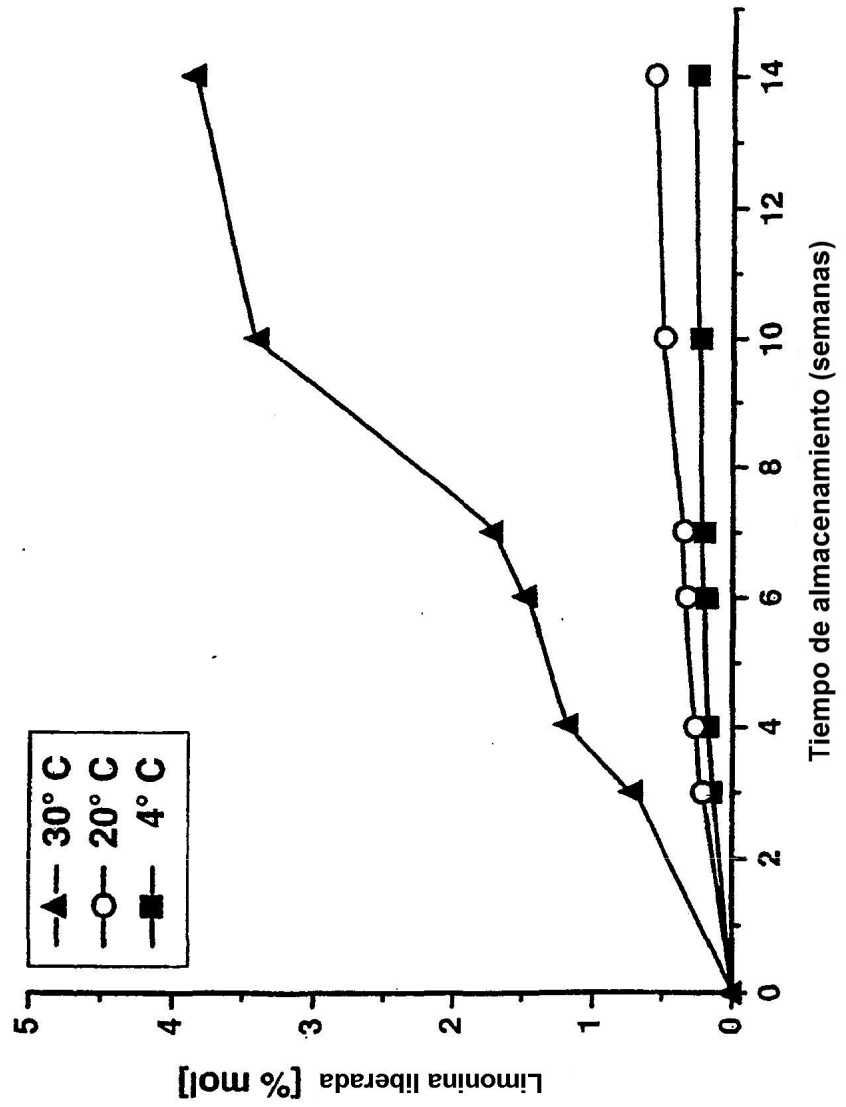
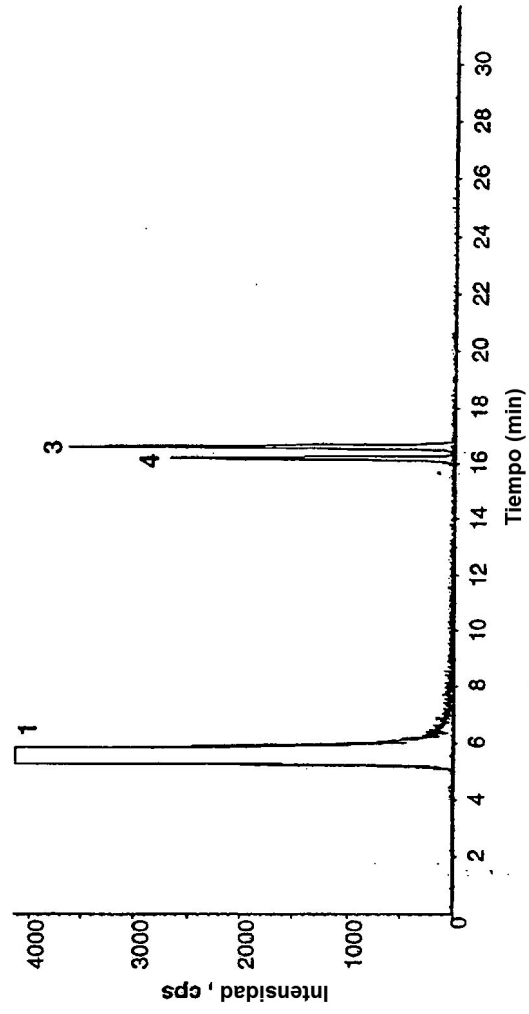


Fig. 4



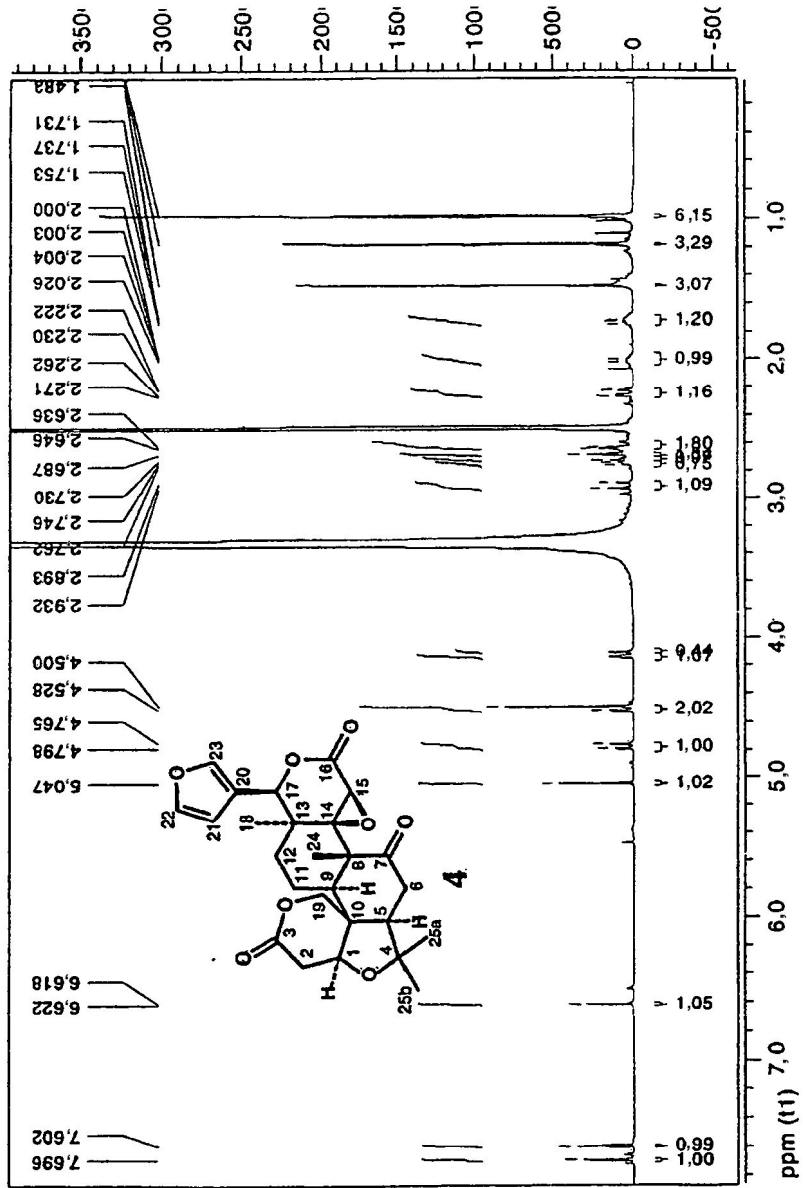


Fig. 5

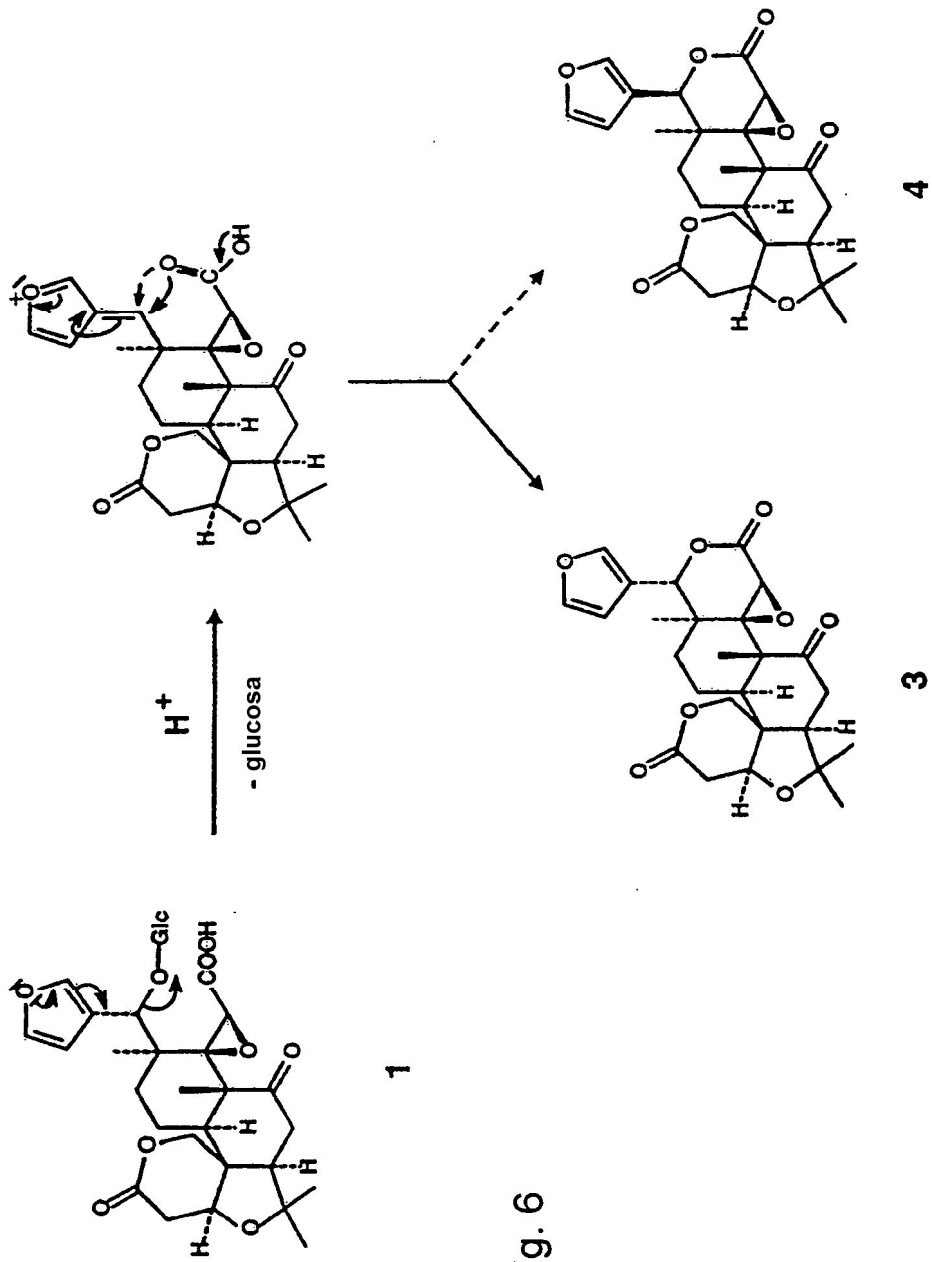


Fig. 6

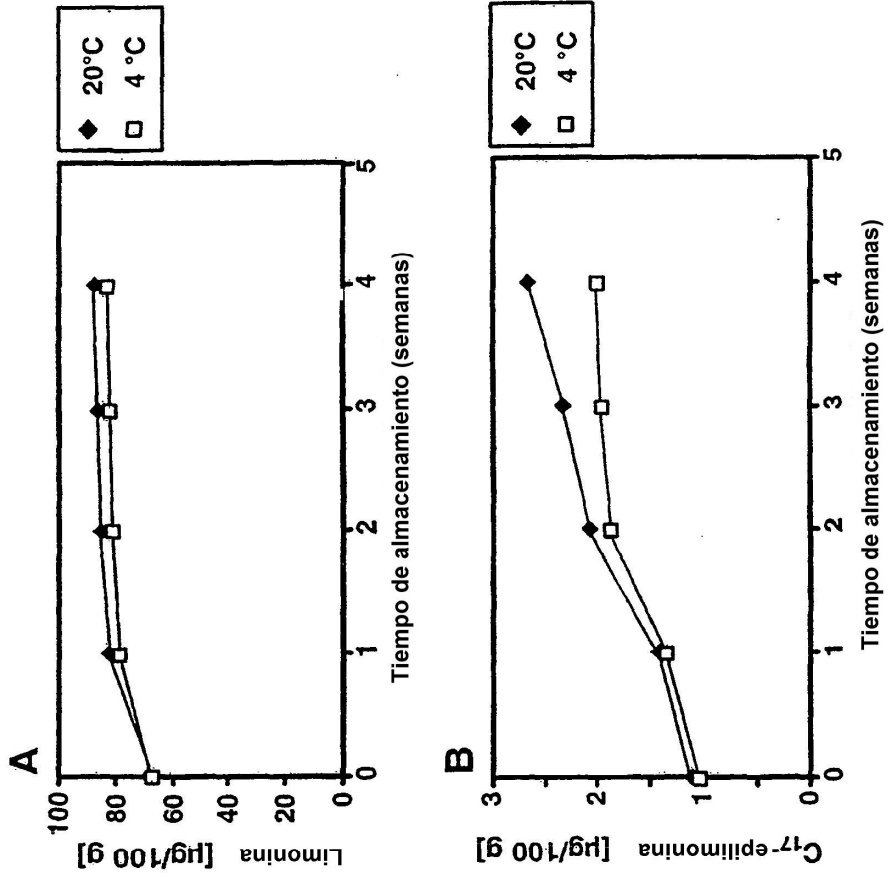


Fig. 7

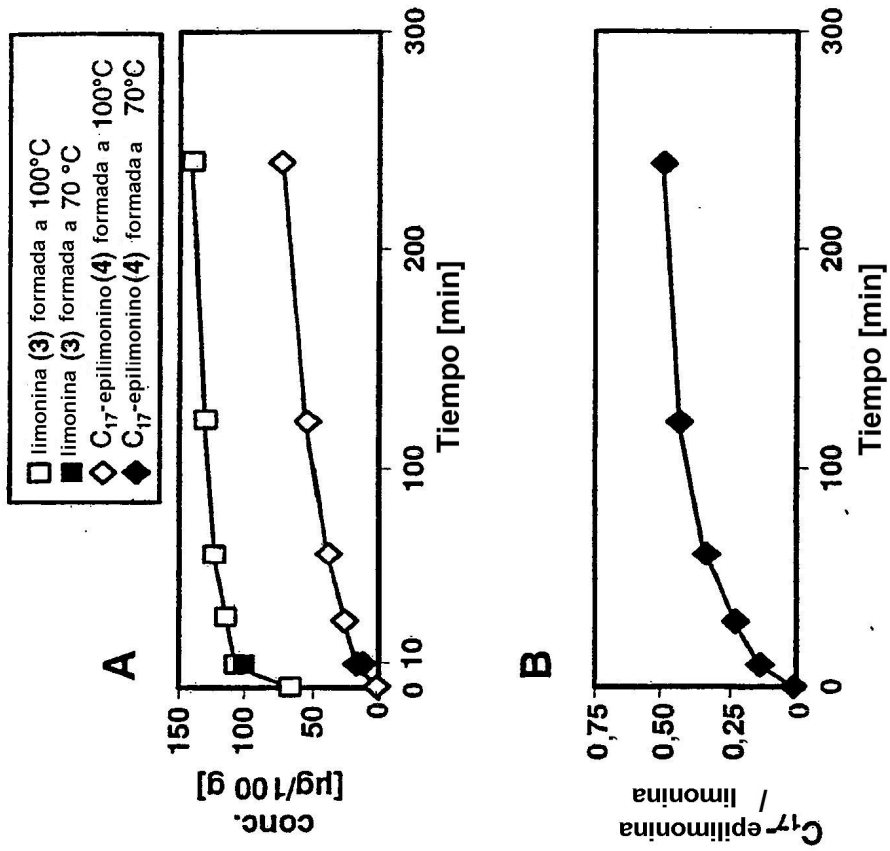


Fig. 8