

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 595 237**

51 Int. Cl.:

C07H 13/08 (2006.01)

C07H 15/24 (2006.01)

C07C 62/32 (2006.01)

A23L 2/60 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.09.2008** **E 11007574 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.07.2016** **EP 2397485**

54 Título: **Isómeros del glucósido esteviol**

30 Prioridad:

17.09.2007 US 856274

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

28.12.2016

73 Titular/es:

**PEPSICO, INC. (100.0%)
700 Anderson Hill Road Purchase
New York 10577, US**

72 Inventor/es:

LEE, THOMAS

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 595 237 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

Isómeros del glucósido esteviol

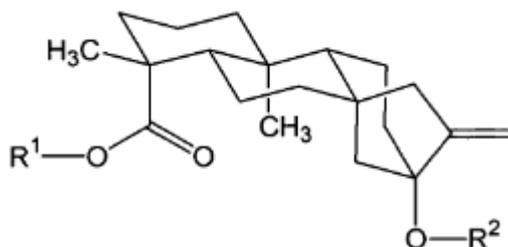
Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a determinados isómeros novedosos de los glucósidos de esteviol, que son adecuados para su uso como edulcorantes, por ejemplo, mediante su incorporación a productos alimenticios y de bebida.

Antecedentes

10 Dada la creciente atención que se presta en Estados Unidos y en el resto del mundo a los efectos negativos que la obesidad tiene para la salud, la exigencia del mercado de alimenticios y de bebidas que tengan características nutricionales alternativas, incluyendo, por ejemplo, un contenido calórico reducido, o cero, también ha aumentado. Existe también una demanda del mercado para sustituir los edulcorantes con elevado contenido calórico en productos alimenticios y de bebidas, tal como sacarosa y jarabe de maíz con un alto contenido en fructosa (HFCS), por edulcorantes no nutritivos. Por ejemplo, se ha sugerido que las bebida de cola dietéticas se edulcoren con potentes edulcorantes no nutritivos tales como glucósidos de esteviol (esteviósido, rebaudiósido A, etc.).

15 Los glucósidos de esteviol son compuestos de sabor dulce extraídos de la planta de la estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni). Normalmente, se encuentra que estos compuestos incluyen esteviósido (4-13 % de peso en seco), esteviolbiósido (trazas), los rebaudiósidos, incluyendo rebaudiósido A (1-6 %), rebaudiósido B (trazas), rebaudiósido C (1-2 %), rebaudiósido D (trazas), y rebaudiósido E (trazas), y dulcósido A (0,4-0,7 %). Muchos glucósidos de esteviol son potentes edulcorantes no nutritivos. Los glucósidos de esteviol comprenden un núcleo de diterpeno (fórmula I) sustituido en R¹ y R² con varias combinaciones de hidrógeno, glucosa, ramnosa, y xilosa.



Fórmula I

25 Por ejemplo, R¹ puede ser hidrógeno, 1-β-D-glucopiranosilo, o 2-(1-β-D-glucopiranosil)-1-β-D-glucopiranosilo, y R² puede ser hidrógeno, 1-β-D-glucopiranosilo, 2-(1-β-D-glucopiranosil)-1-β-D-glucopiranosilo, 2,3-bis(1-β-D-glucopiranosil)-1-β-D-glucopiranosilo, 2-(1-α-L-ramnopiranosil)-1-β-D-glucopiranosilo, 2-(1-α-L-ramnopiranosil)-3-(1-β-D-glucopiranosil)-1-β-D-glucopiranosilo, o 2-(1-β-D-xilopiranosil)-3-(1-β-D-glucopiranosil)-1-β-D-glucopiranosilo. El rebaudiósido A (en la que R¹ = 1-β-D-glucopiranosilo y R² = 2,3-bis(1-β-D-glucopiranosil)-1-β-D-glucopiranosilo) tiene un dulzor de aproximadamente 200 a 300 veces el dulzor de la sacarosa. La industria alimenticia se ha interesado en los glucósidos del esteviol en la búsqueda de edulcorantes alternativos. Sin embargo, la sustitución directa de edulcorantes nutritivos por edulcorantes potentes no nutritivos conocidos ocasiona problemas de mal sabor, por ejemplo, inicio lento, o amargo, o regaliz, o regusto persistente. Este mal gusto también surge cuando los glucósidos de esteviol se utilizan como edulcorantes no nutritivos en productos alimenticios y bebidas. Por tanto, existe una necesidad de edulcorantes alternativos adicionales no nutritivos.

35 Es por tanto un objeto de al menos algunas realizaciones de la presente invención proporcionar compuestos que son útiles como edulcorantes. Es un objeto de al menos algunas realizaciones de la invención proporcionar productos de bebida o productos alimenticios que tengan características nutricionales alternativas y propiedades de gusto. Estos y otros objetos, características y ventajas de la invención o de algunas realizaciones de la invención serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la siguiente divulgación y descripción de las realizaciones ilustrativas.

40 [A] M. KOBAYASHI Y COL divulga "Dulcosides A and B, new diterpene glycosides from *Stevia rebaudiana*", PHYTOCHEMISTRY, vol. 16, 1977, páginas 1405-1408, XP002517591.

El documento US-4.404.367 A (STEPHENSON REBECCA A G [US] Y COL) 13 de septiembre de 1983 (1983-09-13) divulga edulcorantes de diterpenoides glucosustituidos.

Breve resumen de la invención

45 Se ha descubierto ahora una nueva familia de isómeros de glucósidos del esteviol. En estos isómeros, el doble enlace exocíclico de la Fórmula I se ha desplazado a una posición endocíclica dentro del anillo de cinco miembros (véase la Fórmula II). Estos compuestos son útiles como edulcorantes, y se puede incluir en este tipo de productos

de alimentos y bebidas. De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un compuesto de acuerdo con las reivindicaciones.

De acuerdo con otros aspectos, se proporciona un producto alimenticio que comprende un componente alimenticio y un compuesto de fórmula II.

- 5 De acuerdo con otro aspecto, se proporciona un procedimiento para preparar los compuestos de fórmula II.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es un espectro de RMN de protón del rebaudiósido A.

La Figura 2 es un espectro de RMN de protón del isorebaudiósido A.

La Figura 3 es una superposición de los espectros de las Figuras 1 y 2.

- 10 La Figura 4 es un espectro de masas ESI del rebaudiósido A.

La Figura 5 es un espectro de masas ESI del isorebaudiósido A.

La Figura 6 es un cromatograma de HPLC de una mezcla de reacción de 10 semanas que contiene rebaudiósido A e isorebaudiósido A.

La Figura 7 es un espectro de masas ESI del pico del isorebaudiósido A de la Figura 6.

- 15 La Figura 8 es un cromatograma de HPLC del rebaudiósido A.

La Figura 9 es un cromatograma de HPLC del isorebaudiósido A.

La Figura 10 es un espectro de masas ESI del pico del rebaudiósido A de la Figura 8.

La Figura 11 es un espectro de masas ESI del pico del isorebaudiósido A de la Figura 9.

- 20 La Figura 12 es un cromatograma de HPLC de una mezcla de reacción de 10 semanas enriquecida con el isorebaudiósido A.

La Figura 13 es un espectro de masas ESI del pico del isorebaudiósido A de la Figura 12.

La Figura 14 es una estructura de rayos x del isorebaudiósido A.

La Figura 15 es una estructura de rayos x del rebaudiósido A.

La Figura 16 es una comparación entre las estructuras del rebaudiósido A y el isorebaudiósido A.

- 25 Las Figuras 17 y 18 muestran la dependencia del pH de la velocidad de síntesis del isorebaudiósido A (Cmpd X) a partir del rebaudiósido A (Reb A).

La Figura 19 muestra la dependencia de la temperatura de la velocidad de síntesis del isorebaudiósido A (Cmpd X) a partir del rebaudiósido A (Reb A).

La Figura 20 es un espectro de RMN de protón del rebaudiósido B.

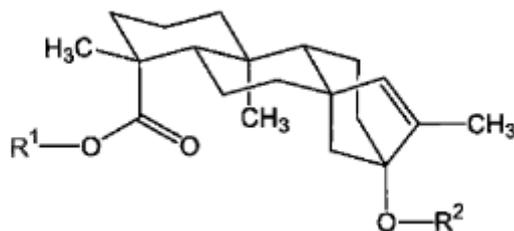
- 30 La Figura 21 es un espectro de RMN de protón del isorebaudiósido B.

La Figura 22 es una superposición de los espectros de las Figuras 20 y 21.

La Figura 23 es una superposición de los cromatogramas de HPLC del rebaudiósido B, el isorebaudiósido B, y una mezcla 1:1 de los dos componentes.

Descripción detallada de determinadas realizaciones ilustrativas

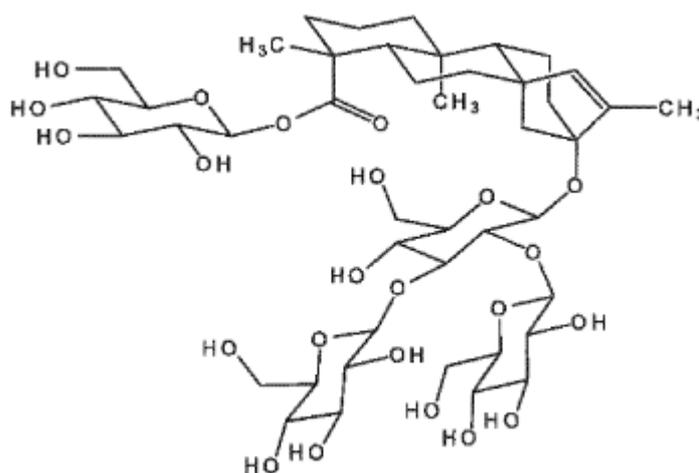
- 35 En determinadas realizaciones ilustrativas, los isómeros de los glucósidos del esteviol de la presente invención se pueden definir mediante la fórmula general II:



Fórmula II

compuesto que se define en las reivindicaciones.

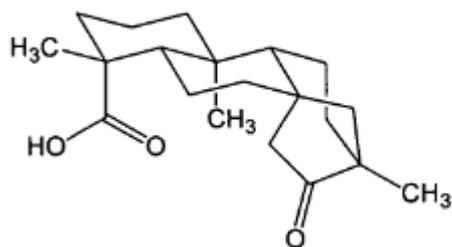
- 5 Un compuesto que no forma parte de la invención tiene la fórmula general II en la que R¹ es 1-β-D-glucopiranosilo y R² es 2,3-bis(1-β-D-glucopiranosil)-1-β-D-glucopiranosilo. Este compuesto tiene la estructura mostrada en la Fórmula III siguiente. A partir de ahora en el presente documento, este compuesto se denomina como isorebaudiósido A.



Fórmula III

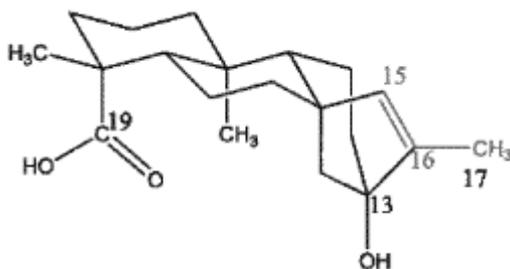
- 10 Los isómeros de glucósidos del esteviol divulgados en el presente documento se pueden preparar mediante el calentamiento del rebaudiósido A en una solución acuosa a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 90 °C (por ejemplo, 43 °C, 65 °C, 75 °C, 85 °C, o en el intervalo de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 50 °C) en condiciones ácidas fuertes (por ejemplo, aproximadamente pH 1,0 - 4,0; tal como pH aproximadamente pH 2,0 - 2,5) durante un periodo de tiempo suficiente (por ejemplo, más de dos días, tal como de dos días a aproximadamente 11 semanas) para producir el isorebaudiósido A (Fórmula III). En determinadas realizaciones ilustrativas, al menos el 1,0 % en peso (por ejemplo, al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 25 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 75 %, al menos el 90 % en peso) del materiales de partida de rebaudiósido A se convierte en el isorebaudiósido A. Una revisión de la bibliografía sugiera que, en condiciones ácidas (pH 2,4 a 2,6), el esteviósido o el rebaudiósido A es bastante estable a 60 °C, pero experimenta cambios importantes a 100 °C, proporcionando subproductos de hidrólisis tales como glucosa, esteviolbósido (a partir de esteviósido), rebaudiósido B (a partir de rebaudiósido A), y compuestos desconocidos que tienen un valor de R_f en la TLC o de T_R en HPLC muy alejados de esteviósido o el rebaudiósido A. Cuando el esteviósido se sometió a temperaturas elevadas, también se formó isoesteviol.

(Fórmula IV). (S.S. Chang y J. M. Cook, J. Agric. Food Chem., 31, 409 - 412 (1983)).



Fórmula IV

- Otros informes de la bibliografía han indicado que la hidrólisis catalizada por ácidos del esteviósido produce isoesteviol (M. Bridel y R. Lavieille, *Journal de Pharmacie et de Chimie*, 14, 321-328, y 369 -379 (1931), y J.R. Hanson y B.H. Oliverira, *Natural Product Reports*, 10, 301-309 (1993)). Se ha demostrado que el isoesteviol es un producto de reordenación de Wagner-Meerwein que implica la inversión del anillo D del esteviol (Fórmula I en la que cada uno de R^1 y R^2 es hidrógeno). Las enseñanzas de la bibliografía sugieren por tanto que los glucósidos del esteviol, por ejemplo, rebaudiósido A, experimentarían cada uno de ellos una isomerización catalizada por ácido, a un producto resultante análogo con isoesteviol como el resto aglicona.
- Pero sorprendentemente, se ha descubierto ahora que el tratamiento con ácido y con calor de glucósidos de esteviol, por ejemplo, rebaudiósido A, de acuerdo con la presente invención, produce isómeros de glucósidos de esteviol de Fórmula II, por ejemplo, iso-rebaudiósido A (Fórmula III), que tiene un resto aglicona que no es ni esteviol ni isoesteviol, sino en su lugar un nuevo resto aglicona que tiene un doble enlace migrado en comparación con esteviol. El resto aglicona inesperado del nuevo compuesto se denomina a partir de ahora en el presente documento como isoesteviol II (véase la Fórmula II). Cuando cada uno de R^1 y R^2 son hidrógeno, el compuesto se denomina isoesteviol II (Fórmula V).



Fórmula V

- Los isómeros de glucósidos de esteviol divulgados en el presente documento se pueden hidrolizar para eliminar las unidades de glucosa, ramnosa, y/o xilosa. Por tanto, los isómeros del glucósido esteviol, por ejemplo, los iso-rebaudiósidos A-F, iso-esteviósido, iso-dulcósido, etc., se pueden hidrolizar después de después de tratamiento posterior con calor y ácido en diferentes isómeros de glucósidos de esteviol, por ejemplo, iso-esteviósido, el isorebaudiósido B, iso-esteviolbósido, iso-rubusósido, iso-esteviolmonósido, éster de glucosilo del iso-esteviol II, etc. De esta manera, como ejemplo no limitante, el rebaudiósido A se puede isomerizar mediante tratamiento con calor y ácido en iso-rebaudiósido A como compuesto intermedio, que a continuación se puede hidrolizar al iso-rebaudiósido B. En algunas realizaciones ilustrativas, los materiales de partida de glucósidos de esteviol se pueden hidrolizar en primer lugar para eliminar una o más unidades de glucosa, ramnosa y/o xilosa, y a continuación se isomerizan a isómeros de glucósidos de esteviol. Como ejemplo no limitante, el rebaudiósido A se puede hidrolizar mediante tratamiento con calor y ácido en rebaudiósido B como compuesto intermedio, que a continuación se puede isomerizar al iso-rebaudiósido B.

- Una solución acuosa ácida que tiene un pH comprendido en el intervalo de pH 1,0 - 4,0 (por ejemplo, en el intervalo de pH 2,0 - 2,5) y que comprende el rebaudiósido A (es decir, el compuesto de fórmula I en el que R^1 es 1- β -D-glucopiranosilo y R^2 es 2,3-bis(1 β -D-glucopiranosil)-1- β -D-glucopiranosilo) se calienta a una temperatura comprendida en el intervalo de 30 °C a aproximadamente 90 °C (por ejemplo, 43 °C, 65 °C, 75 °C, 85 °C, o dentro de un intervalo de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 50 °C) durante un periodo de tiempo suficiente (por ejemplo, más de dos días, tal como de dos días a aproximadamente 11 semanas) para producir el isorebaudiósido B (es decir, el compuesto de fórmula II en el que R^1 es hidrógeno y R^2 es 2,3-bis(1- β -D-glucopiranosil)-1- β -D-glucopiranosilo). En un ejemplo, en las condiciones anteriores, el rebaudiósido A se convierte en primer lugar en el iso-rebaudiósido A, que a continuación se convierte en el iso-rebaudiósido B. En otra realización ilustrativa, en las condiciones anteriores, el rebaudiósido A se convierte en el iso-rebaudiósido B, que a continuación se convierte en el iso-rebaudiósido B. En algunas realizaciones ilustrativas, al menos el 1,0 % en peso (por ejemplo, al menos el

5 %, al menos el 10 %, al menos el 25 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 75 %, al menos un 90 % en peso) del materiales de partida de rebaudiósido A se convierte en el iso-rebaudiósido B.

Cada uno de los isómeros de glucósidos del esteviol divulgados en el presente documento se puede preparar mediante tratamiento de un glucósido de esteviol, por ejemplo, el correspondiente glucósido de esteviol, con ácido y calor de acuerdo con la invención. Específicamente, el esteviósido se puede calentar en una solución acuosa a una temperatura comprendida en el intervalo de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 90 °C (por ejemplo, 43 °C, 65 °C, 75 °C, 85 °C, o en el intervalo de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 50 °C) en condiciones ácidas fuertes (por ejemplo, aproximadamente pH 1,0 - 4,0; tal como pH aproximadamente pH 2,0 - 2,5) durante un periodo de tiempo suficiente (por ejemplo, más de dos días, tal como de dos días a aproximadamente 11 semanas) para producir un compuesto de fórmula II en la que R¹ es 1-β-D-glucopiranosilo y R² es 2-(1-β-D-glucopiranosil)1-β-D-glucopiranosilo (iso-esteviósido). En determinadas realizaciones ilustrativas, al menos el 1,0 % en peso (por ejemplo, al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 25 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 75 %, al menos un 90 % en peso) del material de partida del esteviósido se convierte en el iso-esteviósido. De manera similar, rebaudiósido B se puede calentar en una solución acuosa a una temperatura comprendida en el intervalo de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 90 °C (por ejemplo, 43 °C, 65 °C, 75 °C, 85 °C, o en el intervalo de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 50 °C) en condiciones ácidas fuertes (por ejemplo, aproximadamente pH 1,0 - 4,0; tal como pH aproximadamente pH 2,0 - 2,5) durante un periodo de tiempo suficiente (por ejemplo, más de dos días, tal como de dos días a aproximadamente 11 semanas) para producir un compuesto de fórmula II en la que R¹ es hidrógeno y R² es 2,3-bis(1-β-D-glucopiranosil)-1-β-D-glucopiranosilo (iso-rebaudiósido B). En determinadas realizaciones ilustrativas, al menos el 1,0 % en peso (por ejemplo, al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 25 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 75 %, al menos el 90 % en peso) del material de partida del rebaudiósido B se convierte en el iso-rebaudiósido B. El esteviolbíosido se puede calentar en una solución acuosa hasta una temperatura en el intervalo de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 90 °C (por ejemplo, 43 °C, 65 °C, 75 °C, 85 °C, o en el intervalo de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 50 °C) en condiciones ácidas fuertes (por ejemplo, aproximadamente pH 1,0 - 4,0; tal como pH aproximadamente pH 2,0 - 2,5) durante un periodo de tiempo suficiente (por ejemplo, más de dos días, tal como de dos días a aproximadamente 11 semanas) para producir un compuesto de fórmula II en la que R¹ es hidrógeno y R² es 2-(1-β-D-glucopiranosil)-1-β-D-glucopiranosilo (iso-esteviolbíosido). En determinadas realizaciones ilustrativas, al menos el 1,0 % en peso (por ejemplo, al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 25 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 75 %, al menos un 90 % en peso) del material de partida del esteviolbíosido se convierte en el iso-esteviolbíosido. El rubusósido se puede calentar en una solución acuosa a una temperatura comprendida en el intervalo de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 90 °C (por ejemplo, 43 °C, 65 °C, 75 °C, 85 °C, o en el intervalo de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 50 °C) en condiciones ácidas fuertes (por ejemplo, aproximadamente pH 1,0 - 4,0; tal como pH aproximadamente pH 2,0 - 2,5) durante un periodo de tiempo suficiente (por ejemplo, más de dos días, tal como de dos días a aproximadamente 11 semanas) para producir un compuesto de fórmula II en la que R¹ es 1β-D-glucopiranosilo y R² es 1-β-D-glucopiranosilo (iso-rubusósido). En determinadas realizaciones ilustrativas, al menos el 1,0 % en peso (por ejemplo, al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 25 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 75 %, al menos un 90 % en peso) del material de partida del rubusósido se convierte en el iso-rubusósido. El esteviolmonósido se puede calentar en una solución acuosa a una temperatura comprendida en el intervalo de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 90 °C (por ejemplo, 43 °C, 65 °C, 75 °C, 85 °C, o en el intervalo de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 50 °C) en condiciones ácidas fuertes (por ejemplo, aproximadamente pH 1,0 - 4,0; tal como pH aproximadamente pH 2,0 - 2,5) durante un periodo de tiempo suficiente (por ejemplo, más de dos días, tal como de dos días a aproximadamente 11 semanas) para producir un compuesto de fórmula II en la que R¹ es hidrógeno y R² es 1-β-D-glucopiranososa (iso-esteviolmonósido). En determinadas realizaciones ilustrativas, al menos el 1,0 % en peso (por ejemplo, al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 25 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 75 %, al menos un 90 % en peso) del material de partida del esteviolmonósido se convierte en el iso-esteviolmonósido. El éster de glucosa esteviol (Formula I, en la que R¹ es 1-β-D-glucopiranosilo y R² es hidrógeno) se puede calentar en solución acuosa a una temperatura comprendida en el intervalo de 30 °C a aproximadamente 90 °C (por ejemplo, 43 °C, 65 °C, 75 °C, 85 °C, o en el intervalo de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 50 °C) en condiciones ácidas fuertes (por ejemplo, aproximadamente pH 1,0 - 4,0; tal como pH aproximadamente pH 2,0 - 2,5) durante un periodo de tiempo suficiente (por ejemplo, más de dos días, tal como de dos días a aproximadamente 11 semanas) para producir un compuesto de fórmula II en la que R¹ es 1-β-D-glucopiranososa y R² es hidrógeno (éster de glucosilo de iso-esteviol II). En determinadas realizaciones ilustrativas, al menos el 1,0 % en peso (por ejemplo, al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 25 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 75 %, al menos el 90 % en peso) de material de partida de éster de glucosa del esteviol se convierte en el éster de glucosilo de iso-esteviol II. El dulcósido A se puede calentar en una solución acuosa a una temperatura comprendida en el intervalo de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 90 °C (por ejemplo, 43 °C, 65 °C, 75 °C, 85 °C, o en el intervalo de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 50 °C) en condiciones ácidas fuertes (por ejemplo, aproximadamente pH 1,0 - 4,0; tal como pH aproximadamente pH 2,0 - 2,5) durante un periodo de tiempo suficiente (por ejemplo, más de dos días, tal como de dos días a aproximadamente 11 semanas) para producir un compuesto de fórmula II en la que R¹ es 1-β-D-glucopiranosilo y R² es 2-(1-α-L-ramnopiranosil)1-β-D-glucopiranosilo (iso-dulcósido A). En determinadas realizaciones ilustrativas, al menos el 1,0 % en peso (por ejemplo, al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 25 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 75 %, al menos el 90 % en peso) del material de partida del dulcósido A se convierte en el iso-dulcósido A. El rebaudiósido C se puede calentar en una solución acuosa hasta

una temperatura en el intervalo de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 90 °C (por ejemplo, 43 °C, 65 °C, 75 °C, 85 °C, o en el intervalo de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 50 °C) en condiciones ácidas fuertes (por ejemplo, aproximadamente pH 1,0 - 4,0; tal como pH aproximadamente pH 2,0 - 2,5) durante un periodo de tiempo suficiente (por ejemplo, más de dos días, tal como de dos días a aproximadamente 11 semanas) para producir un compuesto de fórmula II en la que R¹ es 1-β-D-glucopiranosilo y R² es 2-(1-α-L-ramnopiranosil)-3-(1-β-D-glucopiranosil)-1-β-D-glucopiranosilo (iso-rebaudiósido C). En determinadas realizaciones ilustrativas, al menos el 1,0 % en peso (por ejemplo, al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 25 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 75 %, al menos el 90 % en peso) del material de partida del rebaudiósido C se convierte en el iso-rebaudiósido C. El rebaudiósido D se puede calentar en una solución acuosa hasta una temperatura en el intervalo de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 90 °C (por ejemplo, 43 °C, 65 °C, 75 °C, 85 °C, o en el intervalo de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 50 °C) en condiciones ácidas fuertes (por ejemplo, aproximadamente pH 1,0 - 4,0; tal como pH aproximadamente pH 2,0 - 2,5) durante un periodo de tiempo suficiente (por ejemplo, más de dos días, tal como de dos días a aproximadamente 11 semanas) para producir un compuesto de fórmula II en la que R¹ es 2-(1-β-D-glucopiranosil)-1-β-D-glucopiranosilo y R² es 2,3-bis(1-β-D-glucopiranosil)-1-β-D-glucopiranosilo (iso-rebaudiósido D). En determinadas realizaciones ilustrativas, al menos el 1,0 % en peso (por ejemplo, al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 25 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 75 %, al menos el 90 % en peso) del material de partida del rebaudiósido D se convierte en el iso-rebaudiósido D. El rebaudiósido E se puede calentar en una solución acuosa hasta una temperatura en el intervalo de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 90 °C (por ejemplo, 43 °C, 65 °C, 75 °C, 85 °C, o en el intervalo de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 50 °C) en condiciones ácidas fuertes (por ejemplo, aproximadamente pH 1,0 - 4,0; tal como pH aproximadamente pH 2,0 - 2,5) durante un periodo de tiempo suficiente (por ejemplo, más de dos días, tal como de dos días a aproximadamente 11 semanas) para producir un compuesto de fórmula II en la que R¹ es 2-(1-β-D-glucopiranosil)-1-β-D-glucopiranosilo y R² es 2-(1-β-D-glucopiranosil)-1-β-D-glucopiranosilo (iso-rebaudiósido E). En determinadas realizaciones ilustrativas, al menos el 1,0 % en peso (por ejemplo, al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 25 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 75 %, al menos el 90 % en peso) del material de partida del rebaudiósido E se convierte en el iso-rebaudiósido E. El rebaudiósido F se puede calentar en una solución acuosa hasta una temperatura en el intervalo de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 90 °C (por ejemplo, 43 °C, 65 °C, 75 °C, 85 °C, o en el intervalo de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 50 °C) en condiciones ácidas fuertes (por ejemplo, aproximadamente pH 1,0 - 4,0; tal como pH aproximadamente pH 2,0 - 2,5) durante un periodo de tiempo suficiente (por ejemplo, más de dos días, tal como de dos días a aproximadamente 11 semanas) para producir un compuesto de fórmula II en la que R¹ es 1-β-D-glucopiranosilo y R² es 2-(1-β-D-xilopiranosil)-3-(1-β-D-glucopiranosil)-1-β-D-glucopiranosilo (iso-rebaudiósido F). En determinadas realizaciones ilustrativas, al menos el 1,0 % en peso (por ejemplo, al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 25 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 75 %, al menos un 90 % en peso) del materiales de partida de rebaudiósido F se convierte en el iso-rebaudiósido F. Se pueden emplear otros procedimientos de síntesis, por ejemplo, isomerización enzimática. Los isómeros de glucósidos de esteviol se pueden aislar y purificar, por ejemplo, mediante cromatografía, recristalización, etc.

Los ácidos ilustrativos adecuados para su uso en la preparación de isómeros de glucósidos del esteviol en condiciones de ácido fuerte incluyen los ácidos inorgánicos tal como el ácido fosfórico, ácido clorhídrico, ácido nítrico, ácido sulfúrico, etc. y/o los ácidos orgánicos tales como ácido cítrico, ácido málico, ácido tartárico, ácido láctico, ácido ascórbico, etc. Uno o más ácidos, y opcionalmente las correspondientes sales de ácido (por ejemplo, ácido cítrico y citrato), se incluyen en la mezcla de reacción en una cantidad suficiente para que la mezcla de reacción se vuelva fuertemente ácida (por ejemplo, para conseguir un valor de pH comprendido en el intervalo de pH 1,0 - 4,0, tal como aproximadamente pH 2,0 - 2,5). También se puede utilizar la isomerización enzimática.

Los glucósidos de esteviol de Fórmula I, en forma individual o en forma de mezcla, pueden tener un número adicional de unidades de β-D-glucopiranosilo con enlace covalente 4→1 a las unidades existentes de β-D-glucopiranosilo en R¹ y/o R² mediante reacciones de transglucosilación enzimática con almidón, proporcionando una mezcla compleja de productos. (Véase Kazuhiro Ohtani y Kazuo Yamasaki, Capítulo 7, "Method to improve the taste of the sweet principles of Stevia rebaudiana," p. 145 en el libro titulado "Stevia, The genus Stevia", editado por A. Douglas Kinghorn, Taylor y Francis, 2002). Estos extractos de estevia modificados están comercialmente disponibles para utilizarse como edulcorantes en productos de alimentos y bebidas. Los isómeros de glucósidos de esteviol de Fórmula II se pueden someter al mismo tipo de reacciones de transglucosilación enzimática, proporcionando una compleja mezcla de productos que se pueden utilizar como edulcorantes en productos de alimentos y bebidas. Se contempla también que el producto de la transglucosilación enzimática de los isómeros de glucósidos de esteviol de Fórmula I se pueden calentar en solución acuosa a una temperatura comprendida en el intervalo de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 90 °C (por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 50 °C, tal como 43 °C) en condiciones ácidas fuertes (por ejemplo, aproximadamente pH 1,0 - 4,0; tal como pH aproximadamente pH 2,0 - 2,5) durante un periodo de tiempo suficiente (por ejemplo, más de dos días, tal como de dos días a aproximadamente 11 semanas) para producir una mezcla compleja de productos que tienen el resto aglicona de la Fórmula II. Estos productos de isomerización también se pueden utilizar como edulcorantes en productos de alimentos y bebidas.

Los isómeros de glucósidos de esteviol que comprenden al menos un compuesto de Fórmula II se pueden utilizar como ponentes edulcorantes no nutritivos. Los edulcorantes son consumibles comestibles adecuados para el

consumo y para su uso en alimentos y bebidas. Tal como se usa en el presente documento, "consumibles comestibles" significa un alimento o bebida o un ingrediente o un alimento o bebida para consumo humano o animal. Tal como se usa en el presente documento, un "edulcorante no nutritivo" es aquel que no proporciona un contenido calórico significativo en las cantidades de utilización típicas, por ejemplo, aquel que proporciona menos de 5 calorías por ración de 226,89 g (8 oz) de bebida para conseguir un dulzor equivalente a 10 Brix de azúcar. Tal como se usa en el presente documento, un "edulcorante potente" significa un edulcorante que es al menos dos veces tan dulce como el azúcar (sacarosa), es decir, un edulcorante que, en una base de peso, no requiere más de la mitad de su peso en azúcar para conseguir un dulzor equivalente. Por ejemplo, un potente edulcorante puede requerir menos de una mitad de su peso en azúcar para conseguir un dulzor equivalente en una bebida edulcorada hasta un nivel de 10 grados Brix con azúcar.

En determinadas realizaciones ilustrativas, un edulcorante puede comprender al menos un compuesto de fórmula II, y opcionalmente una carga, un agente voluminoso tal como dextrosa, maltodextrina, eritritol, tagatosa, o mezcla de eritritol y tagatosa, polidextrosa, y/o un agente antiapelmazantes.

Uno o más isómeros de glucósidos de esteviol divulgados en el presente documento pueden estar presentes como edulcorantes no nutritivos en un producto de bebida. En determinadas realizaciones ilustrativas, el producto de bebida incluye una cantidad edulcorante del iso-rebaudiósido A (es decir, el compuesto de fórmula II en la que R¹ es 1-β-D-glucopiranosilo y R² es 2,3-bis(1-β-D-glucopiranosil)-1-β-D-glucopiranosilo). En determinadas realizaciones ilustrativas, el producto de bebida incluye al menos un 0,005 % en peso (por ejemplo, al menos el 0,01 %, al menos el 0,02 %, al menos un 0,03 % en peso) del iso-rebaudiósido A. En determinadas realizaciones ilustrativas, el producto de bebida incluye una cantidad edulcorante del iso-rebaudiósido B (es decir, el compuesto de fórmula II en el que R¹ es hidrógeno y R² es 2,3-bis(1-β-D-glucopiranosil)-1-β-D-glucopiranosilo). En determinadas realizaciones ilustrativas, el producto de bebida incluye al menos un 0,005 % en peso (por ejemplo, al menos el 0,01 %, al menos el 0,02 %, al menos un 0,03 % en peso) del iso-rebaudiósido B.

Los productos de bebida comprenden un líquido acuoso y un compuesto de la fórmula, e incluyen bebidas tales como, por ejemplo, formulaciones líquidas listas para beber, concentrados de bebidas y similares. Las bebidas incluyen, por ejemplo, refrescos carbonatados y no carbonatados, bebidas en dispensadores, bebidas congeladas listas para beber, bebidas carbonatadas congeladas, concentrados líquidos, concentrados en polvo, bebidas de café, infusiones, bebidas lácteas, aguas aromatizadas, aguas mejoradas, zumos de frutas, bebidas de frutas aromatizadas con zumo, bebidas aromatizadas con fruta, bebidas deportivas, bebidas de soja, bebidas de hortalizas, bebidas basadas en granos (por ejemplo, bebidas de malta), bebidas fermentadas (por ejemplo, yogurt y kéfir), bebidas alcohólicas, y las mezclas de cualquiera de ellos. Las fuentes de zumo de frutas ilustrativas incluyen cítricos, por ejemplo, naranja, pomelo, limón y lima, bayas, por ejemplo, arándano rojo, frambuesa, arándano y fresa, manzana, uva, piña, ciruela, pera, melocotón, cereza, mango, y granada. Los productos de bebidas incluyen productos envasados en botellas, latas y cartón y aplicaciones para dispensadores de jarabe.

Los términos "concentrado de bebida" y "jarabe" se utilizan indistintamente en toda esta divulgación. Al menos algunas realizaciones ilustrativas de los concentrados para bebidas contemplados se preparan con un volumen inicial de agua al cual se añaden ingredientes adicionales. Se pueden formar composiciones para bebidas de concentración completa a partir de concentrados para bebidas añadiendo volúmenes adicionales de agua al concentrado. Normalmente, por ejemplo, se pueden preparar bebidas de concentración completa combinando aproximadamente 1 parte de concentrado con entre aproximadamente 3 y aproximadamente 7 partes de agua. En algunas realizaciones ilustrativas, la bebida de concentración completa se prepara combinando 1 parte de concentrado con 5 partes de agua. En determinadas realizaciones ilustrativas, el agua adicional utilizada para formar las bebidas de concentración completa es agua carbonatada. En algunas otras realizaciones, se prepara directamente una bebida de concentración completa sin la formación de un concentrado y posterior dilución.

Uno o más isómeros de glucósidos de esteviol divulgados en el presente documento pueden estar presentes como edulcorantes no nutritivos en un producto alimenticio. Los productos alimenticios comprenden al menos un componente alimenticio, es decir, cualquier material comestible adecuado para uso humano o consumo animal, ya se completa o parcialmente digerible o no lo sea. Los ejemplos no limitativos de componentes alimenticios incluyen proteínas, hidratos de carbono, grasas, vitaminas, minerales, etc. Los productos alimenticios que comprenden un compuesto de fórmula II divulgado en el presente documento incluyen, por ejemplo, copos de avena, cereales, productos horneados (por ejemplo, galletas, galletas saladas, tortas, pasteles, panes, etc.), productos de aperitivo (por ejemplo, patatas fritas a la inglesa, obleas de tortilla, palomitas de maíz, barritas de aperitivos, tortas de arroz, etc.), y otros productos alimenticios basados en grano. Todas las variaciones, alternativas, opciones, etc., analizadas en otra parte de la presente memoria se aplican a las realizaciones de alimentos de la invención.

Debe entenderse que los productos para alimentos o bebidas de acuerdo con la presente divulgación pueden tener cualquiera de numerosas formulaciones o constituciones específicas diferentes. La formulación de un producto para alimentos o bebidas de acuerdo con la presente divulgación puede variar en una determinada extensión, dependiendo de factores tales como del segmento de mercado previsto del producto, sus características nutritivas deseadas, el perfil del aroma y similares. Por ejemplo, será generalmente una opción añadir ingredientes adicionales a la formulación de una realización concreta de un alimento o bebida, incluyendo cualquiera de las formulaciones para alimentos o bebidas descritas en el presente documento. Se pueden añadir edulcorantes adicionales (es decir,

más y/u otro). Los acidulantes, aromatizantes, colorantes, electrolitos, minerales, suplementos nutritivos no minerales, zumos de fruta u otros productos de fruta, saborizantes, agentes enmascarantes y similares, potenciadores del aroma, agentes tamponantes, espesantes, emulsionantes, compuestos comestibles en forma de partículas, agentes antiespumantes, conservantes, carbonación, y mezclas de los mismos se pueden añadir normalmente a cualquiera de dichas formulaciones para variar el sabor, sensación en boca, características nutritivas, funcionalidad, etc. del producto para alimento o bebida. Los ejemplos de ingredientes complementarios nutritivos no minerales son conocidos de los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, antioxidantes y vitaminas, incluyendo las vitaminas A, D, E (tocoferol), C (ácido ascórbico), B (tiamina), B2 (riboflavina), B6, B12, y K, niacina, ácido fólico, biotina, y combinaciones de las mismas. Los suplementos nutritivos no minerales opcionales suelen estar presentes en cantidades generalmente aceptadas por las buenas prácticas de fabricación. Las cantidades ilustrativas están comprendidas entre aproximadamente 1 % y aproximadamente 100 % de la CDR (cantidad diaria recomendada), donde dicha CDR está establecida. En determinadas realizaciones ilustrativas, el ingrediente o ingredientes complementarios nutritivos no minerales están presentes en una cantidad de aproximadamente 5 % a aproximadamente 20 % CDR, cuando está establecida. Los expertos en la materia reconocerán ingredientes adicionales y alternativos adecuados dado el beneficio de esta divulgación.

Algunas bebidas carbonatadas divulgadas en el presente documento son bebidas carbonatadas aromatizadas con cola, que como características suelen incluir agua carbonatada, un compuesto de fórmula II, extracto de nuez de cola y/u otro aromatizante de cola, colorante de caramelo, un acidulante (por ejemplo, ácido fosfórico), y opcionalmente otros ingredientes tales como otros edulcorantes. Algunas otras realizaciones ilustrativas de bebidas carbonatadas divulgadas en el presente documento son bebidas carbonatadas aromatizadas con cítricos (por ejemplo, limón-lima, pomelo, limón, lima, etc.), que como características suelen incluir agua carbonatada, un compuesto de fórmula II, un aroma de cítrico, un acidulante (por ejemplo, ácido cítrico), y opcionalmente otros ingredientes tales como agentes colorantes y/u otros edulcorantes. En determinadas realizaciones ilustrativas, se proporciona un concentrado de bebida que comprende agua, un compuesto de fórmula II, aromatizante de cola, colorante de caramelo, un acidulante (por ejemplo, ácido fosfórico), y opcionalmente otros ingredientes tales como otros edulcorantes. En determinadas realizaciones ilustrativas, se proporciona un concentrado de bebida que comprende agua, un compuesto de fórmula II, un aroma de cítrico, un acidulante (por ejemplo, ácido cítrico), y opcionalmente otros ingredientes tales como agentes colorantes y/u otros edulcorantes.

En al menos algunos ejemplos de los productos de alimentos y bebidas divulgados en el presente documento, se pueden incluir otros edulcorantes o edulcorantes adicionales, por ejemplo, edulcorantes nutritivos o edulcorantes no nutritivos. Los ejemplos no limitantes de endulzantes nutritivos incluyen sacarosa, sacarosa líquida, fructosa, fructosa líquida, glucosa, glucosa líquida, jarabe de glucosa-fructosa de fuentes naturales tales como manzana, achicoria, agave, miel, etc., por ejemplo, jarabe de maíz con alto contenido en fructosa, jarabe de achicoria, jarabe de agave, azúcar invertido, azúcar invertido intermedio, jarabe de arce, jarabe de maple, miel, melazas de azúcar moreno, por ejemplo, melazas de caña y melazas de remolacha azucarera, jarabe de sorgo, y mezclas de cualquiera de ellos. Dichos edulcorantes están presentes al menos en determinadas realizaciones ilustrativas en una cantidad de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente un 20 % en peso del producto de alimento o bebida terminado, tal como de aproximadamente 6 % a aproximadamente un 16 % en peso, dependiendo del nivel deseado de dulzor del producto de alimento o bebida terminado. Los edulcorantes nutritivos pueden estar presentes en las realizaciones del concentrado de bebida en hasta un 60 % en peso del concentrado de bebida.

Los ejemplos no limitantes de potentes edulcorantes no nutritivos que se pueden incluir en los productos de alimentos y bebidas incluyen el rebaudiósido A, esteviósido, otros glucósidos de esteviol, extractos de *Stevia rebaudiana*, Lo Han Guo (LHG), por ejemplo, concentrado de zumo de LHG o LHG en polvo, taumatina, monelina, brazeína, monatina, y las mezclas de cualquiera de ellos. LHG, si se utiliza, puede tener, por ejemplo, un contenido de mogrósido V de aproximadamente 2 a aproximadamente 99 %. En determinadas realizaciones ilustrativas, se proporciona un producto para alimento o bebida que comprende una mezcla de un compuesto de fórmula II y un LHG que tiene un contenido en mogrósido V de al menos un 30 %. En determinadas realizaciones ilustrativas, el LHG de la mezcla tiene un contenido de mogrósido V de aproximadamente un 45 %, más o menos el 5 %. En determinadas realizaciones ilustrativas, una mezcla que comprende LHG y un compuesto de fórmula II proporciona al menos un 10 % del dulzor de un producto de alimento o bebida. En determinadas realizaciones ilustrativas, la mezcla proporciona de aproximadamente 1/3 a aproximadamente 2/3 del dulzor. Otros ejemplos de edulcorantes no nutritivos incluyen sorbitol, manitol, xilitol, glicirriciza, maltitol, maltosa, lactosa, xilosa, arabinosa, isomalt, lactitol, trehalulosa, ribosa, fructooligosacáridos, y las mezclas de cualquiera de ellos. Opcionalmente, el componente edulcorante puede incluir eritritol, tagatosa, una mezcla de eritritol y tagatosa, o polidextrosa. En determinadas realizaciones ilustrativas, se proporciona un producto para alimento o bebida que comprende un compuesto de fórmula II y cualquiera entre eritritol, tagatosa, o una mezcla de eritritol y tagatosa.

Los ejemplos no limitantes de potentes edulcorantes no nutritivos artificiales que se pueden incluir en los productos de alimentos y bebidas incluyen edulcorantes basados en péptidos, por ejemplo, aspartame, neotame, y alitame, y edulcorantes no basados en péptidos, por ejemplo, sacarina sódica, sacarina cálcica, acesulfame (incluyendo pero sin limitación, acesulfame potasio), ciclamato (incluyendo pero sin limitación, ciclamato sódico y/o ciclamato cálcico), neohesperidina dhidrochalcona, sucralosa, y las mezclas de cualquiera de ellos. Los edulcorantes potentes no nutritivos suelen utilizarse en cantidades de miligramos por gramo de alimento o bebida de acuerdo con su poder edulcorante, lo estipulado en cualquier normativa gubernamental en vigor en el país en el que se va a comercializar

el alimento o la bebida, el nivel deseado de dulzor del alimento o la bebida, etc. Las mezclas de cualquiera de los anteriores edulcorantes nutritivos y no nutritivos están incluidos en el alcance de la presente invención. Se incluye en el conocimiento de los expertos en la materia, dado el beneficio de la presente divulgación, seleccionar los edulcorantes adicionales o alternativos adecuados para su uso en diversas realizaciones de los productos para alimento o bebida descritos en el presente documento.

Los expertos en la materia entenderán que, por conveniencia, algunos ingredientes se describen en el presente documento, en algunos casos, haciendo referencia a la forma original del ingrediente que se añade a la formulación del producto para bebida. Dicha forma original puede diferir de la forma en la que el ingrediente se encuentra en el producto del alimento o la bebida terminado. Por tanto, por ejemplo, en determinadas realizaciones ilustrativas de los productos de bebida de cola de la presente divulgación, la sacarosa y la sacarosa líquida normalmente se disolverán y dispersarán de forma sustancialmente homogénea en la bebida. Del mismo modo, otros ingredientes identificados como sólidos, concentrados (por ejemplo, concentrado de zumo), etc. se dispersarán de forma homogénea en la totalidad del producto de alimento o la bebida, en lugar de permanecer en su forma original. Por tanto, la referencia a la forma de un ingrediente para una formulación de producto de alimento o bebida no se debe tomar como una limitación sobre la forma del ingrediente en el producto de alimento o bebida, sino en su lugar, como un medio conveniente para describir el ingrediente en forma de un componente aislado de la formulación del producto.

Los productos de alimento y bebida divulgados en el presente documento se pueden preservar mediante pasteurización. El procedimiento de pasteurización puede incluir, por ejemplo, un tratamiento con temperatura ultra elevada (UHT) y/o un tratamiento de alta temperatura y tiempo corto (HTST). El tratamiento UHT incluye someter el producto de alimento o bebida a elevadas temperaturas, tal como mediante inyección directa de vapor o infusión de vapor, o mediante calentamiento indirecto en un intercambiador de calor. En general, una vez que el producto está pasteurizado, el producto se puede enfriar según lo requiera la composición/configuración del producto particular y/o la aplicación de relleno del envase. Por ejemplo, en una realización, el producto de alimento o bebida se somete a calentamiento de aproximadamente 85 °C a aproximadamente 121 °C durante un corto periodo de tiempo, por ejemplo, de aproximadamente 1 a 60 segundos, a continuación se enfría rápidamente a aproximadamente 2,2 °C +/- 2,8 °C) para productos refrigerados, a temperatura ambiente para productos estables en almacenamiento o productos refrigerados, y hasta aproximadamente 85 °C +/- 5,5 °C para aplicaciones de relleno en caliente para productos estables en almacenamiento. El procedimiento de pasteurización normalmente se realiza en un sistema cerrado, de forma que el producto de alimento o bebida no se expone a la atmósfera u otras posibles fuentes de contaminación. También pueden ser útiles otras técnicas de pasteurización o esterilización, tales como, por ejemplo, envasado aséptico, pasteurización en túnel, o procesamiento en olla. En general, los procedimientos de pasteurización en túnel utilizan temperaturas inferiores durante un tiempo más largo, por ejemplo, aproximadamente 71 °C durante 10-15 minutos, y los procedimientos de olla que utilizan normalmente, por ejemplo, aproximadamente 121 °C durante 3-5 minutos a presión elevada, es decir, a una presión superior a 1 atmósfera (101,3 kPa). Además, se pueden llevar a cabo varios procedimientos de pasteurización, en serie o en paralelo, según lo requiera el producto de alimento o bebida.

Los siguientes ejemplos son realizaciones específicas de la presente invención, pero no se pretende que la limiten.

Ejemplo 1

Síntesis del iso-rebaudiósido A: El rebaudiósido A (0,5 g) disuelto en una solución acuosa de tampón citrato (aproximadamente pH 2,0) se trató durante 10 semanas a aproximadamente 43,3 °C. A continuación, la mezcla de reacción se criodesecó y después se sometió a una columna de gel de sílice (1 x 20 cm) eluyendo con un sistema disolvente de 70 % de acetona, 15 % de trietilamina, y 15 % de agua. Se aislaron dos fracciones, donde la fracción 2 contiene el rebaudiósido A y el iso-rebaudiósido A. Tras concentrar, se aislaron aproximadamente 6 mg de aceite de la fracción 2. El aceite se disolvió en D₂O (0,6 ml) y se dejó a temperatura ambiente durante aproximadamente tres días. Se formaron cristales incoloros transparentes en forma de aguja (1-2 mg) que se aislaron para su análisis.

Ejemplo 2

Análisis del iso-rebaudiósido A:

Una pequeña cantidad del producto cristalino del Ejemplo 1 se analizó mediante RMN de protón y se comparó con el espectro del rebaudiósido A progenitor (D₂O, 400 MHz RMN 1H). Los dos compuestos no eran idénticos, lo que demostró que se había formado un nuevo isómero. Las Figuras 1 y 2 contienen los espectros de RMN de protón de un patrón de rebaudiósido A y del iso-rebaudiósido A, respectivamente. La Figura 3 muestra una superposición de ambos espectros.

Las muestras del patrón de rebaudiósido A y el producto cristalino del Ejemplo 1 se enviaron para su análisis de espectro de masas (IEN modo iones positivos). Ambos compuestos mostraron el peso molecular esperado para el rebaudiósido A de 966,5 uma y patrones de fragmentación similares. Las Figuras 4 y 5 muestran los espectros de masas del rebaudiósido A y del iso-rebaudiósido A, respectivamente.

Los análisis se realizaron en una columna analítica C-18 de fase invertida (Alltima 2,1 x 250 mm) a un caudal de 0,250 ml/min con detección a 210 nm, y detectores evaporativos de dispersión de luz (ELSD). La columna se

preequilibró con agua que contenía un 0,1 % de ácido trifluoroacético (disolvente A). El disolvente B fue acetonitrilo que contenía un 0,1 % de ácido trifluoroacético. Las condiciones del gradiente fueron las siguientes:

Tiempo (min)	% Disolvente A	% Disolvente B
0	100	0
3	100	0
35	5	95
40	5	95
41	0	00
50	0	100

- 5 El producto del Ejemplo 1 se inyectó en agua (5 ml), dando como resultado dos picos en una relación 30:70 cuya línea base no estaba resuelta, eluyéndose el pico inferior a los 22,523 minutos y eluyéndose el pico principal a los 22,680 minutos. Se analizó un patrón del rebaudiósido A en el HPLC en las mismas condiciones, y proporcionó un pico con elución a 22,523 min. El mismo patrón de rebaudiósido A se enriqueció con una pequeña cantidad del producto cristalino del Ejemplo 1, y, cuando se analizó en el HPLC, reveló un área de pico proporcionalmente aumentada a 22,680 minutos.
- 10 El rebaudiósido A y su isómero se resolvieron en la línea base mediante inyección de la mezcla bruta de 10 semanas de reacción del Ejemplo 1 en la columna C-18 de fase invertida, eluyendo con una mezcla isocrática compuesta de acetonitrilo:agua 30:70 con un 0,1 % de ácido fórmico, a un caudal de 0,25 ml/min. También se obtuvo la resolución de la línea de base usando un gradiente de 15 minutos de agua al 95 % con un caudal de 0,25 ml/min. En estas condiciones, el rebaudiósido A se eluyó a aproximadamente 10,9 minutos, y el iso-rebaudiósido A se eluyó a aproximadamente 12,2 minutos (Figura 6). La detección mediante CL/EM (IEN-EM) mostró un ion molecular de 989 (M+23, el aducto del ion sodio) para el pico del iso-rebaudiósido A a 12,2 minutos (Figura 7). Un patrón de rebaudiósido A y el iso-rebaudiósido A aislados se analizaron independientemente por CL/EM. El patrón del rebaudiósido A se eluyó a 11,08 minutos (Figura 8), que corresponde al pico de 10,9 minutos de la Figura 6, y el iso-rebaudiósido A aislado se eluyó a 12,1 minutos (Figura 9), que corresponde al pico de 12,2 minutos de la Figura 6. Tanto el patrón como el producto aislado tuvieron un ion molecular de 989 (Figuras 10 y 11, respectivamente). Se analizó por CL/EM una mezcla de la mezcla de reacción de 10 semanas bruta del Ejemplo 1 enriquecida en el iso-rebaudiósido A aislado. El iso-rebaudiósido A añadido se eluyó con un área aumentada para el pico de 12,2 minutos (Figura 12, comparar con la Figura 6), y el espectro de masas del pico de 12,2 minutos siguió dando un ion molecular de 989 (Figura 13).
- 25 Los datos de los espectros de RMN, HPLC y masas, conjuntamente, confirmaron sin ambigüedad que el nuevo compuesto isorebaudiósido A era un derivado químicamente diferente del rebaudiósido A.

Ejemplo 3

- 30 Síntesis del iso-rebaudiósido A: el rebaudiósido A (5 g) se disolvió en una disolución acuosa de tampón citrato (pH 2, 100 mM, 200 ml) y se calentó a aproximadamente 75 °C. El progreso de la reacción se controló mediante HPLC y cuando la relación entre el iso-rebaudiósido A y el rebaudiósido A fue superior al 75 % (72 horas) la mezcla de reacción se evaporó para dar un sólido cristalino pegajoso. La mezcla de producto se hizo pasar sobre una columna de gel de sílice (10 x 40 cm) eluyendo con acetona:agua:trietilamina (70:15:15) para proporcionar un aceite vítreo (aproximadamente 1,0 g). El análisis mediante HPLC mostró la presencia del rebaudiósido A e iso-rebaudiósido A junto con una gran cantidad de material aparentemente hidrolizado correspondiente a la pérdida de uno o más restos azúcar (por ejemplo, iso-esteviósido, el isorebaudiósido B, iso-rubusósido, iso-esteviolbiósido, iso-esteviolmonósido, etc.).

- 40 El aceite vítreo se disolvió en agua (3 ml) y se separó mediante HPLC semipreparativa (columna semipreparativa C-18 Alltech Alltima, 10 x 250 mm, caudal 5 ml/min, composición de disolvente 30 % de acetonitrilo en agua con ácido fórmico al 0,1 %). Se realizaron varias inyecciones repetidas, 15 en total, y se recogió un pico que eluyó a 13,7 minutos, las fracciones se combinaron y se concentraron para dar un polvo de color blanco (23 mg de iso-rebaudiósido A aislado y purificado). El polvo de color blanco se suspendió primero en agua (2 ml) y se centrifugó. El sólido residual se disolvió en acetonitrilo caliente (200 ml) seguido por la adición de agua (200 ml) y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 5 días, periodo durante el cual fueron apareciendo lentamente cristales en forma de agujas grandes. La mezcla se sometió a cristalografía de rayos x sin perturbar los cristales. Los cristales se separaron de la parte líquida, y las dos muestras se secaron por separado a alto vacío durante tres días. Los cristales secos se utilizaron para obtener los datos de cristalografía de rayos X.

- 50 Se obtuvo una estructura del cristal por rayos X del iso-rebaudiósido A y se elucidó la estructura (véase la Figura 14). Por comparación, se obtuvo una estructura del cristal por rayos X del patrón de rebaudiósido A, y se elucidó la estructura (Figura 15). El análisis mediante cristalografía de rayos X mostró inesperadamente que la estructura tridimensional del iso-rebaudiósido A tenía un doble enlace endocíclico en el anillo de cinco miembros, con un grupo metilo externo, evidenciado mediante la menor longitud del enlace entre los átomos de carbono 15 y 16. La estructura cristalina del rebaudiósido A mostró el doble enlace exocíclico esperado, evidenciado mediante la menor

longitud del enlace entre los átomos de carbono 15 y 17. Véase la Figura 16 para una comparación de ambas longitudes. También sorprendentemente, se demostró que la estructura del iso-rebaudiósido A era un producto de migración de doble enlace catalizada por ácido, y no un producto de reordenación de Wagner-Meerwein como se había previsto según los informes de la bibliografía en los que, en condiciones ácidas y de calor, el esteviol se convertía en isoesteviol.

Ejemplo 4

El iso-rebaudiósido A de la muestra de cristalografía de rayos X de Ejemplo 3 se disolvió en agua a una concentración de 1000 ppm, y un panel de cinco personas descubrió que tenía una intensidad de dulzor similar a la de una disolución de sacarosa al 7 %; por tanto, se estimó que su potencial de dulzor era 70 veces el de la sacarosa.

Ejemplo 5

Se prepararon seis reacciones en condiciones idénticas a las del Ejemplo 3 salvo por que se configuraron temperaturas de reacción de 43 °C, 65 °C, 75 °C, 85 °C, y 90 °C, seguido por la detección mediante HPLC-EM o UV (210 nm). Se observó que, a temperaturas elevadas, se produjo una hidrólisis extensa en la mayor parte del rebaudiósido A, quedando este hidrolizado, que eliminó uno o más restos azúcar, según se determina mediante el análisis por HPLC-EM a medida que transcurre la reacción.

Ejemplo 6

Se realizaron dos estudios sobre la dependencia del pH de la síntesis del iso-rebaudiósido A (Cmpd X) a partir del rebaudiósido A (Reb A). El rebaudiósido A se disolvió a la misma concentración en una serie de soluciones acuosas de ácido cítrico, cada una a pH diferente. Las soluciones se calentaron a 43 °C durante 11 semanas. Se realizó un estudio con soluciones a pH 2,0, 4,0, y 7,0. El otro estudio se realizó con soluciones a pH 2,5, 3,0, y 3,5. Los resultados de ambos estudios se muestran en las Figuras 17 y 18, respectivamente, en las que Reb A significa rebaudiósido A y Cmpd X significa iso-rebaudiósido A. En la Figura 17, la concentración del iso-rebaudiósido A a pH 2 tiene un máximo en la semana 9 y disminuye después. La concentración del rebaudiósido A a pH 2 sigue disminuyendo después de la semana 9. Esto indica que el propio iso-rebaudiósido A se degrada/hidroliza a otros isómeros de glucósidos de esteviol, por ejemplo, el isorebaudiósido B, etc.

Ejemplo 7

Se realizó un estudio sobre la dependencia de la temperatura de la síntesis del iso-rebaudiósido A (Cmpd X) a partir del rebaudiósido A (Reb A). El rebaudiósido A se disolvió a la misma concentración en una serie de soluciones acuosas de ácido cítrico, todo a pH 2,5. Cada una de las soluciones se mantuvo a una temperatura diferente (21 °C, 32 °C, y 43 °C) durante 11 semanas. Los resultados del estudio se muestran en la Figura 19.

Ejemplo 8

El iso-rebaudiósido B (Fórmula VI) se sintetizó y se purificó de acuerdo con el procedimiento definido en el Ejemplo 3, en condiciones de reacción más favorables a la formación del iso-rebaudiósido B. Dichas condiciones de reacción incluyen un tiempo de reacción más prolongado y/o una temperatura de reacción más elevada que las del Ejemplo 3. El iso-rebaudiósido B se purificó mediante HPLC semipreparativa, y el iso-rebaudiósido B purificado se analizó mediante RMN de protón y se comparó con el espectro de RMN de una muestra de referencia del rebaudiósido B (D₂O, 400 MHz RMN 1H). Las Figuras 20 y 21 muestran los espectros de RMN de protón de un patrón de rebaudiósido B y del iso-rebaudiósido B, respectivamente, con secciones ampliadas para mostrar detalles. La Figura 22 muestra una superposición de los dos espectros de RMN. La Figura 22 muestra dos diferencias fácilmente discernibles entre ambos compuestos. El espectro del iso-rebaudiósido B tiene tres grupos metilo singlete, mientras que el espectro del rebaudiósido B solamente tiene dos. Asimismo, en la región alternativa de aproximadamente 5,2 ppm, los dos protones del pico del alquenilo del rebaudiósido B están un poco por debajo del pico del protón único del iso-rebaudiósido B.

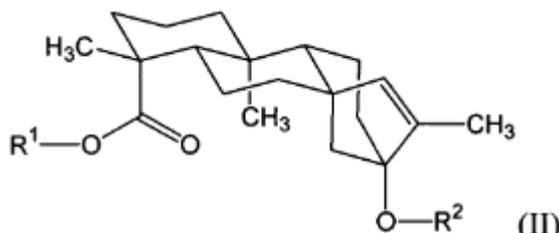
Se realizaron análisis mediante HPLC analítica de fase invertida de acuerdo con el procedimiento definido en el Ejemplo 2. La Figura 23 muestra una superposición de la traza del HPLC de tres muestras: un patrón de rebaudiósido B, el isorebaudiósido B, y una mezcla 1:1 de ambos. La Figura 23 muestra los picos del rebaudiósido B y el iso-rebaudiósido B que no se separan en la línea base en estas condiciones, pero se pueden distinguir. Los espectros de UV-VIS son esencialmente idénticos para ambos compuestos. El iso-rebaudiósido B aislado de la mezcla de reacción parece seguir teniendo aproximadamente un 26 % del rebaudiósido B tras comparar las trazas de los espectros de HPLC y RMN de ambos compuestos.

La invención se ha descrito con referencia a las realizaciones preferidas. Evidentemente, los expertos en la materia deducirán modificaciones y alteraciones tras la lectura y comprensión de la anterior descripción detallada. Se pretende que la presente invención se considere incluyendo dichas modificaciones y alteraciones, en la medida de que estén comprendidas en el alcance de las realizaciones adjuntas o equivalentes de las mismas.

Los aspectos de la invención también se citan en las siguientes cláusulas.

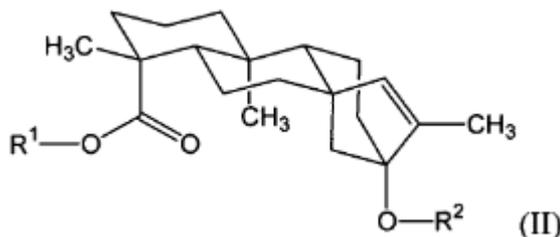
Cláusulas

1. Un compuesto de fórmula II:



- 5 en la que R¹ es hidrógeno, 1-β-D-glucopiranosilo, o 2-(1-β-D-glucopiranosil)-1-β-D-glucopiranosilo, y R² es hidrógeno, 1-β-D-glucopiranosilo, 2-(1-β-D-glucopiranosil)-1-β-D-glucopiranosilo, 2,3-bis(1-β-D-glucopiranosil)-1-β-D-glucopiranosilo, 2-(1-α-L-ramnopiranosil)-1-β-D-glucopiranosilo, 2-(1-β-L-ramnopiranosil)-3-(1-β-D-glucopiranosil)-1-β-D-glucopiranosilo, o 2-(1-β-D-xilopiranosil)-3-(1-β-D-glucopiranosil)-1-β-D-glucopiranosilo.
- 10 2. El compuesto de la cláusula 1, en la que R¹ es 1-β-D-glucopiranosilo y R² es 2,3-bis(1-β-D-glucopiranosil)-1-β-D-glucopiranosil.
- 3. El compuesto de la cláusula 1, en la que R¹ es 1-β-D-glucopiranosilo y R² es 2-(1-β-D-glucopiranosil)-1-β-D-glucopiranosilo.
- 4. El compuesto de la cláusula 1, en la que R¹ es hidrógeno y R² es 2,3-bis(1-β-D-glucopiranosil)-1-β-D-glucopiranosilo.
- 15 5. El compuesto de la cláusula 1, en la que R¹ es hidrógeno y R² es 2-(1-β-D-glucopiranosil)-1-β-D-glucopiranosilo.
- 6. El compuesto de la cláusula 1, en la que R¹ es 1-β-D-glucopiranosilo y R² es 1-β-D-glucopiranosilo.
- 7. El compuesto de la cláusula 1, en la que R¹ es hidrógeno y R² es 1-β-D-glucopiranosilo.
- 8. El compuesto de la cláusula 1, en la que R¹ es 1-β-D-glucopiranosilo y R² es hidrógeno.
- 20 9. El compuesto de la cláusula 1, en la que R¹ es 1-β-D-glucopiranosilo y R² es 2-(1-α-L-ramnopiranosil)-1-β-D-glucopiranosilo.
- 10. El compuesto de la cláusula 1, en la que R¹ es 1-β-D-glucopiranosilo y R² es 2-(1-α-L-ramnopiranosil)-3-(1-β-D-glucopiranosil)-1-β-D-glucopiranosilo.
- 11. El compuesto de la cláusula 1, en el que el compuesto se aísla y purifica.
- 25 12. Un producto para bebida que comprende:

un líquido acuoso, y
un compuesto de fórmula II:



- 30 en la que R¹ es hidrógeno, 1-β-D-glucopiranosilo, o 2-(1-β-D-glucopiranosil)-1-β-D-glucopiranosilo, y R² es hidrógeno, 1-β-D-glucopiranosilo, 2-(1-β-D-glucopiranosil)-1-β-D-glucopiranosilo, 2,3-bis(1-β-D-glucopiranosil)-1-β-D-glucopiranosilo, 2-(1-α-L-ramnopiranosil)-1-β-D-glucopiranosilo, 2-(1-α-L-ramnopiranosil)-3-(1-β-D-glucopiranosil)-1-β-D-glucopiranosilo, o 2-(1-β-D-xylopiranosil)-3-(1-β-D-glucopiranosil)-1-β-D-glucopiranosilo.

13. El producto para bebida de la cláusula 12, en el que el producto para bebida se selecciona del grupo que consiste de bebidas carbonatadas, bebidas no carbonatadas, bebidas en dispensadores, bebidas carbonatadas congeladas, concentrados en polvo, concentrados de bebidas, zumos de frutas, bebidas aromatizadas con zumo de fruta, bebidas aromatizadas con fruta, bebidas deportivas, bebidas energéticas, bebidas de agua reforzada/potenciada, bebidas de soja, bebidas de hortalizas, bebidas basadas en granos, bebidas de malta, bebidas fermentadas, bebidas de yogurt, kéfir, bebidas de café, infusiones, bebidas lácteas, y las mezclas de cualquiera de ellos.

14. El producto para bebida de la cláusula 12, que comprende además un edulcorante seleccionado entre el grupo que consiste de glucósido de esteviol, extractos de *Stevia rebaudiana*, Lo Han Guo, concentrado de zumo de Lo Han Guo, polvo de Lo Han Guo, mogrósido V, taumatina, monelina, brazeína, monatina, eritritol, tagatosa, sacarosa, sacarosa líquida, fructosa, fructosa líquida, glucosa, glucosa líquida, jarabe de maíz con alto contenido en fructosa, azúcar invertido, azúcar invertido intermedio, jarabe de arce, jarabe de maple, miel, jarabe de achicoria, jarabe de agave, melazas de azúcar moreno, melazas de caña, melazas de remolacha azucarera, jarabe de sorgo, sorbitol, manitol, maltitol, xilitol, glicirriciza, maltitol, maltosa, lactosa, xilosa, arabinosa, isomalt, lactitol, trehalulosa, ribosa, fructooligosacáridos, aspartame, neotame, alitame, sacarina sódica, sacarina cálcica, acesulfame potasio, ciclamato sódico, ciclamato cálcico, neohesperidina dhidrochalcona, sucralosa, polidextrosa, y las mezclas de cualquiera de ellos.

15. El producto para bebida de la cláusula 12, en la que R^1 es 1- β -D-glucopiranosilo y R^2 es 2,3-bis(1- β -D-glucopiranosil)1- β -D-glucopiranosilo, en el que el producto de bebida es un concentrado de bebida, y que comprende además el rebaudiósido A.

16. El producto para bebida de la cláusula 12, en la que R^1 es 1- β -D-glucopiranosilo y R^2 es 2,3-bis(1- β -D-glucopiranosil)1- β -D-glucopiranosilo, en el que el producto de bebida es una bebida carbónica, y que comprende además el rebaudiósido A.

17. El producto para bebida de la cláusula 12, que comprende un agente edulcorante del compuesto de fórmula II, en la que R^1 es 1- β -D-glucopiranosilo y R^2 es 2,3-bis(1- β -D-glucopiranosil)-1- β -D-glucopiranosilo.

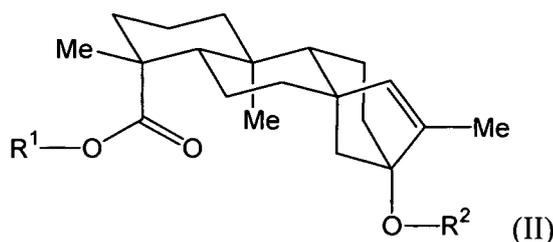
18. El producto para bebida de la cláusula 12, que comprende al menos un 0,005 % en peso del compuesto de fórmula II, en la que R^1 es 1- β -D-glucopiranosilo y R^2 es 2,3-bis(1- β -D-glucopiranosil)-1- β -D-glucopiranosilo.

19. El producto para bebida de la cláusula 12, que comprende un agente edulcorante del compuesto de fórmula II, en la que R^1 es hidrógeno y R^2 es 2,3-bis(1- β -D-glucopiranosil)-1- β -D-glucopiranosilo.

20. El producto para bebida de la cláusula 12, que comprende al menos un 0,005 % en peso del compuesto de fórmula II, en la que R^1 es hidrógeno y R^2 es 2,3-bis(1- β -D-glucopiranosil)-1- β -D-glucopiranosilo.

21. Un producto alimenticio que comprende:

un componente alimenticio, y
un compuesto de fórmula II:



en la que R^1 es hidrógeno, 1- β -D-glucopiranosilo, o 2-(1- β -D-glucopiranosil)-1- β -D-glucopiranosilo, y R^2 es hidrógeno, 1- β -D-glucopiranosilo, 2-(1- β -D-glucopiranosil)-1- β -D-glucopiranosilo, 2,3-bis(1- β -D-glucopiranosil)-1- β -D-glucopiranosilo, 2-(1- α -L-ramnopiranosil)-1- β -D-glucopiranosilo, 2-(1- α -L-ramnopiranosil)3-(1- β -D-glucopiranosil)-1- β -D-glucopiranosilo, o 2-(1- β -D-xilopiranosil)-3-(1- β -D-glucopiranosil)-1- β -D-glucopiranosilo.

22. El producto alimenticio de la cláusula 21, en el que el producto alimenticio se selecciona del grupo que consiste de avena, cereales, productos horneados, galletas, galletas saladas, tortas, pasteles, panes, aperitivos, patatas fritas a la inglesa, obleas de tortilla, palomitas de maíz, barritas de aperitivos, tortas de arroz, y productos alimenticios basados en grano.

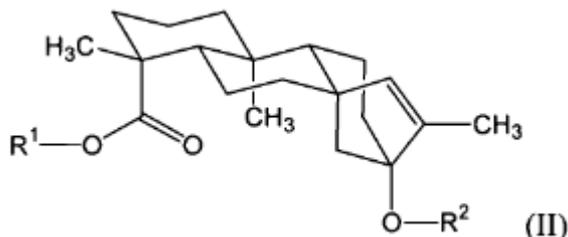
23. El producto alimenticio de la cláusula 21, que comprende además un edulcorante seleccionado entre el grupo que consiste de glucósido de esteviol, extractos de *Stevia rebaudiana*, Lo Han Guo, concentrado de zumo de Lo Han Guo, polvo de Lo Han Guo, mogrósido V, taumatina, monelina, brazeína, monatina, eritritol, tagatosa, sacarosa, sacarosa líquida, fructosa, fructosa líquida, glucosa, glucosa líquida, jarabe de maíz con alto contenido

en fructosa, azúcar invertido, azúcar invertido intermedio, jarabe de arce, jarabe de maple, miel, jarabe de achicoria, jarabe de agave, melazas de azúcar moreno, meladas de caña, melazas de remolacha azucarera, jarabe de sorgo, sorbitol, manitol, maltitol, xilitol, glicirriciza, malitol, maltosa, lactosa, xilosa, arabinosa, isomalt, lactitol, trehalulosa, ribosa, fructooligosacáridos, aspartame, neotame, alitame, sacarina sódica, sacarina cálcica, acesulfame potasio, ciclamato sódico, ciclamato cálcico, neohesperidina dhidrochalcona, sucralosa, polidextrosa, y las mezclas de cualquiera de ellos.

5

24. El producto alimenticio de la cláusula 23, en el que el glucósido de esteviol es el rebaudiósido A, y en la que R^1 es 1- β -D-glucopiranosilo y R^2 es 2,3-bis(1- β -D-glucopiranosil)-1- β -D-glucopiranosilo.

25. Un edulcorante que comprende un compuesto de fórmula II:



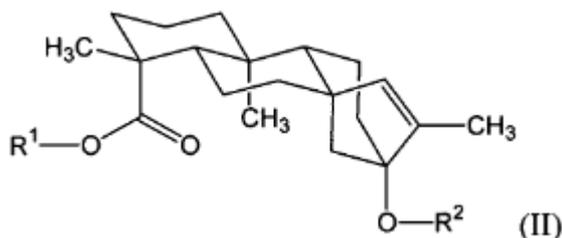
10

en la que R^1 es hidrógeno, 1- β -D-glucopiranosilo, o 2-(1- β -D-glucopiranosil)-1- β -D-glucopiranosilo, y R^2 es hidrógeno, 1- β -D-glucopiranosilo, 2-(1- β -D-glucopiranosil)-1- β -D-glucopiranosilo, 2,3-bis(1- β -D-glucopiranosil)-1- β -D-glucopiranosilo, 2-(1- α -L-ramnopiranosil)-1- β -D-glucopiranosilo, 2-(1- α -L-ramnopiranosil)-3-(1- β -D-glucopiranosil)-1- β -D-glucopiranosilo, o 2-(1- β -D-xilopiranosil)-3-(1- β -D-glucopiranosil)-1- β -D-glucopiranosilo.

15

26. El edulcorante de la cláusula 25, que comprende además al menos uno de una carga, agente de carga, y un agente antiapelmazante.

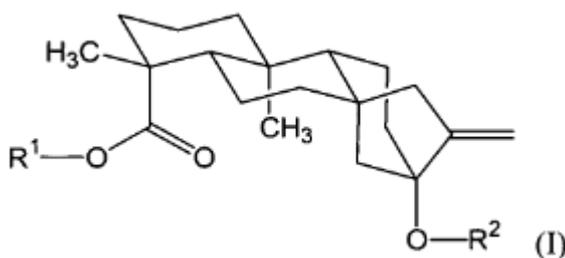
27. Un procedimiento para preparar un compuesto de fórmula II:



20

en la que R^1 es hidrógeno, 1- β -D-glucopiranosilo, o 2-(1- β -D-glucopiranosil)-1- β -D-glucopiranosilo, y R^2 es hidrógeno, 1- β -D-glucopiranosilo, 2-(1- β -D-glucopiranosil)-1- β -D-glucopiranosilo, 2,3-bis(1- β -D-glucopiranosil)-1- β -D-glucopiranosilo, 2-(1- α -L-ramnopiranosil)-1- β -D-glucopiranosilo, 2-(1- α -L-ramnopiranosil)-3-(1- β -D-glucopiranosil)-1- β -D-glucopiranosilo, o 2-(1- β -D-xilopiranosil)-3-(1- β -D-glucopiranosil)-1- β -D-glucopiranosilo, que comprende las etapas de:

proporcionar una solución acuosa ácida que comprenden de un compuesto de fórmula I:



25

en la que R^1 es hidrógeno, 1- β -D-glucopiranosilo, o 2-(1- β -D-glucopiranosil)-1- β -D-glucopiranosilo, y R^2 es hidrógeno, 1- β -D-glucopiranosilo, 2-(1- β -D-glucopiranosil)-1- β -D-glucopiranosilo, 2,3-bis(1- β -D-glucopiranosil)-1- β -D-glucopiranosilo, 2-(1- α -L-ramnopiranosil)-1- β -D-glucopiranosilo, 2-(1- α -L-ramnopiranosil)-3-(1- β -D-glucopiranosil)-1- β -D-glucopiranosilo, o 2-(1- β -D-xilopiranosil)-3-(1- β -D-

glucopiranosil)-1-β-D-glucopiranosilo; y calentar la solución a una temperatura comprendida en un intervalo de 30 °C a 90 °C durante un período de tiempo mayor de dos días.

28. El procedimiento de la cláusula 27, en el que R¹ es 1-β-D-glucopiranosilo y R² es 2,3-bis(1-β-D-glucopiranosil)-1-β-D-glucopiranosilo en el compuesto de fórmula I.

5 **29.** El procedimiento de la cláusula 28, en el que

R¹ es 1-β-D-glucopiranosilo y R² es 2,3-bis(1-β-D-glucopiranosil)-1-β-D-glucopiranosilo en el compuesto de fórmula II; y la solución acuosa ácida tiene un valor del pH comprendido en el intervalo de pH 1,0 - 4,0.

10 **30.** El procedimiento de la cláusula 29, en el que al menos un 1,0 % en peso del compuesto de fórmula I se convierte en el compuesto de fórmula II.

31. El procedimiento de la cláusula 28, en el que

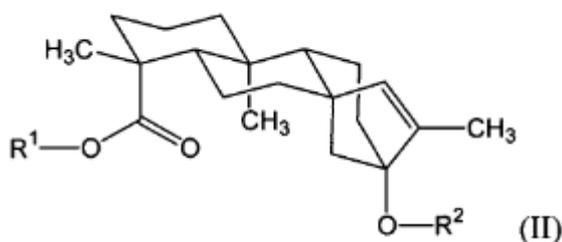
R¹ es hidrógeno y R² es 2,3-bis(1-β-D-glucopiranosil)-1-β-D-glucopiranosilo en el compuesto de fórmula II; y la solución acuosa ácida tiene un valor del pH comprendido en el intervalo de pH 1,0 - 4,0.

15 **32.** El procedimiento de la cláusula 31, en el que al menos un 1,0 % en peso del compuesto de fórmula I se convierte en el compuesto de fórmula II.

33. El procedimiento de la cláusula 27, en el que

R¹ es hidrógeno y R² es 2,3-bis(1-β-D-glucopiranosil)-1-β-D-glucopiranosilo tanto en el compuesto de fórmula I como en el compuesto de fórmula II; y la solución acuosa ácida tiene un valor del pH comprendido en el intervalo de pH 1,0 - 4,0.

20 **34.** El procedimiento de la cláusula 33, en el que al menos un 1,0 % en peso del compuesto de fórmula I se convierte en el compuesto de fórmula II.

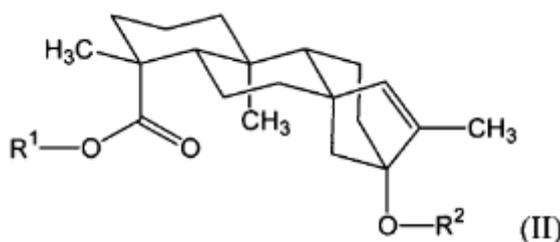


25 **35.** El procedimiento de la cláusula 27, en el que la temperatura está comprendida en el intervalo de 40 °C a 50 °C, y la solución acuosa ácida comprende además al menos uno de ácido fosfórico, ácido clorhídrico, ácido nítrico, ácido sulfúrico, ácido cítrico, ácido málico, ácido tartárico, ácido láctico, y ácido ascórbico, en una cantidad suficiente para conseguir un valor de pH comprendido en el intervalo de pH 1,0 - 4,0.

Entendiendo las cláusulas, la invención se define por las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula II:



5 en la que R¹ es hidrógeno y R² es 2-(1-β-D-glucopiranosilo)-1-β-D-glucopiranosilo, 2,3-bis(1-β-D-glucopiranosilo)-1-β-D-glucopiranosilo, 2-(1-α-L-ramnopiranosilo)-1-β-D-glucopiranosilo, 2-(1-α-L-ramnopiranosilo)-3-(1-β-D-glucopiranosilo)-1-β-D-glucopiranosilo o 2-(1-β-D-xilopiranosilo)-3-(1-β-D-glucopiranosilo)-1-β-D-glucopiranosilo.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R² es 2-(1-β-D-glucopiranosilo)-1-β-D-glucopiranosilo.

3. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R² es 2,3-bis(1-β-D-glucopiranosilo)-1-β-D-glucopiranosilo.

4. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R² es 2-(1-α-L-ramnopiranosilo)-1-β-D-glucopiranosilo.

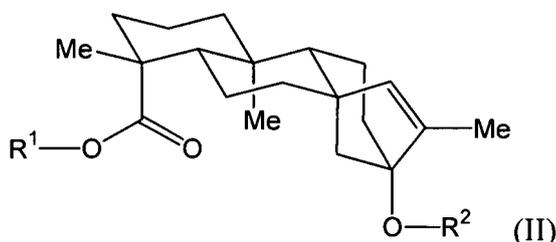
10 5. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R² es 2-(1-α-L-ramnopiranosilo)-3-(1-β-D-glucopiranosilo)-1-β-D-glucopiranosilo.

6. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R² es 2-(1-β-D-xilopiranosilo)-3-(1-β-D-glucopiranosilo)-1-β-D-glucopiranosilo.

7. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el compuesto está aislado y purificado.

15 8. Un producto alimenticio que comprende:

un componente alimenticio, y
un compuesto de fórmula II de acuerdo con la reivindicación 1:



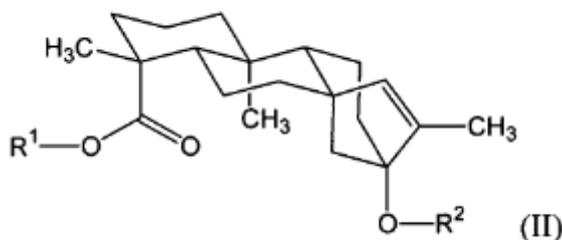
20 en la que R¹ es hidrógeno y R² es 2-(1-β-D-glucopiranosilo)-1-β-D-glucopiranosilo, 2,3-bis(1-β-D-glucopiranosilo)-1-β-D-glucopiranosilo, 2-(1-β-L-ramnopiranosilo)-1-β-D-glucopiranosilo, 2-(1-β-L-ramnopiranosilo)-3-(1-β-D-glucopiranosilo)-1-β-D-glucopiranosilo, o 2-(1-β-D-xilopiranosilo)-3-(1-β-D-glucopiranosilo)-1-β-D-glucopiranosilo.

25 9. El producto alimenticio de la reivindicación 8, en el que el producto alimenticio se selecciona del grupo que consiste en avena, cereales, productos horneados, galletas, galletas saladas, tortas, pasteles, panes, aperitivos, patatas fritas a la inglesa, obleas de tortilla, palomitas de maíz, barritas de aperitivos, tortas de arroz, y productos alimenticios basados en grano.

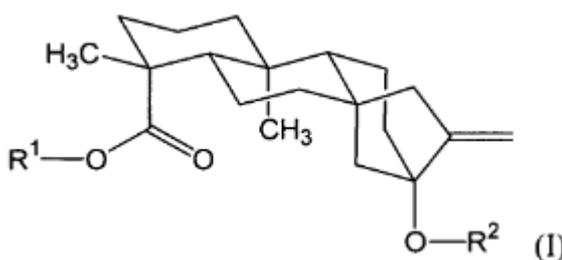
30 10. El producto alimenticio de la reivindicación 8, que comprende además un edulcorante seleccionado del grupo que consiste en glucósido de esteviol, extractos de *Stevia rebaudiana*, Lo Han Guo, concentrado de zumo de Lo Han Guo, Lo Han Guo en polvo, mogrósido V, taumatina, monelina, brazeína, monatina, eritritol, tagatosa, sacarosa, sacarosa líquida, fructosa, fructosa líquida, glucosa, glucosa líquida, jarabe de maíz con alto contenido en fructosa, azúcar invertido, azúcar invertido intermedio, jarabe de arce, jarabe de maple, miel, jarabe de achicoria, jarabe de agave, melazas de azúcar moreno, melazas de caña, melazas de remolacha azucarera, jarabe de sorgo, sorbitol, manitol, maltitol, xilitol, glicirriciza, malitol, maltosa, lactosa, xilosa, arabinosa, isomalt, lactitol, trehalulosa, ribosa, fructooligosacáridos, aspartame, neotame, alitame, sacarina sódica, sacarina cálcica, acesulfame potasio, ciclamato sódico, ciclamato cálcico, neohesperidina dihidrochalcona, sucralosa, polidextrosa, y las mezclas de cualquiera de ellos.

11. El producto alimenticio de la reivindicación 8, en el que el glucósido de esteviol es rebaudiósido D.

12. Un procedimiento de preparación de un compuesto de fórmula II de acuerdo con la reivindicación 1:



- 5 en la que R^1 es hidrógeno y R^2 es 2-(1- β -D-glucopiranosilo)-1- β -D-glucopiranosilo, 2,3-bis(1- β -D-glucopiranosilo)-1- β -D-glucopiranosilo, 2-(1- α -L-ramnopiranosil)-1- β -D-glucopiranosilo, 2-(1- α -L-ramnopiranosil)-3-(1- β -D-glucopiranosil)-1- β -D-glucopiranosilo, o 2-(1- β -D-xilopiranosil)-3-(1- β -D-glucopiranosil)-1- β -D-glucopiranosilo, que comprende las etapas de:
proporcionar una solución acuosa ácida que compren de un compuesto de fórmula I:



- 10 en la que R^1 es hidrógeno, 1- β -D-glucopiranosilo, o 2-(1- β -D-glucopiranosil)-1- β -D-glucopiranosilo, y R^2 es hidrógeno, 1- β -D-glucopiranosilo, 2-(1- β -D-glucopiranosil)-1- β -D-glucopiranosilo, 2,3-bis(1- β -D-glucopiranosil)-1- β -D-glucopiranosilo, 2-(1- α -L-ramnopiranosil)-1- β -D-glucopiranosilo, 2-(1- α -L-ramnopiranosil)-3-(1- β -D-glucopiranosil)-1- β -D-glucopiranosilo, o 2-(1- β -D-xylopiranosil)-3-(1- β -D-glucopiranosil)-1- β -D-glucopiranosilo; y calentar la solución a una temperatura comprendida en un intervalo de 30 °C a 90 °C durante un período de tiempo mayor de dos días.
- 15 13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que la temperatura está comprendida en el intervalo de 40 °C a 50 °C, y la solución acuosa ácida comprende además al menos uno de ácido fosfórico, ácido clorhídrico, ácido nítrico, ácido sulfúrico, ácido cítrico, ácido málico, ácido tartárico, ácido láctico, y ácido ascórbico, en una cantidad suficiente para conseguir un valor de pH comprendido en el intervalo de pH 1,0 - 4,0.
14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que la solución acuosa ácida tiene un valor de pH comprendido en el intervalo de pH 2,0 - 2,5.
- 20 15. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que el periodo de tiempo está comprendido entre 2 días y 11 semanas y al menos un 1,0 % en peso del compuesto de fórmula I se convierte en el compuesto de fórmula II.

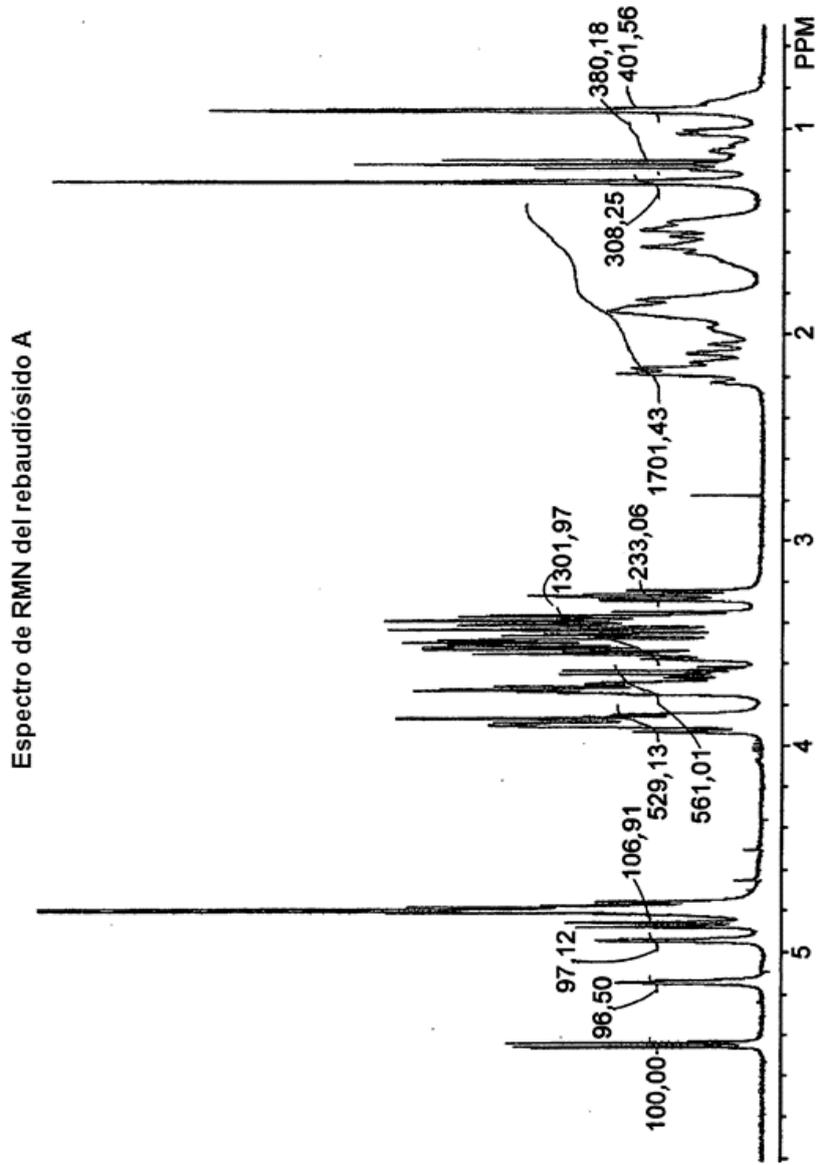


FIG. 1

Espectro de RMN del iso-rebaudiósido A

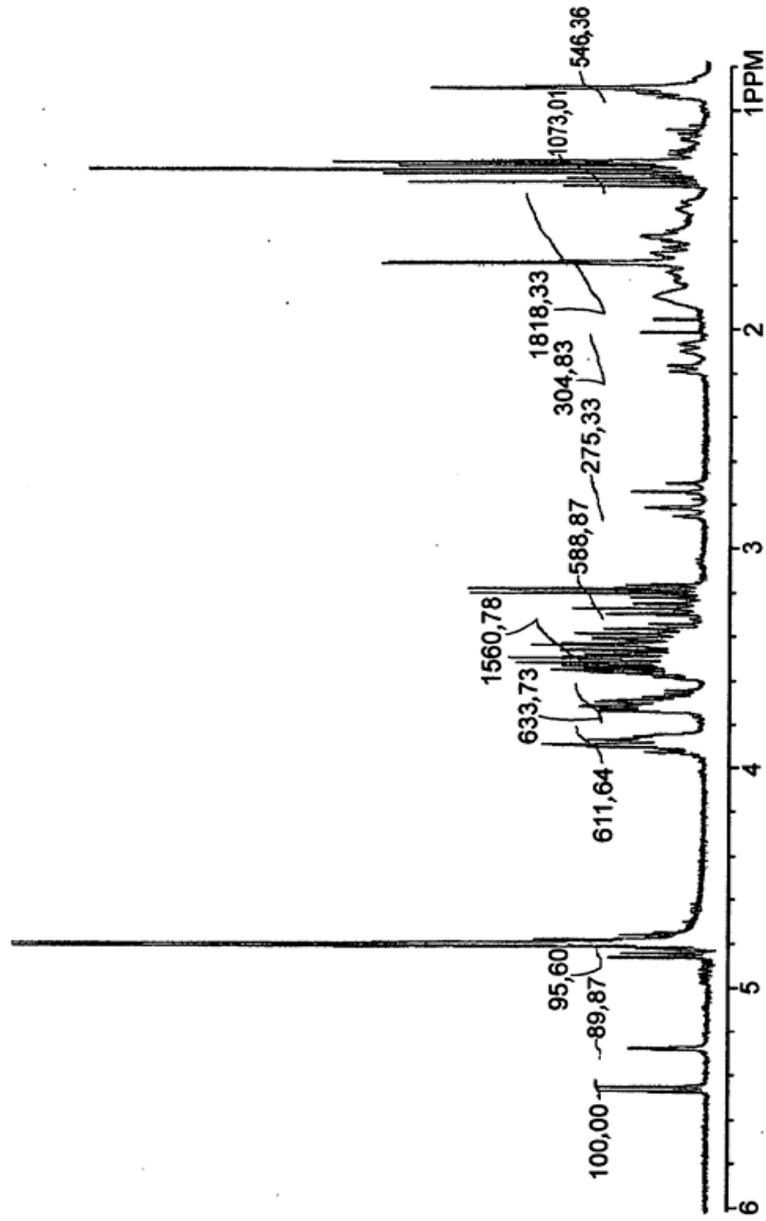


FIG. 2

Superposición del espectro de RMN del isorebaudiósido A sobre el espectro de RMN del rebaudiósido A

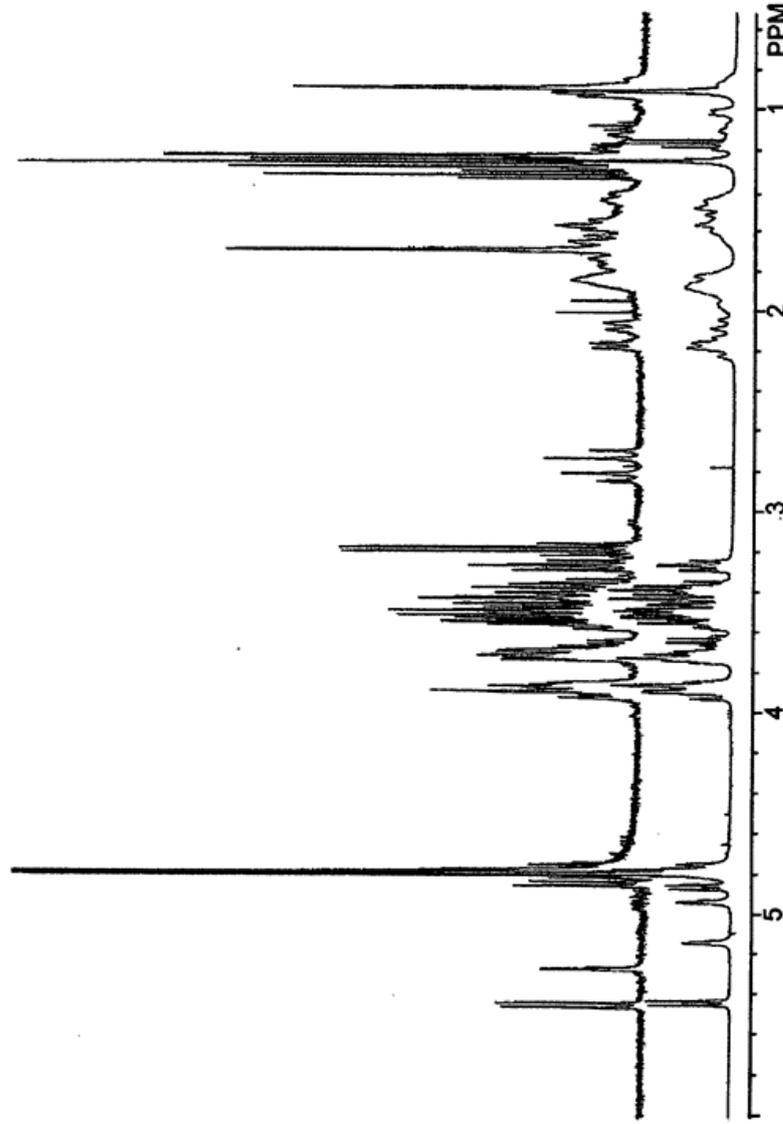


FIG. 3

Espectro de masas IEN del rebaudiosido A.

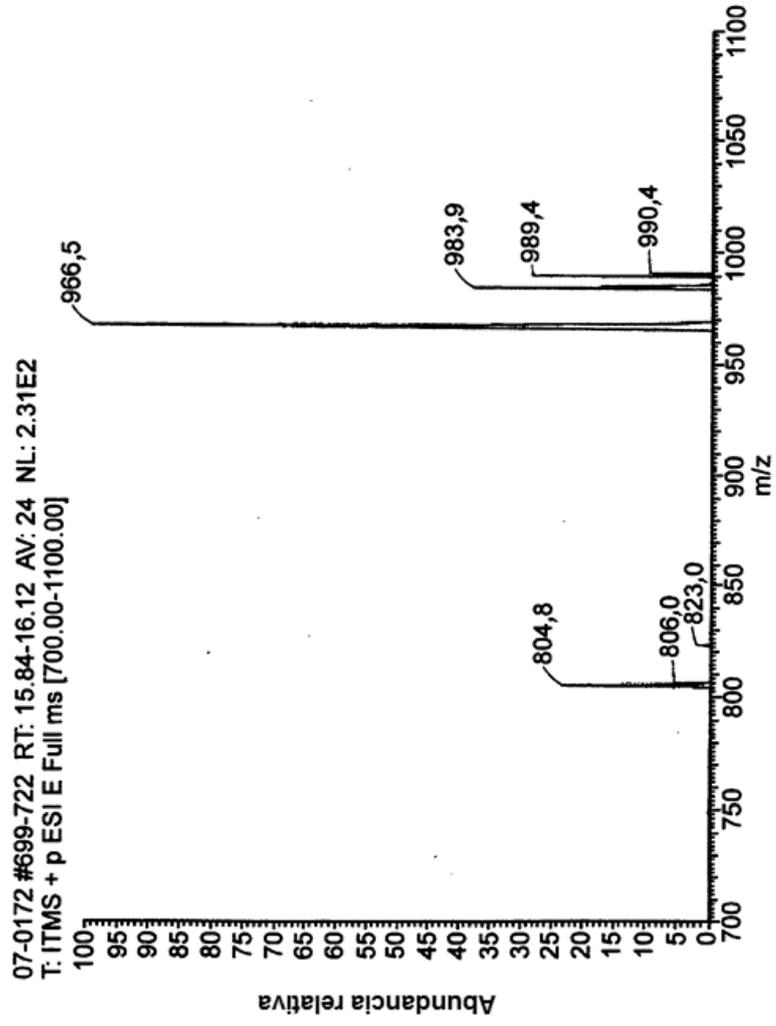


FIG. 4

Espectro de masas IEN del iso-rebaudiósido A.

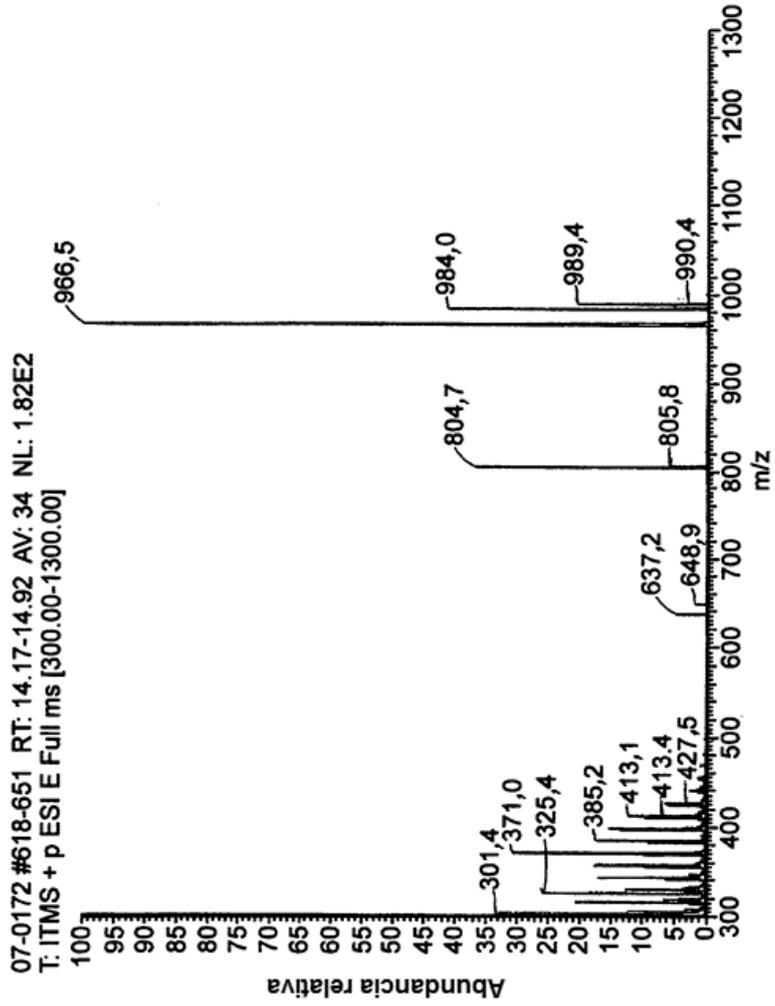


FIG. 5

HPLC de una mezcla de reacción de 10 semanas que contiene rebaudiósido A e iso-rebaudiósido A.
Traza superior detectada para una absorción de UV de 210 nm
Traza inferior detectada con ion extraído a 989 (M+23)

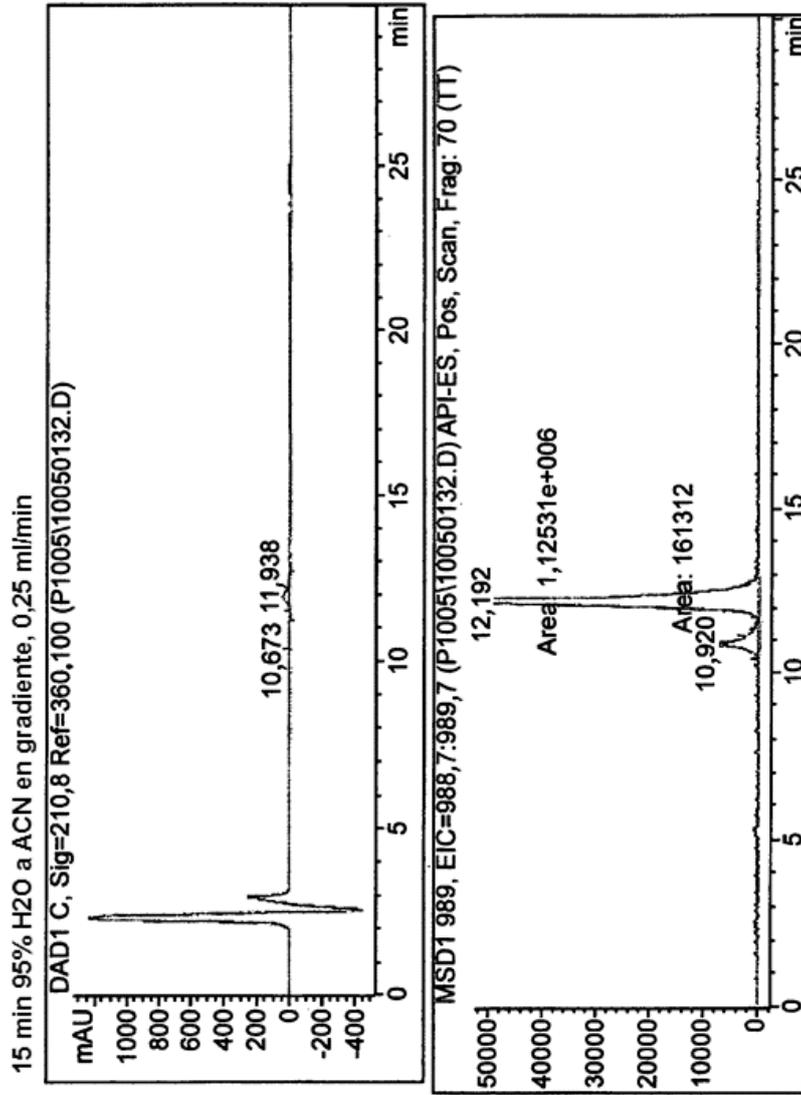


FIG. 6

Espectro de masas IEN del iso-rebaudiósido A a 12,192 minutos

Espectro de masas máximo del pico 12,192 minutos de 10050132.D

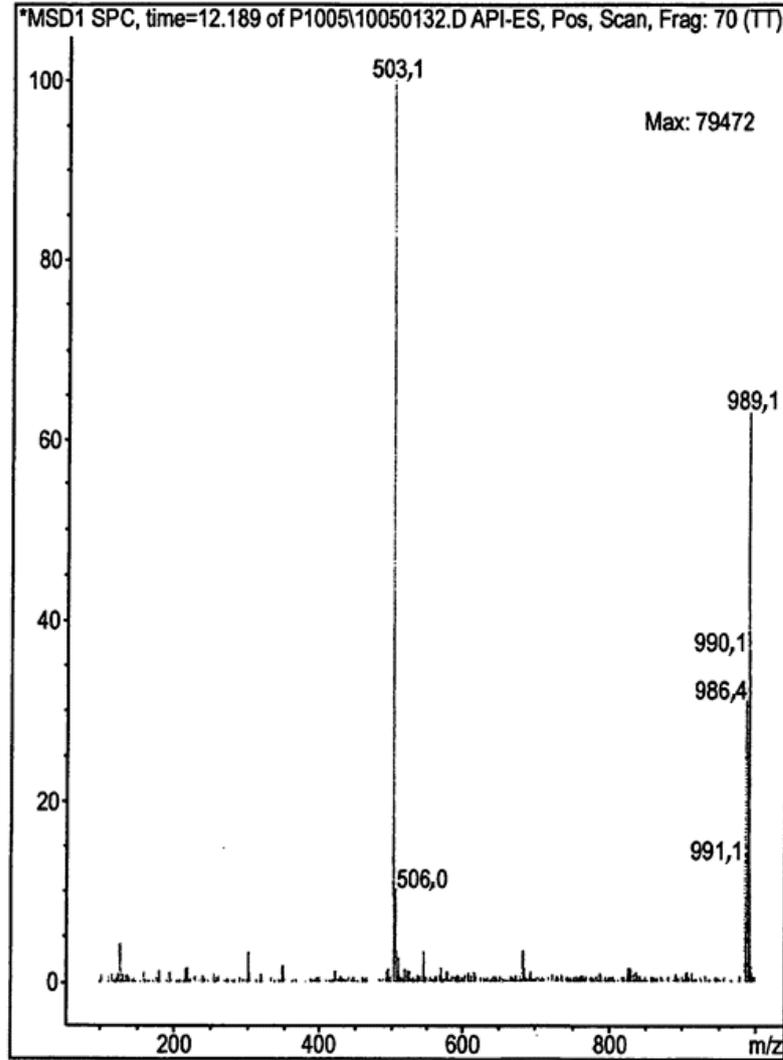


FIG. 7

HPLC del patrón de rebaudiósido A
Traza superior detectada para una absorción de UV de 210 nm
Traza inferior detectada con ion extraído a 989 (M+23)

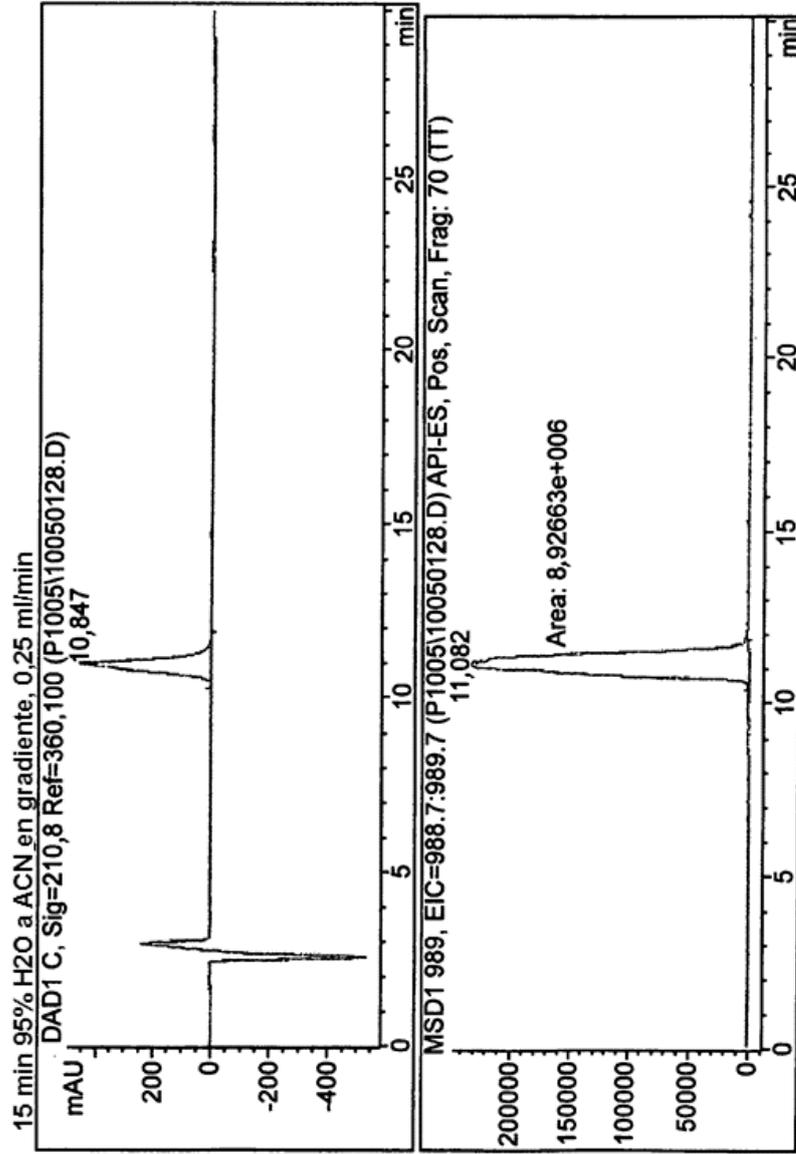


FIG. 8

HPLC del iso-rebaudiósido A aislado
Traza superior detectada para una absorción de UV de 210 nm
Traza inferior detectada con ion extraído a 989 (M+23)

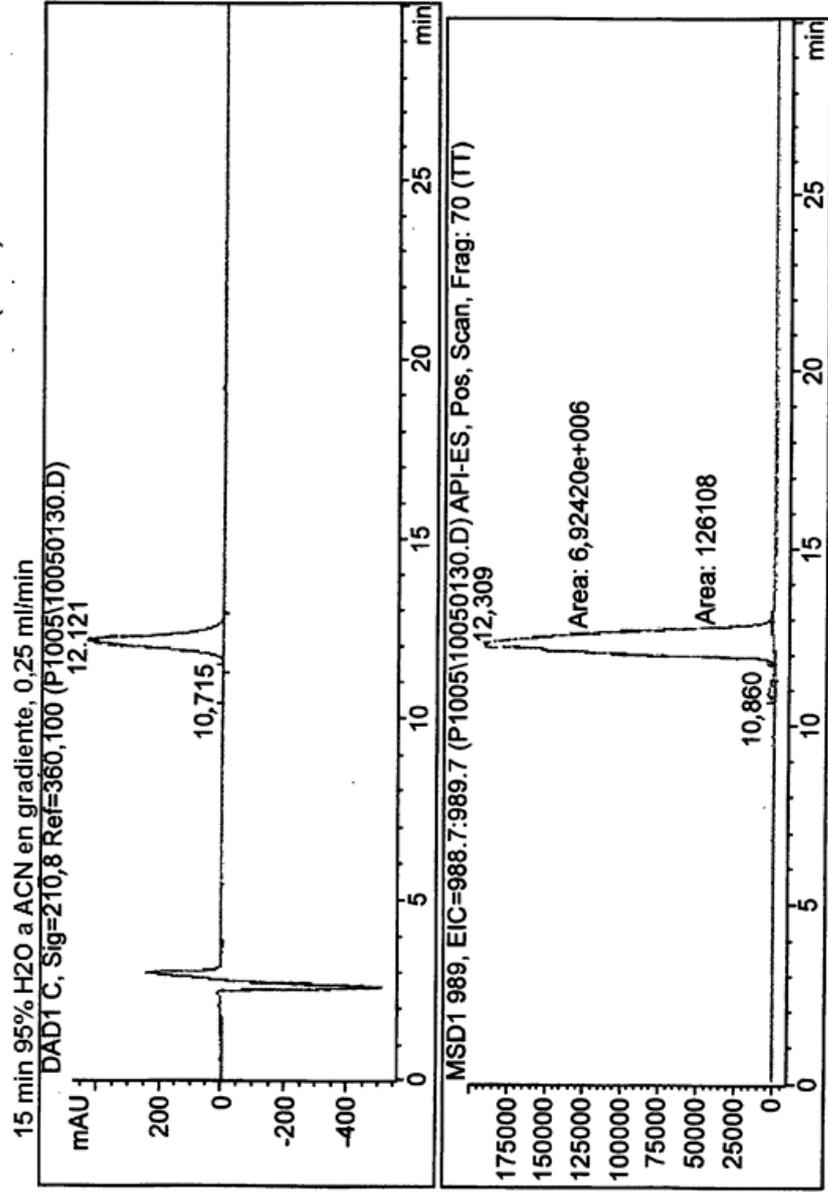


FIG. 9

Espectro de masas IEN del patrón del pico de rebaudiósido A

Espectro de masas máximo del pico 11,082 de 10050128.D

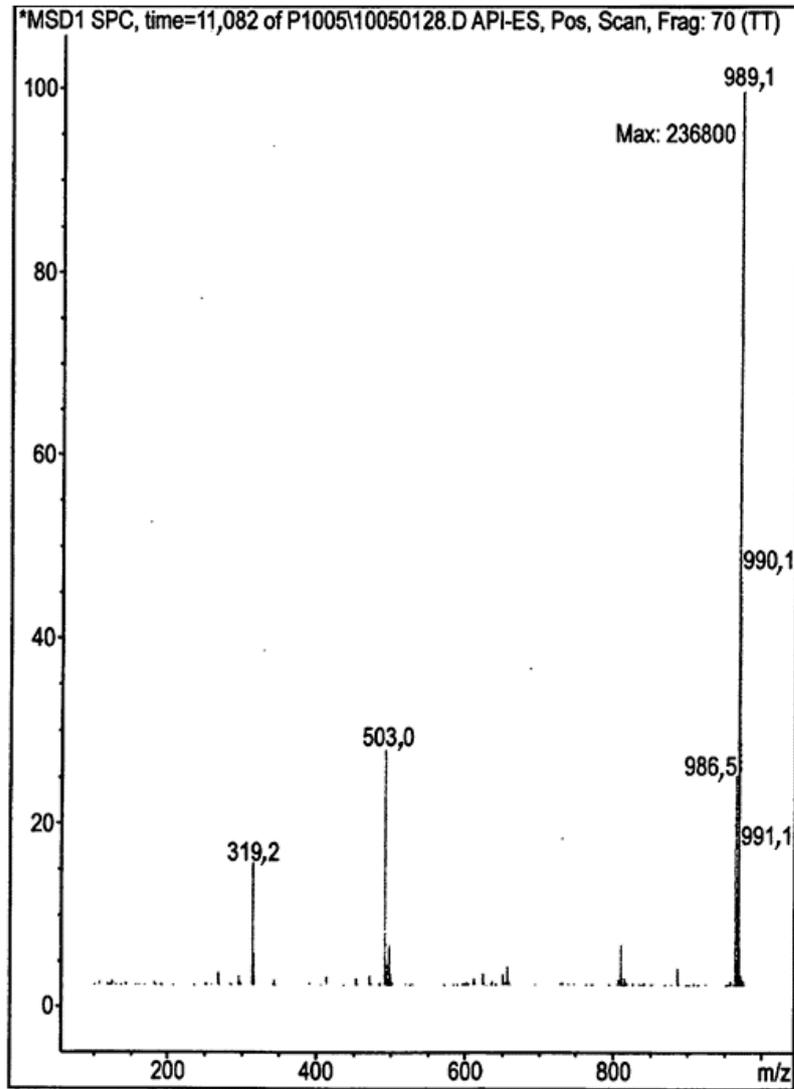


FIG. 10

Espectro de masas IEN del pico del iso-rebaudiósido aislado

Espectro de masas máximo del pico 12,239 minutos de 10050130.D

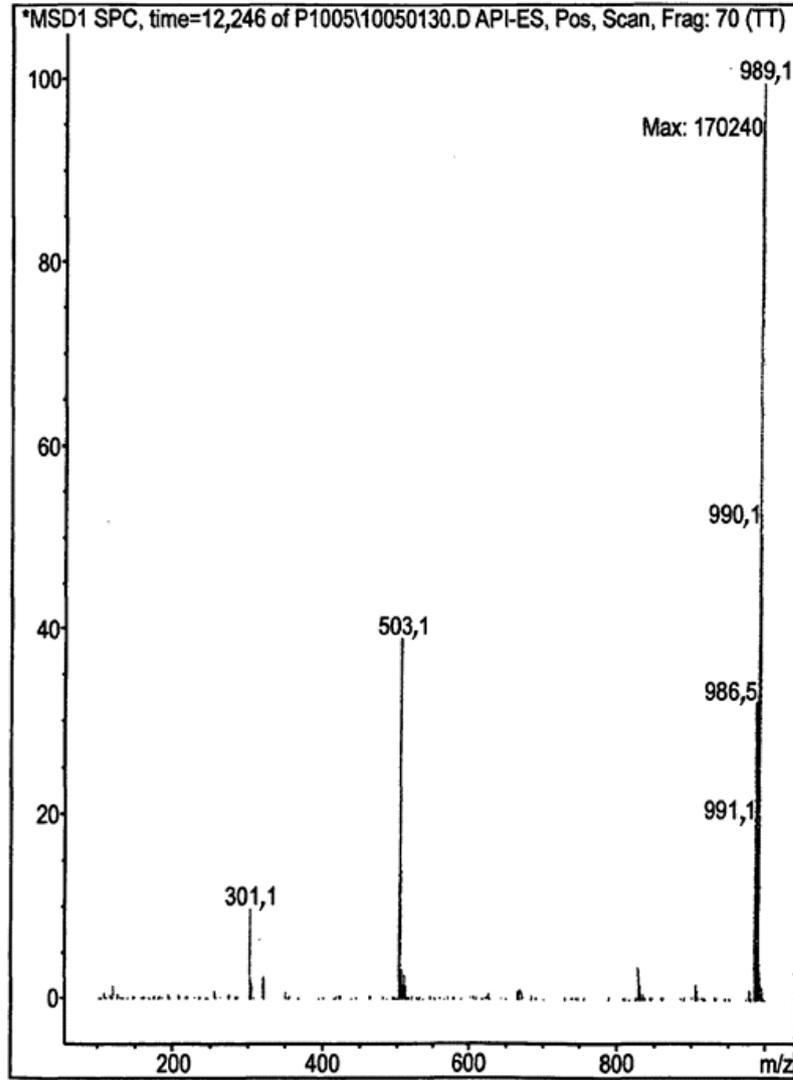


FIG. 11

HPLC de una mezcla de reacción de 10 semanas enriquecida con el iso-rebaudiósido A aislado
Traza superior detectada para una absorción de UV de 210 nm
Traza inferior detectada con ion extraído a 989 (M+23)

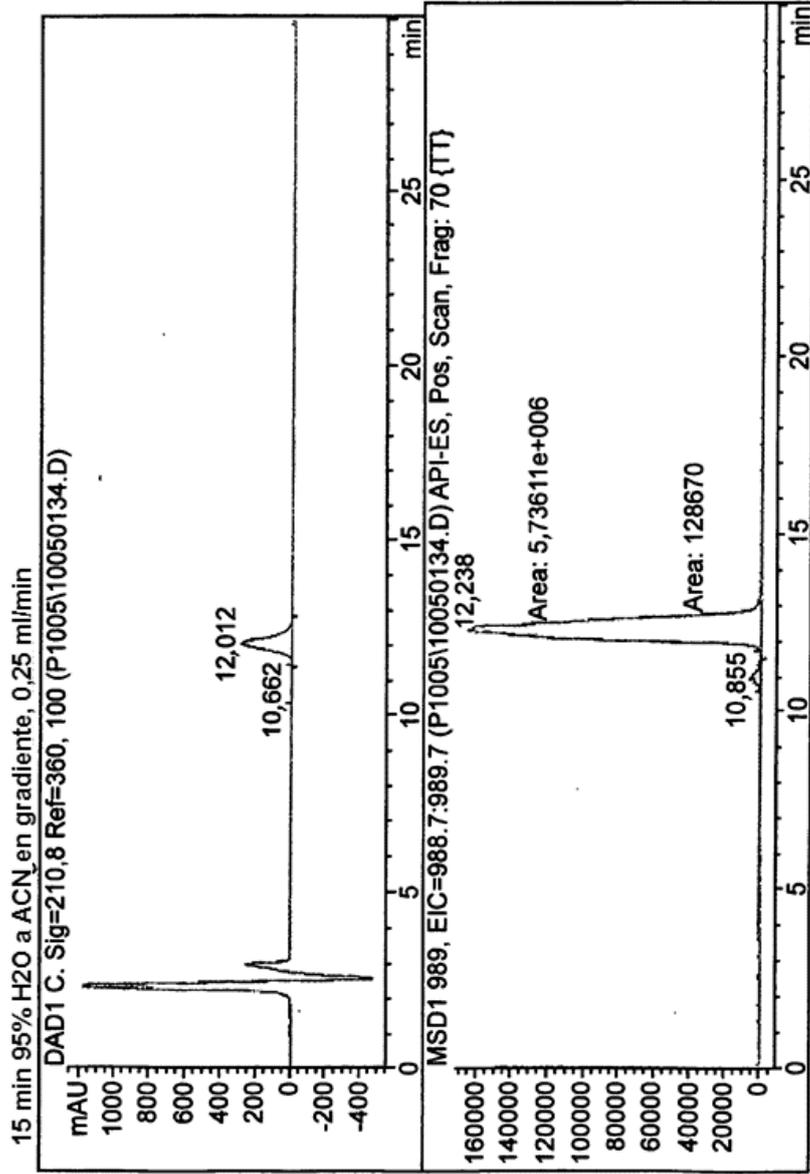


FIG. 12

Espectro de masas IEN del patrón del pico de iso-rebaudiósido A a 12,232 minutos

Espectro de masas máximo del pico 12,238 minutos de 10050134.D

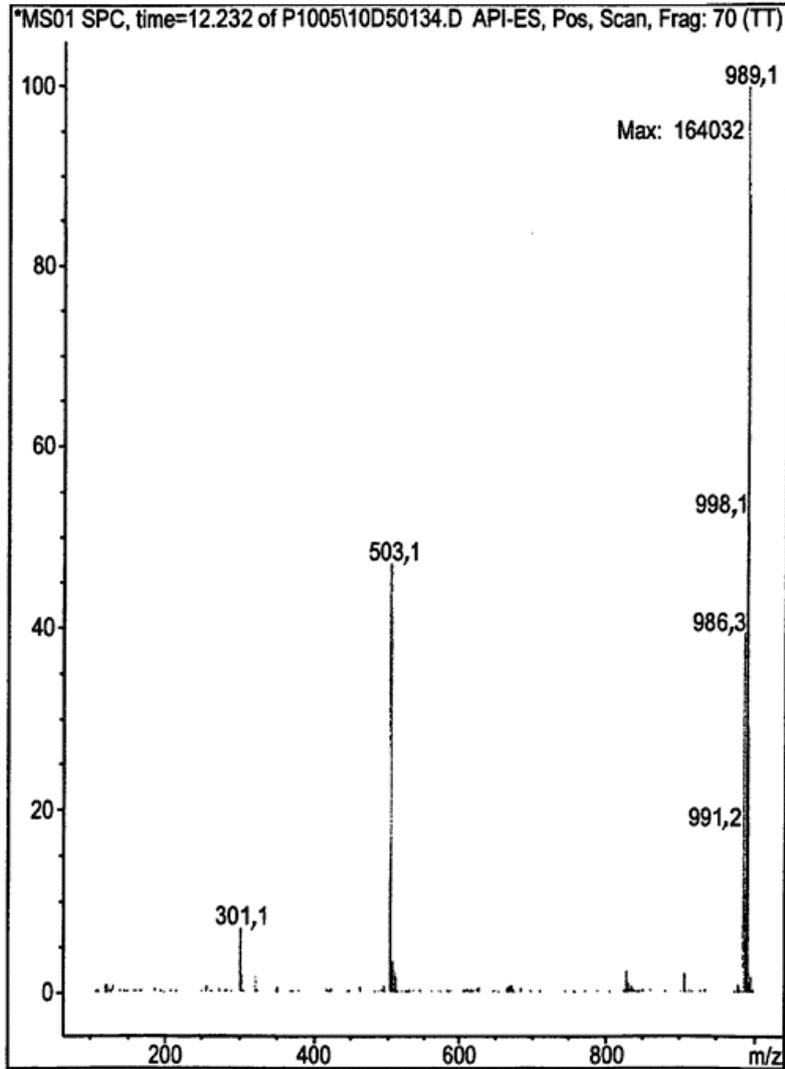


FIG. 13

Estructura de cristal del iso-rebaudiósido A según rayos X

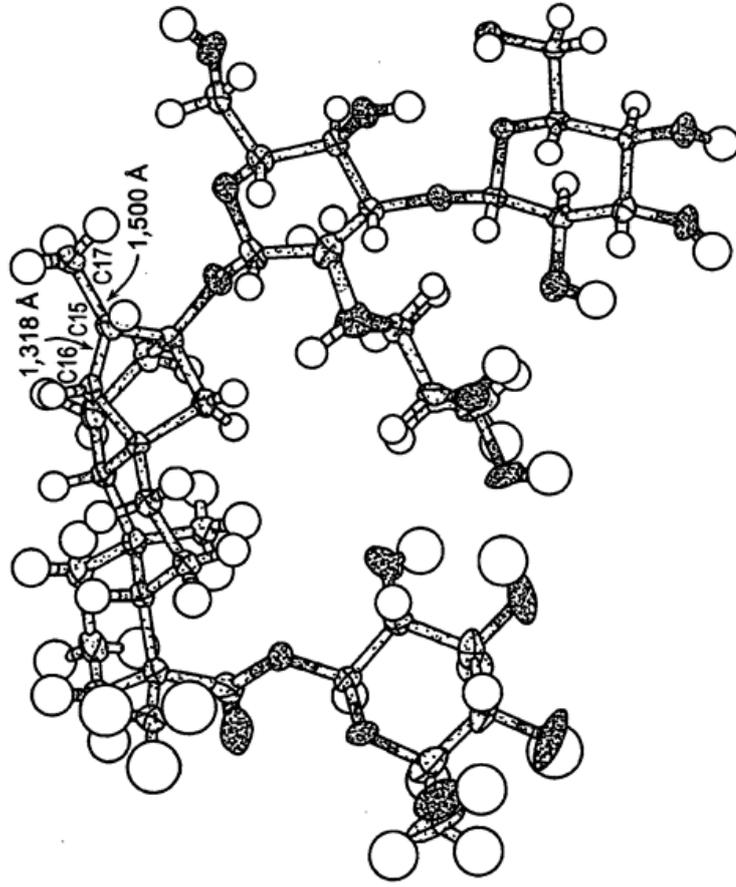


FIG. 14

Estructura de cristal del patrón de rebaudiósido A según rayos X

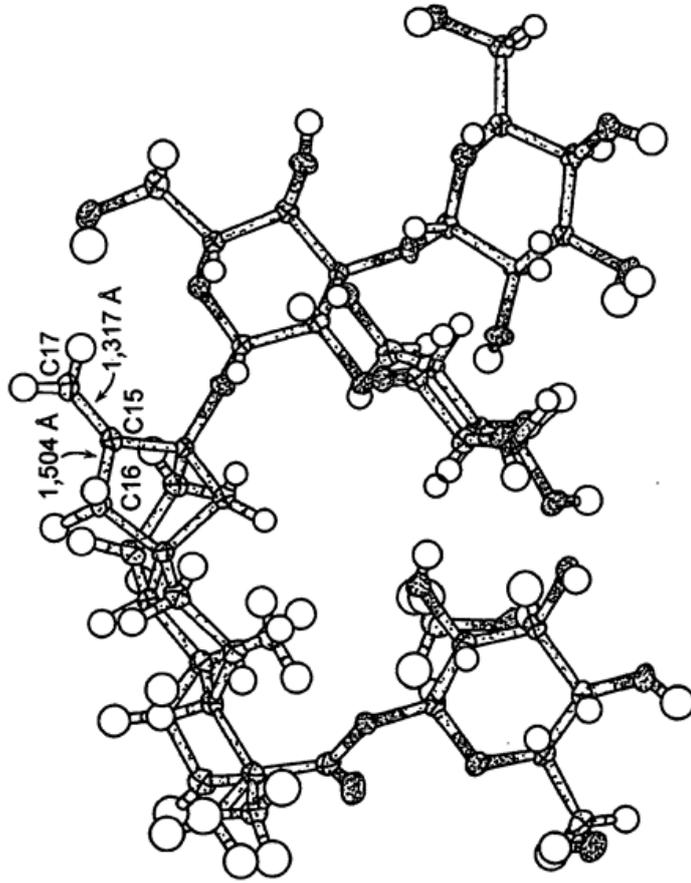


FIG. 15

Estructuras del rebaudiósido A y el iso-rebaudiósido A con numeración de los átomos de carbono y longitudes de enlace relevantes

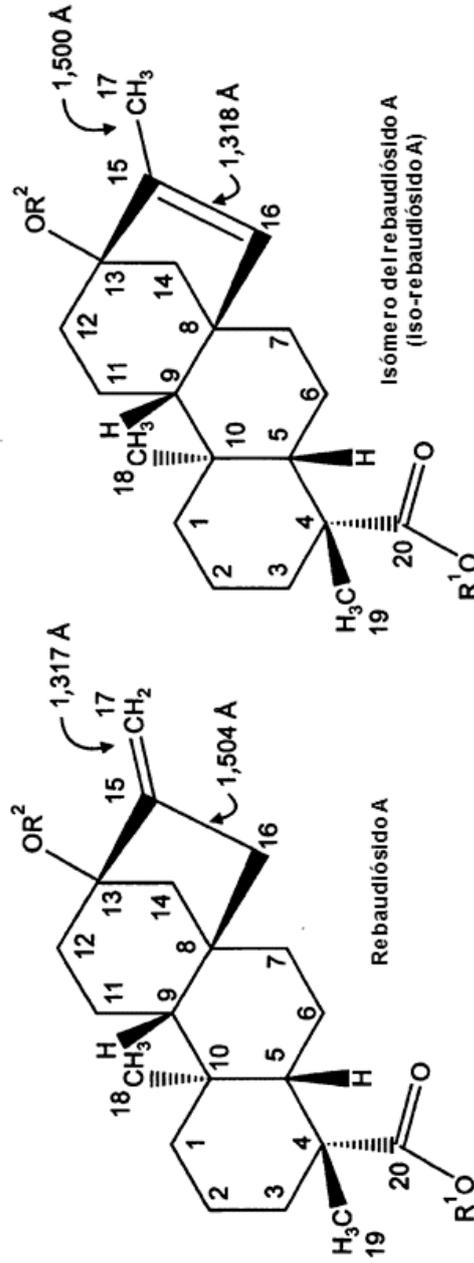


FIG. 16

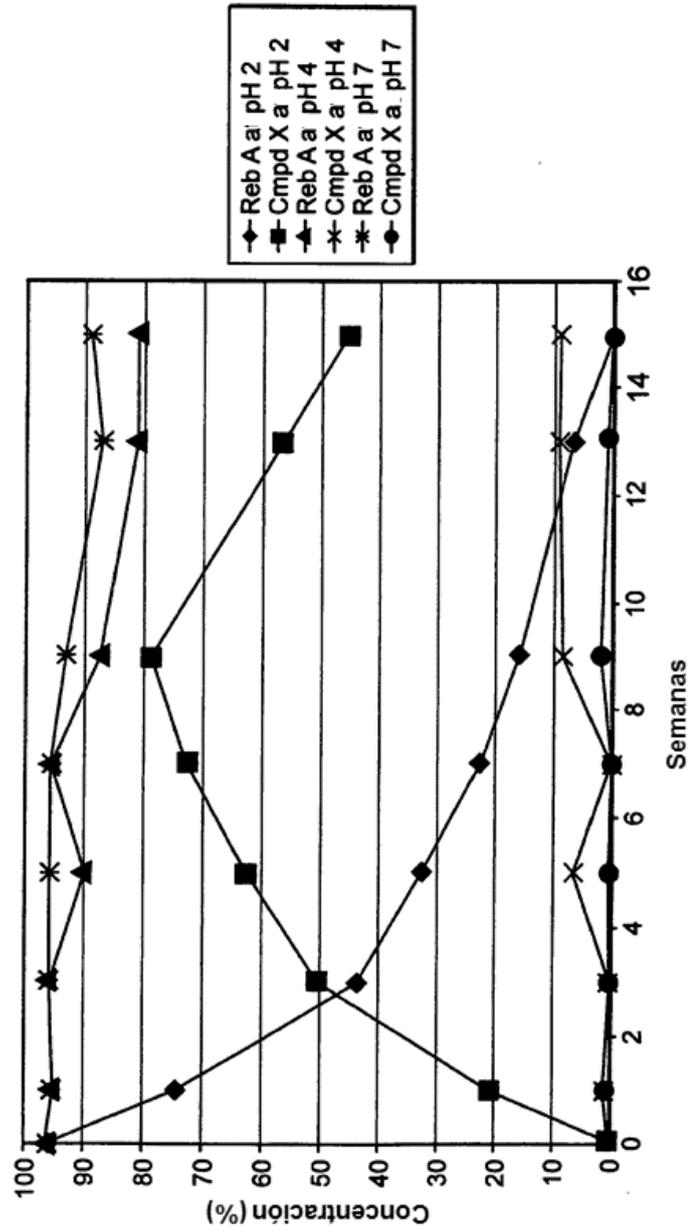


FIG. 17

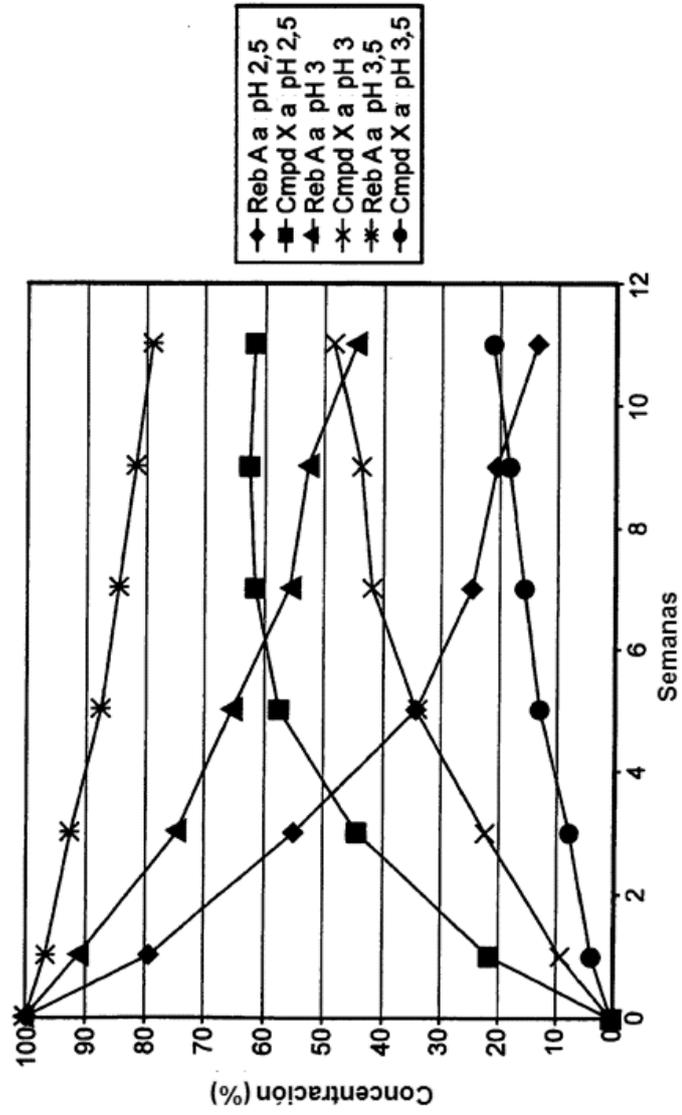


FIG. 18

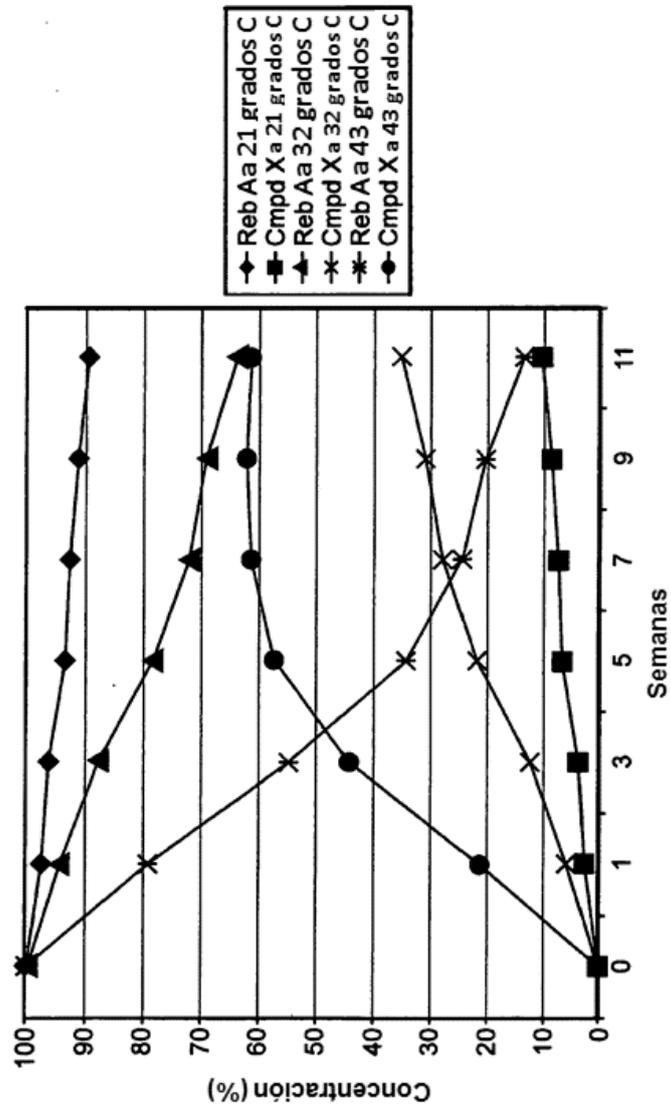
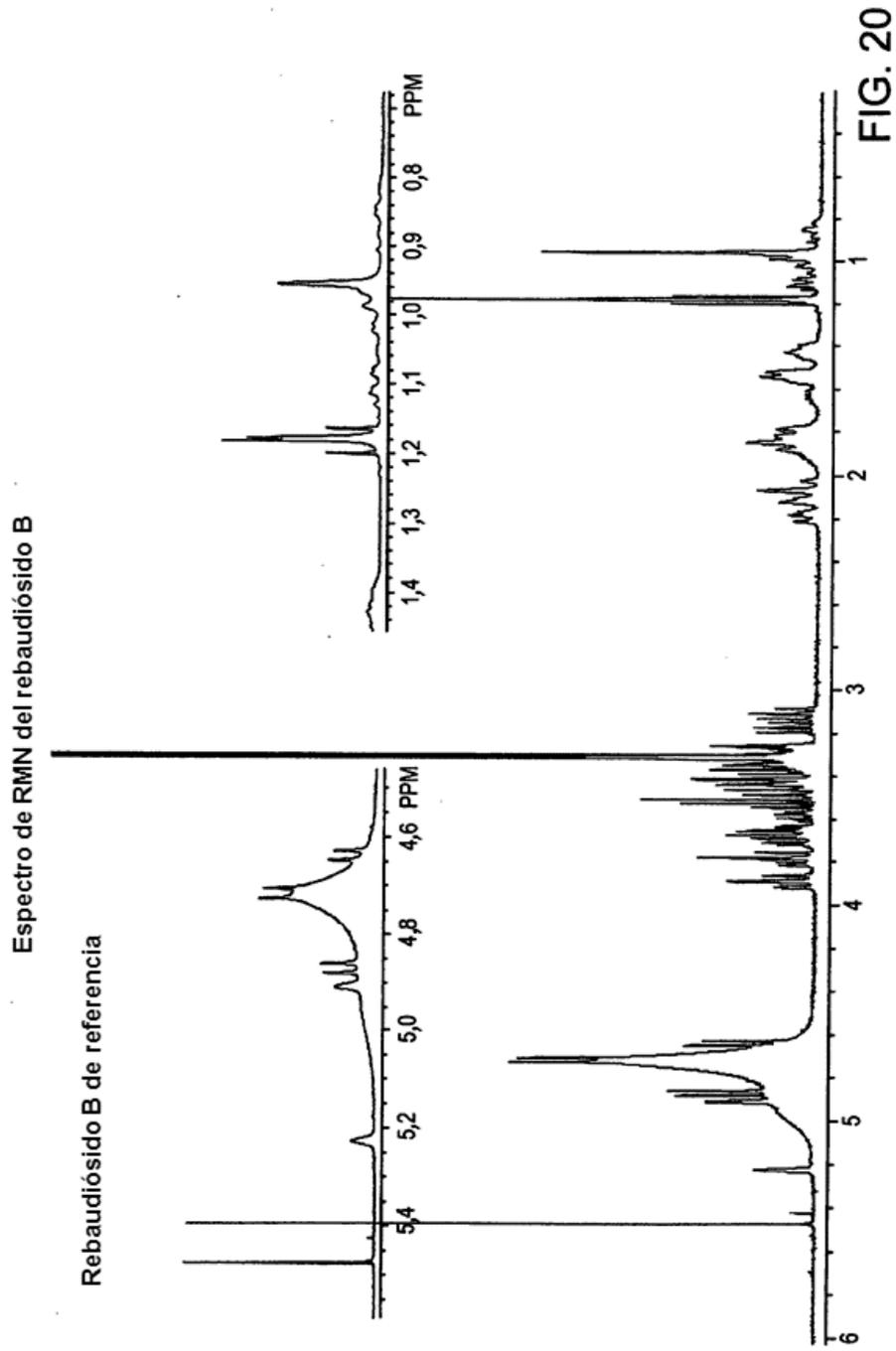
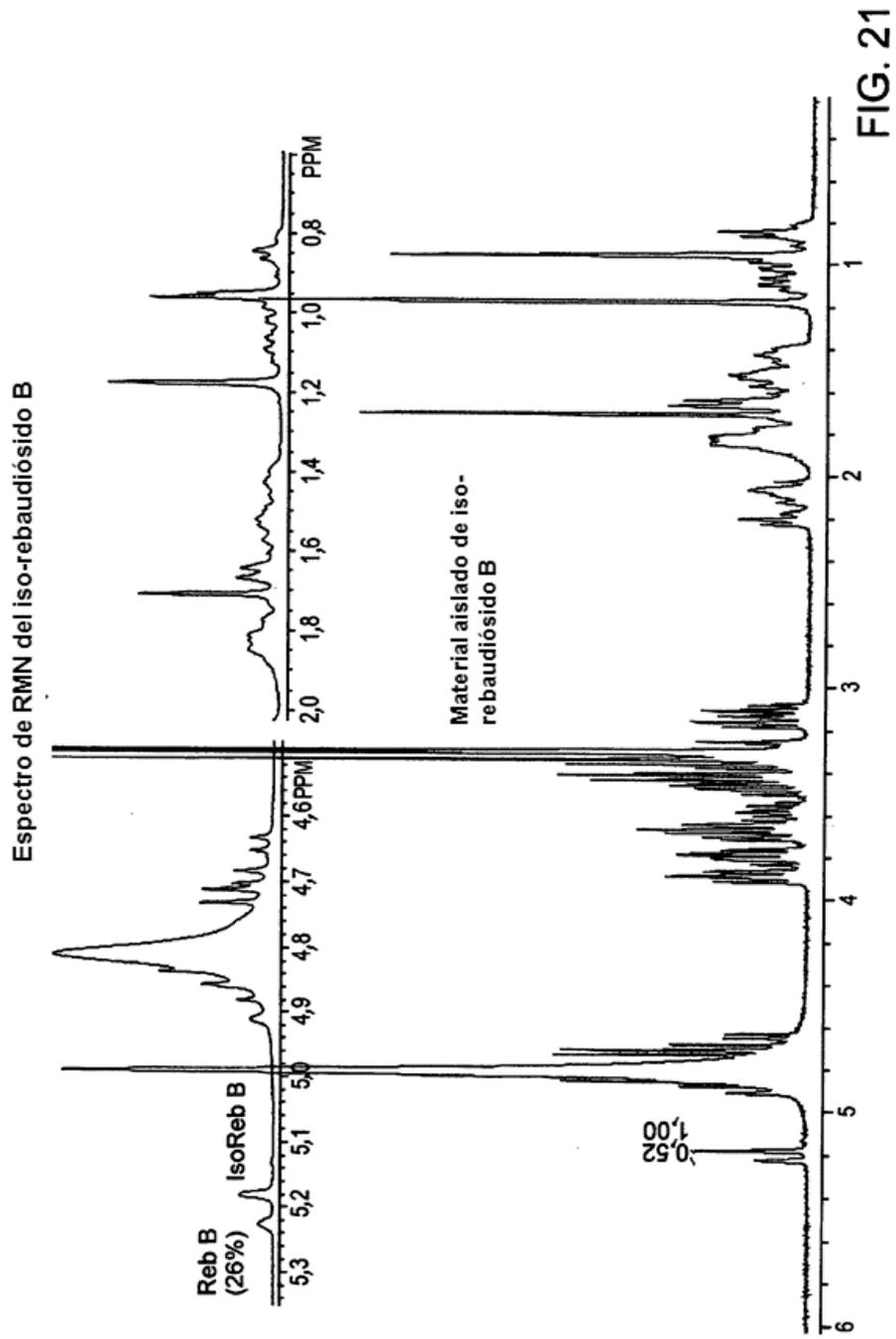


FIG. 19





Superposición del espectro de RMN de proton del isorebaudiósido B sobre el espectro de RMN del rebaudiósido B

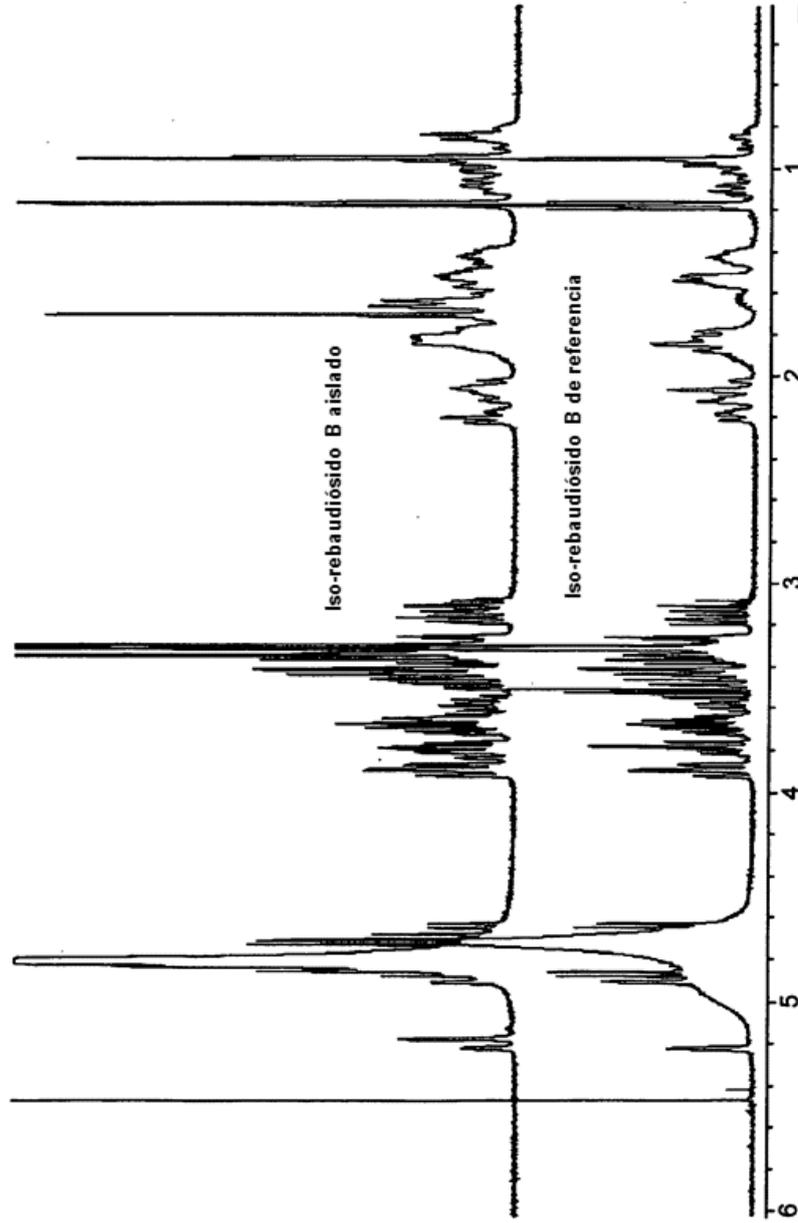


FIG. 22

Superposición de las trazas de HPLC
para el rebaudiósido B, iso-
rebaudiósido B, y mezcla 1:1 de ambos
Cromatograma actual (s)

FIG. 23

